



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOSÉ LOUZINHO LOPES

**DERIVADOS DA BOTRIOSFERANA
REGIOSSELETIVAMENTE SULFATADOS COM POTENCIAL
AÇÃO ANTIVIRAL**

Londrina
2019

JOSÉ LOUZINHO LOPES

**DERIVADOS DA BOTRIOSFERANA
REGIOSSELETIVAMENTE SULFATADOS COM POTENCIAL
AÇÃO ANTIVIRAL**

Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do título de mestre ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Orsato

Londrina
2019

JOSÉ LOUZINHO LOPES

**DERIVADOS DA BOTRIOSFERANA REGIOSSELETIVAMENTE
SULFATADOS COM POTENCIAL AÇÃO ANTIVIRAL**

Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do título de mestre ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Orsato
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Prof. Dr. Doumit Camilios Neto
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço, ao meu orientador Alexandre Orsato, pelo suporte, ensinamento, correções, incentivos e pela oportunidade que me concedeu para cursar o mestrado em química.

À professora Aneli de Melo Barbosa Dekker por oferecer conhecimentos e recursos que foram de suma importância para realização deste trabalho e a sua aluna Tatiane Mazziero

Às professoras Lígia Carla Faccin Galhardi e Rosa Elisa Carvalho Linhares, do Laboratório de virologia do CCB/UEL, pelas análises biológicas dos derivados de beta-glucana.

Às professoras Carla Cristina Perez e Marcelle de Lima Ferreira Bispo pelos ensinamentos e sugestões.

Aos docentes Fernando César de Macedo Júnior, Anna Paola Butera, Luiz Henrique Dall'Antonia e Maria Josefa dos Santos Miabe pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas do Laboratório de Síntese de Moléculas Medicinais, Bruce Alan, Vinícius Takemura, Cleiton Silvério, Douglas Damico, Felipe Benatti, Ingrid Barbosa, Kaio Maciel, Marcieli Fabris e Wellington da Silva, pela amizade e por compartilharem experiências nestes dois anos de curso.

À esta Universidade, seu corpo docente, direção e administração.

Aos meus amigos Eduardo Orácio, Willy Adda e Djhalma Venâncio.

À minha mãe Emília Pinto pelos conselhos que me ajudaram a caminhar e atravessar os obstáculos da vida.

LOPES, José Louzinho. **Derivados da botriosferana regioselectivamente sulfatados com potencial ação antiviral.** 2019. 84 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A dengue e a herpes fazem parte das doenças virais que mais afetam a população humana. Tanto a dengue como a herpes não tem um tratamento que possa curá-los. O medicamento existente para herpes simplesmente retarda a replicação do vírus na célula hospedeira, e a vacina herpesvac é ineficaz para herpes do tipo 2, que é a forma mais severa. Para a dengue, não existe um tratamento específico, e a única vacina disponível não atinge um amplo espectro de ação. Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, relatados na literatura, foram identificados como potenciais inibidores da infecção da célula pelo vírus envelopado. Contudo, a sua obtenção ainda depende de efeitos da sazonalidade. Porém, existem processos biotecnológicos por fermentação, que são mais atrativos, pois os polissacarídeos são produzidos com boa repetibilidade, elevado grau de pureza e rendimento. A botriosferana é uma beta-glucana produzida pelo fungo *Botryosphaeria rhodina*, que após sulfatação em laboratório, possui potencial atividade antiviral. Neste projeto optou-se por introduzir os grupos sulfato em posições específicas da botriosferana, de modo a poder relacionar a potencialidade antiviral com a posição dos grupos sulfato. Por esta metodologia foram produzidos diferentes derivados empregando-se a estratégia de proteção-sulfonação-desproteção e carboximetilação-sulfonação. A proteção pelo grupo pivaloila foi comprovada no espectro de infravermelho por bandas de vibração assimétrica referente à carbonila (C=O) do grupo protetor. O espectro de RMN de ^{13}C e HSQC confirmaram a presença de carbono metílico (CH_3) e quaternário. Bandas próximas à 1230 cm^{-1} e 810 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento assimétrico S=O e simétrico C-O-S, comprovaram a sulfonação do derivado protegido, o que foi confirmado pelo HSQC. A desproteção deste derivado ocorreu parcialmente. O derivado protegido na forma de um acetonídeo sulfatado foi comprovado pelo espectro de infravermelho, com bandas em 1470 cm^{-1} atribuídas ao anel cetálico, e próximas a 1230 cm^{-1} e 810 cm^{-1} atribuídas ao estiramento S=O e C-O-S. A desproteção também foi comprovada com a ausência da banda de estiramento C-O do anel cetálico. Os derivados carboximetilados sulfatados foram comprovados pelos espectros de infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C . Os derivados carboximetilados sulfatados, com graus de sulfatação de 0,1 a 0,4, apresentaram-se com potencial atividade antiviral frente ao vírus da herpes em testes preliminares.

Palavras-Chave: Polissacarídeos. *Botryosphaeria rhodina*. Agentes antivirais. Bioquímica médica.

LOPES, José Louzinho. **Regioselectively sulfated botriosferan derivatives with potential antiviral action.** 2019. 84 p. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Dengue and herpes are among the viral diseases that most affect the human population. Both dengue and herpes have no specific treatment that can cure them. The existing herpes drugs simply retard virus replication in the host cell, and the herpes vaccine is ineffective for herpes type 2, which is the most severe form. For dengue, the only available vaccine does not reach a broad spectrum of action. The sulfated polysaccharides from seaweeds, reported in the literature, have been identified as potential inhibitors of cell infection by enveloped viruses. However, their production still depends on the effects of seasonality. Biotechnological processes by fermentation seem to be more attractive, because the polysaccharides are produced with repeatability, a high degree of purity and yield. Botryosphaeran is a beta-glucan produced by the fungus *Botryosphaeria rhodina*, that after sulfonation in the laboratory it acquires good antiviral activity. This work was dedicated to the introduction of sulfate groups in specific positions of botryosphaeran, in order to relate the antiviral potentiality with the position of the sulfate groups. Different derivatives were produced employing the strategies of protection-sulfonation-deprotection and carboxymethylation-sulfonation. Asymmetric vibration bands, related to the carbonyl group (C=O) of the pivaloyl protecting group, were verified by the FT-IR spectrum. ^{13}C and HSQC NMR spectra confirmed the presence of methyl and quaternary carbons. Bands near 1230 cm^{-1} and 810 cm^{-1} were attributed to the S=O asymmetric and C-O-S symmetric stretches, proved the sulfonation of the pivaloyl derivative. The structure of the sulfated acetonide derivative was confirmed by the FT-IR spectrum, with bands at 1470 cm^{-1} attributed to the ketal ring, close to 1230 cm^{-1} and 810 cm^{-1} attributed to the S=O and C-O-S stretches, and was confirmed by HSQC. Deprotection was also proven with the absence of the ketal band. Sulfated-carboxymethylated derivatives were prepared and characterized by FT-IR, bands close to 1600 cm^{-1} , attributed to the COO^- stretch, 1230 cm^{-1} (S=O) and 810 cm^{-1} (C-O-S) confirmed the expected structure. The presence of the carbonyl group near 179 ppm was confirmed by ^{13}C NMR. The sulfated-carboxymethylated derivatives were confirmed by the FT-IR spectrum and ^1H and ^{13}C NMR. Sulfated-carboxymethylated derivatives with DSs between 0,1 and 0,4 presented potential antiviral activity against herpes in preliminary assays.

Key words: Polysaccharides. *Botryosphaeria rhodina*. Antivirals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estruturas de β -Glucanas fúngicas: (a) (1 \rightarrow 3)-; (b) (1 \rightarrow 6)-; (c) (1 \rightarrow 4;1 \rightarrow 3)-; (d) (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- e (e) (1 \rightarrow 6;1 \rightarrow 3)- β -D-Glucanas	19
Figura 2-	Representação da estrutura química do exopolissacarídeo botriosferana	20
Figura 3-	Possibilidades conformacionais de polissacarídeos em solução aquosa	27
Figura 4-	Estruturas mínimas ligantes no heparan sulfato (a) e em agaranas sulfato (b)	30
Figura 5-	Espectro na região do infravermelho (TF-IV) da botriosferana nativa	39
Figura 6-	Espectro de RMN de ^1H da botriosferana nativa em D_2O (NaOH 0,25 M)	41
Figura 7-	Espectro de RMN (DEPT135) da botriosferana nativa em D_2O (NaOH 0,25 M)	43
Figura 8-	Espectro de HSQC da botriosferana nativa em D_2O (NaOH 0,25 M)	44
Figura 9-	Espectros TF-IV das amostras Piv1 à 4, comparados ao espectro TF-IV da botriosferana reduzida	47
Figura 10-	Espectro de RMN- ^{13}C da amostra Piv 1 em DMSO-d_6	49
Figura 11-	Recorte do espectro de HSQC da amostra Piv1 em DMSO-d_6	49
Figura 12-	Espectro de RMN de ^{13}C da amostra Piv 2 em DMSO-d_6	50
Figura 13-	Espectro de RMN- ^{13}C da amostra Piv 4 em DMSO-d_6	51
Figura 14-	Espectro de HSQC da amostra Piv 4 em DMSO-d_6	52
Figura 15-	Espectro de TF-IV da amostra Piv1S, comparado ao espectro TF-IV da amostra Piv 1	53
Figura 16-	Espectro de TF-IV da amostra Piv1SDP, comparado ao espectro TF-IV da amostra Piv1S	54
Figura 17-	Espectro de TF-IV da amostra Piv 4S (C), comparado ao espectro TF-IV da amostra Piv4 (B) e botriosferana (A)	55
Figura 18-	Espectro de HSQC da amostra Piv 4S em DMSO-d_6	56
Figura 19-	Espectro de TF-IV da amostra Piv 4S (A), comparado ao espectro TF-IV da amostra Piv 4SDP (B)	57
Figura 20-	Espectro TF-IV do acetónídeo sulfatado comparado ao espectro da botriosferana reduzida	59

Figura 21-	Espectro TF-IV da amostra desprotegida e sulfatada, comparado ao espectro da botriosferana precursora, na forma de acetnídeo sulfatado	60
Figura 22-	Espectro de TF-IV da botriosferana carboximetilada (botriosferanaCm) comparado àquele da botriosferana.....	61
Figura 23-	Espectro de RMN de ^1H da botriosferana carboximetilada em D_2O (NaOH 0,25 M).....	62
Figura 24-	Espectro de RMN de ^{13}C da botriosferana carboximetilada em D_2O (NaOH 0,25 M). No insert, observa-se a região de carbonos sacarídicos de 110 a 58 ppm.....	63
Figura 25-	Espectro de RMN de ^{13}C em estado sólido da botriosferana carboximetilada	64
Figura 26-	Espectros de TF-IV da botriosferana nativa (A), carboximetilada (B) e carboximetilada e sulfatada (CmRS3) (C).	66
Figura 27-	Espectro de RMN de ^1H da botriosferana carboximetilada e sulfatada (CmRS5) em D_2O	67
Figura 28-	Espectro de TF-IV da botriosferana sulfatada com complexo SO_3^- Py, comparado ao espectro da botriosferana	69
Figura 29-	Espectro de HSQC da amostra botriosferana sulfatada (entrada 2) em DMSO-d_6	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Deslocamento químico dos carbonos de todas unidades da botriosferna	42
Tabela 2-	Testes de variação das condições de reação de proteção com PivCl	46
Tabela 3-	Otimização das condições de sulfonação da botriosferana carboximetilada	65
Tabela 4-	Otimização das condições de sulfonação seletiva da botriosferana	68

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1-	Agentes acilantes e mecanismo proposto de esterificação com cloreto de pivaloíla	22
Esquema 2-	Mecanismo de formação de um acetonídeo de carboidrato	23
Esquema 3-	Sulfonação regiosseletiva dos polissacarídeos carragenana e curdlana mediante proteção pelo grupo pivaloila	25
Esquema 4-	Reação de carboximetilação de um polissacarídeo	26
Esquema 5-	Rotas sintéticas propostas para a preparação dos derivados da botriosferana	32
Esquema 6-	Representação da reação de redução da botriosferana	45
Esquema 7-	Representação da reação de esterificação com PivCl	46
Esquema 8-	Representação da reação de desproteção da amostra Piv 1S	53
Esquema 9-	Representação da reação de sulfonação da amostra Piv 4.....	54
Esquema 10-	Representação da reação de formação do acetonídeo sulfatado de botriosferana.....	57
Esquema 11-	Mecanismo de formação do acetonídeo sulfatado de botriosferana	58
Esquema 12-	Representação da reação de desproteção do acetonídeo sulfatado	59

LISTA DE ABREVIATURAS

CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
DENV	Vírus da dengue
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMA	Dimetilacetamida
DMI	Dimetil-2-imidazilona
DMAP	<i>N,N</i> -4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Grau de substituição do polissacarídeo
EPS	Exopolissacarídeo
ESI-MS	Espectrometria de massas de ionização por eletrospray
FA	Formamida
TF-IV	Infravermelho com transformada de Fourier
HS	Heparan sulfato
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% do alvo
LABESPEC	Laboratório de Espectroscopia (Multiusuário/UEL)
LAMM	Laboratório de Análise de Materiais e Moléculas (Multiusuário/UEL)
LQP	Laboratório de Química Prebiótica (CCE/UEL)
MCA	Ácido monocloroacético
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
PivCl	Cloreto de pivaloila
RMN	Resonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
S%	Porcentagem de enxofre em massa
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SO ₃ -Py	Complexo de trióxido de enxofre e piridina
t.a.	temperatura ambiente
TBAF	Fluoreto de tetrabutílamônio
UFP	Unidade de formação de plaque

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Revisão Bibliográfica.....	16
2.1. Vírus.....	16
2.2. Vírus da herpes	16
2.3. Vírus da Dengue	17
2.4 Polissacarídeos.....	17
2.3.1 Exopolissacarídeos.....	18
2.3.2 β -glucanas	18
2.3.3 Botriosferana.....	19
2.4 Modificação química dos polissacarídeos	20
2.4.1 Proteção dos grupos hidroxila de polissacarídeos	21
2.4.2. Sulfonação regioseletiva.....	23
2.5 Carboximetilação de polissacarídeo	25
2.6 Estrutura conformacional de β -glucanas.....	26
2.7 Solubilidade de polissacarídeos	27
2.8 Atividade Biológica dos Polissacarídeos	28
3. Objetivos.....	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. Metodologia	33
4.1. Redução da botriosferana com boroidreto de sódio.....	33
4.2 Carboximetilação da botriosferana	33
4.2.1 Reações de sulfonação da botriosferana carboximetilada com o ácido clorossulfônico	34
4.3 Reação de sulfonação com o complexo trióxido de enxofre e piridina	34
4.4 Sulfonação da botriosferana via éster de pivaloila	35

4.5 Sulfonação da botriosferana via acetonídeo	35
4.6 Determinação do grau de substituição (DS)	36
4.6.1 Quantificação dos grupos sulfato (DSs)	36
4.6.2 Quantificação dos grupos carboximetil (DSc).....	37
4.7 Caracterizações espectroscópicas	37
4.7.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (TF-IV)	37
4.7.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	38
5. Resultados e Discussão	39
5.1 Caraterização estrutural da botriosferana.....	39
5.2 Caraterização da botriosferana por RMN 1D e 2D.....	40
5.3 Derivatização da botriosferana	44
5.3.1 Redução da botriosferana nativa.....	44
5.3.2 Sulfonação da botriosferana.....	45
5.3.4 Sulfonação regioseletiva da amostra Piv 4.....	54
5.3.5 Modificação regioseletiva da botriosferana via acetonídeo	57
5.3.6 Reação de carboximetilação da botriosferana.....	60
5.3.7 Sulfonação regioseletiva da botriosferana sem grupo protetor	67
6. Conclusão.....	71
7. Referência bibliográfica.....	72
8. Anexos	80

1. Introdução

Dengue e herpes fazem parte das doenças virais que mais afetam a população humana. A herpes representa um problema global da saúde pública e, por não existir medicamento antiviral que possa curar a doença, mais de 417 milhões de pessoas vivem com herpes simplex virus tipo 2 (HSV-2) (LOOKER *et al.*, 2012; VICKERMAN *et al.*, 2017).

A dengue é transmitida ao ser humano pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* que se distribuem principalmente em regiões tropicais e subtropicais, localizados em Países onde as condições são favoráveis para a proliferação do vetor, como Brasil e Moçambique. Mais de 3,9 bilhões de pessoas se encontram em regiões de risco e a cada ano cerca de 390 milhões de pessoas são infectadas (GYAWALI; BRADBURY; TAYLOR-ROBINSON, 2016). Muitos destes infectados apresentam sintomas como febres altas, dores fulminantes e alguns desenvolvem o quadro hemorrágico, que é a forma mais severa e fatal (SINGHI; KISSOON; BANSAL, 2007).

Atualmente, são usados medicamentos anti-herpes simplesmente para reduzir a frequência dos sintomas, mas que não curam a doença. E a vacina existente (herpesvac) não é suficientemente eficaz para prevenir a infecção pelo HSV-2, que é a forma mais severa (READ; SCHLEISS, 2018). Para a Dengue, até o momento não existe nenhum tratamento específico, no entanto, quando a doença é diagnosticada, o paciente somente recebe um apoio clínico baseado em terapia de suporte, principalmente no monitoramento da reposição do líquido intravascular (BEHNAM *et al.*, 2016). A única vacina existente não é suficientemente eficaz, pois ela apresenta uma resposta imune baixa aos indivíduos soronegativos quando comparados aos soropositivos. Devido à diversidade genética que o vírus experimenta no seu habitat, que aponta a possibilidade de existência de um novo sorotipo (DENV-5), pode-se aumentar a dificuldade no diagnóstico da doença e no desenvolvimento de uma vacina que seja suficientemente eficaz (GYAWALI; BRADBURY; TAYLOR-ROBINSON, 2016). Tendo em vista esta situação, bem como o elevado número de casos infectados que vem crescendo a cada ano e a inexistência de um medicamento específico que possa curar a dengue e a herpes, há necessidade de se desenvolver fármacos antivirais eficazes contra estas doenças.

As proteínas estruturais dos vírus da dengue (DENV) e da herpes (HSV) estão localizadas na porção *N*-terminal da poliproteína viral e englobam uma proteína do envelope (E), do capsídeo (C) e do precursor da proteína da membrana (M). Pelo fato de serem vírus envelopados, apresentam em comum o mecanismo de infecção. A glicoproteína E do envelope para DENV e a glicoproteína C para HSV possuem uma porção carregada positivamente que acredita-se ser a região que favorece a fixação do vírus ao receptor glicosaminoglicano heparan-sulfato (HS) da superfície celular. Devido à interação iônica promovida entre regiões das glicoproteínas virais carregadas positivamente e componentes da membrana celular carregados negativamente, o vírus penetra na célula por um processo chamado fusão (CHEN; MAGUIRE; MARKS, 1996; MARKS *et al.*, 2001).

A elucidação do mecanismo de infecção do vírus envelopado abriu caminho para a descoberta de novas moléculas naturais, pertencentes à classe dos carboidratos, que funcionam como inibidores da infecção viral. Dentre vários carboidratos destacam-se os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas que se demonstraram potencialmente ativos frente a vários vírus envelopados, tais como: HSV-1 e 2, vírus Influenza A, HIV-1 e 2 (HOSOYA *et al.*, 1991; KITAZATO; WANG; KOBAYASHI, 2007). Os polissacarídeos sulfatados, como as carragenanas e agaranas, intervêm na primeira etapa de infecção que envolve a associação entre o vírus envelopado e a célula hospedeira. Nesta etapa, o polissacarídeo sulfatado mimetiza o HS, assim bloqueando a entrada do vírus na célula hospedeira (CARLUCCI *et al.*, 2004; DAMONTE *et al.*, 2004; DUARTE *et al.*, 2004).

Apesar do potencial inibitório demonstrado pelos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas frente aos vírus envelopados, a sua produção permanece sob o efeito da sazonalidade, que resulta na produção de diferentes quantidades de polissacarídeo ao longo do ano. Entretanto, existem processos biotecnológicos que se baseiam na fermentação, onde os exopolissacarídeos podem ser produzidos com repetibilidade, bom rendimento e pureza (BARBOSA *et al.*, 2003). Neste contexto, no presente projeto optou-se por usar um polissacarídeo produzido por via fermentativa, a botriosferana. O nosso grupo de pesquisa vem se dedicando ao estudo de derivatização de polissacarídeos, e mostrou que a modificação química da botriosferana através da introdução de grupos sulfato potencializa a atividade antiviral (SACCHELLI, 2018). Porém, como não se sabe exatamente qual é a posição dos grupos sulfato na botriosferana que pode

influenciar na atividade antiviral, o presente estudo propõe a aplicação de procedimentos sintéticos de modo a inserir os grupos sulfato na molécula, em posições específicas, no intuito de se obter uma potencial atividade inibitória contra o DENV e o HSV.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Vírus

Estruturalmente, o vírus pode ser constituído pelo material genético DNA ou RNA , revestido por uma camada protéica chamada capsídeo. Alguns vírus possuem uma segunda camada constituída por glicoproteínas. Estes vírus que possuem uma cobertura de glicoproteínas são designados por vírus envelopados (GELDERBLOM, H.R, 1996). O vírus é o único agente patogênico que não tem a capacidade de sofrer a replicação sem a célula hospedeira. Por isso, aproveita-se da sua estrutura externa para interagir com componentes da membrana celular e consequentemente facilitar a entrada do genoma para a célula por processo de fusão. Neste estágio, o vírus adapta-se ao sistema metabólico da célula e desenvolve mecanismos importantes para a sua replicação. A replicação viral envolve diferentes estágios, com a participação de enzimas específicas sintetizadas pela célula hospedeira ou pelo próprio virion. No ciclo de replicação, geralmente os vírus passam por estágios comuns, como a interação com a célula hospedeira, transcrição do mRNA viral, replicação do genoma viral, montagem e clivagem de proteínas virais infecciosas à célula (KITAZATO; WANG; KOBAYASHI, 2007).

2.2. Vírus da herpes

O vírus da herpes (HSV) encontra-se em dois sorotipos, HSV-1 e HSV-2, pertencentes à família *herpesviridae*. Contém uma molécula de DNA de dupla hélice. A molécula de DNA é protegida por uma camada de proteínas que o envolve (capsídeo) e um envelope lipídico com glicoproteínas. A infecção viral é iniciada com a associação de glicoproteínas do envelope viral (gC) com receptores específicos da membrana celular. O vírus penetra na célula sem o envelope e procura atingir o núcleo celular. Quando o vírus coberto só de capsídeo atinge o núcleo, o DNA é liberado e começa a sofrer o processo de replicação e transcrição. O resultado final da transcrição é a formação de proteínas virais (WHITLEY, 2006).

O HSV-1 é transmitido principalmente por via oral e causa herpes labial, caracterizado por sintomas como feridas abertas ao redor da boca chamadas úlceras. O HSV-2 é transmitido exclusivamente por contato sexual, causando herpes genital. Geralmente, o infectado não apresenta sintomas ou manifesta sintomas leves que dificultam o reconhecimento no primeiro estágio da doença. Quando os sintomas aparecem, o herpes genital é caracterizado por úlceras ao redor do órgão genital, febres, dores no corpo e inchaço no gânglios linfáticos. A doença pode

atingir qualquer índice de severidade quando o sistema imune está comprometido. Como por exemplo, os indivíduos que padecem de AIDS sofrem severamente pelo herpes (COSTELLO M.T. (ASCP); SABATINI; YUNGBLUTH, 2006)..

2.3. Vírus da Dengue

O vírus da Dengue (DENV) é um membro da família *Flaviviridae*. Os *Flaviviridae* são vírus de RNA de cadeia simples, contendo um genoma relativamente pequeno de cerca de 10 kilobases. É constituído por três proteínas estruturais (C, prM e E) (VERMA et al., 2014). A infecção com o DENV pode acontecer com quatro sorotipos (DENV-1 a DENV-4), podendo resultar em dengue febril (DF), até formas graves como forma hemorrágica da dengue (DHF) e a síndrome de choque da dengue (DSS) (SINGHI; KISSOON; BANSAL, 2007). DF é a forma menos severa que ocorre entre 3-8 dias depois da infecção, normalmente é caracterizada por febres altas, dores de cabeça, dores musculares, dores de abdômen, vômito persistente, porém a recuperação pode ocorrer depois de alguns dias. E DHF/DSS representam as formas mais complicadas, ocorrem geralmente na segunda semana, e são acompanhadas por vazamento severa do plasma e uma hemorragia incessante. Normalmente, o paciente experimenta dias prolongados de convalescência, com fraqueza e depressão, podendo levar os órgãos à falência, e consequentemente à morte (MONATH, 2006).

2.4 Polissacarídeos

Polissacarídeos são macromoléculas naturais constituídos de unidades de monossacarídeos unidos por meio de ligações glicosídicas do tipo alfa (α) ou beta (β). Estes polímeros são classificados como homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos. Diferem uns dos outros na identidade das unidades monoméricas, no tipo de ligações que une as unidades, no comprimento das cadeias e no grau de ramificação, em consequência, têm propriedades e funções biológicas notavelmente diferentes (NELSON e COX, 2013).

Os polissacarídeos constituem o grupo de compostos mais abundante na biosfera, desempenhando diversas funções fisiológicas nos seres vivos. Servem como forma de armazenamento de energia, atuam como elementos estruturais e protetores nas paredes celulares bacterianas, vegetais e também nos tecidos animais (NELSON & COX, 2013). Possuem ampla

aplicação em indústrias de alimentos, relacionada com as suas propriedades físicas, como o potencial de modificação de propriedades em meio aquoso (CORRADI DA SILVA et al., 2006).

Nas últimas décadas, os polissacarídeos têm levantado interesse de pesquisadores na exploração da sua atividade biológica, como atividade anti-inflamatória (CAROLINE et al., 2013), antioxidante (GAO et al., 2010), antiviral (TALARICO et al., 2005), anticoagulante e antitrombótica (WU, S. J.; CHUN, M. W.; SHIN, K. H.; TOIDA, T.; PARK, Y.; LINHARDT, R. J.; KIM, 1998) e imunomoduladora (BI et al., 2013). A atividade biológica destes compostos depende da estrutura molecular e conformação espacial da molécula (DUARTE et al., 2004). Portanto, a modificação molecular de polissacarídeos é considerada como uma das melhores estratégias para prover novas funções ou potencializar a sua atividade biológica (MENDES et al., 2009).

