



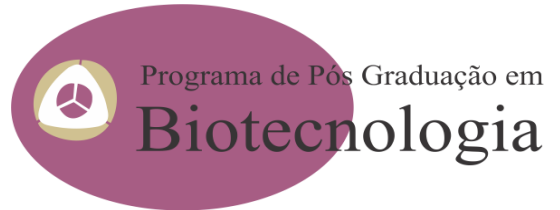
UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BEATRIZ TICIANI VIEIRA PEREIRA

PRODUÇÃO E MODIFICAÇÃO DA LEVANA DE *Bacillus subtilis* natto PARA APLICAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



Programa de Pós Graduação em

Biotecnologia

BEATRIZ TICIANI VIEIRA PEREIRA

PRODUÇÃO E MODIFICAÇÃO DA LEVANA DE *Bacillus subtilis* natto PARA APLICAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE

Londrina
2024

BEATRIZ TICIANI VIEIRA PEREIRA

PRODUÇÃO E MODIFICAÇÃO DA LEVANA DE *Bacillus subtilis* natto PARA APLICAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Coorientador: Profa. Dra. Cristiani Baldo da Rocha.

Londrina
2024

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

P436p PEREIRA, BEATRIZ TICIANI VIEIRA.
PRODUÇÃO E MODIFICAÇÃO DA LEVANA DE *Bacillus subtilis natto* PARA APLICAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE / BEATRIZ TICIANI VIEIRA PEREIRA. - Londrina, 2024.
96 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.
Coorientador: Cristiani Baldo da Rocha.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Levana - Tese. 2. Modificação Química - Tese. 3. Sulfatação - Tese. 4. Saúde - Tese. I. Pedrine Colabone Celligoi, Maria Antonia. II. Baldo da Rocha, Cristiani. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

BEATRIZ TICIANI VIEIRA PEREIRA

PRODUÇÃO E MODIFICAÇÃO DA LEVANA DE *Bacillus subtilis* natto PARA APLICAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Maria Antonia
Pedrine Colabone Celligoi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 11 de março de 2024.

Dedico este trabalho ao meu avô
Geraldo (*in memoriam*), exemplo de fé
e perseverança em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora profa. Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, pela oportunidade, paciência, orientação e por todo conhecimento transmitido durante a realização deste trabalho.

A minha coorientadora profa. Dra. Cristiani Baldo da Rocha, pelo auxílio e conselhos durante esses quase quatro anos. Agradeço por acompanhar o meu crescimento acadêmico e profissional desde a especialização em Biotecnologia.

Ao prof. Dr. Alexandre Orsato e a aluna Gabrielle Cristina Calegari, do Laboratório de Síntese de Moléculas Medicinais (LaSMMed), pela colaboração e dedicação durante os processos químicos de sulfatação.

A profa. Me. Maria Emília Favero e ao prof. Dr. José Wander Breganó, do Laboratório de Hematologia do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, pela contribuição durante a realização dos testes de atividade anticoagulante.

A profa. Dra. Lígia Carla Faccin Gualhardi, do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada (LAVIR), pela ajuda durante a realização dos teste de atividade antiviral.

Ao prof. Dr. Dionísio Borsato, pela atenção durante a realização das análises estatísticas.

Aos meus pais Márcia Regina e José Antonio, por não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Agradeço por toda dedicação e doação para que eu seguisse todos os meus sonhos.

A minha irmã Carolina, por sempre acreditar em mim mesmo nos momentos em que eu duvidava da minha própria capacidade.

A minha avó Margarida, por todo amor e apoio durante essa caminhada.

Ao meu namorado Lucca, por sempre estar ao meu lado e ser aconchego nos momentos mais difíceis. Agradeço por todo incentivo e amor.

Aos meus amigos de bancada Briani, Tainã, Julia, Niumaique, Nathalia, Luiz Henrique, Flávia Eliza, Geórgia e Yara, por compartilharem as alegrias e dificuldades da pesquisa. Agradeço por todo o companheirismo, amizade e, principalmente, as risadas trocadas durante esses dois anos.

Aos meus amigos de mestrado Bianca, Enya Maria, Damaris Cristine,

Débora, Nilton Sérgio, Ariane, Beatriz, Rodolfo, pessoas maravilhosas que conheci durante a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, em especial ao técnico Nelson Janeiro Rodriguez.

A Central Multiusuária de Laboratórios de Pesquisa da UEL (CMLP) e a Universidade Estadual de Londrina (UEL).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Por fim, mas não menos importante, a Deus, por todas as dificuldades superadas e, especialmente, por ter colocado pessoas tão especiais no decorrer minha trajetória no programa de pós-graduação em Biotecnologia e a todos que contribuíram direta e/ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

PEREIRA, Beatriz Ticiani Vieira Pereira. **Produção e modificação da levana de *Bacillus subtilis* natto para aplicação na área da saúde.** 2024. 96 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

A levana, exopolissacarídeo de frutose sintetizado pelo *Bacillus subtilis* natto, é reconhecida por suas diversas propriedades e aplicações biotecnológicas. Apesar da levana apresentar várias bioatividades relacionadas à sua estrutura, modificações químicas, como a sulfatação podem potencializar ou agregar novas atividades biológicas a essa macromolécula. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi produzir, modificar por sulfatação e avaliar a atividade antiviral, anticoagulante e antioxidante da levana nativa e das amostras sulfatadas. Um planejamento fatorial Box-Benken 3^3 incompleto, com as variáveis tempo de fermentação (h) (X_1), concentração de sacarose (g/L) (X_2) e o pH inicial (X_3) foi realizado para avaliação da biomassa, consumo de sacarose e da produção de levana. A levana produzida na melhor condição foi submetida a dois processos de sulfatação, com diferentes proporções do complexo trióxido enxofre-piridina. A levana nativa e as amostras sulfatadas foram testadas quanto a ação antiviral, contra o Herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1); anticoagulante, frente ao ensaio de tromboplastina parcial ativado (KPTT) e tempo de protrombina (TP) e antioxidante pelo método de DPPH. Os resultados mostraram uma produção de levana de 26,86g/L em 24h, 200g/L de sacarose e pH 7,0. As variáveis concentração de sacarose e pH foram significativas, demonstrando que alta concentração de sacarose e o pH próximo do neutro favorecem a produção de levana. O grau de substituição (DS) foi de 1,36 e 1,37 para a levana sulfata 1 e a levana sulfatada 2, respectivamente. O processo de sulfatação melhorou a resistência térmica da levana, com o aumento da temperatura de carbonização de 578°C para 740°C, podendo ser útil para os processos industriais. A atividade antiviral da levana aumentou com a sulfatação exaustiva, diminuindo a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) em 57%. As amostras sulfatadas prolongaram o KPTT de acordo com a concentração, enquanto a levana nativa não apresentou a atividade anticoagulante. Além disso, atividade antioxidante aumentou em 52% com a sulfatação. Esses resultados demonstraram que o processo de sulfatação potencializou a ação antiviral, anticoagulante e antioxidante da levana e esses dados podem contribuir para a criação de novas metodologias terapêuticas para a área da saúde.

Palavras-Chave: Frutana; Sulfatação; Atividade anticoagulante; Atividade antiviral; Atividade antioxidante; Novo tratamento.