2.3.1 Exopolissacarídeos

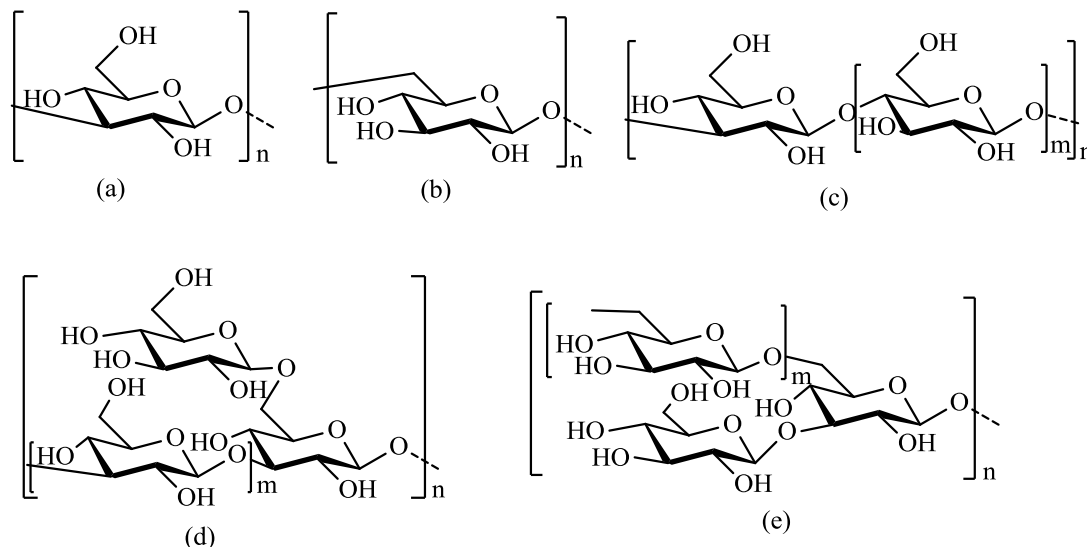
Os exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias através da fermentação, os quais são encontrados ligados à superfície das células destes microorganismos, e são secretados no meio líquido de cultivo. Um dos primeiros polissacarídeos obtidos por este processo, nos meados do século XIX, foi o dextrana, produzido pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*. E mais tarde, ao fim do século XX, iniciou-se o desenvolvimento de estudos de produção de exopolissacarídeos a partir de fungos. Os EPS produzidos por fungos são agrupados em Homopolissacarídeos e Heteropolissacarídeos. Segundo a caracterização química realizada, a maioria dos exopolissacarídeos fúngicos são β -glucanas (CORRADI DA SILVA et al., 2006).

2.3.2 β -glucanas

β -glucanas são polissacarídeos constituídos por monômeros de D-glucose, sequencialmente interligados. São os principais constituintes estruturais da parede celular das bactérias e fungos, podendo ser encontrados também em cereais. As β -glucanas são homopolissacarídeos que derivam de diferentes fontes, podendo apresentar alguma variação na sua estrutura. As cadeias são lineares ou apresentam ramificação em certas partes da estrutura, constituídas por unidades de D-glucose interligadas por meio de ligação glicosídica em

configuração β . Normalmente as ligações glicosídicas são do tipo (1 \rightarrow 3); (1 \rightarrow 4); (1 \rightarrow 6); (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6) ou (1 \rightarrow 4,1 \rightarrow 3) (Figura 1) (AKRAMIEN et al., 2007).

Figura 1- Estruturas de β -Glucanas fúngicas: (a) (1 \rightarrow 3)-; (b) (1 \rightarrow 6)-; (c) (1 \rightarrow 4;1 \rightarrow 3)-; (d) (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- e (e) (1 \rightarrow 6;1 \rightarrow 3)- β -D-Glucanas

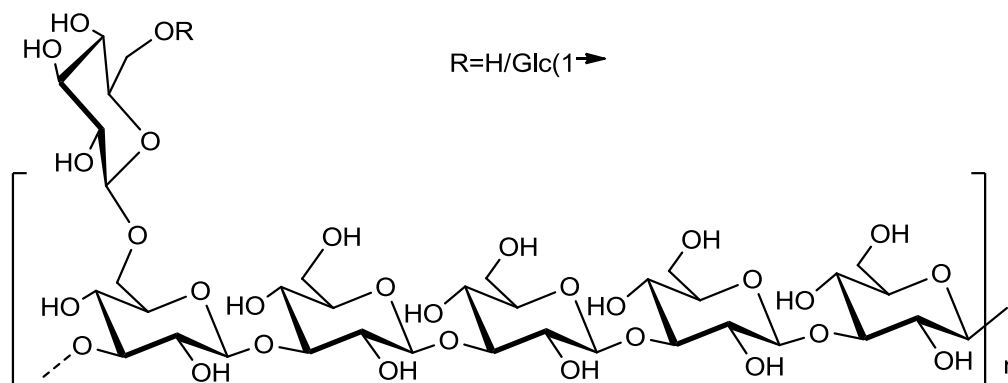


Fonte: (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013)

2.3.3 Botriosferana

A botriosferana, uma β -glucana produzida pelo fungo *Botryosphaeria rhodina*, é um EPS constituído por resíduos de glucose interligados por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3) na cadeia principal e β -(1 \rightarrow 6) nas ramificações. As ramificações são encontradas a cada 5 ou 6 resíduos de glucose na cadeia principal na posição 6 do resíduo de glucose, e são constituídas por glucose ou gentiobiose (Figura 2) (BARBOSA et al., 2003).

Figura 2- Representação da estrutura química do exopolissacarídeo botriosferana



Fonte: (BARBOSA et al., 2003)

2.4 Modificação química dos polissacarídeos

Uma β -Glucana possui distintos grupos reativos que são considerados como posições susceptíveis à modificação química, que são as hidroxilas e a ligação glicosídica. A posição da ligação glicosídica é a posição atraente para prótons e enzimas, promotores da reação de despolimerização, enquanto que a hidroxila é a posição susceptível à reação de substituição nucleofílica (S_N). No entanto, cada resíduo de D-glucose possui até 3 hidroxilas que se diferenciam quanto à sua posição no monômero e efeito estérico e, conseqüentemente, na capacidade reativa. Em reações de derivatização, o oxigênio da hidroxila atua como um nucleófilo, permitindo a introdução de novos grupos funcionais por S_N . Contudo, devido a algumas diferenças estéricas, diferentes graus de substituição (DS) podem ser alcançados nas reações de S_N em β -Glucanas. Relacionado a esta característica estérica, que define o DS, pode-se considerar que as β -Glucanas são susceptíveis a reações regioseletivas, em que uma hidroxila presente em cada resíduo reage preferencialmente em relação à outra. Portanto, a regioseletividade permite sintetizar um derivado estruturalmente definido, podendo-se usar a estratégia de proteção e desproteção de hidroxilas (JACOBSEN; AMBROSINI, 2007). Normalmente, o grupo protetor é introduzido temporariamente na molécula para mascarar os grupos funcionais sensíveis a um determinado reagente. Este grupo protetor, dependendo das suas características eletrônicas, pode desativar o grupo nucleofílico (GUO; YE, 2010). Várias estratégias foram aplicadas com sucesso com grupos de proteção amplamente utilizados em química de carboidratos e uma grande diversidade de polissacarídeos tem sido regioseletivamente sulfatada.

O grau de substituição (DS) é um parâmetro que define o número de substituintes introduzidos em cada unidade monomérica de um polissacarídeo. O valor máximo do DS depende de características como a natureza estrutural do polissacarídeo e o tipo de reação envolvida na introdução do substituinte. Como por exemplo, as β -glucanas lineares possuem 3 grupos hidroxilas livres em cada unidade de glucose. Se a substituição acontecer em todos os grupos, o valor de DS será 3. Em caso da substituição acontecer exclusivamente no álcool primário (OH-6), o DS será 1 (JACOBSEN; AMBROSINI, 2007). O grau de sulfatação está relacionado com a atividade biológica. Por exemplo, no estudo realizado por SACCHELLI (2018) foi demonstrado que os derivados sulfatados da botriosferana de maior grau de sulfatação têm maior atividade antiviral comparado aos de menor grau de sulfatação.

2.4.1 Proteção dos grupos hidroxila de polissacarídeos

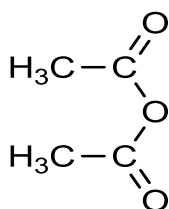
Devido ao número de grupos hidroxila em monômeros de polissacarídeos, a estratégia de proteção é bastante aplicada em reações regioseletivas. Dentre os grupos hidroxila presentes nos polissacarídeos, o álcool primário é mais nucleofílico que o álcool secundário. Isso significa que o grupo hidroxila da posição C-6 reage mais rapidamente que aqueles em C-2, C-3 e C-4 em β -Glucanas. Porém, dentre os álcoois secundários é muito difícil ou impossível diferenciar a sua reatividade e na literatura existe pouca informação sobre este assunto (JACOBSEN; AMBROSINI, 2007).

2.4.1.1 Esterificação regioseletiva de polissacarídeos

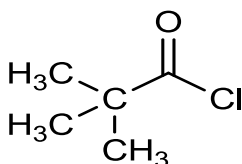
A esterificação envolve a reação de um álcool com um agente acilante. Devido à estabilidade e facilidade de remoção do grupo protetor, os agentes acilantes usados com maior frequência em síntese de polissacarídeos acilados são: o anidrido acético ($(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$) e o cloreto de pivaloila (PivCl). O PivCl é amplamente utilizado na proteção das hidroxilas primárias dos polissacarídeos (em C-6), pois devido ao impedimento estérico do grupo *t*-butila, não há reação com as demais hidroxilas, que são secundárias (Esquema 1). A reação do anidrido acético pode ser realizada em meio ácido ou, na presença de uma base, como a piridina, enquanto que com cloreto de pivaloila, além da piridina é necessário utilizar o 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador (DE ARAÚJO et al., 2013). Estas reações podem ser conduzidas em meio heterogêneo ou homogêneo. Em meio heterogêneo, a formamida ou DMF são usados como solventes, e nestas condições os polissacarídeos se mostram menos reativos, pelo fato da reação

ser conduzida na fase sólida. Em meio homogêneo, o grupo hidroxila é mais reativo que na fase sólida, pois o polissacarídeo dissolve completamente e a interação por ligações de hidrogênio entre as cadeias dos polissacarídeos é quebrada, tornando os grupos hidroxila mais acessíveis. Os solventes geralmente usados em meio homogêneo são DMA/LiCl e DMF/LiCl (JACOBSEN; AMBROSINI, 2007).

Agentes acilantes

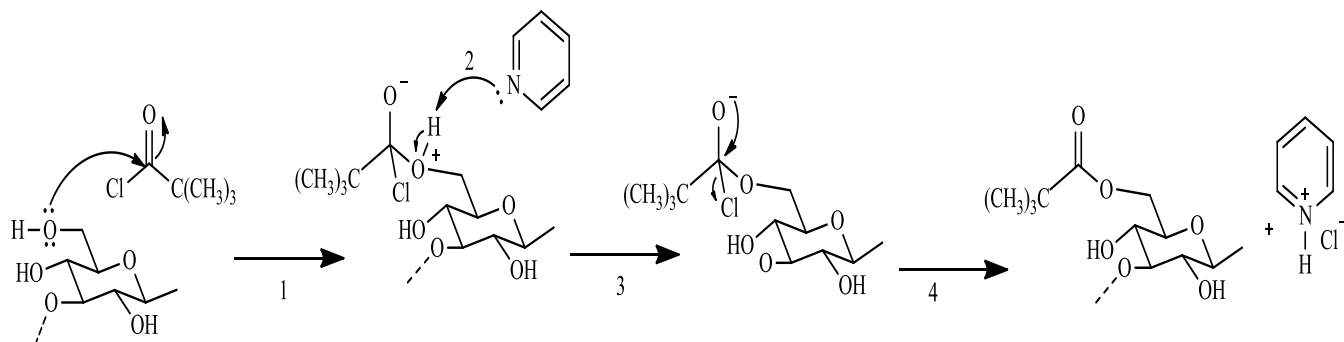


Anidrido acético



Cloreto de pivaloíla

Esquema 1- Agentes acilantes e mecanismo proposto de esterificação com cloreto de pivaloíla



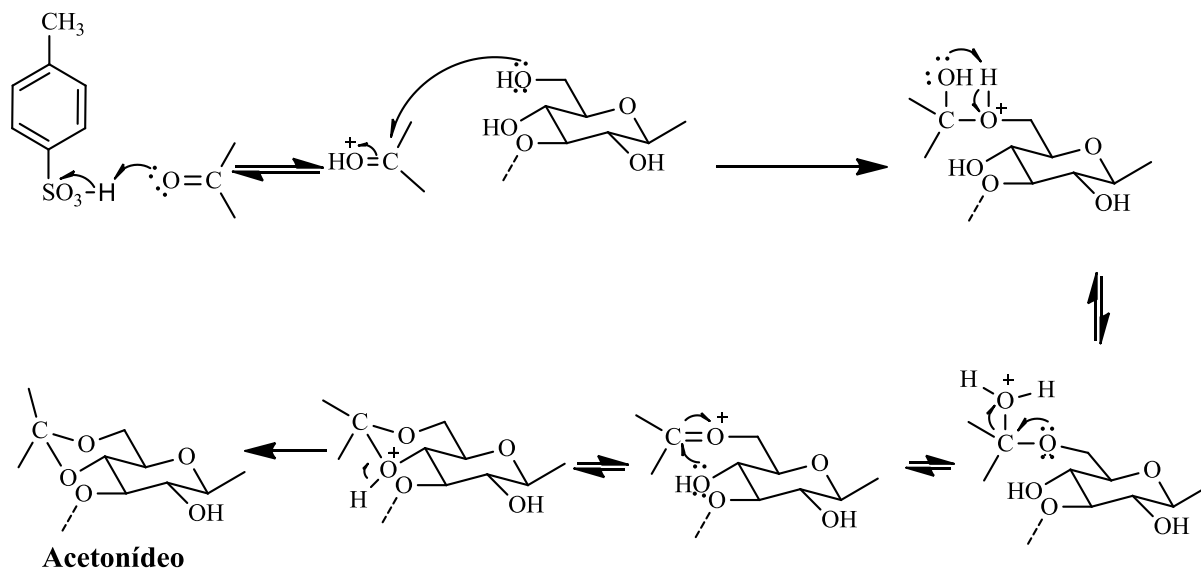
Fonte: (DE ARAÚJO et al., 2013; GAO et al., 1997)

2.4.1.2 Grupos protetores acetal e cetal

Benzilideno e isopropilideno são exemplos de grupos protetores do tipo cetal e acetal, amplamente utilizados para mascarar grupos hidroxila 1,2-*cis*-diol e 1,3-*trans*-diol, formando um anel de cinco e seis membros, respectivamente. O isômero 1,2-*cis*-diol é mais favorecido em relação ao 1,3-*trans*-diol. Geralmente, este tipo de reação ocorre sob condição ácida na presença de benzaldeído ou acetona como agente derivatizante. Normalmente são usados ácidos para-

tolueno sulfônico e canforsulfônico como catalisadores. Na ausência destes ácidos, pode-se usar o ácido sulfúrico diluído, embora a sua força possa quebrar a ligação glicosídica, assim promovendo a despolimerização. O esquema 2 representa o mecanismo de reação da acetona com uma β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana. Sob a ação de um ácido, a acetona será protonada e, posteriormente, o carbono da carbonila sofrerá um ataque nucleofílico pela hidroxila menos impedida estericamente (OH-6). Durante este processo, forma-se o íon oxônio, devido a sua instabilidade, o carbono eletrofílico do íon é atacado pela segunda hidroxila (OH-4), assim formando o acetonídeo (Esquema 2) (GREENE & WUTS, 2007).

Esquema 2- Mecanismo de formação de um acetonídeo de carboidrato



Fonte: (GREENE & WUTS, 2007)

2.4.2. Sulfonação regioseletiva

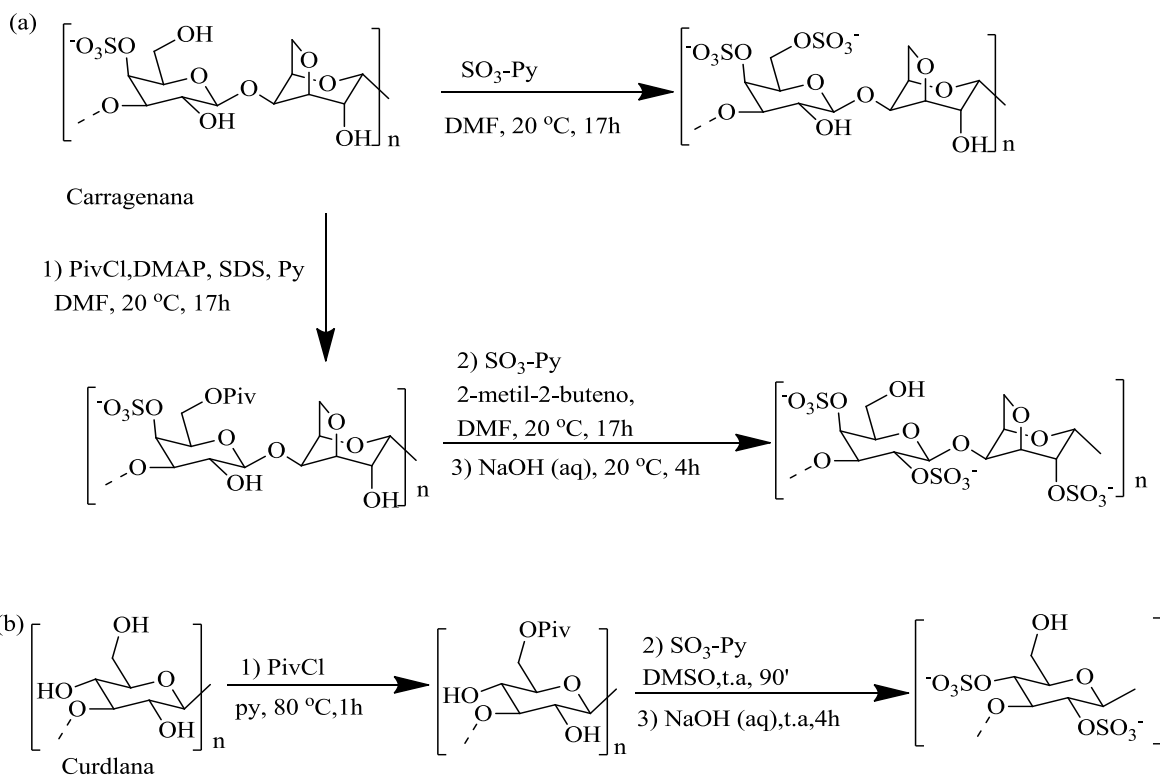
A modificação química de polissacarídeos por sulfonação é bastante utilizada por causa das propriedades biológicas que os produtos modificados adquirem. Por exemplo, a modificação da botriosferana com grupos sulfato no polissacarídeo além de fornecer a atividade anticoagulante melhorou a sua solubilidade (MENDES et al., 2009).

A reação de sulfonação de polissacarídeos consiste em introduzir o grupo sulfonatos nas hidroxilas livres das unidades monossacarídicas, o que altera as propriedades físico-químicas e atividade biológica. Os primeiros reagentes aplicados na sulfonação de polissacarídeos foram: cloreto de

sulfonila, ácido sulfúrico e seus derivados, como o ácido clorossulfúrico, 1-piperidina sulfônico e ácido sulfâmico. Por terem apresentado a capacidade de romper a ligação glicosídica, causando uma despolimerização significativa no polímero, devido à elevada acidez dos reagentes, são utilizados reagentes mais estáveis, de fácil manuseio e menos ácidos. Atualmente, são aplicados complexos de trióxido de enxofre (SO_3) com amidas (DMF) e aminas (piridina(Py), trietilamina(Et_3N), *N,N*-diisopropiletilamina(DIPEA)) em solventes apróticos como Py, DMF, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA) ou *N*-metilpirrolidona (NMP). Todos estes reagentes são utilizados para introduzir o grupo sulfonato na hidroxila do polissacarídeo (BEDINI,2017). Contudo, o grupo hidroxila predomina em todas moléculas de polissacarídeos, em alguns casos os polissacarídeos naturais se apresentam na forma de acetato (heparina), sulfato (carragenana) ou amina (heparan sulfato) (DE ARAÚJO et al., 2013; MARKS et al., 2001). Estes grupos dispõem de uma reatividade química semelhante, por isso nas reações de derivatização é fundamental a escolha dos reagentes e grupos protetores (BEDINI, 2017; ÁGOSTON; STREICHER; FÜGEDI, 2016). No estudo realizado por ARAÚJO e colaboradores (2013), foi mostrado que a sulfonação regioseletiva em polissacarídeos pode ocorrer controlando a quantidade do agente sulfonante ou aplicando a estratégia de proteção-sulfonação-desproteção. Foi aplicado o cloreto de pivaloila como grupo protetor para derivatizar o polissacarídeo carragenana (Esquema 3a). O mesmo grupo protetor foi aplicado no polissacarídeo curdlana por GAO e colaboradores (1997) (Esquema 3b). Em ambos polissacarídeos o grupo pivaloila foi introduzido na posição do C-6, seguida de sulfonação com o complexo SO_3 -Piridina e desproteção em meio básico (NaOH) (DE ARAÚJO et al., 2013; GAO et al., 1997). Cabe salientar que a curdlana é um polissacarídeo não ramificado, constituído por resíduos de glucose interligados por ligação glicosídica β -(1 \rightarrow 3) em uma cadeia linear. A estrutura molecular que a curdlana dispõe pode conferir nela uma melhor solubilidade e conseqüentemente facilidade na derivatização comparado à carragenana e botriosferana. O polissacarídeo usado por ARAÚJO e colaboradores (2013), é uma κ -carragenana, que é uma galactana sulfatada de cadeia linear, constituído por uma unidade alternada de β -D-galactopiranosil sulfatada ligada à unidade de α -3,6-D-anidrogallactopiranosil (forma ciclizada) pela ligação glicosídica (1 \rightarrow 4) (VAN DE VELDE et al., 2002). O grupo substituinte sulfato e a forma ciclizada da carragenana podem elevar o impedimento estérico na molécula, assim como dificultar a derivatização. O efeito estérico é mais acentuado na botriosferana, que é um

polissacarídeo ramificado com uma estrutura conformacional de tripla hélice, onde os grupos OH já estão envolvidos em interações intermoleculares/intramoleculares, conferindo a ela uma baixa solubilidade e reatividade (GIESE et al., 2008).

Esquema 3- Sulfonação regiosseletiva dos polissacarídeos carragenana e curdlana mediante proteção pelo grupo pivaloila



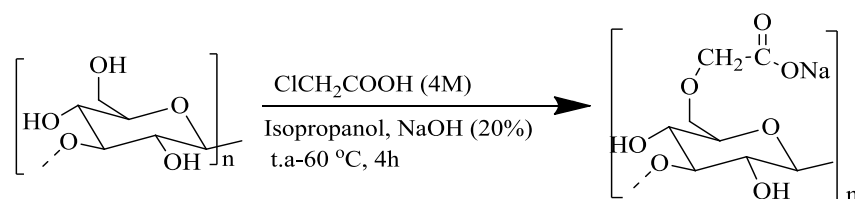
Fonte: (DE ARAÚJO et al., 2013; GAO et al., 1997).

2.5 Carboximetilação de polissacarídeo

A síntese de polissacarídeos carboximetilados geralmente é realizada em condições homogêneas (água) ou heterogêneas (isopropanol ou etanol/tolueno), usando NaOH como base e o ácido monocloroacético (MCA) como agente alquilante. Primeiramente, o NaOH reage com os grupos hidroxila do polissacarídeo para formar grupos alcóxido que tendem a atacar o MCA via SN₂ (JACOBSEN; AMBROSINI, 2007; XU et al., 2009). O resultado deste ataque nucleofílico é um polissacarídeo carboximetilado preferencialmente na posição do C-6 (Esquema 4). Porém, o grupo carboximetila introduzido, além de afetar na mudança conformacional do polissacarídeo

nativo, devido à diminuição da interação intermolecular/intramolecular por ligações de hidrogênio, também pode contribuir para melhorar a solubilidade em água e modular as atividades biológicas (XU et al., 2009; YANG et al., 2011). Vários polissacarídeos foram carboximetilados com sucesso, e além de adquirir uma boa solubilidade em água (KAGIMURA et al., 2015), demonstraram melhorias nas atividades antioxidante (XU et al., 2009) e antitumoral (ZHANG et al., 2005). A atividade antioxidante destes derivados carboximetilados foi relacionada com a presença do grupo carboximetil na sua estrutura. Existem outras características que podem impactar na atividade biológica dos polissacarídeos carboximetilados, como a mudança conformacional, induzida pela introdução do grupo funcional, que propicia à molécula diferentes possibilidades de interações moleculares com receptores celulares (XU et al., 2009; YANG et al., 2011; ZHANG et al., 2005).

Esquema 4- Reação de carboximetilação de um polissacarídeo

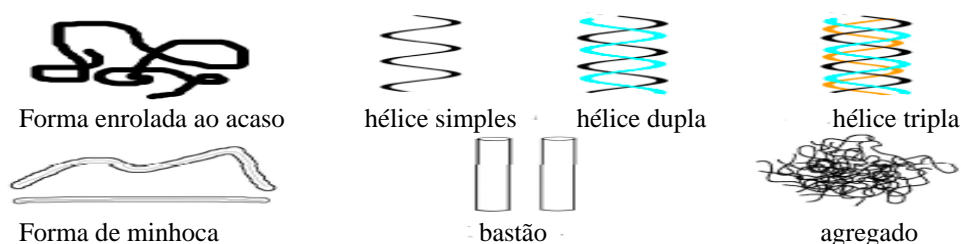


Fonte: (XU et al., 2009)

2.6 Estrutura conformacional de β -glucanas

As β -glucanas, dependendo da sua composição, podem adotar várias formas conformacionais em solução aquosa, como a forma enrolada ao acaso, hélice simples, hélice dupla, hélice tripla, forma de minhoca, bastão e agregado (Figura 3). Em particular, as β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)-D-glucanas tendem a formar conformações em hélice devido às interações intermoleculares por ligações de hidrogênio promovidas por hidroxilas livres presentes na cadeia. Algumas destas β -glucanas, como a botriosferana e a lentinana, existem na forma de tripla hélice em solução e as suas estruturas conformacionais são mantidas por forças intermoleculares. As atividades biológicas destes biopolímeros podem sofrer influência da sua conformação (GIESE et al., 2008; WANG et al., 2017b).

Figura 3- Possibilidades conformacionais de polissacarídeos em solução aquosa



Fonte: (WANG et al., 2017b)

2.7 Solubilidade de polissacarídeos

As β -glucanas possuem uma variedade estrutural e de propriedades físicas, como os graus de polimerização e ramificação, conformação, massa molecular e solubilidade em água. O grau de polimerização (GP) e ramificação é um dos fatores cruciais para determinar a solubilidade dos polissacarídeos. Porém, grande parte de polissacarídeos extracelulares são praticamente insolúveis em água e não são solubilizados facilmente em outros tipos de solventes inorgânicos e orgânicos (ISHIBASHI et al., 2004). Para derivatização de polissacarídeos são usados comumente solventes orgânicos apróticos, como a formamida (FA) e a dimetilformamida (DMF) (BEDINI, 2017). Mas estes polissacarídeos possuem baixa solubilidade em solventes orgânicos. Foi demonstrado que uma solução alcalina de hidróxido de sódio melhora a solubilidade de β -glucanas. O NaOH afeta a estabilidade das interações intermoleculares e intramoleculares por ligações de hidrogênio, levando à uma transição conformacional de tripla hélice para hélice simples. A conversão entre hélice tripla e simples pode ser mediada por diferentes tratamentos químicos e físicos. Sugere-se que o NaOH cause uma abertura parcial na tripla hélice, devido à quebra de ligações de hidrogênio, que leva à formação de uma cadeia simples que, rapidamente, pode retornar à sua conformação estável através da neutralização ou diálise (YOUNG, 2000).

A solução alcalina de NaOH conduz a uma solução homogênea de β -glucana, mas torna-se inviável conduzir reações de derivatização neste meio, pelo fato do íon hidróxido poder interferir na reação e levar à formação de um produto indesejado. No entanto, líquidos iônicos surgiram como novos solventes aplicados na derivatização de polissacarídeos, por estes terem a capacidade de desfazer a complexa estrutura conformacional dos exopolissacarídeos, assim contribuindo no aumento da solubilidade. Portanto, para polissacarídeos que se mostram

insolúveis em água e em solventes orgânicos, sugere-se o uso de uma mistura de solventes que consiste em solvente orgânico e sal inorgânico. Como exemplos incluem-se as misturas de dimetilacetamida (DMA)/cloretodelítio (LiCl), DMF/LiCl, 1,3-dimetil-2-imidazilonona (DMI)/LiCl e DMSO/TBAF (fluoreto de tetrabutílamônio). Um líquido iônico pode dissolver uma variedade de polissacarídeos, permitindo que a derivatização ocorra em meio homogêneo (JACOBSEN; AMBROSINI, 2007).

2.8 Atividade Biológica dos Polissacarídeos

A modificação molecular é uma estratégia importante na obtenção de análogos para utilização em estudos sobre atividade biológica. A variação na estrutura química permite estudar qual o efeito que a alteração traz na atividade biológica (PATRICK, 1995). Devido à ampla variedade de atividades biológicas dos polissacarídeos, a síntese de derivados por diversos métodos sintéticos tem despertado uma grande atenção na descoberta de novas propriedades biológicas. Vários métodos de derivatização dos polissacarídeos foram reportados na literatura, como a sulfonação (MENDES et al., 2009), acilação (GROTE; HEINZE, 2005), fosforilação (GROTH; WAGENKNECHT, 2001) e carboximetilação (XU et al., 2009). Tem sido sugerido que a atividade biológica dos polissacarídeos em alguma parte depende da presença de certos grupos funcionais na molécula, como o íon sulfato (SO_4^-), íon carboxilato (COO^-), como também pode ser influenciada pelo tamanho da molécula, conformação, configuração da ligação glicosídica (CARLUCCI et al., 1997; DUARTE et al., 2004). Porém, os estudos realizados com glucanas não derivatizadas mostraram que a sua atividade está relacionada com a configuração da ligação glicosídica. Por exemplo, uma β -(1 \rightarrow 3)-glucana apresenta atividade imunomoduladora e imunotoxicológica (ISHIBASHI et al., 2004) enquanto que uma α -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 4)-D-glucana é um potente agente antioxidante (GAO et al., 2010). Apesar das β -glucanas apresentarem uma grande diversidade de atividades biológicas, a baixa solubilidade é vista como um dos fatores limitantes (ISHIBASHI et al., 2004). Por isso, a derivatização de β -glucanas é considerada como um meio para aumentar a sua solubilidade e potencializar suas aplicações (KAGIMURA et al., 2014, 2015).

2.8.1 Polissacarídeos sulfatados: relação entre estrutura química e atividade antiviral.

Os polissacarídeos sulfatados que derivam de algas marinhas têm sido investigados por apresentarem uma variedade de atividade biológicas, tais como atividade antiviral (DUARTE et

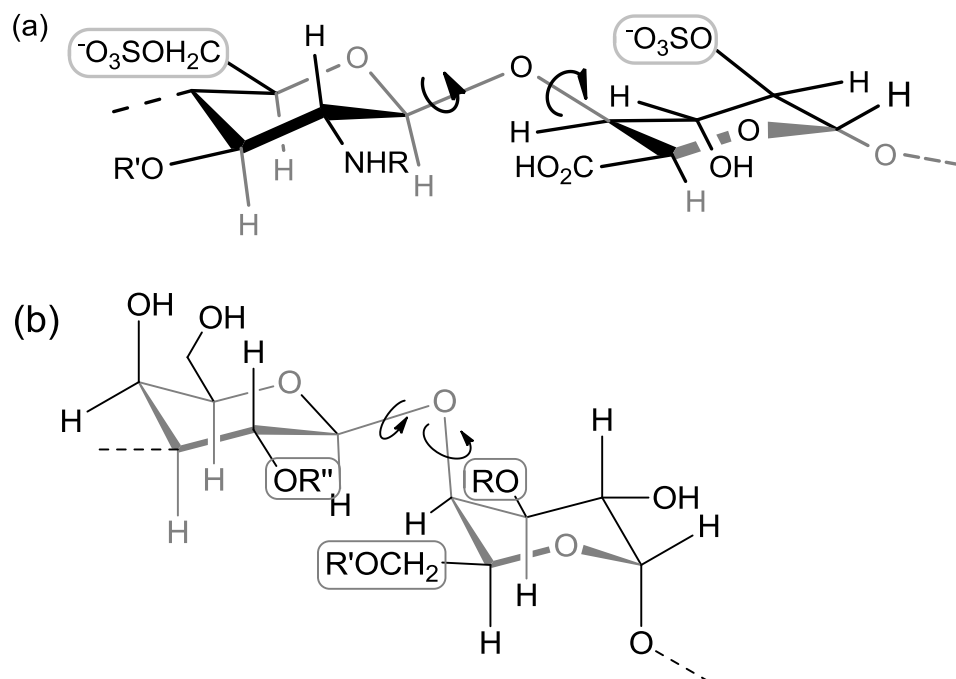
al., 2001, 2004; PAULA et al., 2006), anticoagulante(WU, S. J.; CHUN, M. W.; SHIN, K. H.; TOIDA, T.; PARK, Y.; LINHARDT, R. J.; KIM, 1998), e antitumoral (WANG et al., 2017a). Por exemplo, as carragenanas, produzidas por algas vermelhas da espécie *Gigartina skottsberggi*, demonstraram o efeito antiviral contra o vírus da herpes, e o efeito anticoagulante (CARLUCCI et al., 1997).

A variação na atividade anti-dengue dos polissacarídeos sulfatados depende do sorotipo viral e do tipo de célula utilizada no ensaio. Kappa, iota, lambda carragenanas e DL-galactanas mostraram maior potencial inibitório contra o vírus da dengue-2 (DENV-2), baixo efeito antiviral contra DENV-3 e DENV-4, e totalmente inativos contra DENV-1 (TALARICO et al., 2005). O efeito inibitório destes polissacarídeos sulfatados baseia-se na habilidade que têm em interferir na primeira etapa de infecção da célula hospedeira pelo vírus. São os grupos aniônicos do polissacarídeo heparan sulfato, presentes na superfície da membrana celular, que interagem com uma região catiônica da glicoproteína E (gE) do vírus, favorecendo a sua fixação na superfície da membrana da célula hospedeira. Portanto, existe uma sequência de etapas de interação que ocorrem neste processo, influenciada por outros tipos de glicoproteínas virais (gD ou gB) que ligam-se à diferentes receptores da membrana celular (DUARTE et al., 2004). Neste contexto, a variação da atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados em relação ao sorotipo viral, reportada no estudo de TALARICO e colaboradores (2005) pode estar relacionada com os diferentes tipos de interações que acontecem entre as glicoproteínas virais e os receptores da membrana celular.

O estudo realizado com agaranas sulfatadas mostrou que o aumento do peso molecular e o grau de sulfatação tende a aumentar a atividade antiviral. As agaranas com um grau de sulfatação correspondente à 22-24% e um peso molecular 34-43,7 kDa apresentaram maior atividade antiviral contra herpes viral do tipo 1 e 2 comparativamente às agaranas sulfatadas com 11,2-16,2% de grau de sulfatação e 5,1-31,3 kDa de peso molecular (DUARTE et al., 2004).

A região hidrofóbica do polissacarídeo (região piranosídica) desempenha um papel importante na interação vírus-célula, pois, a rotação da unidade do monômero através da ligação glicosídica favorece a interação entre o polissacarídeo e a glicoproteína viral (Figura 4), forçando o grupo aniônico a acomodar-se melhor à estrutura da glicoproteína, assim resultando em um efeito sinérgico (DUARTE et al., 2004).

Figura 4- Estruturas mínimas ligantes no heparan sulfato (a) e em agaranas sulfato (b). As zonas hidrofóbicas estão indicadas em cinza e as zonas iônicas estão circuladas. As setas indicam as possibilidades de rotação em relação às ligações glicosídicas. Para o heparan sulfato $R' = H$ indica estrutura mínima ligante para glicoproteína gC do HSV. Para as agaranas sulfato $R = H$, $R' = SO_3^-$ e $R'' = SO_3^-$ indicam estrutura mínima ligante de gC do HSV.



Fonte: (DUARTE et al., 2004)

Segundo os estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, a botriosferana sulfatada aleatoriamente possui potencial atividade antiviral, como não se sabe a posição do grupo sulfato que influencia na atividade antiviral, neste trabalho propõem-se a síntese regioespecífica de botriosferana sulfatada e o estudo da relação entre a posição dos grupos sulfato e a respectiva atividade antiviral (Esquema 5).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Preparar derivados regioselectivamente sulfatados do exopolissacarídeo botriosferana e estudá-los como potenciais inibidores da infecção dos vírus da dengue e da herpes.

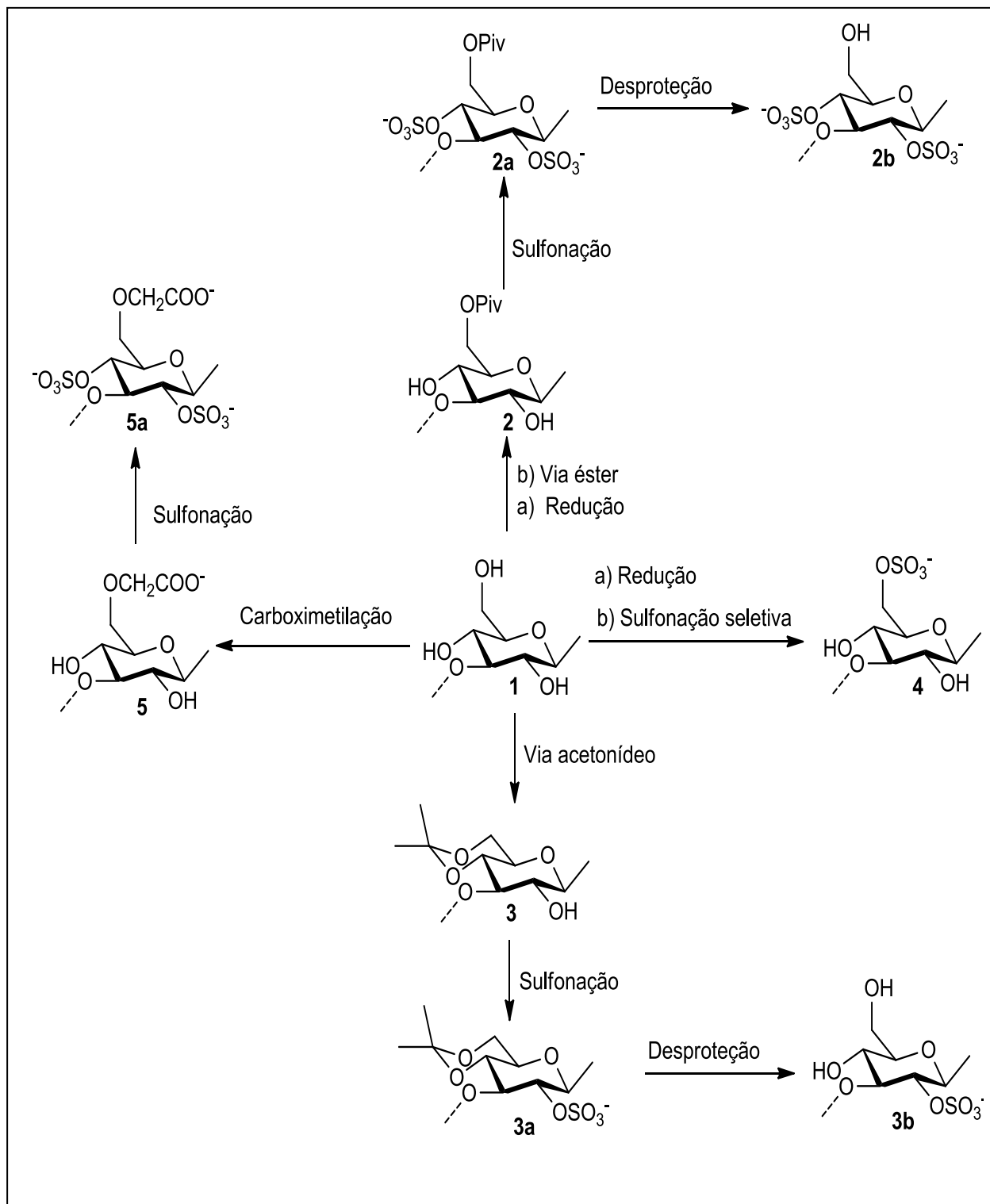
3.2 Objetivos específicos

Preparar derivados da botriosferana, de alto ou baixo peso molecular, sulfatados seletivamente nos grupos hidroxila das posições 2, 4 e 6 das unidades de glucose (Esquema 5);

Avaliar o potencial antiviral dos compostos obtidos e desenvolver um estudo de relação estrutura-atividade dos mesmos;

Elaborar outras reações de derivatização dos compostos obtidos a fim de aumentar a sua variabilidade química e sua respectiva atividade antiviral (Esquema 5).

Esquema 5- Rotas sintéticas propostas para a preparação dos derivados da botriosferana



Fonte: (DE ARAÚJO et al., 2013; XU et al., 2009)

4. Metodologia

As amostras de botriosferana nativa usadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela Prof. Aneli M. Barbosa-Dekker, do Departamento de Química da UEL. Elas foram produzidas segundo a metodologia de Barbosa e colaboradores (2003).

4.1. Redução da botriosferana com boroidreto de sódio

Redução em meio heterogêneo: em um balão de 250 mL, adicionou-se 90 mL de água destilada e, em seguida, numa única porção, 0,29 g de botriosferana e 0,085g de NaBH₄. A mistura resultante foi mantida sob agitação à t.a. durante 24 h. Decorrido este tempo, foi adicionado 1 mL de ácido acético glacial concentrado e mantido sob agitação por 10 min (DE ARAÚJO et al., 2013).

Redução em meio homogêneo: 0,2 g de botriosferana foi solubilizado em 60 mL de NaOH 0,25 M. Depois foi adicionado à mistura homogênea, 2 g de NaBH₄. A mistura resultante foi mantida sob agitação à t.a durante 24h. Decorrido este tempo, foi adicionado 1,5 mL de ácido acético glacial concentrado e mantido sob agitação por 10min (SONG et al., 2009).

Purificação: A mistura foi dialisada em membrana de diálise de celofane, contra solução de NaCl 1M (24 h) e água destilada (96 h), e a mistura resultante foi concentrada por evaporação à pressão reduzida e seca por liofilização (DE ARAÚJO et al., 2013).

4.2 Carboximetilação da botriosferana

As amostras foram preparadas pelo nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais (LaSMMed). Em um balão de fundo redondo, que continha 0,106g de botriosferana nativa, foram adicionados 4mL do isopropanol e a mistura foi mantida sob agitação magnética, à t.a. durante 15 min. Em seguida, foi adicionado gota a gota 1,4 mL de NaOH à 20%. A mistura resultante foi vigorosamente agitada à t.a, durante 1 h. Depois foram adicionados 0,5 mL de ácido monocloroacético (MCA)(4 mol L⁻¹) e a mistura reacional foi mantida sob agitação em um banho de óleo (60 °C) durante 4 h. Decorrido este tempo, a mistura reacional foi neutralizada com solução de HCl 0,1 M. A mistura foi purificada de acordo com o item 4.1 (CHEN et al., 2010; XU et al., 2009).

4.2.1 Reações de sulfonação da botriosferana carboximetilada com o ácido clorossulfônico

Em um balão de fundo redondo de 125 mL, adicionou-se a botriosferana carboximetilada, e já sob atmosfera inerte, foram adicionadas formamida e piridina (1:1, ambas secas em peneira molecular), na proporção de 1 mL para cada 2,5 mg de botriosferana carboximetilada. Essa mistura foi mantida sob agitação magnética à t.a, durante 24 h. Decorrido o tempo acima, foi adicionado 0,8-4,0 mL de ácidoclorossulfônico (100-296 equivalentes/ unidade de glucose) gota a gota ao balão em banho de gelo, durante o tempo de 1 h. Após a adição, o balão foi mantido sob agitação à aproximadamente -4°C , durante 15-24 h. Em outra condição, o balão foi mantido sob agitação em um banho de 60°C durante 4 h. Decorrido esse tempo, a reação foi finalizada com a adição de aproximadamente 50 mL de gelo de água destilada e neutralização com solução saturada de bicarbonato de sódio. A mistura foi dialisada contra solução de NaCl 1 M (24 h) e água destilada(96 h) até se obter teste negativo para íons sulfato por precipitação com BaCl_2 , a solução resultante foi concentrada por evaporação à pressão reduzida e seca por liofilização (CHEN et al., 2010; MENDES et al., 2009).

4.3 Reação de sulfonação com o complexo trióxido de enxofre e piridina

A reação de sulfonação foi conduzida em meio heterogêneo e homogêneo.

Meio homogêneo: 0,03 g da botriosferana reduzida com NaBH_4 foram solubilizados em 15 mL de formamida e depois foi filtrada. A solução resultante da filtração foi colocada em um balão de 125 mL sob atmosfera inerte. Neste balão foram adicionados 0,23 g do complexo $\text{SO}_3\text{-Py}$ (24 equivalentes/unidade de glucose) e 0,067 mL de trietilamina (8 equivalentes/unidade de glucose). A mistura reacional resultante foi agitada à t.a. durante 7 h. Decorrido este tempo, adicionou-se solução de NaHCO_3 saturado, gota a gota, até a neutralização. Depois da neutralização, a mistura foi tratada com 3 volumes de etanol e o precipitado formado foi separado por centrifugação. Em seguida, o precipitado foi dissolvido em 10 mL de solução de tampão fosfato 0,025 M e pH 7,0 e, posteriormente, dialisada em solução de NaCl 1M (24 h) e água destilada (96 h). Após 120 h de diálise, a solução foi concentrada à pressão reduzida e liofilizada.

Meio heterogêneo: em um balão de 125 mL que continha 0,086 g da botriosferana reduzida com $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ foi adicionado 30 mL de DMF e 10 mL de piridina, sob ambiente

inerte de argônio, a mistura foi vigorosamente agitada à t.a. durante 48 h. Em seguida, foi adicionado à mistura 2 g do complexo SO₃-Py (24 equivalentes / unidade de glucose) e 0,6 mL de trietilamina (8 equivalentes / unidade de glucose). A mistura foi agitada à t.a. durante 48 h. Decorrido este tempo, adicionou-se solução de NaHCO₃ saturado, gota a gota, até a neutralização. A mistura resultante foi purificada de acordo com o item 4.1.

4.4 Sulfonação da botriosferana via éster de pivaloila

Em um balão de fundo redondo de 125 mL, adicionou-se 0,14g de botriosferana reduzida e a atmosfera foi ambientada com argônio. Em seguida, foi adicionado 20 mL de formamida e 5 mL de piridina secas. A mistura foi agitada até se notar que a maior parte da massa de polissacarídeo se solubilizou (48 h). Após este tempo, a mistura foi mantida à uma temperatura de 20°C e foram adicionados 0,17g de *N,N*-4-dimetilaminopiridina (4-DMAP), 9 mL de cloreto de pivaloila (PivCl) e 0,4g de dodecilsulfato de sódio (SDS). A mistura resultante foi agitada durante 24 h à t.a, depois colocada em banho de gelo, tratada com etanol e centrifugada. O precipitado obtido foi dissolvido em uma solução tampão de fosfato à pH 7. A mistura resultante foi submetida a precipitação com etanol e diálise descritas anteriormente (item 4.3). Em sequência, o produto obtido, depois de ser caracterizado por FT-IV e RMN, foi solubilizado em formamida (30 mL), e depois foram adicionados 5 mL de piridina e 0,25 g de complexo SO₃-Py (24 equivalentes / unidade de glucose). A mistura resultante foi agitada durante 17 h à t.a.; Depois foi neutralizada com bicarbonato de sódio, dialisada, tratada com etanol e centrifugada. O precipitado obtido foi liofilizado (DE ARAÚJO et al., 2013).

Desproteção: depois de ser caracterizado por FT-IV e RMN, o material resultante foi dissolvido em 20 mL de solução de NaOH 1 M e agitado durante 72 h à t.a e 1h à 50 °C. A solução resultante foi neutralizada com HCl até pH 7 e purificada (item 4.1). Em seguida foi caracterizado por FT-IV e RMN (DE ARAÚJO et al., 2013).

4.5 Sulfonação da botriosferana via acetnídeo

Em um balão de fundo redondo de 125 mL, contendo 0,08 g de botriosferana, adicionou-se 30mL de DMF, sob atmosfera inerte de argônio. A mistura foi agitada por 24 h à t.a. Uma mistura de 40 mL de acetona e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado foi adicionada. A mistura resultante foi aquecida sob refluxo com temperatura de 50-70°C, durante 24 h. Decorrido o tempo, a reação foi interrompida com adição de solução de NaHCO₃ saturado até a neutralização.

Posteriormente, a mistura foi purificada segundo os procedimentos relatados no item 4.1 (GREENE E WUTS, 2007).

Desproteção: depois de ser caracterizado por FT-IV e RMN, o material resultante foi dissolvido em 20 mL de solução de ácido p-toluenossulfônico 1 M e agitado durante 48 h à t.a. Depois deste tempo, a solução resultante foi neutralizada com solução de NaOH 1 M até pH 7 e purificada (item 4.1). Em seguida foi caracterizado por FT-IV (GREENE & WUTS, 2007).

4.6 Determinação do grau de substituição (DS)

4.6.1 Quantificação dos grupos sulfato (DSs)

No dia anterior à análise foram preparadas 4 soluções: HCl 1M, solução gelatina-bário (gelatina Oxoid 5 mgmL⁻¹, 3 horas antes da análise foram adicionados 5 mgmL⁻¹ de BaCl₂), Na₂SO₄ 1 mgmL⁻¹ em HCl 1M e TCA 3% (m/V). Para a curva analítica foram preparadas sete soluções de 5 mL, de quantidades de sulfato variadas e conhecidas (contendo 0-200 µg de SO₄²⁻), contendo 3,8 mL de TCA 3%, 1 mL de solução de gelatina-bário e 200 µL de HCl 1M. Uma massa conhecida de amostra sulfatada (1-1,4 mg) foi submetida à hidrólise com 1 mL de HCl 1M durante 5 h em estufa (110°C) em tubos vedados, próprios para hidrólise. Decorrido esse tempo foram preparadas soluções da amostra (3,8 mL de TCA 3%, 1 mL de solução gelatina-bário e 200 µL de amostra hidrolisada). A leitura foi realizada no espectrofotômetro em 360 nm, as soluções das amostras foram preparadas em triplicata (DODGSON; PRICE, 1962).

A partir da equação da reta da curva analítica e da média dos três valores de absorvância das amostras, foi possível determinar a quantidade de sulfato nas alíquotas de 200 µL. A porcentagem de enxofre em massa (S%) e o grau de substituição do polissacarídeo (DS) foram calculados a partir das seguintes fórmulas (DODGSON, 1961).

$$S\% = SO_4^{2-} (\mu g) \frac{0,1374 \times 100}{Amostra (\mu g)}$$

$$DS = \frac{162,14 \cdot S\%}{3200 - (102 \cdot S\%)}$$

4.6.2 Quantificação dos grupos carboximetil (DSc)

O grau de substituição dos derivados carboximetilados foi determinado pelo método titulação ácido-base.

Foram dissolvidos 200 mg da botriosferana carboximetilada (CM) em 100 mL de água destilada. A mistura foi agitada vigorosamente por 3 min e centrifugada. O sobrenadante na forma de um sal (CM-Na) foi convertido para forma ácida (CM-H) através de percolação em coluna de troca iônica (Amberlite IR-120) com um fluxo aproximadamente 3 mL/ min. Para construir a coluna foi usado uma seringa de 10 mL empacotada com resina. A solução CM-H foi eluída e depois a coluna foi lavada com 400 mL de água ultra-pura. O volume final (500 mL) foi concentrado em um rotaevaporador e liofilizado. O sólido obtido foi dissolvido em 100 mL de água destilada e misturado com 3 gotas de fenolftaleína, 2 mL de metanol e, 15 mL de NaOH 0,1N. A mistura resultante foi titulada com HCl 0,1N, usando 100 mL de água destilada como branco. O DSc foi calculado pela seguinte fórmula (TATONGJAI; LUMDUBWONG, 2010).

$$W_c = \frac{c \times M_c \times (V_b - V_s) \times 100\%}{m}$$

$$DS = \frac{W_c \times M_a}{(100\% - W_c) \times M_c}$$

4.7 Caracterizações espectroscópicas

4.7.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (TF-IV)

Os espectros TF-IV das amostras de 400 a 4000 cm^{-1} foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro TF-IV Bruker modelo Vertex 70, com acessório de refletância Platinum ATR no Laboratório de Química Prebiótica (LQP) do Departamento de Química da UEL. Os espectros também foram obtidos utilizando-se o espectrofotômetro TF-IV, marca Shimadzu, modelo IR PRESTIGE-21 e no espectrofotômetro TF-IV, marca Shimadzu modelo FTIR-8300. Quando apropriado, foram utilizadas pastilhas de KBr, previamente seco em estufa à 80 °C por 24 h. Para fabricação das pastilhas, utilizou-se 1 mg de amostra para 20 mg de KBr. Então, os sólidos foram homogeneizados e a mistura foi prensada na forma de uma pastilha. Os espectros foram analisados utilizando-se o programa OriginPro 9.0.