ABSTRACT

PEREIRA, Beatriz Ticiani Vieira. 2024. **Production and modification of levan from *Bacillus subtilis* natto for application in health area.** 2024. 96 p. Dissertation (Master's in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina, 2024.

Levan, exopolysaccharide of fructose synthesized by *Bacillus subtilis* natto, is recognized for its diverse properties and biotechnological applications. Despite presenting various bioactivities related to its structure, chemical modifications such as sulfation can potentiate or add new biological activities to this macromolecule. Thus, the aim of this study was to produce, modify by sulfation, and evaluate the antiviral, anticoagulant, and antioxidant activity of native levan and sulfated samples. An incomplete Box-Benhken 3³ factorial design, with the variables fermentation time (h) (X1), sucrose concentration (g/L) (X2), and initial pH (X3), was conducted to evaluate biomass, sucrose consumption, and levan production. Levan produced under the best condition was subjected to two sulfation processes with different proportions of the sulfur trioxide-pyridine complex. Native levan and sulfated samples were tested for antiviral activity against Herpes simplex virus type 1, anticoagulant activity using the activated partial thromboplastin time (KPTT) and prothrombin time (PT) assays, and antioxidant activity by the DPPH method. Results showed a levan production of 26.86g/L in 24h, with 400g/L of sucrose and pH 7.0. Sucrose concentration and pH were significant variables, indicating that increasing sucrose concentration and maintaining pH close to neutral favored levan production. The degree of sulfation (DS) was 1.36 and 1.37 for sulfated levan 1 and sulfated levan 2, respectively. The sulfation process improved the thermal resistance of levan, increasing the carbonization temperature from 578°C to 740°C, which could be beneficial for industrial processes. Antiviral activity of levan increased with exhaustive sulfation, reducing the IC50 by 57%. Sulfated samples prolonged concentration-dependent KPPT, while native levan showed no anticoagulant activity. Additionally, antioxidant activity increased by 52% with sulfation. These results demonstrate that the sulfation process enhanced the antiviral, anticoagulant, and antioxidant action of levan, providing insights for the development of new therapeutic methodologies in the healthcare field.

Key-words: Fructan; Sulfation; Anticoagulant activity; Antiviral activity; Antioxidant activity; New treatment.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estrutura Química da Levana..... | 17 |
| Figura 2 – Reações Enzimáticas para a Síntese da Levana e FOS..... | 19 |
| Figura 3 – Possíveis Regiões de Substituição da Levana..... | 24 |
| Figura 4 – Estrutura do Herpes Simplex Vírus (HSV) | 28 |
| Figura 5 – Possível Mecanismo de Ação Antiviral dos Polissacarídeos Sulfatados | 31 |
| Figura 6 – Via Intrínseca e Extrínseca da Cascata de Coagulação Sanguínea..... | 32 |
| Figura 7 – Mecanismo de Ação Anticoagulante da Heparina..... | 34 |
| Figura 8 – Possível Mecanismo de Ação Antioxidante dos Polissacarídeos Sulfatados | 38 |
| Artigo | |
| Figura 1 – Superfície de Resposta (MSR) para a Produção de Levana (g/L), considerando a Concentração de Sacarose (g/L) e o pH e fixando o Tempo de Fermentação (h) | 61 |
| Figura 2 – Perfil de Valores Previstos para a Biomassa (g/L), Consumo de Sacarose (g/L) e a Produção de Levana (g/L) | 62 |
| Figura 3 – Espectros de FT-IR para a Levana Nativa (NL), Levana Sulfatada 1 (SL1) e Levana Sulfatada 2 (SL2)..... | 65 |
| Figura 4 – Perfis térmicos (TGA e DTG) da Levana Nativa (NL) (A), Levana Sulfatada 1 (SL1) (B) e da Levana Sulfatada 2 (SL2) (C) | 66 |
| Figura 5 – Citotoxicidade em Células Vero (CCL-81) (A) e Atividade Antiviral contra o Herpes Simplex Vírus tipo 1 cepa KOS (HSV-1 KOS) (B) para a Levana Nativa (NL), Levana Sulfatada 1 (SL1) e a Levana Sulfatada 2 (SL2)..... | 69 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Planejamentos Estatísticos Aplicados para a Produção da Levana por Diferentes Espécies Microbianas | 20 |
| Tabela 2 – Composição do Meio de Preservação para <i>B. subtilis</i> natto | 40 |
| Tabela 3 – Composição do Meio de Ativação para <i>B. subtilis</i> natto..... | 40 |
| Tabela 4 – Composição do Meio de Fermentação para <i>B. subtilis</i> natto | 40 |
| Tabela 5 – Planejamento Box-Behnken 3 ³ para a Avaliação do: (X ₁) Tempo de Fermentação (h), (X ₂) Concentração de Sacarose (g/L) e do (X ₃) pH inicial na Produção de Levana..... | 42 |

Artigo

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Respostas do Planejamento Box-Behnken 3 ³ incompleto, com o (Y ₁) consumo de sacarose (g/L), (Y ₂) biomassa (g/L) e (Y ₃) produção de levana (g/L) | 59 |
| Tabela 2 – Análise de Variância (ANOVA) para a Produção de Levana..... | 60 |
| Tabela 3 – CC ₅₀ , C ₅₀ e SI para a Levana Nativa (NL), Levana Sulfatada 1 (SL1) e Levana Sulfatada 2 (SL2)..... | 68 |
| Tabela 4 – Atividade Anticoagulante da Levana Nativa (NL), Levana Sulfatada 1 (SL1) e Levana Sulfatada 2 (SL2) na via Extrínseca e Intrínseca da Cascata de Coagulação Sanguínea | 72 |
| Tabela 5 – Atividade Antioxidante da Levana Nativa (NL), Levana Sulfatada 1 (SL1) e Levana Sulfatada 2 (SL2) pela Inibição (%) do DPPH | 75 |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 | Objetivo geral | 16 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 16 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 3.1 | Levana: estrutura, produção e propriedades biológicas | 17 |
| 3.2 | Modificação estrutural de exopolissacarídeos | 23 |
| 3.3 | Infecções virais | 27 |
| 3.4 | Coagulação sanguínea | 31 |
| 3.5 | Agentes antioxidantes | 35 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 4.1 | Material | 39 |
| 4.1.1 | <i>Bacillus subtilis</i> natto | 39 |
| 4.1.2 | Herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) | 39 |
| 4.1.3 | Células vero (CCL-18)..... | 39 |
| 4.1.4 | Meios de cultura | 40 |
| 4.2 | Métodos | 40 |
| 4.2.1 | Curva de biomassa e preparo do inóculo | 40 |
| 4.2.2 | Produção da levana por fermentação submersa..... | 41 |
| 4.2.3 | Avaliação dos parâmetros fermentativos | 42 |
| 4.2.3.1 | Biomassa e consumo do substrato | 43 |
| 4.2.3.2 | Precipitação e quantificação da levana | 43 |
| 4.2.4 | Separação da levana | 43 |
| 4.2.5 | Modificação química da levana | 44 |
| 4.2.5.1 | Reação de sulfatação da levana | 44 |
| 4.2.5.2 | Análise do grau de substituição (DS) | 44 |
| 4.2.6. | Espectroscopia no infravermelho com transformada no fourier (FT-IR)..... | 45 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.2.7 | Termogravimetria (TG)..... | 45 |
| 4.2.8 | Avaliação das propriedades biológicas | 46 |
| 4.2.8.1 | Citotoxicidade..... | 46 |
| 4.2.8.2 | Atividade antiviral | 46 |
| 4.2.8.3 | Atividade anticoagulante | 47 |
| 4.2.8.4 | Atividade antioxidante | 48 |
| 4.2.9 | Análise estatística | 48 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 49 |
| 5.1 | Artigo: processo de sulfatação para avaliação das propriedades antiviral, anticoagulante e anticoagulante da levana de <i>Bacillus subtilis</i> natto..... | 49 |
| 5.2 | Patente: levana sulfatada de <i>Bacillus subtilis</i> natto com capacidade antiviral, anticoagulante e antioxidante..... | 85 |
| 6 | CONCLUSÃO | 86 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 87 |