4.7.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os experimentos de RMN foram realizados em Espectrômetro Bruker Mod. Avance III operando a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da UEL. As amostras foram preparadas em solventes D_2O e DMSO-d_6 . A análise dos espectros foi feita utilizando-se o programa MestreNova-6.0.

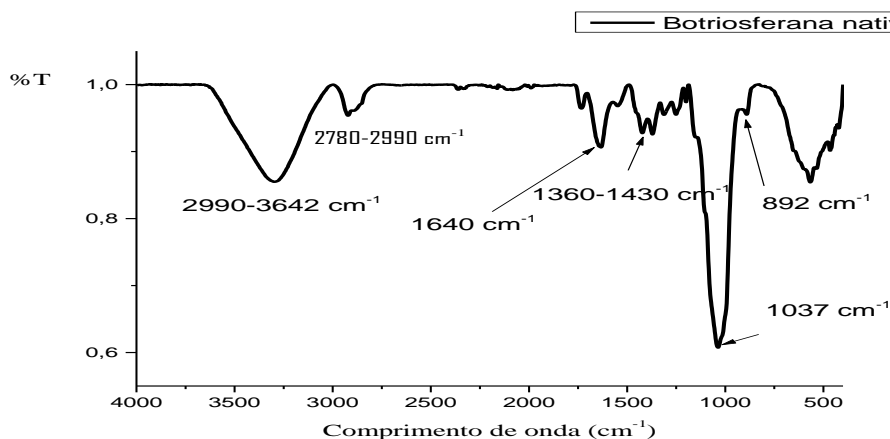
5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização estrutural da botriosferana

A botriosferana, uma glucana do tipo β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6) é constituída por quatro tipos de unidades classificados de acordo com o tipo de ligação que os monômeros de glucose realizam ao longo da cadeia ramificada. A cadeia principal (linear) é constituída por monômeros interligados, que correspondem à unidade \rightarrow 3)-Glc p -(1 \rightarrow . O monômero da cadeia linear que liga-se à ramificação correspondente à unidade \rightarrow 3,6)-Glc p -(1 \rightarrow . E as ramificações são constituídas por uma ou duas unidades β -D-Glc-(1 \rightarrow 6) (Figura 2, página 20).

A caracterização por espectroscopia de infravermelho (TF-IV) permitiu a identificação dos principais grupamentos químicos presentes na botriosferana (Figura 5). A banda de vibração do grupo hidroxila foi confirmada na região de 3600 à 3000 cm^{-1} . Na região de 2999 à 2780 cm^{-1} foi observada uma vibração de estiramento C-H. A banda intensa em 1640 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento do anel de glucose e também pode indicar a presença de moléculas de H₂O na estrutura. As deformações da vibração assimétrica dos grupos CH₂ e COH encontram-se na região de 1425 e 1362 cm^{-1} , respectivamente. A banda fortemente intensa em 1037 cm^{-1} refere-se à vibração de estiramento C-O de álcool e do anel da glucose. A banda de vibração que ocorre na região de 1040 e 890 cm^{-1} indica a presença de unidades de glucose interligadas por ligação glicosídica de configuração β . Estes resultados vão de acordo com o estudo realizado por Da Silva (DA SILVA et al., 2008).

Figura 5- Espectro na região do infravermelho (TF-IV) da botriosferana nativa

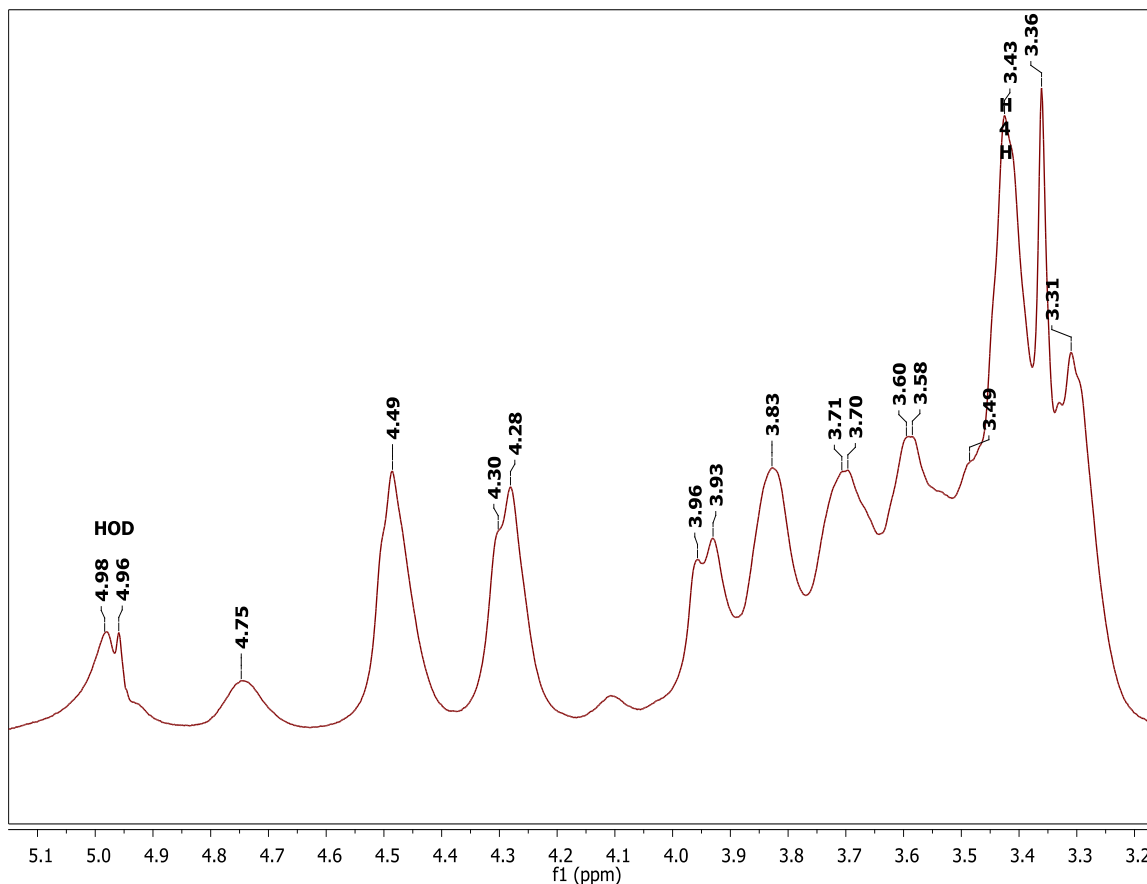


5.2 Caracterização da botriosferana por RMN 1D e 2D

O exopolissacarídeo botriosferana possui uma baixa solubilidade em água devido principalmente à sua conformação em tripla hélice. Para se obter uma boa intensidade dos sinais de RMN, antes da sua solubilização em D₂O, a botriosferana nativa foi inicialmente solubilizada em NaOH 0,25M, liofilizada e, posteriormente, dissolvida em D₂O. Este procedimento permitiu o rompimento da tripla hélice e, conseqüentemente, aumentou a solubilidade do EPS em água. Os sinais de RMN foram assinalados através dos espectros de RMN de ¹H, DEPT135, COSY e HSQC. É a primeira vez que foi realizada a caracterização da botriosferana em solução de NaOH e os espectros forneceram sinais mais evidentes que estudos prévios e informação muito detalhada, que pode ser comparada com o estudo realizado por Barbosa (BARBOSA et al., 2003).

Pelo espectro de RMN de ¹H (Figura 6) distinguem-se sinais em 4,75 (H-1) e 4,50 ppm (H-1') correspondentes aos hidrogênios anoméricos dos resíduos de glucose. Outros sinais característicos de polissacarídeos referem-se aos H-6, que surgem em 4,28 e 3,93 ppm. Através do espectro de COSY (Anexo 1), distinguem-se duas correlações em 4,28/3,83 e 3,93/3,73 que foram interpretadas no espectro de HSQC para atribuição dos respectivos carbonos (Figura 8). Depois de confrontar-se os espectros, foi possível identificar que a correlação (4,28/3,83) corresponde aos hidrogênios diastereotópicos (H6ab') metilênicos, pertencentes nas unidades →3,6)-GlcP-(1→ e β-D-GlcP-(1→6) enquanto que a correlação (3,93/3,73) corresponde aos hidrogênios (H-6ab) do grupo metilênico, pertencentes à unidade →3)-GlcP-(1→. Levando em consideração que o hidrogênio anomérico H-1 de uma α-glucana ocorre normalmente em 5,2 ppm (VAN LEEUWEN et al., 2008), estes resultados indicam claramente que a botriosferana é uma β-glucana, confirmando assim o que foi observado no espectro TF-IV.

Figura 6- Espectro de RMN de ^1H da botriosferana nativa em D_2O (NaOH 0,25 M)



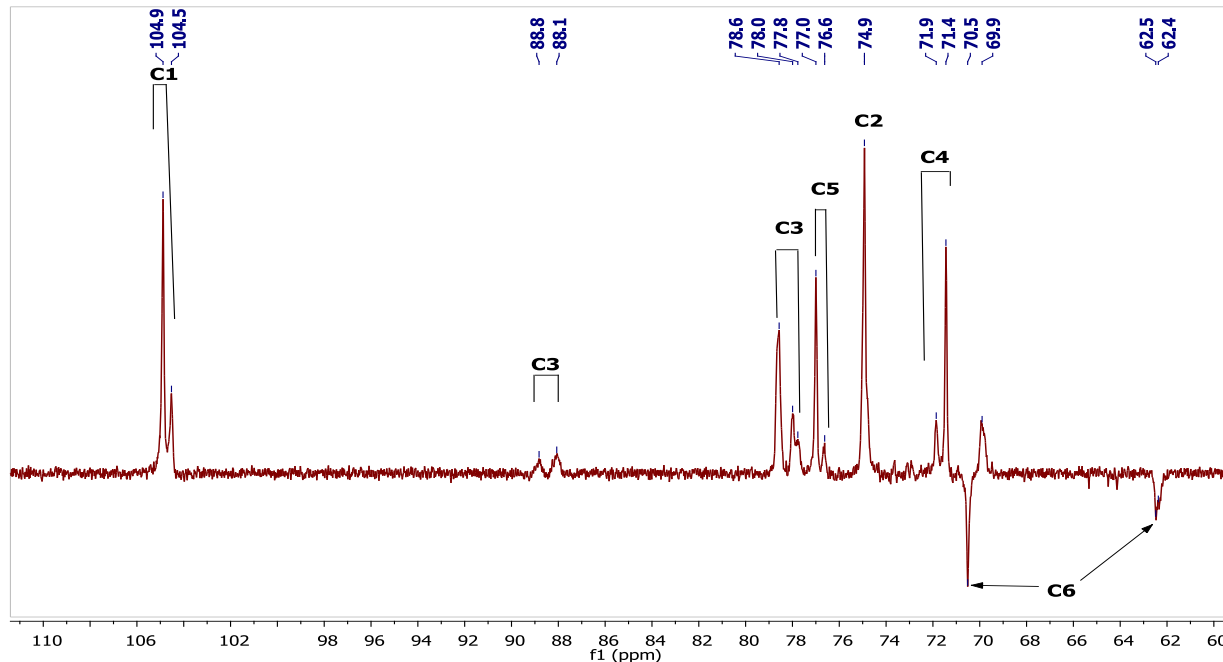
No espectro DEPT135 (Figura7) observam-se sinais de carbono que correspondem à 4 unidades de uma β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)-D-glucana: $\text{Glc}p$ -(1 \rightarrow , \rightarrow 6)- $\text{Glc}p$ -(1 \rightarrow , \rightarrow 3)- $\text{Glc}p$ -(1 \rightarrow e \rightarrow 3,6)- $\text{Glc}p$ -(1 \rightarrow . O sinal em 104,9 ppm, de maior intensidade, corresponde ao carbono anomérico da unidade \rightarrow 3)- $\text{Glc}p$ -(1 \rightarrow , o sinal em 104,8ppm é referente à unidade $\text{Glc}p$ -(1 \rightarrow . Os carbonos anoméricos das unidades 3,6)- $\text{Glc}p$ -(1 \rightarrow e \rightarrow 6)- $\text{Glc}p$ -(1 \rightarrow foram observados em 104,6 e 104,5 ppm, respectivamente. O sinal em 88,8 ppm é atribuído ao C-3 do resíduo \rightarrow 3)- $\text{Glc}p$ -(1 \rightarrow , enquanto que em 88,1ppm corresponde ao C-3 da unidade trissubstituída \rightarrow 3,6)- $\text{Glc}p$ -(1 \rightarrow . Os sinais de fase negativa no DEPT135 indicam a presença do grupo metileno (CH_2). O sinal em 70,5 ppm pertence ao C-6 substituído enquanto que em 62,4 ppm corresponde ao C-6 com OH livre. Outros sinais foram registrados em 78,6 (C-3 com OH livre); 77,0 (C-5); 74,9 (C-2) e 71,9 ppm (C-4) (Tabela 1). Os sinais de carbono registrados vão de acordo com os

resultados publicados pela BARBOSA e colaboradores (2003), assim confirmando-se que a botriosferana é uma β -glucana ramificada.

Tabela1- Deslocamento químico dos carbonos de todas unidades da botriosferna

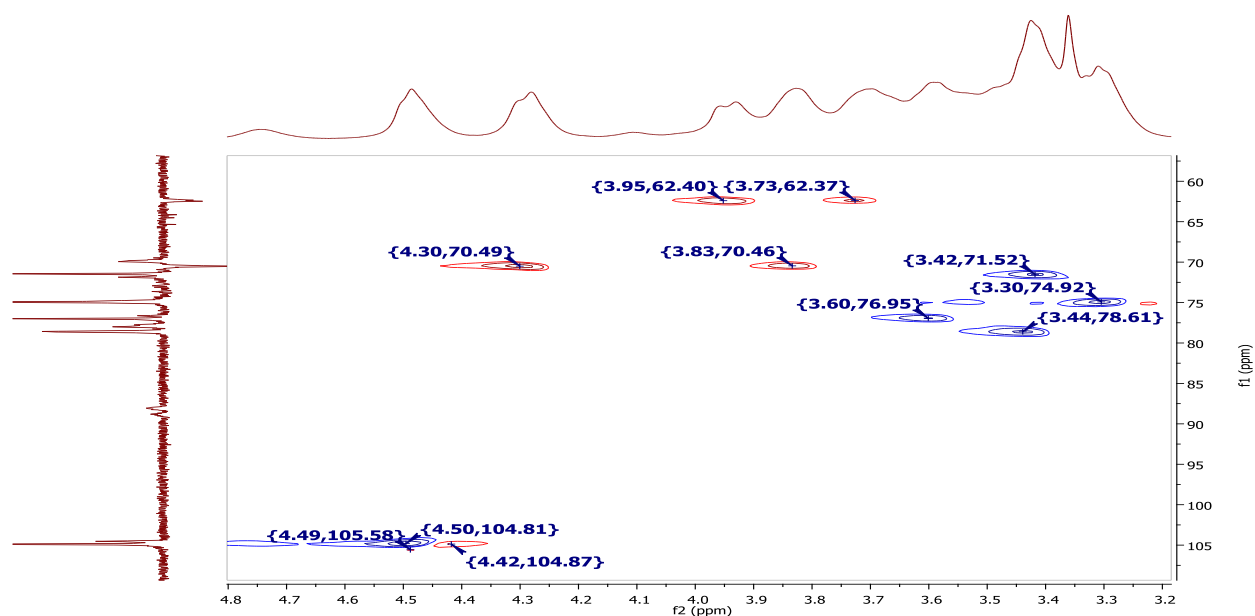
Unidades de Glucose	Deslocamento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
GlcP-(1→	104,8	74,8	78,6	71,9	77	62,5
→6)-GlcP-(1→	104,5	74,8	78	71,4	76,7	70,5
→3)-GlcP-(1→	104,9	74,9	88,8	69,9	77	62,5
						62,4
3,6)-GlcP-(1→	104,8	74,9	88,1	69,9	76,6	70,5

Figura 7- Espectro de RMN (DEPT135) da botriosferana nativa em D₂O (NaOH 0,25 M).



Todos os assinalamentos foram confrontados pelo espectro de HSQC (Figura 8). Nele, distinguem-se as correlações em 104,8/4,75 (C-1/H-1: *Glc*p-(1→) e em 104,9/4,5 (C-1/H-1: →3)-*Glc*p-(1→), que torna evidente tratar-se de uma β-glucana ramificada, onde os átomos de H e C anoméricos posicionados em unidades diferentes ressonam em frequências diferentes. As correlações em 70,5/4,30 e 70,5/3,83 ppm correspondem a C-6/H-6ab da unidade ramificada em C-6, enquanto que em 62,4/3,93 e 62,4/3,73 ppm correspondem a C-6/H-6ab das unidades sem ramificação. Os sinais de hidrogênio destas correlações condizem com a correlação observada em espectro de COSY (Anexo 1), assim confirmando-se mais uma vez a estrutura química do material em análise.

Figura 8- Espectro de HSQC da botriosferana nativa em D₂O (NaOH 0,25 M)



5.3 Derivatização da botriosferana

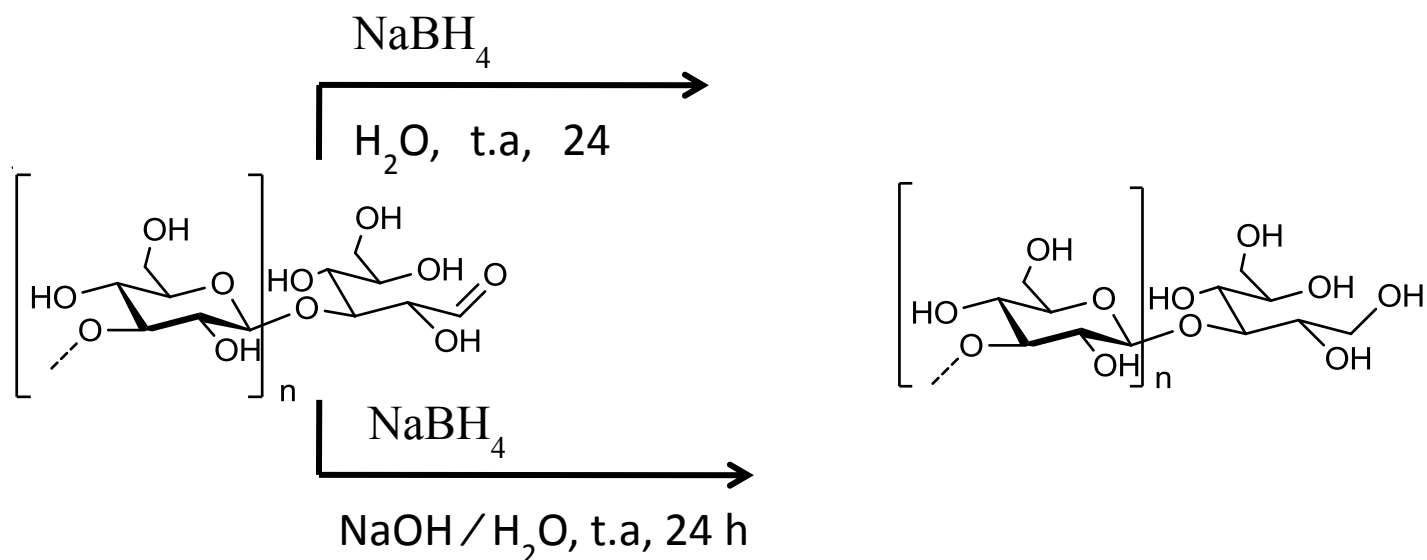
A maioria das unidades de glucose na botriosferana possui três grupos hidroxila livres. Estes grupos hidroxila estão envolvidos em ligações de hidrogênio, necessárias para manter a estrutura conformacional tripla hélice (GIESE et al., 2008). Devido à baixa solubilidade relacionada a essa conformação, para promover a modificação química foi necessário escolher uma mistura de solventes adequados, variar a temperatura e usar diferentes equivalentes dos agentes derivatizantes. Com a variação destes parâmetros de reação foi possível derivatizar a botriosferana em condições heterogêneas (mistura heterogênea na qual a maior parte do EPS permaneceu insolúvel no meio de reação) e homogêneas (mistura homogênea).

5.3.1 Redução da botriosferana nativa

A redução da botriosferana pode se fazer necessária quando se deseja que seus terminais redutores não interfiram nas reações que se destinam à modificação química de grupos hidroxila ao longo da sua cadeia. Foram utilizadas duas condições diferentes para reduzir a botriosferana. Na primeira condição, a redução ocorreu em uma solução aquosa de NaBH₄. A proporção das quantidades usadas foi de 1:1 ($m_{\text{botriosferana}}/m_{\text{NaBH}_4}$) (Esquema 6). A segunda condição consistiu primeiramente em solubilizar a botriosferana em uma solução de NaOH 0,25M e, em seguida, adicionou-se à mistura homogênea formada, um excesso (2 g) de NaBH₄ (4 equivalentes/unidade

de glucose). A botriosferana resultante da redução com $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ mostrou-se mais solúvel que a botriosferana reduzida somente com o NaBH_4 .

Esquema 6- Representação da reação de redução da botriosferana



Os produtos resultantes da redução foram submetidos às reações de derivatização que serão abordadas a seguir.

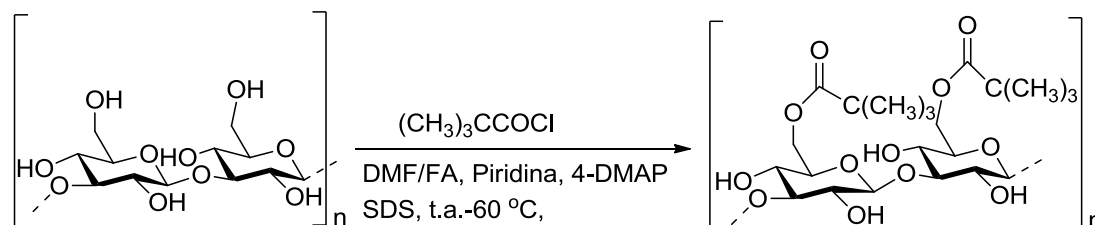
5.3.2 Sulfonação da botriosferana

De modo a se inserir grupos sulfato em posições específicas da sua estrutura, o polissacarídeo foi primeiramente protegido na forma de éster de pivaloila ou acetonídeo. Outros derivados foram preparados por carboximetilação e sulfonação branda.

5.3.3 Proteção regiosseletiva da botriosferana com cloreto de pivaloila

Primeiramente, a botriosferana foi submetida à reação de proteção dos grupos hidroxila da posição 6 com o grupo pivaloila, antes da sulfonação. A reação de proteção foi realizada em diferentes condições reacionais. Foi usado formamida (FA) ou DMF como solvente, piridina como base, 4-DMAP como catalisador e o SDS como tensoativo. O cloreto de pivaloila (PivCl) foi usado como agente derivatizante (Esquema 7).

Esquema 7- Representação da reação de esterificação com PivCl



Na entrada 1 da tabela 2, mostra-se que a reação foi conduzida à temperatura ambiente, com 150 equivalentes moles de PivCl durante 24 h. Nestas condições não foi formado nenhum produto reacional. O sucesso da reação foi alcançado quando mudou-se as condições reacionais. Na entrada 2, elevou-se a quantidade de PivCl para 200 equivalentes, manteve-se o tempo reacional e a temperatura foi aumentada para 60 °C durante 1 h. Nas entradas 3-5, a quantidade do PivCl foi reduzida quase à metade, foi usado o tenso ativo SDS e a reação foi conduzida à t.a. Na entrada 4, a reação passou por dois ciclos de proteção.

Tabela 2- Testes de variação das condições de reação de proteção com PivCl

Entradas	Equivalente ^a	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Rendimento ^b	SDS	Amostras
1	150	t.a.	24	-	Não	-
2	200	t.a.→60	23→1	26	Não	Piv 1
3	82	t.a.	62	56	Sim	Piv 2
4 ^c	82	t.a.	48	25	Sim	Piv 3
5	75	t.a.	48	100	Sim	Piv 4

^a número de equivalentes em relação a cada unidade de glucose do polissacarídeo.

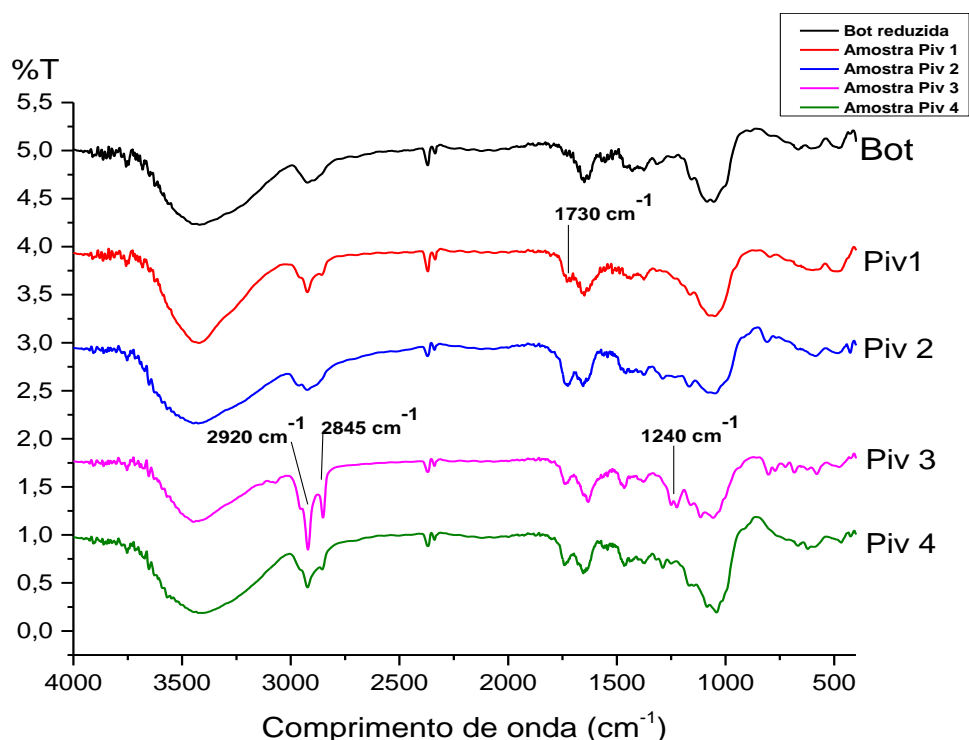
^b rendimento relativo à massa de polissacarídeo recuperada.

^c realizada em dois ciclos de proteção.

As amostras protegidas pelos grupos pivaloila foram caracterizadas pela espectroscopia de TF-IV e comparadas ao espectro da botriosferana reduzida (figura 9). A banda de vibração assimétrica de estiramento C=O característica dos ésteres apareceu com menor intensidade na região 1730 cm⁻¹ para a amostraPiv1 (Figura 9). O espectro de TF-IV da amostraPiv2 mostrou

uma banda de estiramento C=O na mesma região, um pouco mais intensa se comparada ao espectro da amostra Piv1 (Figura 9). No mesmo espectro, foi observada uma sobreposição de bandas na região 1300-1100 cm^{-1} . Dentro desta região, é comum o aparecimento de banda de vibração assimétrica de estiramento C-O do grupo éster, que normalmente observa-se em 1240 cm^{-1} . No espectro da amostra Piv3 (Figura 9), a banda de vibração O-H em torno de 3400 cm^{-1} tornou-se mais estreita, e a banda de vibração assimétrica e simétrica de estiramento C-H em 2920 cm^{-1} e 2845 cm^{-1} , tornou-se mais intensa. A banda de estiramento C=O desta amostra apareceu com menor intensidade em 1730 cm^{-1} . O espectro da amostra Piv4 (Figura 9) mostrou uma banda de estiramento de C=O de menor intensidade em 1730 cm^{-1} e uma banda um pouco mais intensa devido a vibração de estiramento C-H na região 2920-2845 cm^{-1} . Os resultados relatados indicam a presença dos grupos carbonila e *t*-butila, provenientes do agente derivatizante PivCl, na estrutura da botriosferana.

Figura 9- Espectros TF-IV das amostras Piv1 à 4, comparados ao espectro TF-IV da botriosferana reduzida



No entanto, para uma melhor caracterização do grupo protetor ligado à estrutura da botriosferana, as amostras foram conduzidas à análise por RMN 1D e 2D.

O grupo pivaloila foi confirmado pelos espectros de RMN de ^1H (Anexo 2), ^{13}C (Figura 10) e HSQC (Figura 11). O espectro HSQC (amostraPiv1, Figura 11) mostrou correlação em 1,01/26,6 ppm, que indica a presença das metilas ($-\text{CH}_3$) do grupo pivaloila. No espectro de RMN de ^{13}C (amostraPiv1) (Figura 10) foi observado o sinal do carbono quaternário do grupo pivaloila em 39,1 ppm, próximo ao sinal do solvente DMSO- d_6 , e um sinal de menor intensidade em 180,7 ppm pertencente à carbonila ($\text{C}=\text{O}$) da função éster. Ainda pelo espectro HSQC, foi possível distinguir uma correlação muito importante em 3,54/60,3 e 3,45/62,44 ppm, correspondente a H-6/C-6. Este resultado indica que a correlação 3,54/60,3 corresponde ao C-6 não substituído e a correlação 3,45/62,44 refere-se à C-6 substituído pelo grupo pivaloila, que tende a aparecer em maior deslocamento químico. A presença do sinal de C-6 em 60,3 ppm indica que as hidroxilas na posição 6 da botriosferana estão parcialmente substituídas pelo grupo pivaloila. Quando este sinal desaparece e um novo sinal aparece em maior deslocamento químico, a substituição pelo grupo pivaloila foi completa. Os sinais dos carbonos C-2 e C-4, comparados aos sinais da botriosferana nativa, não sofreram nenhuma mudança, pois aparecem em regiões características. Isto indica que a substituição pelo grupo protetor não aconteceu em C-2 e nem em C-4. Esta diferença corrobora com a ordem de reatividade dos grupos hidroxila. O grupo OH-6, que é um álcool primário, é o menos impedido estericamente, consequentemente, mais reativo que grupos OH-2 e OH-4. Desta forma, a modificação regiosseletiva foi possível devido ao efeito estérico promovido pelo grupo pivaloila (DE ARAÚJO et al., 2013; GAO et al., 1997).

Figura 10- Espectro de RMN- ^{13}C da amostra Piv 1 em DMSO- d_6

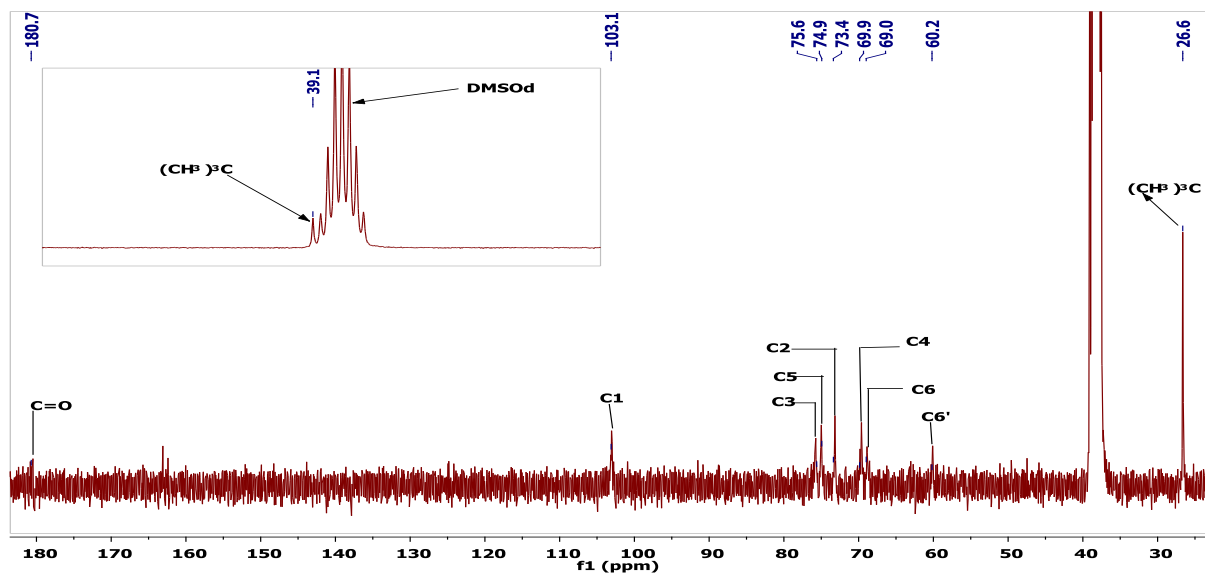
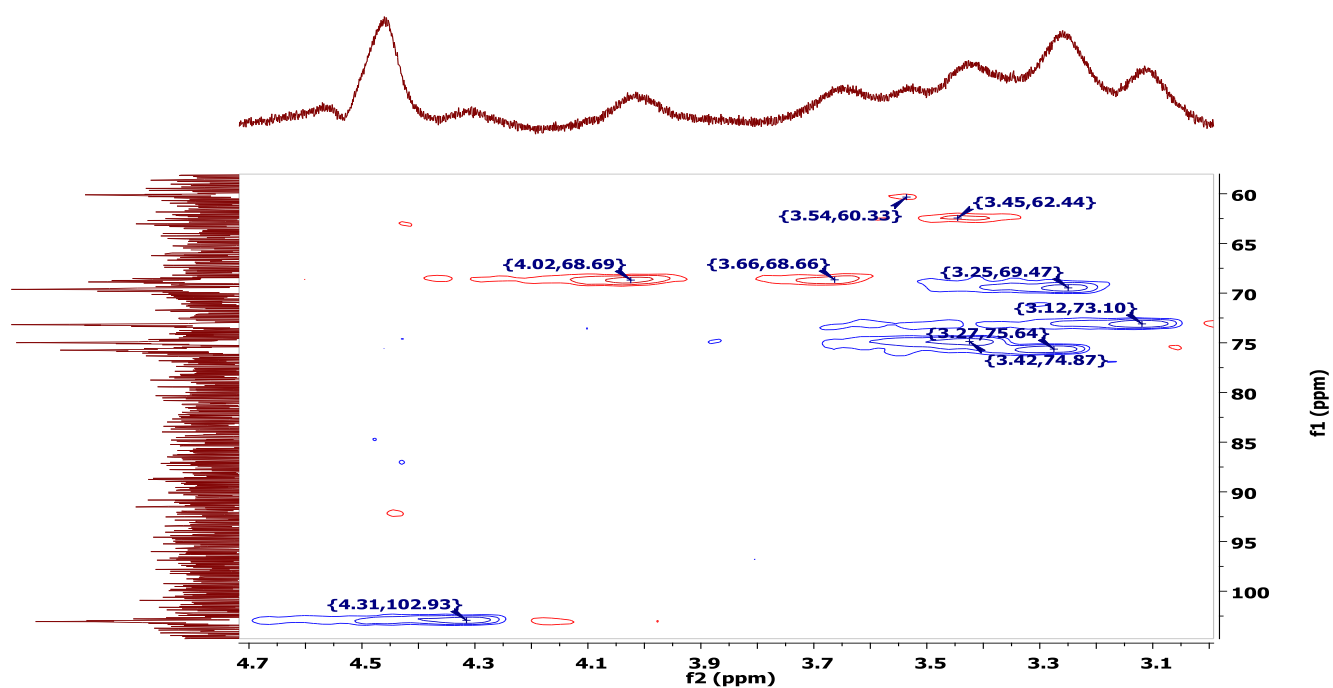


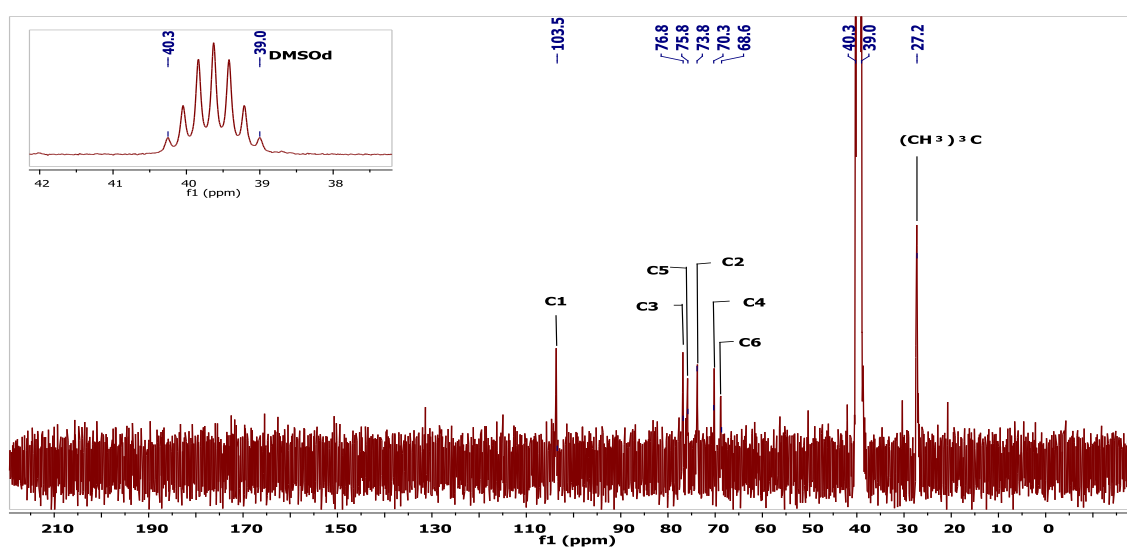
Figura 11- Recorte do espectro de HSQC da amostra Piv1 em DMSO- d_6



A amostra Piv2 foi caracterizada por RMN de ^1H e ^{13}C . O espectro de RMN de ^1H (Anexo 3) mostrou o sinal em 1,01 ppm, atribuído aos hidrogênios metílicos do grupo *t*-butila. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 12) foi observado um sinal intenso em 27 ppm, atribuído ao carbono dos grupos metila pertencentes ao grupo *t*-butila, entretanto, não foi possível observar o

carbono quaternário do grupo *t*-butila. Não foi observado o sinal de C-6 não substituído, que geralmente é observado aproximadamente em 60,3 ppm. A ausência deste sinal pode indicar que os grupos OH-6 foram completamente substituídos. Não foi observado o sinal da carbonila, possivelmente devido à necessidade de maior acúmulo de aquisições no RMN para este grupo. Foram observados sinais em, 103,5 (C-1), 76,8 (C-3), 75,8 (C-5), 73,8 (C-2), 70,3 (C-4) e 68,9 ppm (C-6), atribuídos aos carbonos das unidades de glucose (Figura 12).

Figura 12 Espectro de RMN de ^{13}C da amostra Piv 2 em DMSO-d_6



A amostra Piv 3, devido a menor massa recuperada, não foi caracterizada por RMN. A amostra Piv 4 foi caracterizada por RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC. O espectro de RMN de ^1H (Anexo 4) mostrou um intenso sinal em 1,22 ppm, atribuído aos hidrogênios metílicos do grupo *t*-butila. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 13) foi observado um sinal intenso em 29,5 ppm, atribuído ao carbono dos grupos metila pertencentes ao grupo *t*-butila, entretanto, não foi possível distinguir o carbono quaternário do grupo *t*-butila. O espectro HSQC (Figura 14) mostrou correlação em 1,22/29,5 ppm, assim confirmando a presença dos grupos metila ($-\text{CH}_3$). Pelo espectro de RMN de ^{13}C foi observado um sinal de baixa intensidade em 61,3 atribuído ao C-6 não substituído e, foi observado a presença de um sinal de elevada intensidade em torno de 66,1 ppm. No espectro de HSQC (Figura 14), o sinal em 66,0 ppm faz correlação com o sinal de H-6 em 3,68 ppm. A baixa intensidade do sinal em 61,3 ppm e o aparecimento de um novo sinal com maior intensidade em 66,0 ppm indicam claramente que a substituição em C-6 pelo grupo pivaloila foi

completa. Estes resultados vão de acordo com o estudo realizado por GAO et al.; 1997 e DE ARAÚJO et al.; 2013. Segundo estes autores, o grau de substituição em OH-6 livre é aproximadamente igual à 1, indicando que todas as posições deste carbono encontram-se ocupadas pelo grupo pivaloila. Foram observados sinais em 103,6 (C-1), 76,9 (C-3), 75,9 (C-5), 73,8 (C-2), 70,2 (C-4) e 68,8 ppm (C-6), atribuídos aos carbonos das unidades de glucose (Figura 13).

Figura 13- Espectro de RMN-¹³C da amostra Piv 4 em DMSO-d₆

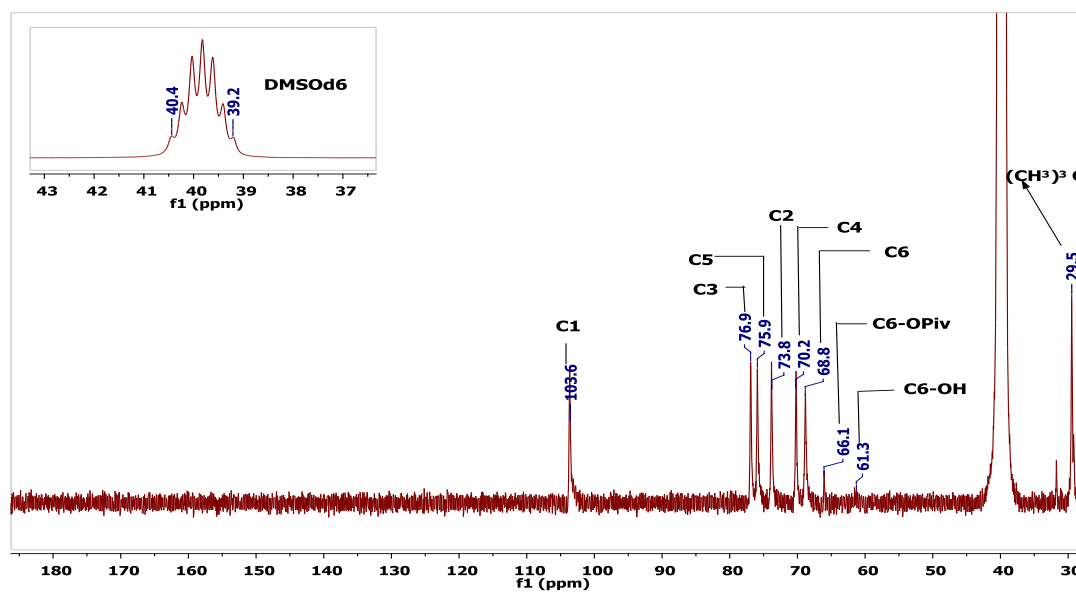
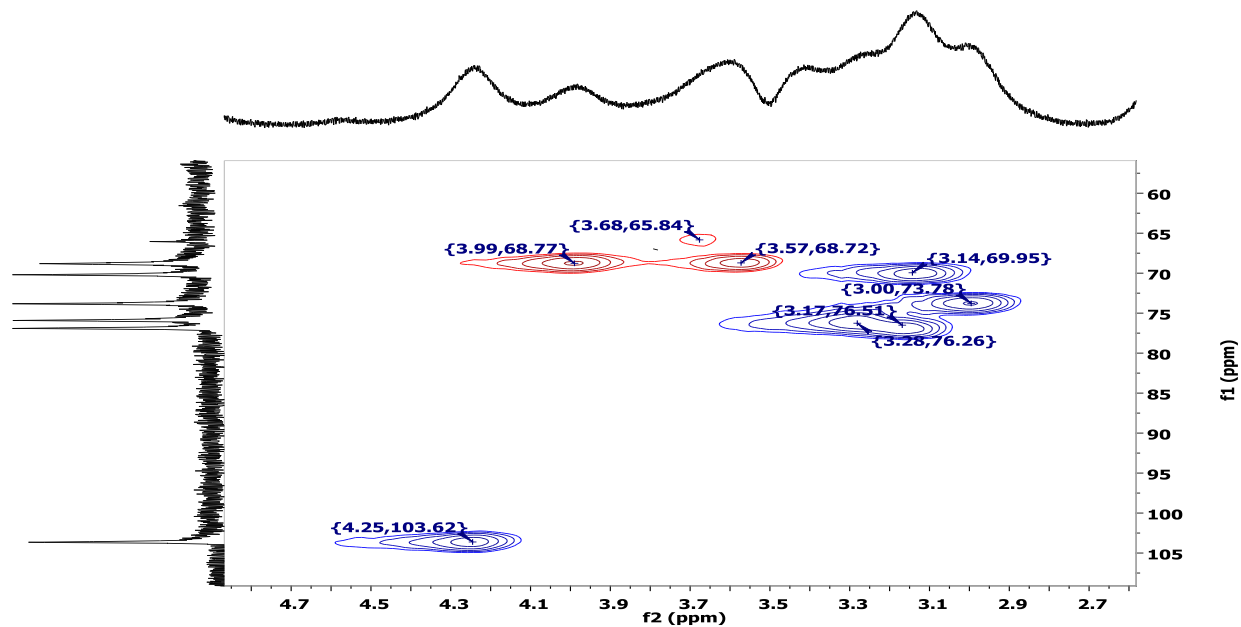


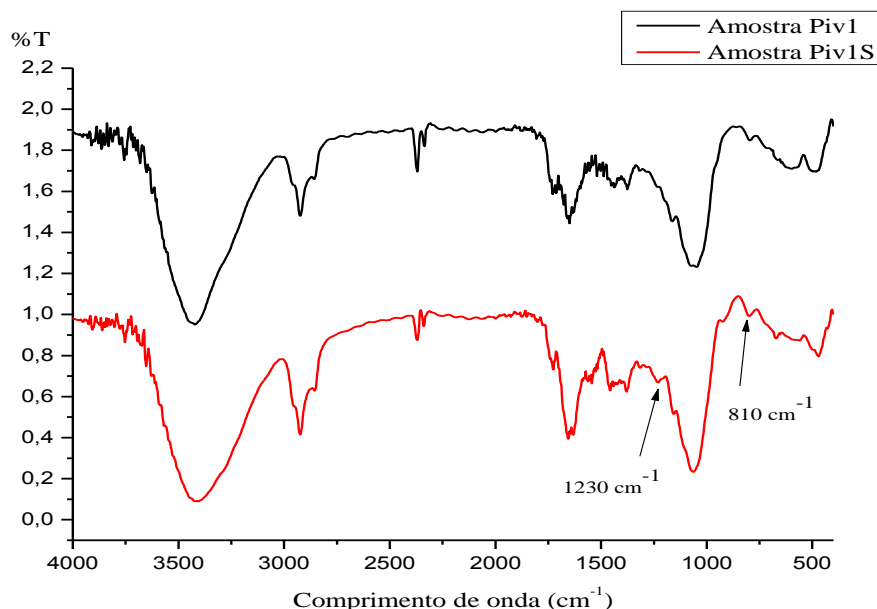
Figura 14- Espectro de HSQC da amostra Piv 4 em DMSO-d₆



5.3.3.1 Sulfonação regioseletiva da amostra Piv 1

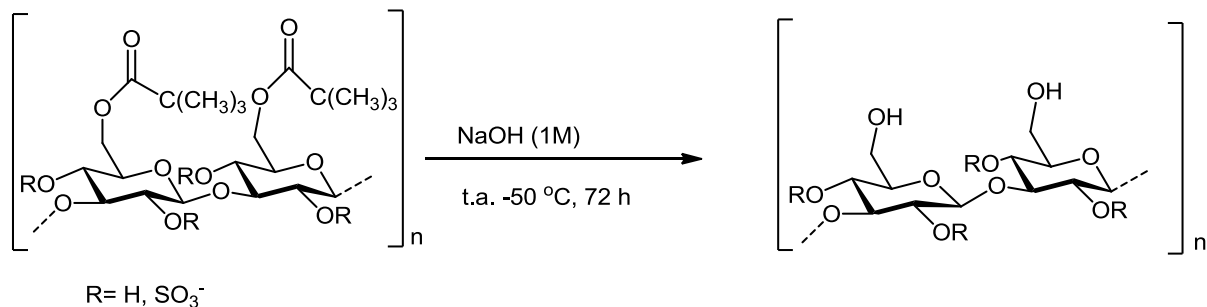
Devido à caracterização mais completa da amostra Piv 1, esta foi escolhida para a sucessiva derivatização. A reação de sulfonação da amostra Piv 1 começou com o processo de solubilização em formamida. Dada a baixa solubilidade, foi adicionado piridina e DMSO e a temperatura foi mantida a 50 °C. A sulfonação foi conduzida com o complexo SO₃-Py à t.a. O produto formado (amostra Piv 1S) foi primeiramente caracterizado por TF-IV, onde foi possível observar bandas de menor intensidade de vibração assimétrica de estiramento S=O e simétrica de estiramento C-O-S em 1230 e 810 cm⁻¹, respectivamente, indicando a presença de grupos sulfato ligados à estrutura do polissacarídeo (Figura 15).

Figura 15- Espectro de TF-IV da amostra Piv1S, comparado ao espectro TF-IV da amostra Piv 1



5.3.3.2 Desproteção da amostra Piv 1S

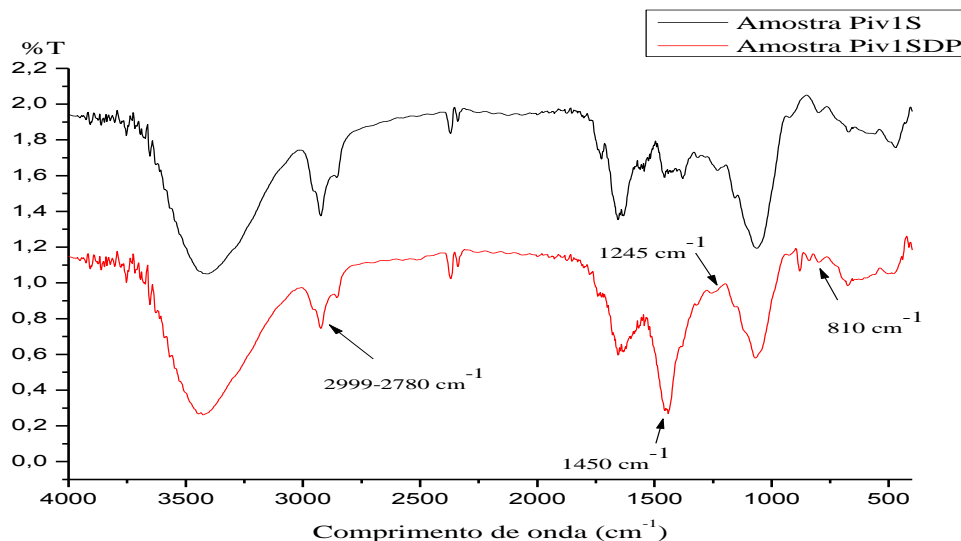
Esquema 8- Representação da reação de desproteção da amostra Piv 1S



A amostra Piv 1S foi agitada vigorosamente em solução de NaOH 1M durante 72 h com uma variação de temperatura (t.a. -50 °C). O NaOH foi utilizado para remover o grupo protetor. O espectro de TF-IV (Figura 16) do produto da reação de desproteção (Amostra Piv 1SDP), mostrou uma banda intensa em 1450 cm⁻¹ que provavelmente deve ser devido à vibração de estiramento C-O e, a banda de estiramento C-H na região 2999-2780 cm⁻¹ reduziu de intensidade. No espectro de RMN de ¹H, observou-se a permanência do sinal de H metílico em 1,0 ppm de menor intensidade comparado ao espectro da amostra Piv1S (Anexo 5). Estes

resultados indicam que a desproteção foi parcial, uma vez que, a amostra Piv1SDP ganhou solubilidade e parte dos grupos protetores permaneceu.

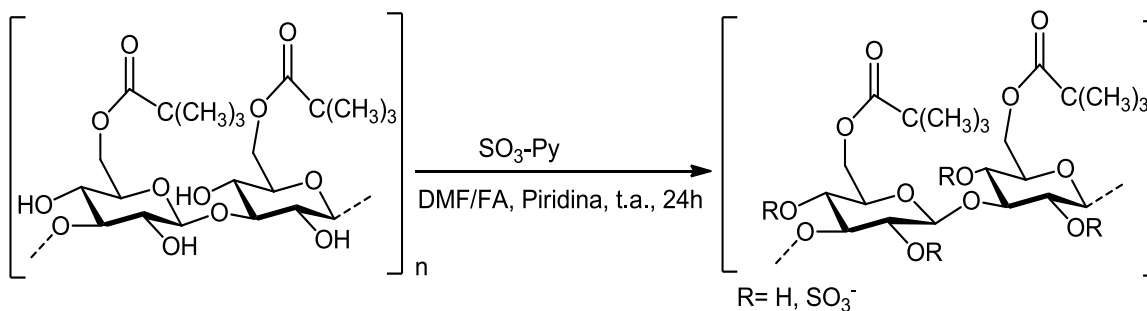
Figura 16- Espectro de TF-IV da amostra Piv1SDP, comparado ao espectro TF-IV da amostra Piv1S



5.3.4 Sulfonação regiosseletiva da amostra Piv 4

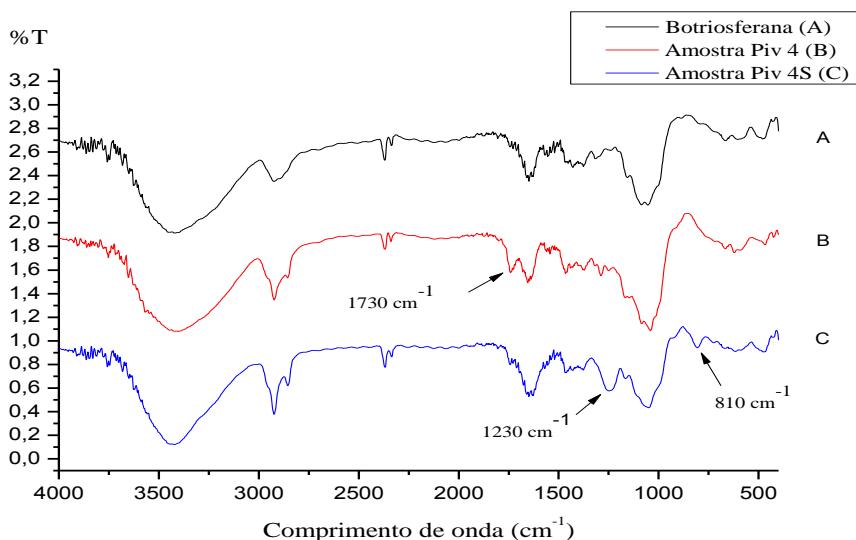
O derivado pivaloila (amostra Piv 4) apresentou uma melhor solubilidade em formamida, por isso, a sulfonação rendeu um bom resultado. Foram utilizados 24 equivalentes do complexo SO₃-Py/unidades de glucose .