1 INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são macromoléculas biológicas sintetizadas por diferentes espécies microbianas reconhecidas pelas suas inúmeras propriedades e aplicações biotecnológicas. A levana, por sua vez, é um EPS polimerizado pela enzima levanasacarase (E.C 2.4.1.10) e formado de resíduos de β -D-frutofuranosil, unidos por ligações glicosídicas β -(2 \rightarrow 6) e com ramificações β -(2 \rightarrow 1). A produção pode ser realizada por diferentes espécies microbianas, mas estudos demonstraram que a bactéria *Bacillus subtilis* natto é um dos microrganismos mais eficientes para o processo de síntese. A cepa de *B. subtilis* natto é utilizada no preparo da soja fermentada, alimento tradicional do Japão conhecido comercialmente como Natto.

Semelhante a outros polissacarídeos, as atividades biológicas da levana, como a solubilidade em água e óleo, resistência a tração, boa estabilidade a temperatura e a capacidade de formar filmes estão diretamente relacionadas com a sua estrutura química. Como esses biopolímeros com bioatividades possuem a origem microbiana e a possibilidade de aplicação industrial, metodologias estatísticas podem ser aplicadas para a avaliação e identificação de parâmetros significativos e a otimização de parâmetros fermentativos, resultando no aumento da produção final.

As modificações químicas, que são realizadas para a adição de grupos funcionais na cadeia polissacarídica, além de favorecer alterações estruturais e conformacionais e o aumento da cadeia e massa molecular, podem intensificar e/ou agregar novas bioatividades. Dentre as modificações químicas que podem potencializar as funcionalidades biológicas dos polissacarídeos, destaca-se a sulfatação. Esse processo envolve a substituição dos grupos mais reativos, das unidades monoméricas por grupos sulfato (-SO₃H) através do uso de um solvente orgânico e um agente sulfatante, para a promoção da atividade antimicrobiana, anticoagulante e antioxidante.

Dessa forma, este estudo teve como objetivo produzir a levana de *B. subtilis* natto variando o tempo de fermentação (h), concentração de sacarose (g/L) e o pH inicial e a partir da melhor condição, sulfatar a levana com duas proporções do agente sulfatante complexo tróxido de enxofre-piridina e avaliar a atividade antiviral, contra o Herpes simplex vírus (HSV-1); anticoagulante, a partir do tempo de tromboplastina parcial ativado (KPTT) e tempo de protrombina (TP) e antioxidante,

pelo ensaio de DPPH para explorar suas potenciais aplicações na área da saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir a levana de *Bacillus subtilis* natto, modificar a sua estrutura química e avaliar as propriedades biológicas para a aplicação na área da saúde.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar por um planejamento Box-Behnken 3³ incompleto a influência do tempo de fermentação (h), concentração de sacarose (g/L) e do pH inicial na produção de levana por *Bacillus subtilis* natto;

Modificar quimicamente a levana por sulfatação, com diferentes proporções do agente sulfatante para a obtenção de amostras sulfatadas com grau de substituição (DS) diferentes.

Caracterizar a levana nativa e as amostras sulfatadas por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e Termogravimetria (TG);

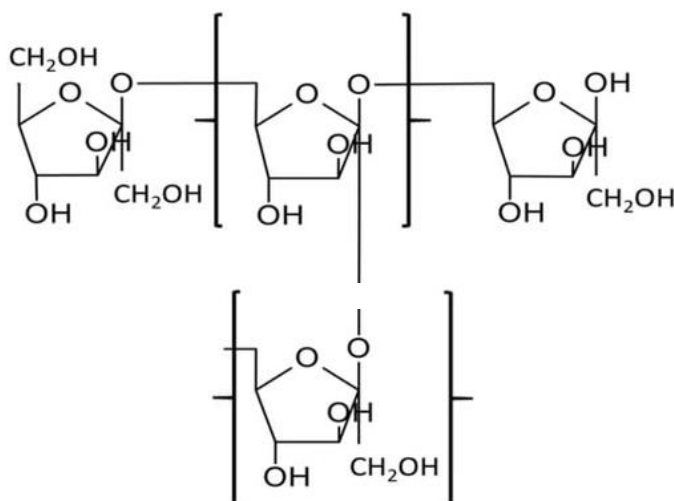
Verificar a atividade antiviral contra o Herpes simplex vírus tipo 1 (HSV), anticoagulante frente aos ensaios do tempo de tromboplastina parcial ativado (KPTT) e do tempo de protrombina (TP) e antioxidante pelo método DPPH da levana nativa e das amostras sulfatadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEVANA: ESTRUTURA, PRODUÇÃO E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

A levana, exopolissacarídeo (EPS) de frutose produzido pela enzima levanasacarase (E.C 2.4.1.10), é constituído de resíduos de β -D-frutofuranosil unidos por ligações glicosídicas β -(2 \rightarrow 6) e com ramificações β -(2 \rightarrow 1) (AGARWAL *et al.*, 2023). Algumas variações estruturais, como o nível de polimerização, grau de ramificação e o número de unidades de frutose adicionadas na cadeia polissacarídica podem ser encontradas de acordo com o microrganismo produtor, fonte enzimática e as condições do cultivo. Essas alterações podem interferir nas propriedades e, por consequência, aplicações da levana (HAN, 1990; MARTÍNEZ-FLEITES *et al.*, 2005). A Figura 1 mostra a estrutura química da levana, com as unidades de frutose unidas a partir das ligações glicosídicas β -(2 \rightarrow 6) e das ramificações β -(2 \rightarrow 1).

Figura 1 – Estrutura Química da Levana.



Fonte: Domzal-Kedzia *et al.* (2023).

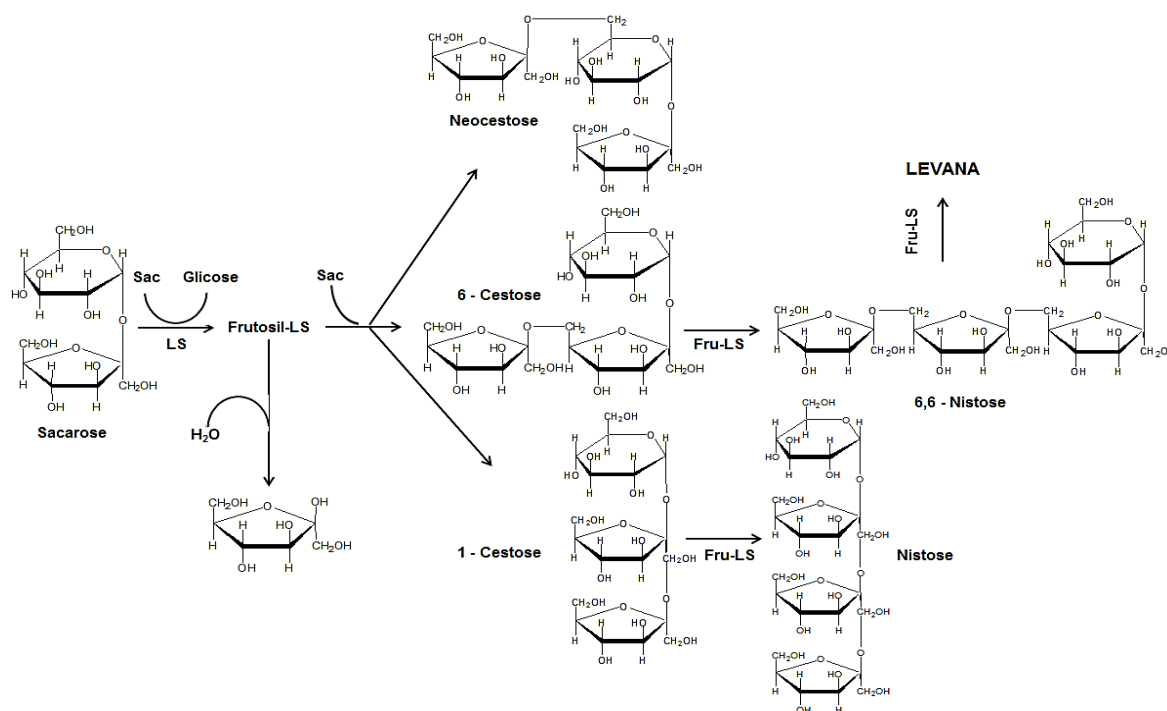
A levana pode ser produzida de duas formas; (1) pelos microrganismos, por fermentação submersa e (2) pela enzima isolada, com a disponibilização da sacarose como substrato (SIQUEIRA; ONER, 2023; SRIKANTH *et al.*, 2015). Assim, a levana de origem microbiana pode apresentar diferença na estabilidade e funciona como fonte de armazenamento para os carboidratos (ÖNER;

HERNÁNDEZ; COMBIE, 2016). A estrutura, dessa forma, pode ser classificada de acordo com o seu peso molecular em levana (até 3.000kDa) ou frutooligossacarídeos (FOS) (10-33kDa) (CASTREJÓN-CARRILLO *et al.*, 2024; JALAN *et al.*, 2013).

Várias cepas bacterianas foram descritas como produtoras, incluindo *Pseudomonas* spp., *Acetobacter pasteurianus*, *Aerobacter levanicum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa* e *Bacillus amyloliquefaciens* (GHALY *et al.*, 2007). Além disso, *B. subtilis* natto, um microrganismo utilizado no preparo da soja fermentada Natto, também demonstra eficiência na síntese da levana (MELO *et al.*, 2015). Assim, as bactérias Gram-positivas produzem, principalmente, a levana, sem o acúmulo de cadeias intermediárias, enquanto as Gram-negativas sintetizam grandes concentrações do FOS (SHAYOUN *et al.*, 2024).

A produção ocorre pela ação da enzima levanasacarase, que catalisa a hidrólise da sacarose (na ligação β -(1 \rightarrow 2)), transfrutossilacção e a polimerização da frutose (LI; SEO; KARBOUNE, 2015; SRIKANTH *et al.*, 2015). O intermediário frutosil-levanasacarase (frutosil-LS) transfere o resíduo de frutose para água (hidrólise) ou outra molécula aceptora (reação de acceptor), que pode atuar como substrato e produto da reação (mecanismo ping-pong). Com a influência da sacarase, pode ser formada a neocestose, 6-cestose e a 1-cestose. A partir da 6-cestose é sintetizada a 6,6-nistose e a levana (CHAMBERT; TREBOUL; DEDONDER, 1974; SANTOS-MORIANO *et al.*, 2015). A Figura 2 mostra as reações enzimáticas da levanasacarase a partir do intermediário frutosil-levanasacarase, com a hidrólise para a formação da frutose e a transfrutossilacção para polimerização dos FOS e da levana.

Figura 2 – Reações Enzimáticas para a Síntese da Levana e FOS.



Fonte: Mantovan (2016).

Vários fatores, como a composição química do meio de fermentação (fonte de carbono e nitrogênio), tempo de fermentação, pH inicial e a taxa de agitação e aeração podem interferir no processo e rendimento da produção de levana. A sacarose no meio de cultura é crucial, visto que a síntese não foi observada em outros meios contendo a glicose ou a frutose como fonte de carbono (ANANTHALAKYSHMY; GUNASEKARAN, 1999). O pH também é um fator importante para a polimerização da levana e a faixa ideal de pH para a atividade enzimática da levanasacarase é de 5,0 a 7,0 (LIU *et al.*, 2017).

Assim, planejamentos estatísticos podem ser empregados para a identificação das condições ideais de operação e a otimização do processo de síntese, visando a redução dos custos de produção e o aumento do rendimento do EPS produzido por fermentação. Apesar da abordagem mais eficaz envolver a otimização de um fator por vez, modelos experimentais, como a metodologia de superfície de resposta (MSR) e o planejamento composto central (CCD) permitem a avaliação da interação entre diferentes parâmetros e fatores e a identificação de variáveis significativas e condições ótimas para os bioprocessos (BOUALLEGUE *et al.*, 2020). A Tabela 1 exhibe planejamentos estatísticos empregados para a síntese de levana por diferentes espécies microbianas.

Tabela 1 - Planejamentos estatísticos para a produção da levana por diferentes espécies microbianas.

| Autores | Microrganismo | Meio de Cultivo e Condição | Produção |
|---|--|---|---|
| Oliveira et al. (2007) | <i>Zymomonas mobilis</i> (ATCC 31821). | Três planejamentos fatoriais completos; (1) 3^2 com sacarose (g/L) e tempo de fermentação (h) (2) 2^{4-1} com extrato de levedura, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e MgSO_4 (g/L) e (3) com fontes renováveis. | O primeiro planejamento, a condição ótima foi de 250g/L de sacarose e 24h, com 26,68g/L de levana. O segundo planejamento, o extrato de levedura e KH_2PO_4 possuíam efeito positivo, com 20,20g/L de levana. O terceiro planejamento, a cana-de-açúcar foi eficiente na polimerização, com 15,00g/L de levana. |
| Bersaneti et al. (2017) | <i>B. subtilis</i> natto (CCT 7712). | Planejamento Box-Behnken 2^3 com sacarose (g/L), temperatura e o tempo de fermentação (h) na produção da levana e do FOS. | A condição ótima foi de 50 g/L de sacarose, 35°C e 26h, com 69,80g/L de FOS e 44,20g/L de levana. |
| Bouallegue et al. (2020) | <i>B. subtilis</i> . | Dois planejamentos estatísticos; (1) Plackett-Burman estabelecimento das variáveis significativas e (2) Box-Behnken 3^4 com a sacarose e peptona (g/L) e o pH inicial. | A condição ótima foi de 162,5g/L de sacarose, 10g/L de peptona e pH 7,0, com 7,88g/L de levana. |
| Hertadi, Permatasari e Ratnaningshi (2021) | <i>Bacillus licheniformis</i> BK1 e BK2. | Planejamento Box-Wilson 2^3 com sacarose (%), temperatura, pH inicial na produção da levana pela enzima levanasacarase. | A condição ótima foi de 36°C, pH 7,0 e 12% de sacarose para BK1 e de 32°C, pH 8,0 e 12% de sacarose para BK2. |