Esquema 9- Representação da reação de sulfonação da amostra Piv 4

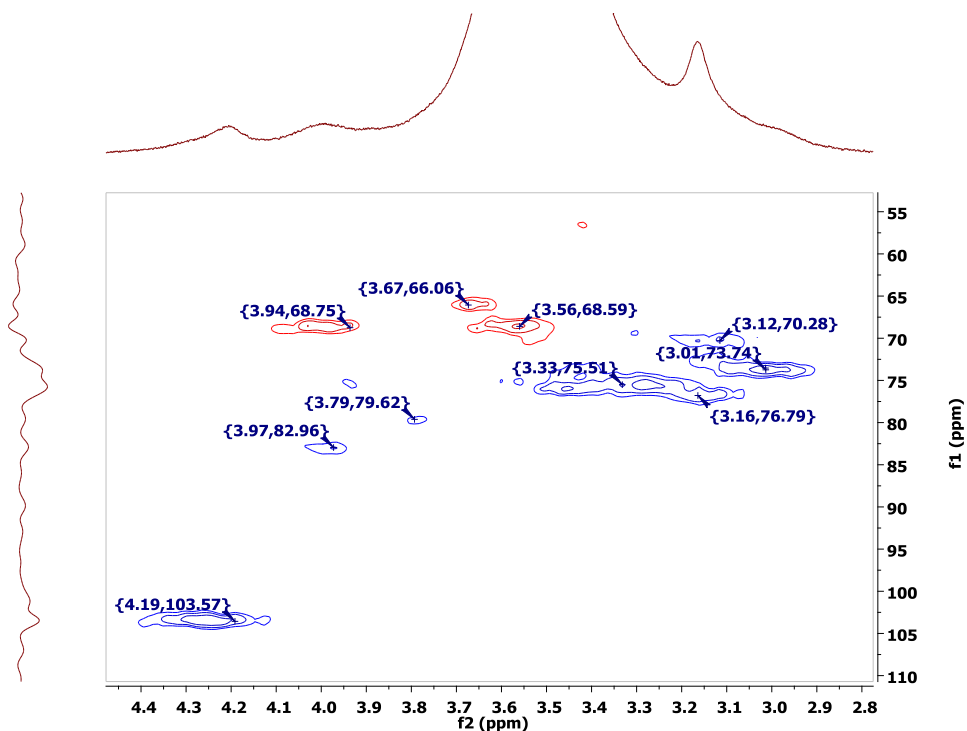


O produto resultante foi caracterizado por TF-IV, onde observou-se uma intensa banda em 1230 cm^{-1} , atribuída à vibração assimétrica de estiramento S=O, e em 810 cm^{-1} foi observada a banda de vibração simétrica de estiramento C-O-S, indicando a presença do grupo sulfato na estrutura do derivado pivaloila (Figura 17).

Figura 17- Espectro de TF-IV da amostra Piv 4S (C), comparado ao espectro TF-IV da amostra Piv4 (B) e botriosferana (A)



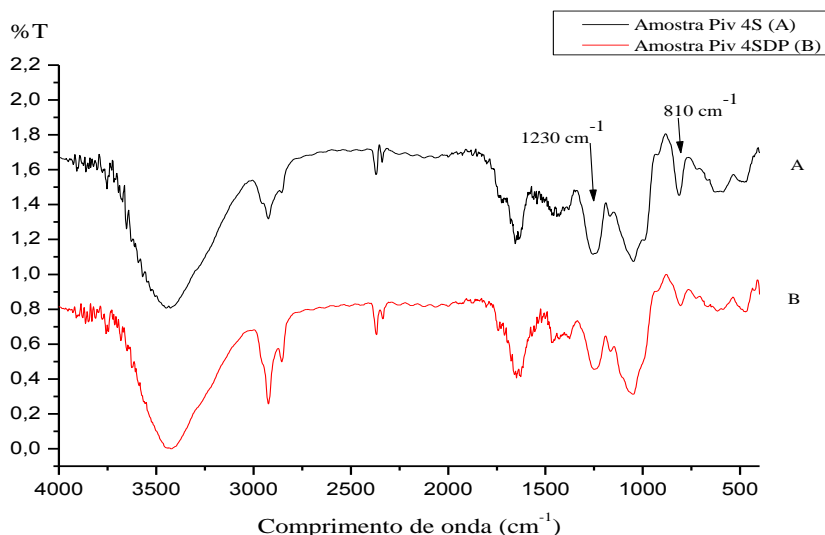
No espectro HSQC (figura 18) do derivado pivaloila sulfatado comparado ao espectro HSQC (Figura14) do derivado pivaloila, foram observados novos sinais em determinadas regiões que podem indicar a presença do grupo sulfato na estrutura. A correlação em $3,79 / 79,6\text{ ppm}$ apareceu devido a substituição da OH-4 pelo grupo sulfato. E a correlação em $3,97 / 83,0\text{ ppm}$ deve-se à presença do grupo sulfato no C-2. Estes resultados indicam que a sulfonação regioseletiva ocorreu com sucesso preferencialmente nas posições de C-2 e C-4.

Figura18- Espectro de HSQC da amostra Piv 4S em DMSO-d₆

5.3.4.1 Desproteção da amostra Piv 4S

A reação de desproteção da amostra Piv 4S foi realizada em solução de NaOH 1M durante 72 h à t.a. e 1 h em banho (55 -60 °C). O produto resultante foi caracterizado por TF-IV e foi possível detectar a presença de bandas características do grupo pivaloila (Figura 19). Estes resultados podem indicar que a desproteção não ocorreu com sucesso. A caracterização deste produto por RMN permitirá uma melhor análise da desproteção.

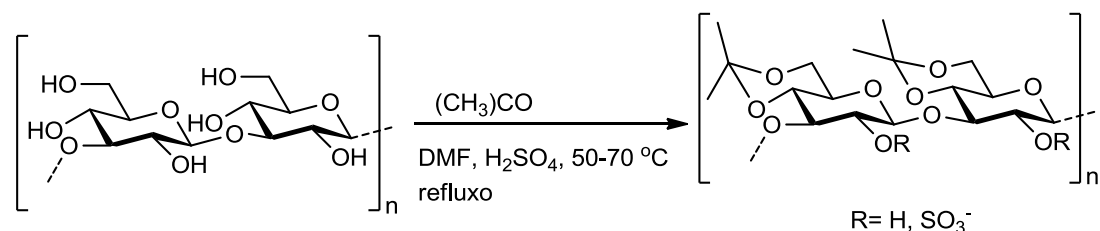
Figura 19- Espectro de TF-IV da amostra Piv 4S (A), comparado ao espectro TF-IV da amostra Piv 4SDP (B)

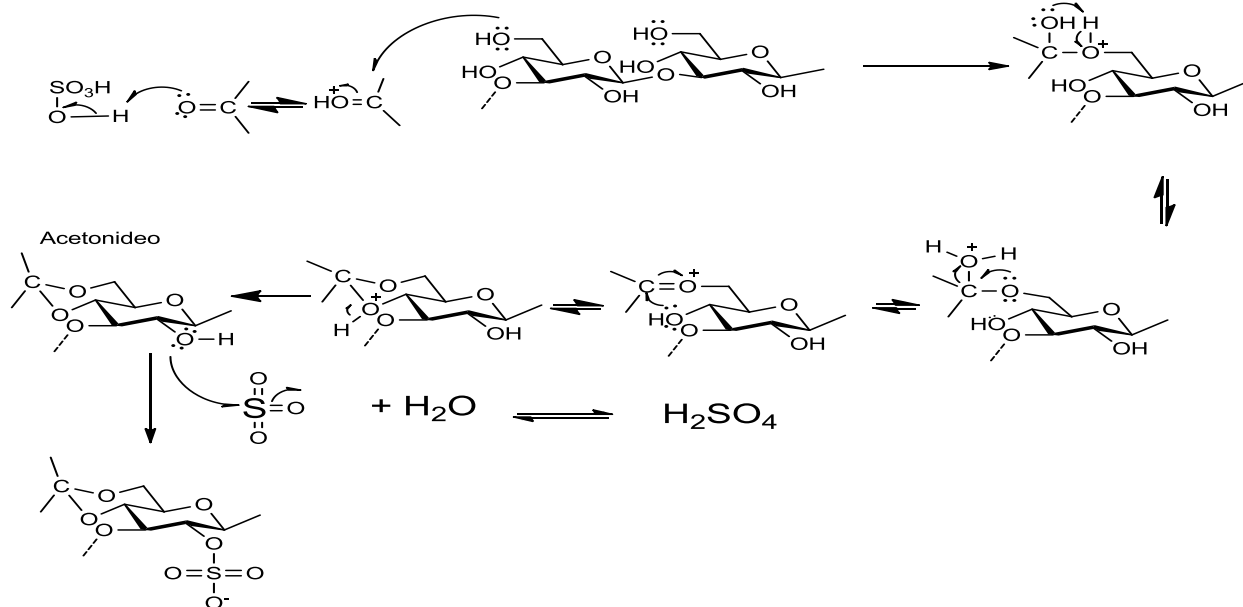


5.3.5 Modificação regioseletiva da botriosferana via acetonídeo

A botriosferana foi modificada na presença do agente derivatizante acetona e do ácido sulfúrico diluído como catalisador sob condições de refluxo (Esquema 10). A catálise com ácido *p*-toluenossulfônico não ocorreu com sucesso, por essa razão, recorreremos ao ácido sulfúrico diluído. O próton doado pelo ácido torna a acetona mais reativa, assim favorecendo o ataque pelo grupo hidroxila menos impedido estericamente (OH-6) e, conseqüentemente, a hidroxila secundária na posição 4 (OH-4), promove o fechamento do anel de 6 átomos para formar um cetal. Entretanto, o H_2SO_4 em solução encontra-se em um equilíbrio dinâmico com o trióxido de enxofre (SO_3), um eletrófilo, sendo assim, somente as hidroxilas desprotegidas OH-2, podem atacar o SO_3 , levando à formação de um polissacarídeo protegido na forma de acetonídeo e, adicionalmente, sulfatado na posição OH-2 (Esquema11).

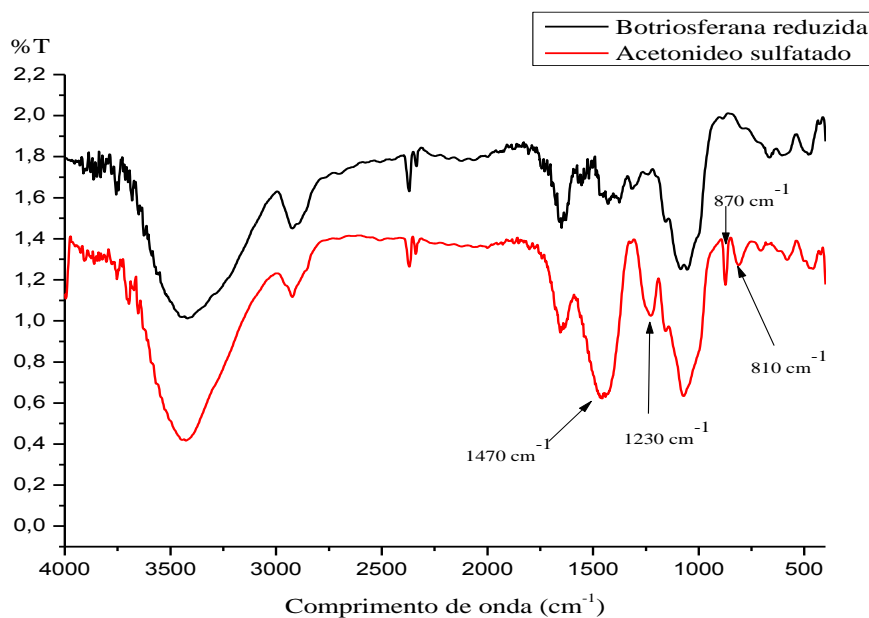
Esquema 10- Representação da reação de formação do acetonídeo sulfatado de botriosferana



Esquema 11- Mecanismo de formação do acetônio sulfatado de botriosferana

No espectro de TF-IV (Figura 20) do derivado acetônio sulfatado, comparado àquele da botriosferana, é possível identificar novas bandas que indicam tratar-se de um composto diferente do material de partida. A banda intensa que apareceu em 1470 cm^{-1} é atribuída à vibração assimétrica do estiramento C-O do anel cetálico. A banda em 1230 cm^{-1} é atribuída à vibração assimétrica do estiramento S=O e em 810 cm^{-1} é atribuída à vibração simétrica do estiramento C-O-S, correspondente ao grupo C-O-SO₃. Estes resultados indicam que a botriosferana foi transformada em acetônio sulfatado. Neste caso, seria necessário a caracterização por RMN. Todavia, a baixa solubilidade da amostra em D₂O e DMSO-d₆ impossibilitou a análise por RMN e não foi encontrado na literatura um modelo para fundamentar a sua caracterização.

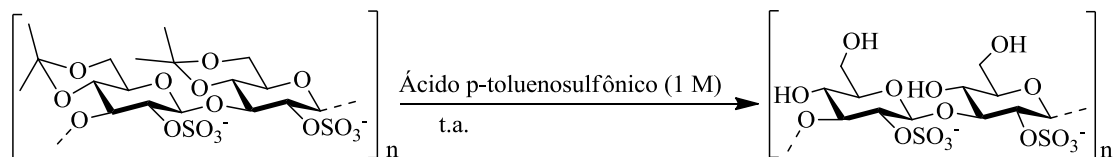
Figura 20- Espectro TF-IV do acetônio sulfatado comparado ao espectro da botriosferana reduzida



5.3.5.1 Desproteção do acetônio sulfatado

Foi utilizado ácido *p*-toluenossulfônico aquoso para desproteger o acetônio sulfatado. O átomo de oxigênio na posição 4 das unidades de glucose protegidas é protonado, assim transformando-se num bom grupo abandonador. Sua ligação com o carbono cetálico é rompida, desencadeando o mecanismo inverso da reação de proteção. O esquema 12 ilustra a reação de desproteção.

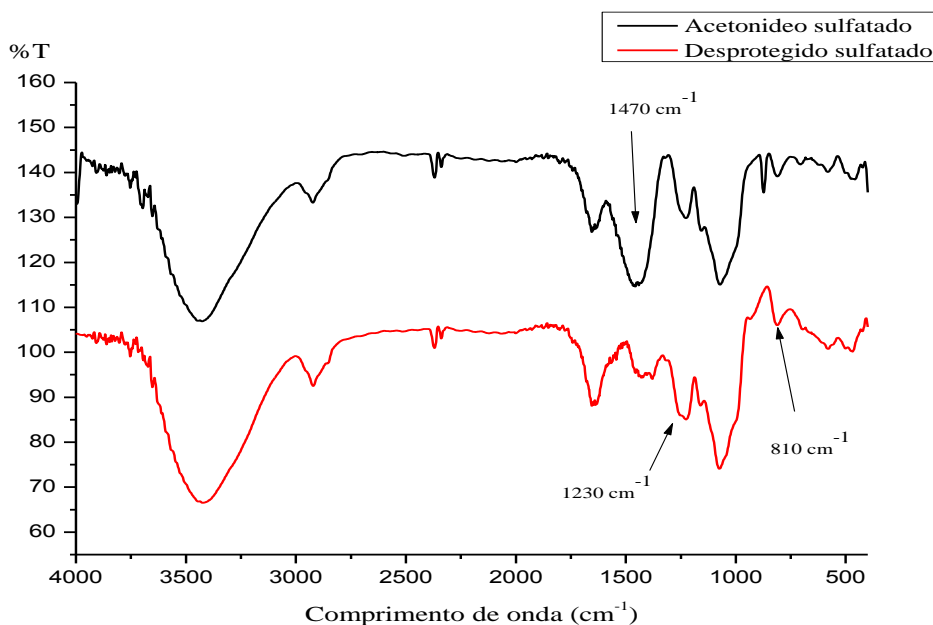
Esquema 12- Representação da reação de desproteção do acetônio sulfatado



No espectro TF-IV (Figura 21) da amostra desprotegida sulfatada, observou-se a permanência da banda de vibração assimétrica de estiramento S=O em 1230 cm^{-1} e simétrica de estiramento C-O-S em 810 cm^{-1} . Comparado ao espectro do acetônio sulfatado, notou-se a ausência da banda de vibração de estiramento C-O do anel cetálico em 1470 cm^{-1} . Estes resultados indicam que a

desproteção ocorreu com sucesso e o produto resultante, é um derivado da botriosferana sulfatado.

Figura 21- Espectro TF-IV da amostra desprotegida e sulfatada, comparado ao espectro da botriosferana precursora, na forma de acetônio sulfatado



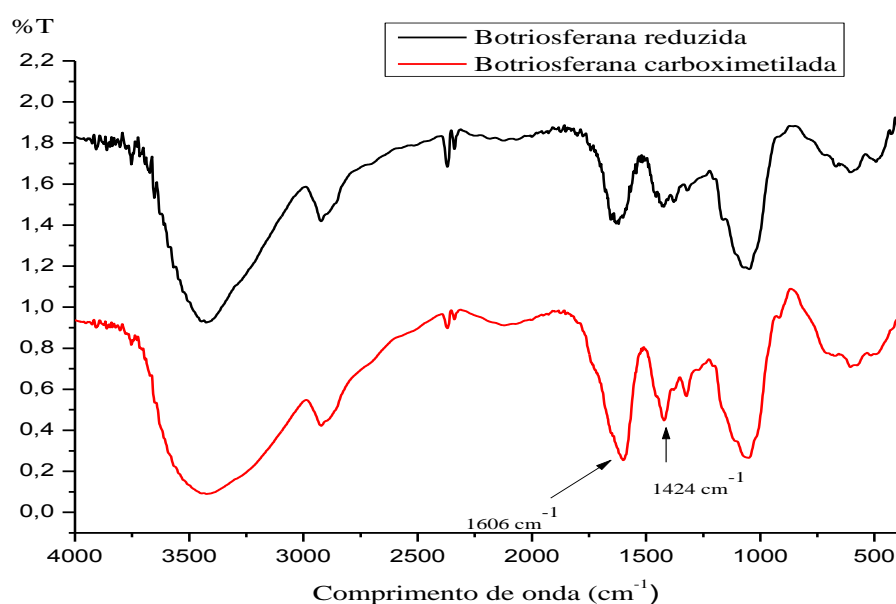
5.3.6 Reação de carboximetilação da botriosferana

O polissacarídeo heparan sulfato, receptor dos vírus envelopados na célula hospedeira, possui grupos carboxila, além dos grupos sulfato. De modo a tornar a botriosferana mais parecida estruturalmente com o heparan sulfato, grupos carboxila foram introduzidos por carboximetilação, seguida de sulfonação. A reação de carboximetilação foi desenvolvida em duas etapas. Primeiramente, foi adicionada a base NaOH em uma mistura heterogênea de isopropanol e botriosferana, em seguida o agente derivatizante, o ácido monocloroacético (MCA). O MCA reagiu pelo ataque dos oxigênios alcoólicos do polissacarídeo ao seu carbono metilênico via S_N2 (XU et al., 2009). Várias tentativas foram realizadas para se alcançar um resultado satisfatório. Foram realizados 3 testes de carboximetilação que diferem no modo de adição do agente derivatizante MCA e do NaOH. No primeiro teste, foi adicionado numa única porção MCA/NaOH à mistura botriosferana/isopropanol. No segundo teste, primeiro dissolveu-se a botriosferana em solução de NaOH a 20% e depois foi adicionado isopropanol e MCA. O último teste consistiu na adição gota a gota da solução de NaOH (20%) à mistura de

botriosferana e isopropanol, decorrida 1h, foi adicionado o MCA. Após aquecimento a 60°C por 4h, obteve-se a transformação desejada com sucesso neste último procedimento. No procedimento 1 a reação não aconteceu, devido tanto à hidrólise do MCA pelos íons hidróxido quanto à neutralização da base NaOH pelo MCA. No procedimento 2, a base NaOH não foi capaz de desprotonar as hidroxilas do polissacarídeo. E com a adição do MCA, a base foi neutralizada. Isto nos faz perceber que a desprotonação das hidroxilas pelo NaOH acontece quando o polissacarídeo está imerso em solução alcoólica (XU et al., 2009).

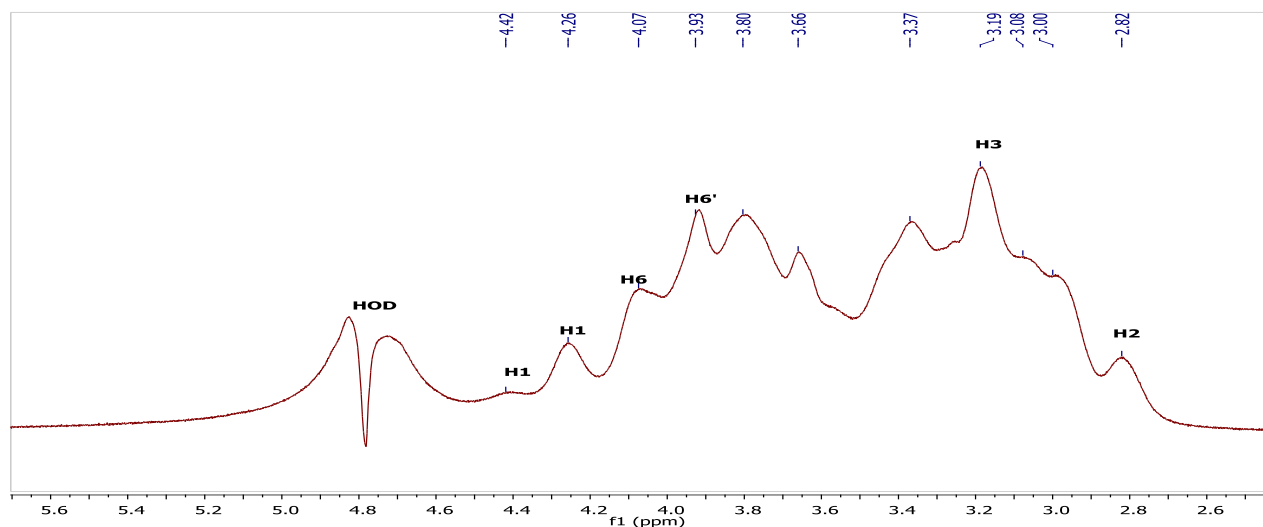
A botriosferana carboximetilada (botriosferanaCm) foi caracterizada por TF-IV (Figura 22). O grupo carboximetila foi confirmado pela intensidade de uma banda característica de vibração assimétrica de estiramento do grupo COO^- em 1606 cm^{-1} (XU et al, 2009). Observaram-se em ambos espectros (botriosferana e botriosferanaCm) uma banda de forte intensidade em 3400 cm^{-1} referente à vibração de estiramento do grupo OH e uma banda em 2921 cm^{-1} atribuída à vibração de estiramento C-H. A banda na região $1450\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ corresponde à deformação simétrica dos grupos CH_2 e COH. A banda atribuída à vibração simétrica de estiramento C-O-C encontra-se aproximadamente à 1050 cm^{-1} (YANG et al., 2011).

Figura 22- Espectro de TF-IV da botriosferana carboximetilada (botriosferanaCm) comparado àquele da botriosferana



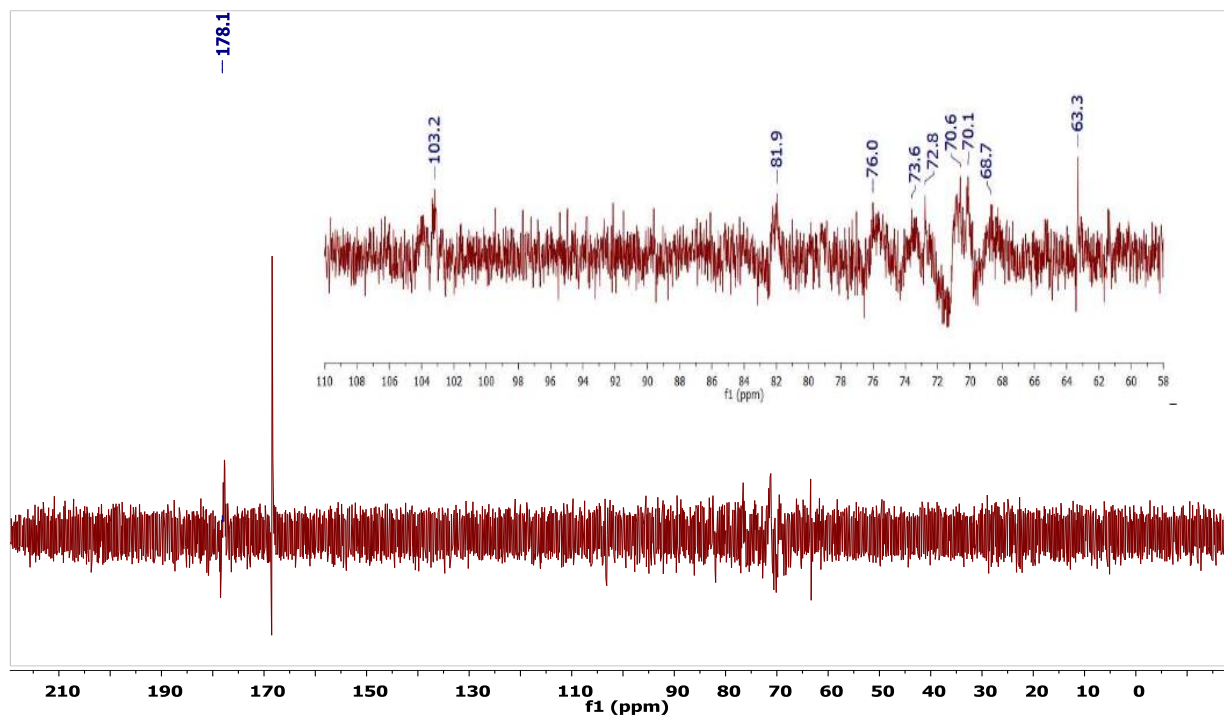
O espectro de RMN de ^1H (Figura 23) da botriosferana carboximetilada analisado em D_2O (NaOH 0,25 M) demonstrou sinais em 4,42 e 4,26 ppm correspondentes aos hidrogênios anoméricos das unidades de glucose. Outros sinais em 4,07 e 3,93 ppm são atribuídos aos H-6. O sinal em 2,82 ppm atribui-se ao H-2. Devido a introdução do grupo carboximetil na botriosferana, esperava-se uma mudança positiva do deslocamento químico de H-6 devido ao efeito de desblindagem exercida pelo grupo carboximetil. O sinal de H-6 da botriosferana em comparado ao H-6 da botriosferana nativa sofreu um deslocamento negativo de 0,21 ppm enquanto que o H-2 deslocou 0,49 ppm..