A levana possui diferentes propriedades biológicas relacionadas com a sua estrutura, como a solubilidade em água e óleo e insolubilidade em quase todos os solventes orgânicos, retenção de água, resistência a tração, baixa viscosidade, compatibilidade com sais e surfactantes, boa estabilidade a temperatura (ponto de fusão próximo de 225°C), formação de filmes e a ação imunomoduladora e prebiótica e por isso, pode ser utilizada na indústria alimentícia como agente emulsificante, estabilizante e espessante e na farmacêutica no controle da liberação de medicamentos em emulsões tópicas e cosmeceútics (BECKERS *et al.*, 2005; DOMZAL-KEDZIA *et al.*, 2023; LI *et al.*, 2016; SRIKANTH *et al.*, 2015).

Bersaneti *et al.* (2019) avaliaram a atividade prebiótica da nistose produzida pela enzima levanasacarase de *B. subtilis* natto e desenvolveram filmes de amido comestível para a criação de um novo produto com propriedades funcionais. A ação prebiótica foi verificada pela produção de biomassa de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* spp. no tratamento com os filmes contendo a nistose e o amido. A redução de pH, foi relacionada com a produção de ácido láctico e ácido acético e proporcional com o crescimento microbiano. Com isso, a adição da nistose em filmes de amido comestível poderia oferecer a indústria alimentícia a oportunidade de produzir um produto com maior valor agregado e de baixo custo.

Xu *et al.* (2022) produziram a levana (Cata-lev) pela enzima levanasacarase BM-2 recombinante e avaliaram os efeitos da adição de Cata-lev no iogurte endurecido. A macromolécula era composta basicamente por açúcares e possuía a estrutura porosa, distribuição uniforme e boa estabilidade térmica. Devido a capacidade dos polissacarídeos de se associarem com as moléculas de água, houve a redução da fase coalhada e a melhora da sensação do sabor do iogurte. Essas características são essenciais para a composição dos produtos lácteos. A adição de 0,2-0,5% de Cata-lev também poderia favorecer o crescimento de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, que são benéficos para a saúde humana.

A manipulação da microbiota intestinal é uma alternativa promissora para a promoção da saúde e a prevenção de diferentes doenças. As enzimas β -frutofuranosídes, produzidas e secretadas pelas bactérias hidrolisam a levana em FOS ou unidades de frutose, que podem então ser fermentadas. O processo de fermentação causa a acidificação do ambiente, redução do pH do sistema gastrointestinal e o aumento de populações bacterianas benéficas, como *Lactobacillus*

e *Bifidobactérias* (HANDY *et al.*, 2018).

Kim *et al.* (2020) prepararam hidrogéis utilizando a levana comercial da Real Biotech (Qingdao, CN) e o álcool polivinílico (levana-PVA), com o glutaraldeído como agente reticulante e observaram a capacidade de capturar e recuperar patógenos a partir desse novo hidrogel. Como a levana e o PVA possuem grande quantidade de grupos hidroxila, há a formação de ligações de hidrogênio e de uma mistura homogênea. Os hidrogéis de levana-PVA expressaram maior resistência a tração e alta adsorção de água, em razão da região hidrofílica dos biopolímeros. A adição da levana resultou no aumento da capacidade de interação com as estruturais virais do vírus Influenza, quando comparado com o algodão (controle). A RT-PCR confirmou a eficiência da captura de 43,75% para os hidrogéis de levana-PVA e de 26,75% para a gaze (controle). Os hidrogéis de levana-PVA são formados por matérias simples e economicamente viáveis e poderiam ser aplicáveis na captura de microrganismos e diagnóstico de doenças.

Wang *et al.* (2022) produziram um filme com a levana produzida pela levanasacarase de *Escherichia coli* BL21 recombinante e a quitosana (LE/CS) e analisaram o efeito de diferentes proporções de levana nas propriedades estruturais, físicas, térmicas e mecânicas dos filmes blendados. Os filmes LE/CS apresentaram melhor resistência a tração, desempenho mecânico e estabilidade térmica. A adição da levana melhorou a rigidez dos filmes e aumentou a absorção de luz UV e a barreira contra a água. Em seguida, os filmes LE/CS foram utilizados para a fabricação de embalagens para carne suína e preservaram a sua qualidade de maneira satisfatória. A combinação da levana e quitosana poderia ser uma opção viável para a confecção de embalagens, considerando que as convencionais são fabricadas por polímeros sintéticos derivados do petróleo.

Em razão das suas propriedades biológicas formadoras de filme, boa resistência e permeabilidade ao oxigênio, sabor e odor neutro, biodegradabilidade e atoxicidade, a levana é uma opção viável para a elaboração de filmes estáveis e ecológicos voltados a indústria alimentícia e farmacêutica. Todavia, como a levana é considerada um biopolímero de alto custo, a inclusão de outras moléculas, além de aprimorar as características estruturais, pode contribuir para a redução dos custos finais de produção (MANTOVAN *et al.*, 2018; SRIKANT *et al.*, 2015).

Wasilewski *et al.* (2022) produziram um extrato bruto rico em levana e analisaram a influência da adição em formulações cosméticas de géis para banho.

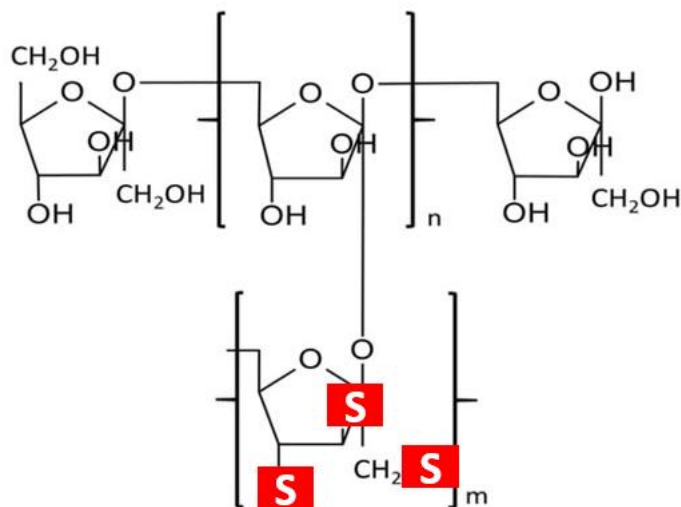
O extrato apresentou a ação antimicrobiana contra *Streptococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *E. coli*, que normalmente são encontradas na pele. Os protótipos demonstraram boa produção de espuma e a ação não irritante, que é relacionada com a concentração do extrato adicionado e a quantidade de levana presente em sua composição. Apesar do extrato comprometer a capacidade do produto de emulsificar a gordura, a redução desse parâmetro resulta na criação de um cosmético seguro em relação aos lipídios encontrados na epiderme. O uso de moléculas microbianas em formulações cosméticas segue a tendência mundial da produção de novos cosméticos naturais.