Figura 23- Espectro de RMN de ^1H da botriosferana carboximetilada em D_2O (NaOH 0,25 M)



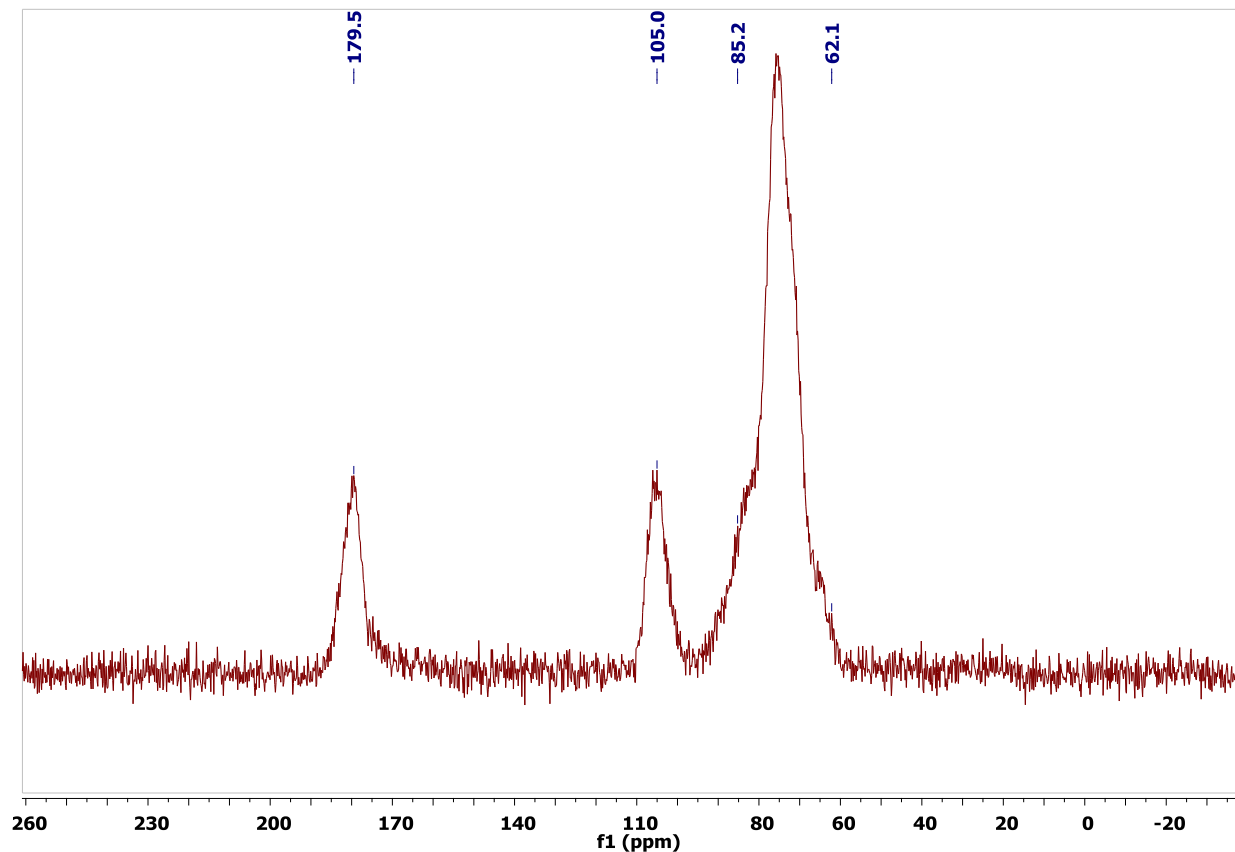
O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 24), forneceu sinais em 103,2 (C-1), 81,9 (C-3), 76,0(C-3), 73,6 (C-5), 72,8 (C-2), 70,1 (C-4), 68,7 (C-6) e 63,3 ppm (C-6') atribuídos às unidades de glucose da botriosferana carboximetilada. O sinal de C-6 livre normalmente aparece em 62,5 ppm (em D_2O), mas neste espectro observou-se em 63,4 ppm. Este deslocamento pode indicar que a beta-glucana botriosferana está substituída na posição 6 pelo grupo carboximetila. O sinal em 178,1 ppm foi atribuído ao grupo carbonila (C=O), este sinal pode ser visto como uma clara evidência da presença do grupo carboximetila, pelo qual corrobora os resultados da espectroscopia de IV. O sinal em 70,6 ppm foi assinalado como sendo o carbono metilênico (CH_2) do substituinte carboximetila (YANG et al., 2011).

Figura 24- Espectro de RMN de ^{13}C da botriosferana carboximetilada em D_2O (NaOH 0,25 M). No insert, observa-se a região de carbonos sacarídicos de 110 a 58 ppm.



A botriosferana carboximetilada também foi caracterizada por RMN de ^{13}C em estado sólido. Pelo espectro, foi possível distinguir um intenso sinal em 179,5 ppm atribuído à carbonila do grupo carboximetila, em 105 ppm atribuído ao C-1 envolvido nas ligação glicosídicas e um sinal muito intenso que encontra-se entre 90 e 60 ppm, atribuído aos demais carbonos das unidades de glucose do polisacarídeo. Estes resultados comprovam que a botriosferana foi satisfatoriamente carboximetilada (Figura 25).

Figura 25- Espectrode RMN de ^{13}C em estado sólido da botriosferana carboximetilada



O grau de substituição da carboximetilação (DSc) foi calculado por titulometria ácido/base, resultando em 0,9. Este valor indica que a cada 10 unidades de glucose da botriosferana em média 9 monômeros possuem o grupo carboximetila. Fazendo uma analogia da mudança do deslocamento químico do C-6' de 62,5 para 63,4 ppm comparado ao valor de DS e buscando a diferença de ordem de reatividade que existe entre os grupos hidroxila, pode-se sugerir que os monômeros estão possivelmente substituídos na posição do OH-6, que é a posição menos impedida estericamente e mais favorável para reagir.

5.3.6.1 Sulfonação da botriosferana carboximetilada

A reação de sulfonação da botriosferana carboximetilada foi conduzida em solventes orgânicos como formamida (FA) ou *N,N*-dimetilformamida (DMF) e piridina como base (MENDES et al., 2009). A escolha do solvente para solubilização do polissacarídeo foi fundamental para a derivatização. A botriosferana mostrou maior solubilidade em formamida que em DMF e outros solventes orgânicos apróticos. A piridina neste processo de derivatização

atuou como uma base, que desempenha a função de desprotonar o grupo hidroxila e tornar o ataque nucleofílico mais favorável (BRANDI et al., 2011). Foram preparadas 6 amostras sulfatadas, duas delas passaram por 1 ciclo de sulfonação enquanto que as demais passaram por 2 ciclos de sulfonação (Tabela 3). Os detalhes sobre as condições de sulfonação das amostras carboximetiladas e seus respectivos DSs, podem ser consultados na tabela 3.

Tabela 3- Otimização das condições de sulfonação da botriosferana carboximetilada

Amostras	eq de HSO₃Cl^a	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Rendimento^b (%)	DSs^c
CmS1	266	1	t.a. à -4	24	—	0,2
CmRS3	296	2	t.a. à -4	26	72	0,4
CmRS4	288	2	t.a. à -4	24	26	0,12
CmRS5	226	2	t.a. à -4	3	35	0,1
CmS6	100	1	60	4	89	0,1
CmRS6	100	2	60	4	87	0,2

^a número de equivalentes em relação a cada unidade de glucose do polissacarídeo

^b rendimento relativo à massa de polissacarídeo recuperada

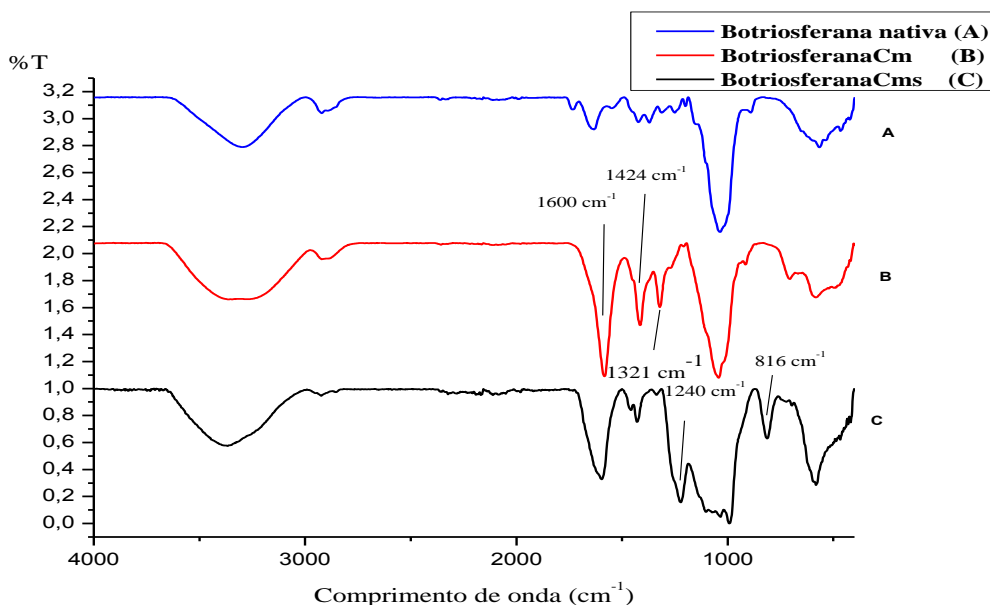
^c grau de sulfatação

O DS das amostras derivatizadas fornece informação sobre o número de grupos funcionais introduzidos em cada unidade de glucose do polissacarídeo (Tabela 3). No entanto, através do DS foi possível observar que a ressulfonação eleva o grau de sulfatação (DSs). Como por exemplo, a amostra CmRS3 possui um DSs de 0,4, o dobro da amostra CmS1, com DSs de 0,2. Um DSs de 0,4 indica que de cada 5 unidades de glucose em média 2 possuem um grupo sulfato. Por outro lado, o valor de DSs está diretamente relacionado com a quantidade do agente sulfonante adicionada ao meio reacional. Como por exemplo, para a preparação da amostra CmS6 (DSs = 0,1) foram necessários 100 equivalentes de HSO₃Cl. Quando a mesma amostra foi ressulfonada na mesma quantidade do agente derivatizante, o DSs passou para 0,2, indicando que

de cada 5 unidades de glucose pelo menos um grupo sulfato está presente. Outros parâmetros de reação que mereceram maior atenção são o tempo e a temperatura. As amostras que foram tratadas em banho de 60 °C durante 3h de reação obtiveram um melhor rendimento (87-89%). Este resultado significa que a sulfonação por HSO_3Cl durante 3h a 60 °C é a melhor condição reacional para a síntese de botriosferana carboximetilada sulfatada com o mínimo de degradação.

Os produtos resultantes foram caracterizados pela espectroscopia TF-IV (Figura 26) e comparados à botriosferana carboximetilada. No espectro TF-IV da amostra carboximetilada e sulfatada, comparado àquele da botriosferana carboximetilada (Figura 22), foram observadas bandas em 1240 e 816 cm^{-1} , atribuídas à vibração assimétrica do grupo S=O e simétrica C-O-S, respectivamente, que indicam a presença do grupo sulfato e, portanto, o sucesso da reação de sulfonação.

Figura 26- Espectros de TF-IV da botriosferana nativa (A), carboximetilada (B) e carboximetilada e sulfatada (CmRS3) (C)

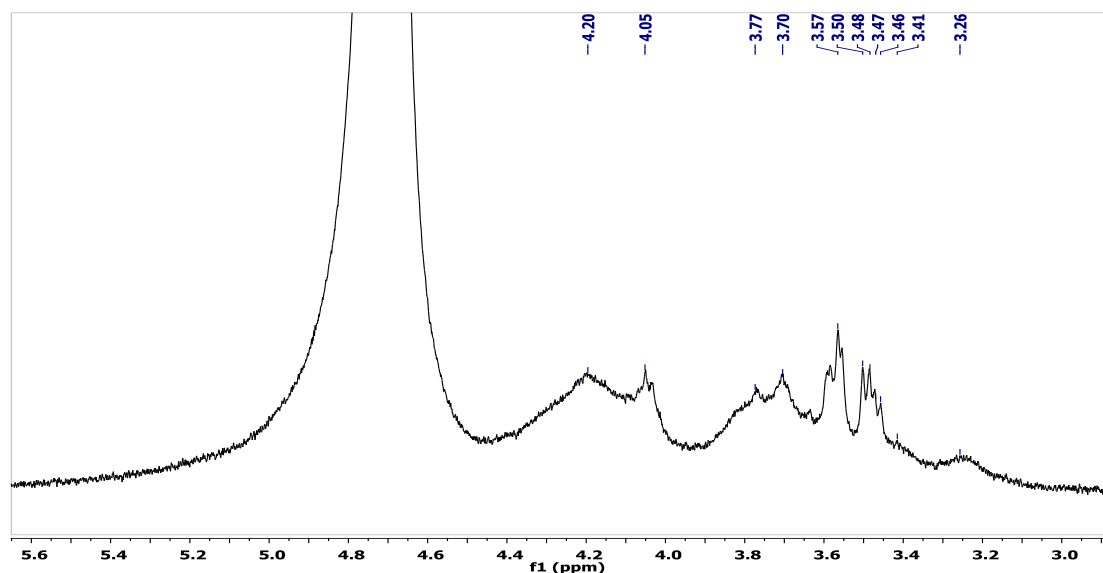


Os espectros no infravermelho das demais amostras que comprovam o sucesso das suas respectivas reações de sulfonação podem ser encontrados no Anexo 6.

O grau de carboximetilação (DSc) da botriosferana carboximetilada foi extensivamente maior que o grau de sulfatação (DSs). Esta diferença pode ser explicada pelo efeito estérico que os grupos carboximetila e as hidroxilas secundárias podem causar na reação de sulfonação. A

ordem de reatividade entre as hidroxilas secundárias em polissacarídeos ainda está em discussão na literatura, neste caso precisaríamos caracterizar as amostras por RMN de ^{13}C ou de ^1H e posteriormente, estimar a posição dos grupos sulfato de acordo com a mudança do deslocamento químico. Mas, pelo valor de DSs das amostras podemos estimar a provável posição do grupo sulfato nos monômeros da botriosferana carboximetilada. Se considerarmos que a posição do O-6 está predominantemente ocupada pelo grupo carboximetila, a sulfonação poderá acontecer com maior probabilidade nas posições OH-2 e OH-4. O espectro de RMN de ^1H da botriosferana carboximetilada (Figura 23) indicou o sinal de H-2 em 2,82 ppm. Comparado ao espectro da botriosferana carboximetilada e sulfatada (CmRS5) (Figura 27), observou-se o sinal de H-2 em 3,26 ppm. Esta mudança de deslocamento químico é causada pelo substituinte sulfato introduzido na posição O-2 que tende à tornar o H-2 mais desblindado. Assim, indica-se pelo espectro de RMN de ^1H , o que havia sido sugerido pelos valores de DSs.

Figura 27- Espectro de RMN de ^1H da botriosferana carboximetilada e sulfatada (CmRS5) em D_2O



5.3.7 Sulfonação regioseletiva da botriosferana sem grupo protetor

A sulfonação seletiva, sem grupo protetor, geralmente é conduzida na presença de um agente derivatizante brando. Pretende-se com isso introduzir o eletrófilo trióxido de enxofre seletivamente na posição 6, mais reativa e acessível. Por essa razão foi utilizado o complexo

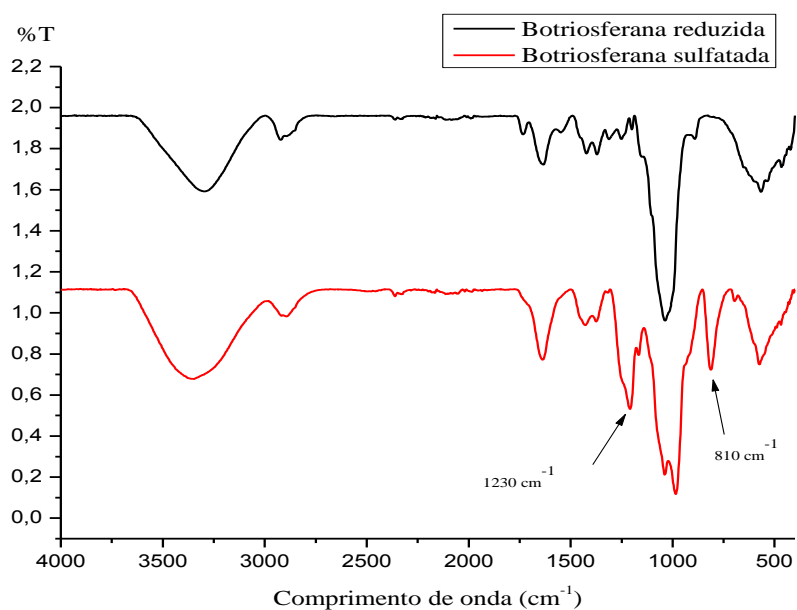
SO₃-Py, que é considerado menos reativo que o ácido clorossulfônico. O material de partida, botriosferana, inicialmente foi reduzido por NaBH₄. Foram necessários (24 equivalentes de SO₃-Py/unidades de glucose) para sulfonar a botriosferana em meio homogêneo (dissolvida no meio reacional) (Entrada 1). As reações que foram realizadas em meio heterogêneo (mistura heterogênea), com as mesmas quantidades do SO₃-Py, não decorreram com sucesso, com exceção de uma botriosferana que foi inicialmente reduzida com NaBH₄/NaOH (Entrada 2) (Tabela 4).

Tabela 4- Otimização das condições de sulfonação seletiva da botriosferana

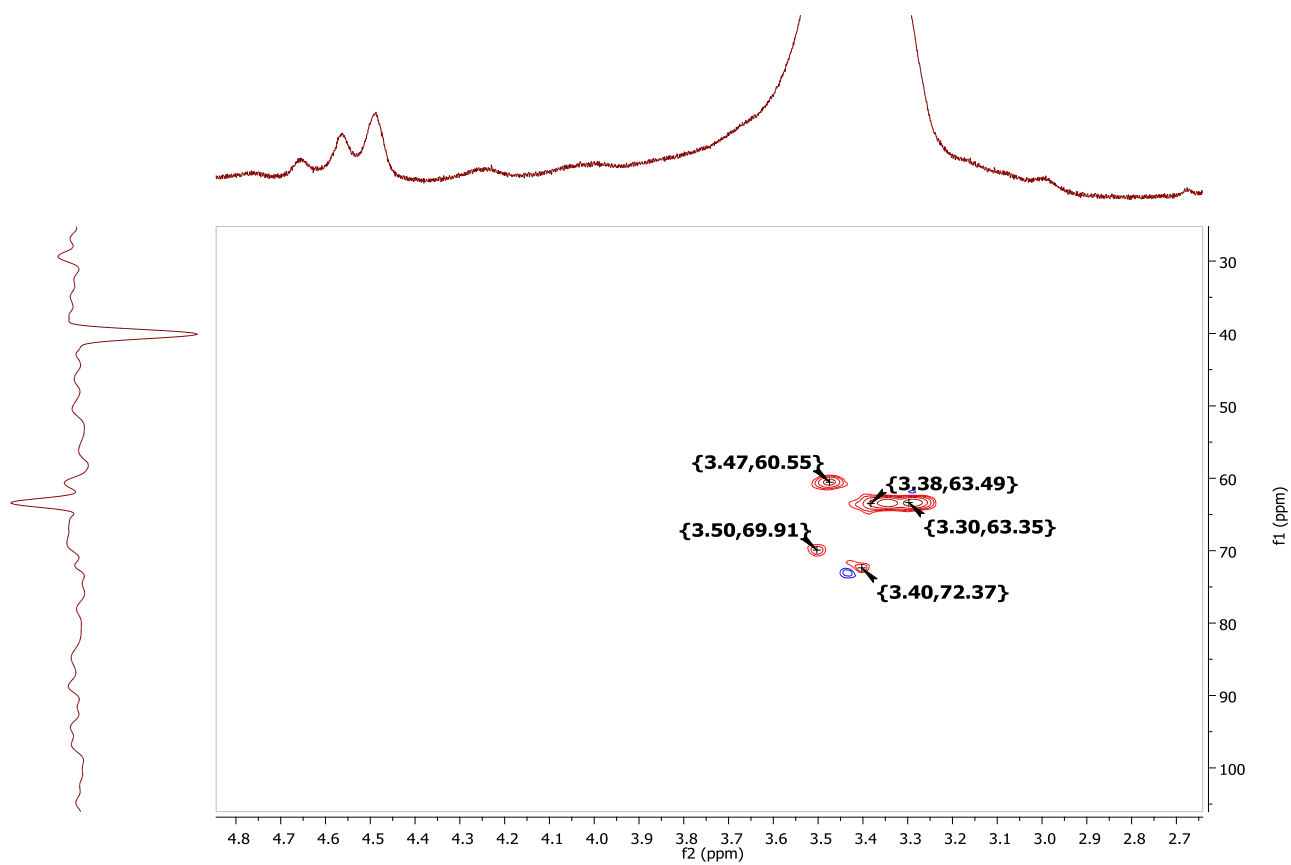
Entrada	Eq. (SO ₃ -Py)	Eq. (Et ₃ N)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Rendimento (%)	DSs
1	24	8	t.a	7	51	0,3
2	24	8	t.a	48	78	0,6

Pelo espectro de TF-IV (Figura 28) da amostra de botriosferana sulfonada brandamente foi possível distinguir bandas de vibração assimétrica do estiramento S=O em 1230 cm⁻¹ e vibração simétrica do estiramento C-O-S em 810cm⁻¹, comprovando que a sulfonação aconteceu com sucesso. O valor de DSs da amostra da entrada 1 foi de 0,3. Este valor indica que a cada 3 unidades deglucose existe em média 1 unidade ligada ao grupo sulfato, provavelmente na posição 6. O valor de DSs da amostra da entrada 2 foi de 0,6, indicando que a cada 5 unidades de glucose existem em média 3 unidades ligadas ao grupo sulfato. Quando fazemos uma comparação com os resultados publicados por Sacchelli (2018), que usou 54 equivalentes de SO₃-Py, mais que o dobro, encontrou-se um DS de 0,43. Pode-se deduzir que a metodologia usada, nas duas entradas, é viável para realizar uma sulfonação com menos equivalentes do agente derivatizante, e obter um DSs satisfatório.

Figura 28- Espectro de TF-IV da botriosferana sulfatada com complexo $\text{SO}_3\text{-Py}$, comparado ao espectro da botriosferana



A amostra da entrada 2 foi caracterizada pelo RMN (HSQC) e pelo espectro foi possível detectar correlação em 3,47/ 60,6 ppm que quando comparado ao espectro de botriosferana nativa (Figura 8) mostra que a correlação corresponde ao C-6 não ligado. E em 3,38/63,5 e 3,30 / 63,4 ppm ($\text{H-6} / \text{C-6}$) encontramos correlações correspondentes aos sinais de C-6 ligado ao grupo sulfato. Estes resultados indicam que a sulfonação ocorreu parcialmente e houve uma considerável regioselectividade pela posição do C-6 (Figura 28).

Figura 29- Espectro de HSQC da amostra botriosferana sulfatada (entrada 2) em DMSO-d₆

6. Conclusão

Em suma, as metodologias de síntese orgânica utilizadas neste trabalho permitiram a preparação de derivados da botriosferana cujas hidroxilas foram protegidas ortogonalmente, de modo a manter hidroxilas específicas disponíveis para a reação de sulfonação. O polissacarídeo botriosferana foi satisfatoriamente protegido na posição 6 pelo grupo pivaloila, o que foi comprovado pelos espectros de TF-IV, RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC. Sua sulfonação gerou um derivado majoritariamente sulfatado nas posições 2 e 4, cuja reação de desproteção foi parcial. A botriosferana foi protegida nas posições 4 e 6 de suas unidades na forma de um cetel, com concomitante sulfonação de sua estrutura. A desproteção das hidroxilas nas posições 4 e 6 do acetonídeo ocorreu com sucesso, a qual conduziu à formação de uma botriosferana sulfatada prioritariamente na posição 2. A reação de carboximetilação da botriosferana, seguida da sua sulfonação, produziu derivados que possuem grupos carboxila e sulfato, semelhantes àqueles do heparan sulfato da célula hospedeira, que é infectada pelos vírus envelopados. O grupo carboximetila não é um grupo protetor, mas uma derivatização, por isso não foi removido ao final da rota sintética. Testes preliminares, não relatados neste trabalho, indicaram que os derivados carboximetilados e sulfatados renderam uma potencial atividade antiviral contra o HSV. Estes derivados merecem um estudo mais detalhado de sua atividade antiviral *in vitro* e possivelmente em modelos *in vivo* da herpes. Uma botriosferana sulfatada majoritariamente na posição 6 foi produzida com sucesso, pelo uso de uma reação de sulfonação em condições mais brandas. A avaliação da atividade antiviral de todos os derivados citados neste trabalho permitirá a elaboração de um estudo de relação estrutura-atividade. Este estudo fornecerá contribuições valiosas ao estado da arte dos polissacarídeos sulfatados inibidores de vírus envelopados.

7. Referência bibliográfica

ÁGOSTON, K.; STREICHER, H.; FÜGEDI, P. Orthogonal protecting group strategies in carbohydrate chemistry. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 27, n. 16, p. 707–728, 2016.

AKRAMIEN, D.; KONDROTAS, A.; DIDZIAPETRIENÉ, J.; KÉVELAITI, E. Effects of β -glucans on the immune system. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 43, n. 8, p. 597–606, 2007.