Os polissacarídeos também podem ser aplicados na indústria cosmética para a criação de novos cosméticos multifuncionais. A levana, além de promover a proliferação de fibroblastos e queratinócitos, possui a atividade antioxidante e a elevada retenção de água, devido a sua estrutura e a formação de ligações com as moléculas de hidrogênio (BOUALLEGUE *et al.*, 2020; DOMZAL-KEDZIA *et al.*, 2019). A avaliação de especialistas da Cosmetic Ingredient Review (CIR), ainda, confirmaram que a levana é segura para a aplicação e o desenvolvimento de formulações cosméticas (FIUME *et al.*, 2016).

3.2 MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE EXOPOLISSACARÍDEOS

As propriedades biológicas dos exopolissacarídeos (EPS) estão diretamente relacionadas com a sua estrutura química. No entanto, alguns polissacarídeos podem apresentar limitações de aplicação, como baixas bioatividades e altos custos de produção. Dessa forma, as modificações químicas aumentam e/ou agregam novas atividades biológicas a partir da inserção de grupos funcionais nos grupos mais reativos da cadeia, como os grupos hidroxila (OH) (LI *et al.*, 2015; MUKHERJEE *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2019). A sulfatação (O-SO₃H), fosforilação (-PO₃H₂), carboximetilação (+CH₂COOH), acetilação (CH₃COO⁻) e selenização (-SeO₂H), por exemplo, são reações químicas utilizadas para as modificações estruturais e biológicas dos biopolímeros (PRASAD; PUROHIT, 2023; XU *et al.*, 2019). A Figura 3 mostra as três possíveis regiões de substituição, pelos grupos sulfato (S) na estrutura monossacarídica da levana.

Figura 3 – Possíveis Regiões de Substituição da Levana.



Fonte: Domzal-Kedzia *et al.* (2023) modificado.

Embora os polissacarídeos sulfatados naturalmente sejam comumente encontrados na parede celular de algas marinhas, o longo período de crescimento, baixa homogeneidade e os complexos processos de extração direcionam a pesquisa para a obtenção de polissacarídeos sulfatados quimicamente (NIU *et al.*, 2023). Na sulfatação podem ser utilizados diferentes solventes, temperaturas, tempos de reação e proporções molares (WANG *et al.*, 2018). Geralmente, o EPS é solubilizado em um solvente orgânico, como o dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) ou a formamida e, em seguida, são adicionados o catalisador e o agente sulfatante, como o ácido sulfúrico (H₂SO₄), complexo trióxido de enxofre-piridina, complexo ácido clorossulfônico-piridina ou o complexo trióxido de enxofre-dimetilacetamida (ARLOV *et al.*, 2021; LU *et al.*, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2013). Por fim, a reação é neutralizada e a mistura reacional dialisada (LI; DAI; SHAH, 2017).

Após a modificação química, o grau de substituição (DS) indica a quantidade de grupos hidroxila que foram substituídos por grupos sulfato. Esse valor pode ser diminuído e/ou aumentado de acordo com a proporção molar do agente sulfatante, temperatura e tempo de reação, isto é, com os parâmetros utilizados durante a reação química (WANG *et al.*, 2018). O método da Gelatina-Bário de Dogson e Price (1962) é comumente utilizado para calcular o DS, onde os íons de bário formam um precipitado com os grupos sulfato e o teor de enxofre (%) é calculado por turbidimetria. Porém, também pode ser realizado por espectroscopia de

fotoelétrons na região de raio X (XPS), espectroscopia de raios X por energia dispersiva e analisador elementar (NIU *et al.*, 2023).

Na maioria das vezes, os polissacarídeos sulfatados com o maior valor de DS manifestam melhores propriedades biológicas, como a atividade antiviral, anticoagulante, antioxidante, antitumoral e imunomoduladora. Além disso, essas macromoléculas apresentam baixa toxicidade, que é proporcional com o valor de DS e resulta em menores efeitos colaterais (LIU *et al.*, 2019). Essas características, portanto, são adquiridas pela adição de grupos sulfato na cadeia polissacarídica e oferecem boas perspectivas farmacológicas para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas voltadas para doenças consideradas de importância médica (LU *et al.*, 2021).

Jiang *et al.* (2014) sulfataram com o H_2SO_4 os polissacarídeos da fruta logan (LP1) e avaliaram a atividade imunomoduladora e antitumoral *in vitro* do biopolímero nativo (LP1) e do derivado sulfatado (LP1-S). Os espectros de FT-IR confirmaram a sulfatação. Para a ação imunomoduladora, LP1 e LP1-S aumentaram a proliferação de linfócitos, quando comparados com o LPS bacteriano (controle). De maneira dose-dependente, LP1 e LP1-S estimularam a fagocitose e a síntese de NO por macrófagos. No entanto, LP1-S mostrou maior produção do fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e da interleucina 6 (IL-6) por macrófagos. Para a atividade antitumoral, LP1 e LP1-S inibiram o crescimento de células do carcinoma nasofaríngeo humano (HONE-1) em 14,7% e 42,16%, respectivamente. Como a maioria dos fármacos voltados ao tratamento do câncer possuem efeitos imunossupressores, a identificação de novas moléculas com a ação antitumoral e imunomoduladora é promissora.

Zhang *et al.* (2023) sulfataram com o complexo ácido clorossulfônico-piridina, em diferentes proporções o polissacarídeo da planta *Sagittaria trifoli* (PST) e observaram o potencial antioxidante, na eliminação dos radicais DPPH e hidroxila e anticoagulante das amostras sulfatadas e do PST nativo, que é também naturalmente sulfatado. Os espectros de FT-IR demonstraram a adição dos grupos sulfato e o DS foi de 0,22 a 1,01. PST e os derivados sulfatados removeram os radicais DPPH e hidroxila e a atividade antioxidante aumentou de acordo com a concentração da amostra testada. Para a atividade anticoagulante, o aumento do valor do DS modificou a ação pró-coagulante em anticoagulante. SPST-3 (DS 1,01) superou os efeitos da heparina, enquanto o SPST-4 (DS 0,79) apresentou melhor capacidade de

eliminação dos radicais livres e por isso, outros parâmetros estruturais, além do DS, podem afetar as propriedades biológicas dos polissacarídeos sulfatados.

Liu *et al.* (2019) sulfataram com o complexo trióxido de enxofre-piridina o EPS da bactéria *Lactobacillus plantarum* WLPL04 e analisaram a atividade antioxidante do EPS nativo e da amostra sulfatada por 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e em modelo de células do epitélio intestinal (CACO-2) tratadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), medindo o nível intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) e malondialdeído (MDA) e das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT). Os espectros obtidos por FT-IR indicaram a adição de grupos sulfato e o DS foi de 0,33. O EPS nativo e a amostra sulfatada apresentaram a atividade antioxidante *in vitro*. Para a viabilidade celular não houve diferença significativa entre as duas amostras, mas a amostra sulfatada inibiu significativamente a produção de ROS e MDA e, por consequência, aumentou a proteção contra o estresse oxidativo. A sulfatação, assim, pode ser uma estratégia eficaz para o melhoramento das bioatividades dos polissacarídeos.

Gamal *et al.* (2020) sulfataram com o ácido clorossulfônico-piridina a levana produzida pela enzima levanasacarase da bactéria *Enterococcus faecalis* Esawy (KR758759) e verificaram a atividade antiviral da levana bruta (CL), levana dialisada (DL) e do derivado sulfatado (SL) contra o vírus da doença de Newcastle em embriões de galinha livres de patógenos específicos (SPR). A sulfatação foi confirmada nos espectros de FT-IR. As três amostras expressaram o efeito antiviral, sendo de 95% para DL e de 90% para SL. A concentração citotóxica de 50% (CC50), concentração inibitória de 50% (IC50) e o índice de seletividade (IS) foram de >300 a 500 μ L/ovo, 6 a 8 μ L/ovo e de 50 a 100, nessa ordem. A provável ação antiviral da levana está relacionada com a sua propriedade de adesão e, conseqüentemente, obstrução do sítio ativo de fusão das glicoproteínas virais.

Como as reações de sulfatação não são controladas, alguns fatores podem modificar o padrão de adição dos grupos sulfato. À medida que a condição ácida hidrolisa as ligações glicosídicas, pode ocorrer a despolimerização parcial da cadeia polissacarídica. As modificações, dessa maneira, não exibem regioseletividade e originam um padrão de substituição aleatório ao longo da estrutura dos polissacarídeos. Contudo, os polissacarídeos sulfatados podem ser submetidos a reação de dessulfatação, para a formação de padrões de substituição específicos e a sulfatação química dos polissacarídeos sulfatados naturalmente pode

proporcionar a síntese de derivados hipersulfatados, com diferentes propriedades biológicas (ARLOV *et al.*, 2021).

Se a estrutura nativa do polissacarídeo sujeito a sulfatação for conhecida, é possível realizar diversas metodologias de caracterização estrutural. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) pode mostrar picos em torno de 800-900 e 1000-1300 cm^{-1} , que correspondem às ligações S=O e C-O-S, respectivamente. A ressonância magnética nuclear (RMN) pode fornecer informações detalhadas, como as localizações preferenciais de substituição. Como as reações de sulfatação são conduzidas com ácidos e altas temperaturas, que podem resultar na hidrólise das ligações a estimativa do peso molecular pode indicar a distribuição e o tamanho da cadeia polissacarídica sintetizada (ARLOV *et al.*, 2021).

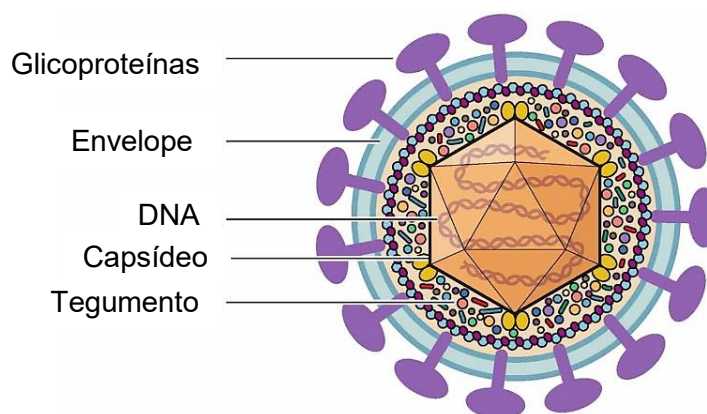
3.3 INFECÇÕES VIRAIS

As infecções virais são as mais comuns entre as doenças e podem ser causadas por diferentes tipos de vírus, que possuem diversos tamanhos microscópicos e formas morfológicas. No entanto, como são estruturalmente simples e não produzem energia, os vírus só realizam o processo de replicação no interior de células hospedeiras adequadas. Com isso, após a adsorção viral, o vírus assume a função das células infectadas e inicia o processo de replicação viral em conjunto da replicação celular (DRONINA; SAMUKAITE-BUBNIENE; RAMANAVICIUS, 2021). O Herpes simplex vírus tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), por exemplo, são amplamente distribuídos em todo o mundo, com a prevalência mundial de 67 e 13%, respectivamente. Na maioria das vezes, os indivíduos são assintomáticos para a doença e transmitem o vírus pela saliva ou secreções contaminadas. A maioria das pessoas adquire o HSV-1 pela cavidade oral no início da vida, enquanto HSV-2 pode ser caracterizado como uma infecção sexualmente transmissível (IST). As lesões são mucocutâneas, com erupções vesiculares e prevalentemente encontradas na região oral ou genital (WILMS, 2022).

Estruturalmente, o HSV apresenta o material genético protegido pelo capsídeo, que é formado por uma bicamada lipídica. O tegumento possui as proteínas virais, envolve o capsídeo e conecta o envelope com as glicoproteínas (KRISHNAN; STUART, 2021; ZHU; VIEJO-BORBOLLA, 2021). Para a entrada do HSV nas células do hospedeiro ocorre a ligação entre as glicoproteínas virais e os receptores celulares,

que desencadeiam mudanças conformacionais nas glicoproteínas do vírus e a fusão das membranas. Após a fusão, o material genético e as proteínas virais do tegumento penetram o núcleo da célula-alvo e iniciam a replicação do genoma viral. O HSV infecta as células epiteliais durante o processo infeccioso e permanece nos gânglios da raiz dorsal (corpo celular dos neurônios), em estado de latência até a reativação (CONOLLY; JARDETZKY; LONGNECKER, 2021; ZHU, VIEJO-BORBOLLA, 2021). A Figura 4 mostra a estrutura viral do HSV com o DNA, capsídeo, tegumento, envelope e as glicoproteínas.

Figura 4 – Estrutura do Herpes Simplex Vírus (HSV).



Fonte: Zhu e Viejo-Borbolla (2021) modificado.

O aciclovir, valaciclovir, fanciclovir, cidofovir e o foscarnet são os agentes antivirais utilizados no tratamento sintomático do HSV. Essas medicações, análogas dos nucleosídeos, inibem a replicação do vírus para o tratamento sintomático da infecção. Apesar de autolimitadas, as infecções refratárias representam um problema de saúde pública devido à resistência viral aos medicamentos convencionais. O uso prolongado desses fármacos viabiliza o aparecimento de novas variantes e o aumento incidental de cepas multirresistentes em pacientes imunodeprimidos (SAND *et al.*, 2021). Uma minoria de pacientes após a infecção crônica também pode desenvolver neoplasias relacionadas aos quadros virais, como o Sarcoma de Kaposi e o Linfoma não Hodgkin de Linfócitos B. Anualmente, 1,4 milhão de cânceres são induzidos por vírus (SCHILLER; LOWY, 2020).

Os vírus constantemente afetam a humanidade e várias pandemias virais ocorreram ao longo da história. De 1889-1890, a gripe asiática causou cerca de

1 milhão de mortes em todo o mundo, enquanto de 1918-1920 a gripe espanhola infectou mais de 50 milhões de pessoas. Desde 1981, por outro lado, mais de 85 milhões de pessoas foram infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Em 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a pandemia global para o novo tipo de Síndrome Respiratória Aguda Grave causada pelo Coronavírus-2 (SARS-CoV-2) (DRONINA; SAMUKAITE-BUBNIENE; RAMANAVICIUS, 2021). O SARS-CoV-2 foi responsável pela terceira pandemia viral do século 21 e segundo a OMS, até 2023, ocorreram 6,8 milhões de mortes (GAO *et al.*, 2023). Os termos endemia, surto, epidemia e pandemia representam a taxa prevista e a disseminação em áreas geográficas de uma condição de saúde (PIRET; BOIVIN, 2021).