BARBOSA, A. M.; STELUTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. 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.

BEDINI, E.; LAEZZA, A.; PARRILLI, M.; IADONISI, A. A review of chemical methods for the selective sulfation and desulfation of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 1224–1239, 2017.

BEHNAM, M. A. M.; NITSCHKE, C.; BOLDESCU, V.; KLEIN, C. D. The Medicinal Chemistry of Dengue Virus. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 5622–5649, 2016.

BI, H.; GAO, T.; LIU, D.; TAI, G.; WEI, M.; ZHOU, Y. Structures of (1 → 6)- β -d-glucans from *Bulgaria inquinans* (Fries) and their immunological activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 2, p. 547–552, 2013.

BRANDI, J.; OLIVEIRA, E. C.; MONTEIRO, N. K.; VASCONCELOS, A. D.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; SILVEIRA, J. L. M.; MOURÃO, P. A. S.; CORRADI DA SILVA, M. L. Chemical modification of botryosphaeran: Structural characterization and anticoagulant activity of a water-soluble sulfonated (1→3)(1→6)- β -d-glucan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1036–1042, 2011.

CARLUCCI, M. J.; PUJOL, C. A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; MATULEWICZ, M. C.; DAMONTE, E. B.; CERESO, A. S. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: Correlation between structure and biological activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 20, n. 2, p. 97–105, 1997.

CARLUCCI, M. J.; SCOLARO, L. A.; NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S.; DAMONTE, E. B. Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice. **Antiviral Research**, v. 64, n. 2, p. 137–141, 2004.

CAROLINE, A.; CARBONERO, E.R.; MACHADO, M.; HATSUKO, C.; ROBERTO, A.; SANTOS, S.; LANZI, GUILHERME.; RICARDO, T.; ALBERT, P.; GORIN, J.; IACOMINI, M. Lactarius rufus (1→3;1→6)-β-D-glucan: structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 129–136, 2013.

CHEN, X.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Immunopotiation and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated β - (1 → 3) - D -glucan from *Poria cocos*. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 4, p. 398–405, 2010.

CHEN, Y.; MAGUIRE, T.; MARKS, R. M. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. **Journal of virology**, v. 70, n. 12, p. 8765–72, 1996.

COSTELLO M.T. (ASCP), M.; SABATINI, L.; YUNGBLUTH, P. Herpes simplex virus infections and current methods for laboratory detection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 28, n. 24, p. 185–192, 2006.

CORRADI DA SILVA, M. L.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; DE STEFANI CARDOSO, M.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E .C.; BARBOSA, A. M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 85–92, 2006.

DA SILVA, R.; CORRADI DA SILVA, M. L.; MONTEIRO, N. K.; SILVEIRA, J. L. M.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; VASCONCELOS, A. F. D.; SASSAKI, G. L.; CARBONERO, E. R. Three exopolysaccharides of the β-(1→6)-d-glucan type and a β-(1→3;1→6)-d-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 14, p. 2481–2485, 2008.

DAMONTE, E. B.; PUJOL, C. A.; TALARICO, L. B.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; NOSEDA, M. D.; SCOLARO, L. A.; DUARTE, M. E R. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, n. 1–2, p. 63–71, 2004.

DE ARAÚJO, C. A.; NOSEDA, M. D.; CIPRIANI, T. R.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R.; DUCATTI, D. R. B. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 483–491, 2013.

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

DODGSON, K. S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemical Journal**, v. 78, n. 2, p. 312–319, 1961.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; TULIO, S.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 53–58, 2001.

DUARTE, M. E. R.; CAUDURO, J. P.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; CEREZO, A. S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 2, p. 335–347, 2004.

GAO, T.; BI, H.; MA, S.; LU, J. Structure elucidation and antioxidant activity of a novel α -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-d-glucan from *Aconitum kusnezoffii* Reichb. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 1, p. 85–90, 2010.

GAO, Y.; FUKUDA, A.; KATSURAYA, K.; KANEKO, Y.; MIMURA, T.; NAKASHIMA, H.; URYU, T.. Synthesis of regioselective substituted curdlan sulfates with medium molecular weights and their specific anti-HIV-1 activities. **Macromolecules**, v. 30, n. 11, p. 3224–3228, 1997.

GELDERBLOM, H, R. Medical Microbiology- 4th edition. 1996. Bookshelf. Disponível em: WWW.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627. Acesso em 29/12/2018.

GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; DA SILVA, R. Triple helix conformation of botryosphaeran, a (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -d-glucan produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 4, p. 953–956, 2008.

GROTE, C.; HEINZE, T. Starch derivatives of high degree of functionalization 11: Studies on alternative acylation of starch with long-chain fatty acids homogeneously in N,N-dimethyl acetamide/LiCl. **Cellulose**, v. 12, n. 4, p. 435–444, 2005.

GREENE, T. W.; WURTS, P. G. M. Greene's protective groups in organic synthesis. 4^a edição. USA. 2007.

GRÖNROOS, A.; PIRKONEN, P.; RUPPERT, O. Ultrasonic depolymerization of aqueous carboxymethylcellulose., v.11, **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11 n. 1, p. 9-12, 2004.

GROTE, C.; HEINZE, T. Starch derivatives of high degree of functionalization 11: Studies on alternative acylation of starch with long-chain fatty acids homogeneously in N,N-dimethyl acetamide/LiCl. **Cellulose**, v. 12, n. 4, p. 435-444, 2005.

GROTH, T.; WAGENKNECHT, W. Anticoagulant potential of regioselective derivatized cellulose. **Biomaterials**, v. 22, n. 20, p. 2719–2729, 2001.

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

GYAWALI, N.; BRADBURY, R. S.; TAYLOR-ROBINSON, A. W. The epidemiology of dengue infection: Harnessing past experience and current knowledge to support implementation of future control strategies. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 53, n. 4, p. 293–304, 2016.

HOSOYA, M.; BALZARINI, J.; SHIGETA, S.; DE CLERCQ, E.. Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides on the replication of various myxo- and retroviruses. **Antiviral Research**, v. 15, n. 12, p. 91, 1991.

HUANG, C.; CUI, S. W.; ZHANG, T.; MIAO, M.; JIANG, B.; JIA, X. Polysaccharides modification through green technology: Role of ultrasonication towards improving physicochemical properties of (1-3)(1-6)- α -d-glucans. **Food Hydrocolloids**, V. 50, P. 166-173, 2015.

ISHIBASHI, K. I.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; TAMURA, H.; TANAKA, S.; OHNO, N. The solubilization and biological activities of *Aspergillus* β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 155–166, 2004.

JACOBSEN, F.; AMBROSINI, M. Towards estimating the uncertainty of intensity-based sound power measurements. **Turkish Acoustical Society - 36th International Congress and Exhibition on Noise Control Engineering, INTER-NOISE 2007 ISTANBUL**, v. 6, p. 4124–4133, 2007.

KAGIMURA, F. Y.; DA CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; MALFATTI, C. R. M. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588–598, 2014.

KAGIMURA, F. Y.; DA CUNHA, M. A. A.; THEIS, T. V.; MALFATTI, C. R. M.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; TEIXEIRA, S. D.; SALOMÉ, K. Carboxymethylation of (1 → 6)- β -glucan (IASIIDIPODAN): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 390–399, 2015.

KITAZATO, K.; WANG, Y.; KOBAYASHI, N. Viral infectious disease and natural products with antiviral activity. **Drug discoveries & therapeutics**, v. 1, n. 1, p. 14–22, 2007.

LOOKER, K. J.; MAGARET, A. S.; TURNER, KAT. M. E.; VICKERMAN, P.; GOTTLIEB, S. L.; NEWMAN, L. M. Global Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 2 Infections in 2012. **PLoS ONE**, p. 1–23, 2012.

MARKS, R. M.; LU, H.; SUNDARESAN, R.; SUZUKI, A.; LINHARDT, R. J.; IMANARI, T.; HERNÁIZ, M. J.; TOIDA, T. Probing the Interaction of Dengue Virus Envelope Protein with Heparin: Assessment of Glycosaminoglycan-Derived Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* v. 50, n. 500, p. 2178–2187, 2001.

MONATH, T. P. Dengue: The risk to developed and developing countries. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 91, n. March, p. 2395–2400, 2006.

MENDES, S. F.; MOURÃO, P. A. S.; BARBOSA, A. M.; ARANDA-SELVERIO, G.; DEKKER, R. F. H.; CORRADI DA SILVA, M. L.; PEREIRA, M. S.; MONTEIRO, N. K.; TOVAR, A. M. F.; VASCONCELOS, A. F. D.; SANTOS, O. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 3, p. 305–309, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Tradução de Ana Beatriz Gorini da Veiga...et al. Porto Alegre. Artemed. 2014. Título original: Lehninger principles of biochemistry, 6ª edição.

PATRICK, G. L. An introduction to medicinal chemistry. 1ª edição. New York. Oxford University Press Inc. 1995.

PAULA, P. C.; TALARICO, L. B.; NOSEDA, M. D.; SILVIA, S. M.; DAMONTE, E. B.; DUARTE, M. E. R. 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.

READ, J. S; SCHLEISS, M. R. Congenital and perinatal infection. 2018. E-book. Disponível em: [www.worldcat.org / title / congenital-and-perinatal-infrction / oclc / 1015215529](http://www.worldcat.org/title/congenital-and-perinatal-infrction/oclc/1015215529). Acesso em 28/12/2018.

SACCHELLI, BRUCE A. L. **Preparação de derivados de beta-glucana e sua avaliação de atividade antiviral**. 2018. 74 páginas. Dissertação de Mestrado em Química – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 7, p. 22–35, 2007.

SONG, H.; NIU, X.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; WANG, J.; ZHANG, Q. 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, 2009.

SYNYTSYA, A.; NOVÁK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 792–809, 2013.

TALARICO, L. B.; PUJOL, C. A.; ZIBETTI, R. G. M.; FARÍA, P. C.S.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; DAMONTE, E. B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Research**, v. 66, n. 2–3, p. 103–110, 2005.

TATONGJAI, J.; LUMDUBWONG, N. Physicochemical properties and textile utilization of low- and moderate-substituted carboxymethyl rice starches with various amylose content. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 377–384, 2010.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CEREZO, A. S. ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: Application in research and industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, n. 3, p. 73–92, 2002.

VAN LEEUWEN, S. S.; LEEFLANG, B. R.; GERWIG, G. J.; KAMERLING, J. P. Development of a ^1H NMR structural-reporter-group concept for the primary structural characterisation of α -d-glucans. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 6, p. 1114–1119, 2008.

VERMA, R.; SINGH, A.; SINGH, S.; A., SINGH V. AND SINGH. Dengue Virus and its Structure - A Promising Target for Drug Discovery. **Int. J. of Pharm. Life Sci.**, v. 5, n. 9, p. 3848–3858, 2014.

VICKERMAN, P.; LOOKER, K. J.; SCHIFFER, J. T.; BOILY, M. C.; TURNER, K. M. E.; ELMES, J. A. R.; GOTTLIEB, S. L. Effect of HSV-2 infection on subsequent HIV acquisition: an updated systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. 1303–1316, 2017.

WANG, J.; BAO, A.; WANG, Q.; GUO, H.; ZHANG, Y.; LIANG, J.; KONG, W.; YAO, J.; ZHANG, J. SULFATION CAN ENHANCE ANTITUMOR ACTIVITIES OF ARTEMISIA SPHAEROCEPHALA POLYSACCHARIDE IN VITRO AND VIVO. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 502-511, 2017a.

WANG, Q.; SHENG, X.; SHI, A.; HU, H.; YANG, Y.; LIU, L.; FEI, L.; LIU, H. β -Glucans: Relationships between modification, conformation and functional activities. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 1–12, 2017b.

WHITLEY, R. J. Herpes simplex virus infections. **The Lancet**, v. 357, p. 1513-18–446, 2001.

WU, S. J.; CHUN, M. W.; SHIN, K. H.; TOIDA, T.; PARK, Y.; LINHARDT, R. J.; KIM, Y. S. Chemical sulfonation and anticoagulant activity of acharan sulfate. **Thrombosis Research**, v. 92, n. 6, p. 273–281, 1998.

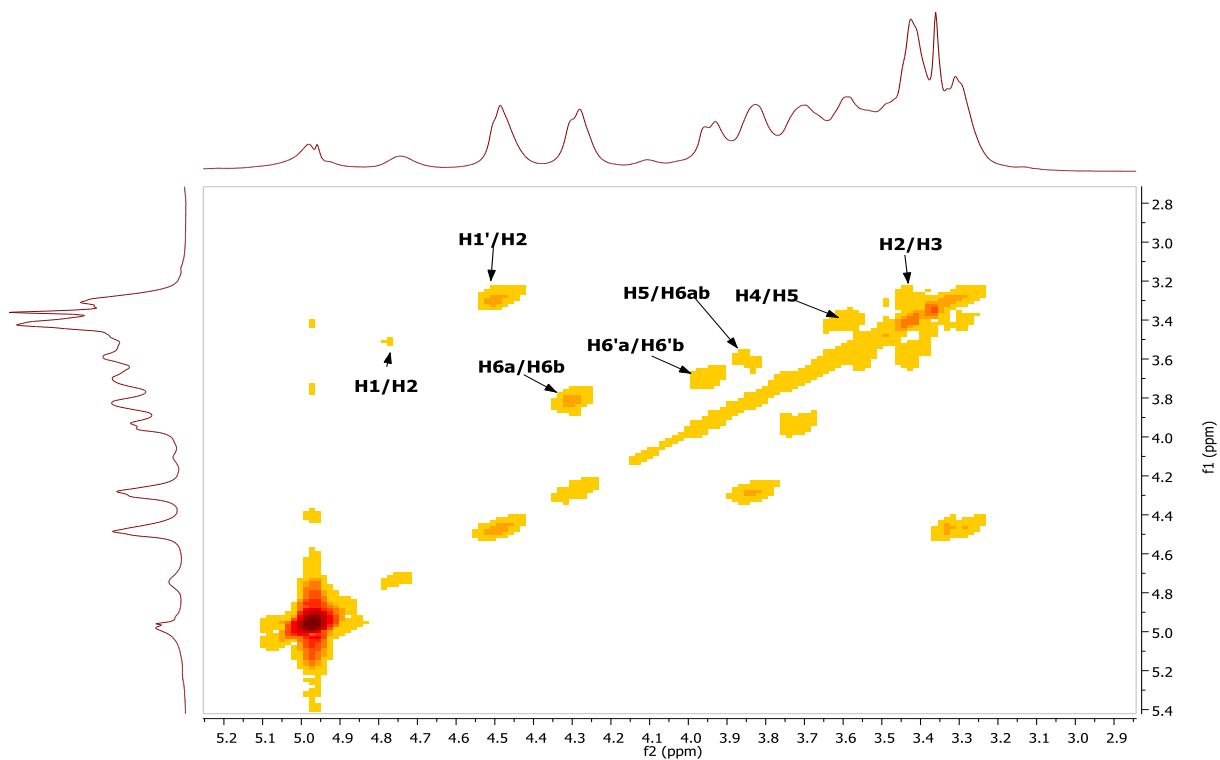
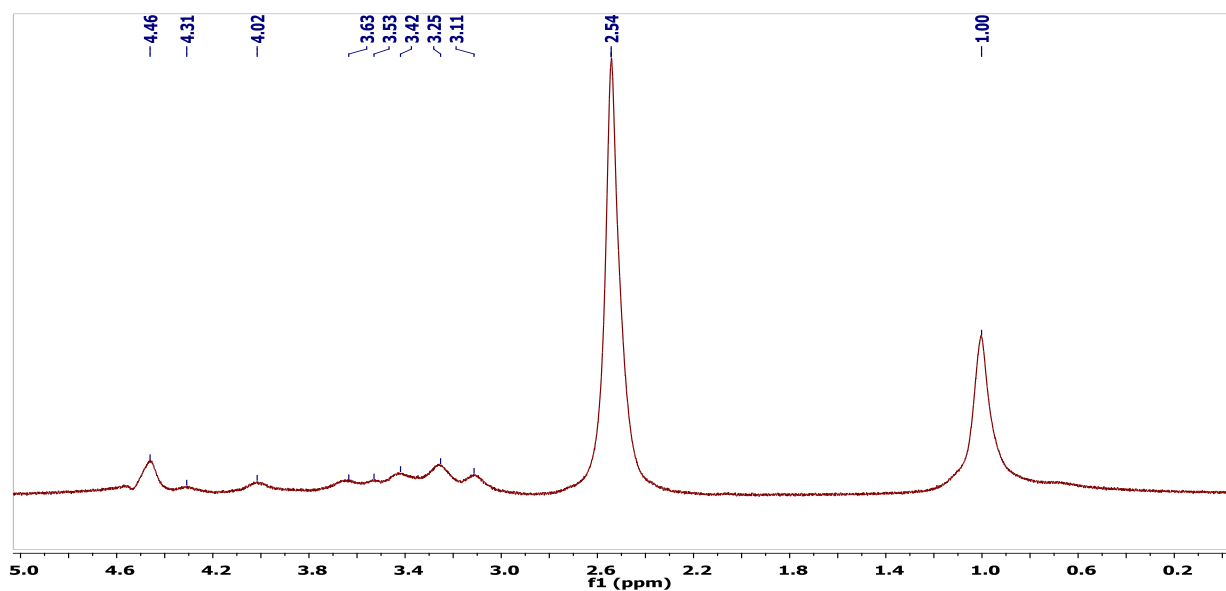
XU, J.; LIU, W.; YAO, W.; PANG, X.; YIN, D.; GAO, X. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 2, p. 227–234, 2009.

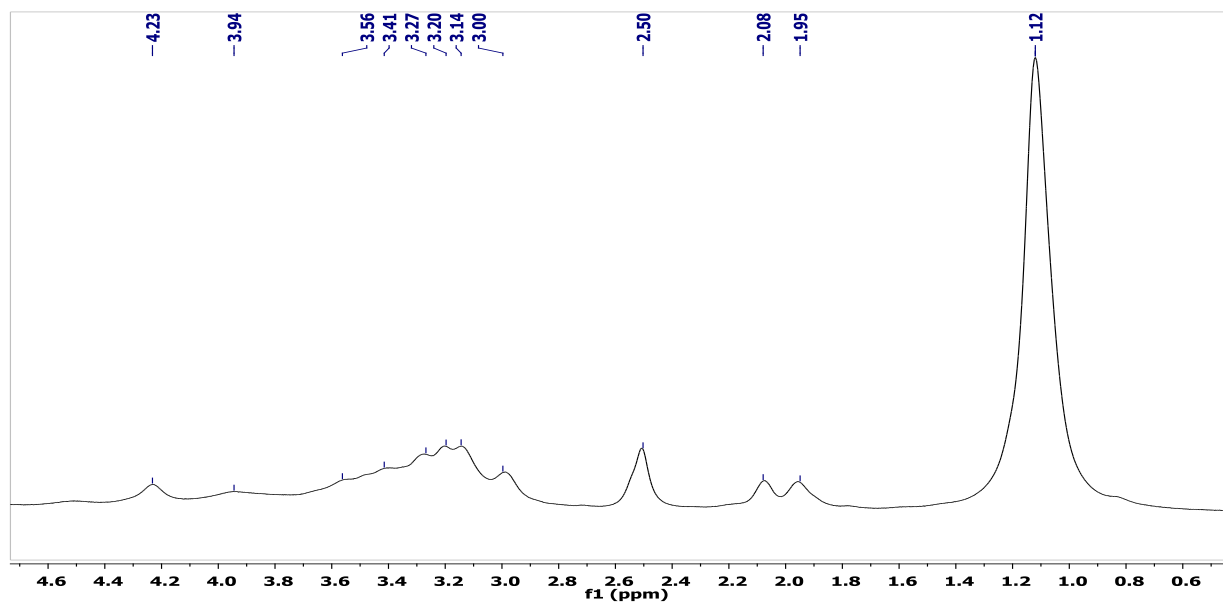
YANG, L.; ZHAO, T.; WEI, H.; ZHANG, M.; ZOU, Y.; MAO, G.; WU, X. Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 5, p. 1124–1130, 2011.

YOUNG, S.-H. GLYCOBIOLOGY AND EXTRACELLULAR MATRICES : Observation of a Partially Opened α -Glucan by Fluorescence Resonance Energy Transfer Spectroscopy Observation of a Partially Opened Triple-helix Conformation in 1 \rightarrow 3)- β -Glucan by Fluorescence Resonance Energy Tra. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 16, p. 11874–11879, 2000.

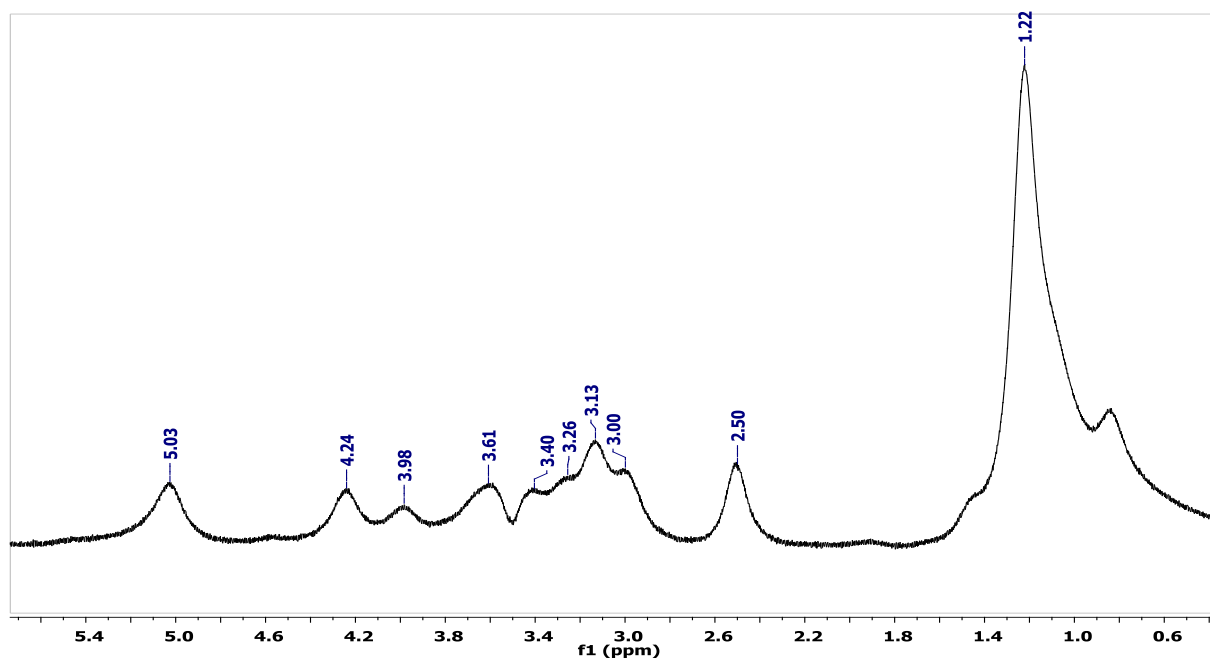
ZHANG, L.; LI, X.; XU, X.; ZENG, F. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 8, p. 1515–1521, 2005.

8. Anexos

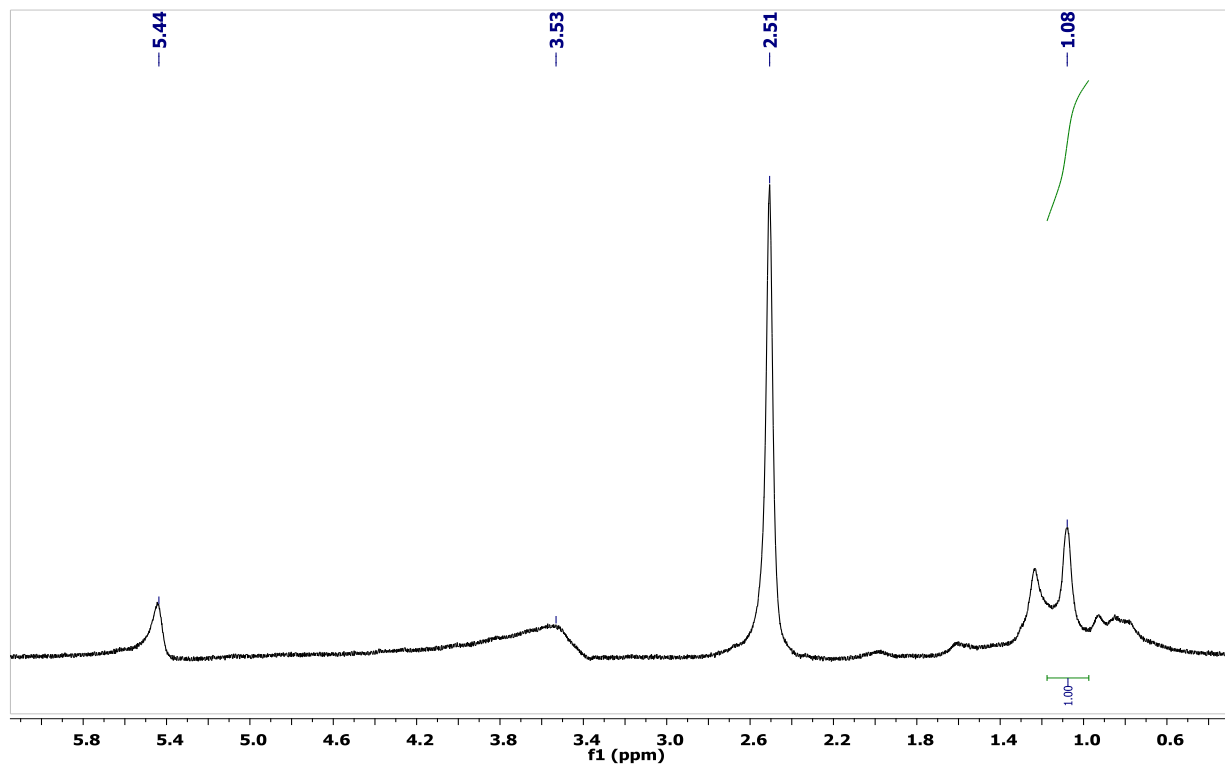
Anexo 1: Espectro de COSY ^1H - ^1H da botriosferana nativa em D_2O (NaOH 0,25M)**Anexo 2:** Espectro de RMN de ^1H da amostra Piv 1 em DMSO-d_6 **Anexo 3:** Espectro de RMN de ^1H da amostra Piv 2 em DMSO-d_6



Anexo 4: Espectro de RMN de ¹H da amostra Piv 4 em DMSO-d₆



Anexo 5: Espectro de RMN de ¹H da amostra Piv1SDP em DMSO-d₆



Anexo 6: Comparação de espectro TF-IV da botriosferana carboximetilada(Cm) e das botriosferanas carboximetiladas sulfatadas.