A propagação de patógenos acompanha, principalmente, a velocidade e globalização de viagens e o comércio de animais e alimentos por todo o mundo, ou seja, ocorre devido as atividades humanas e os seus efeitos no ambiente. Sendo assim, além do desenvolvimento e da implementação de medidas não farmacêuticas para o controle da transmissão de agentes patogênicos, a identificação de novas moléculas com atividade antimicrobiana de largo espectro e, especialmente, antivirais viabilizam a criação de novas abordagens farmacológicas bem toleradas para o tratamento das infecções causadas por microrganismos de importância médica (PIRET; BOIVIN, 2021; SAND *et al.*, 2021).

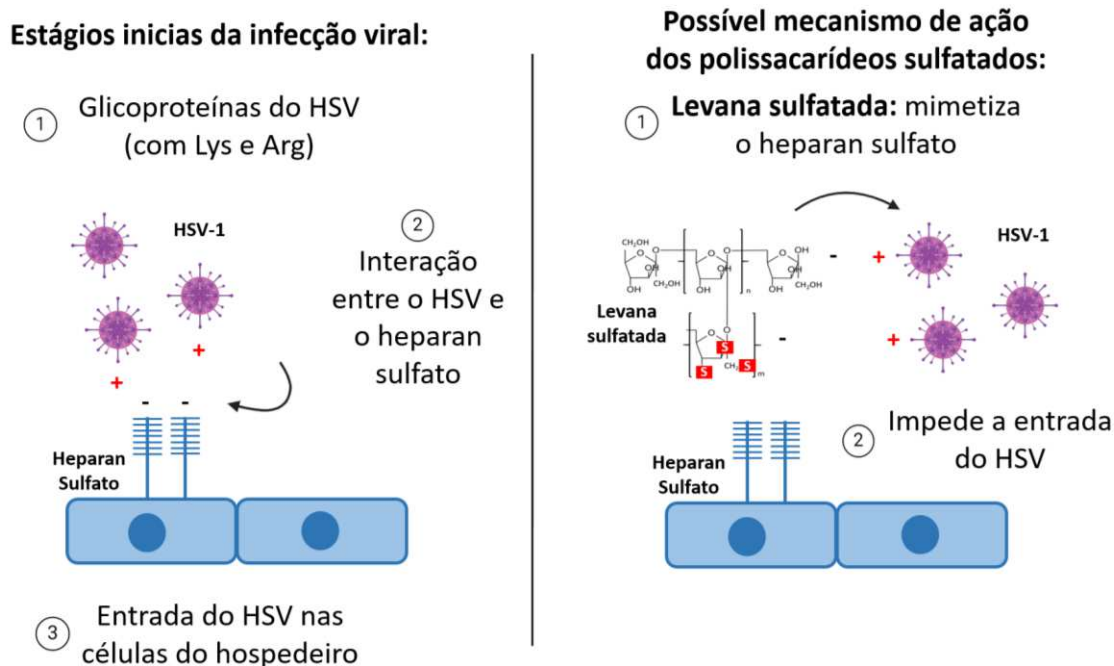
Malagoli *et al.* (2014) extraíram os galactanos sulfatados da parede celular da alga vermelha *Lithothamnion muelleri* e avaliaram a citotoxicidade e a atividade antiviral da fração B1 e B2 (resíduo da extração) contra o HSV-KOS (sensível ao aciclovir), HSV-1 e HSV-2 *in vitro*. As amostras eram compostas por 26,87-34,69% de açúcares e 8,49-11,80% de enxofre e os espectros de FT-IR indicaram a presença de grupos sulfato. Diferentemente do aciclovir (controle), que é usado após a infecção, as frações B1 e B2 inibiram o estágio de adsorção viral do HSV. Para a fração B1, a concentração citotóxica de 50% (IC₅₀) foi de 49,64, 51,69 e 7,39µg/mL para HSV-1 KOS, HSV-1 e HSV-2, nessa ordem. Já para a fração B2, o IC₅₀ foi de 77,89, 125,79 e 9,88µg/mL para HSV-1 KOS, HSV-1 e HSV-2. A concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) foi de >2500µg/mL para B1 e B2. Os polissacarídeos de algas marinhas sulfatados naturalmente atuam no estágio de adsorção e penetração do HSV e poderiam ser utilizados para a criação de novos agentes anti-HSV.

Muschin *et al.* (2016) sulfataram com complexo trióxido enxofre-piridina as galactomananas da goma de feno-grego (FG), goma guar (GG), goma tara (TG) e da goma de alfarroba (LG) e observaram a atividade antiviral das amostras sulfatadas contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e da Dengue (DENV). Os espectros de FT-IR confirmaram a sulfatação e o grau de substituição (DS) foi de 0,70 a 1,40. As amostras sulfatadas apresentaram a atividade anti-HIV (0,04 a 8,0 μ g/mL) e antidengue (1,1 μ g/mL). O IC₅₀ foi de 0,02 a 2,4 e de 0,1 a 1,1 μ g/mL, enquanto o CC₅₀ foi de 91 a >1000 e de >1000 μ g/mL para o HIV e o DENV, nessa ordem. Esses resultados sugerem que as amostras sulfatadas podem ser utilizadas para o tratamento dos quadros infecciosos de origem viral sem causar a citotoxicidade.

Sacchelli *et al.* (2019) sulfataram com o ácido clorossulfônico-piridina a botrosferana do fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 e analisaram a citotoxicidade e o efeito antiviral da botrosferana nativa e das amostras sulfatadas (S1 e S2) contra o HSV-KOS, HSV-AR (resistente ao aciclovir), HSV-1, vírus da Dengue sorotipo 3 (DENV-3) e o Poliovírus (PV). Os espectros de FT-IR evidenciaram a sulfatação e o DS foi de 0,4 e 1,1 para S1 e S2, respectivamente. A botrosferana nativa apresentou atividade anti-HSV moderada com o IC₅₀ de 39,3 a 47,5 μ g/mL, enquanto S1 e S2 foram mais potentes com o IC₅₀ de 2,4 a 7,3 μ g/mL. O índice de seletividade (SI) foi de >10,2 para o HSV-KOS e de 8,4 para o HSV-AR. A ação anti-DENV-3 também foi confirmada, com o IC₅₀ de 66,5 μ g/mL para S1 e de 8,5 μ g/mL para S2. Nenhuma das amostras apresentaram atividade antiviral contra o PV. Como o HSV e o DENV-3 são envelopados e o PV não, esses dados reforçam que a atuação dos polissacarídeos sulfatados provavelmente está relacionada com o processo de adsorção viral.

Os polissacarídeos sulfatados atuam nas estruturas virais para a inibição da capacidade infecciosa do vírus. As interações eletrostáticas, que resultam da carga negativa dos grupos sulfato e da carga positiva dos resíduos dos aminoácidos das glicoproteínas virais impossibilitam a ligação com os receptores das células hospedeiras e o estágio de adsorção viral (LU *et al.*, 2021). A Figura 5 mostra os estágios iniciais da infecção viral do HSV e o possível mecanismo de ação dos polissacarídeos sulfatados devido a interação entre as cargas positivas e negativas.

Figura 5 – Possível Mecanismo de Ação Antiviral dos Polissacarídeos Sulfatados.



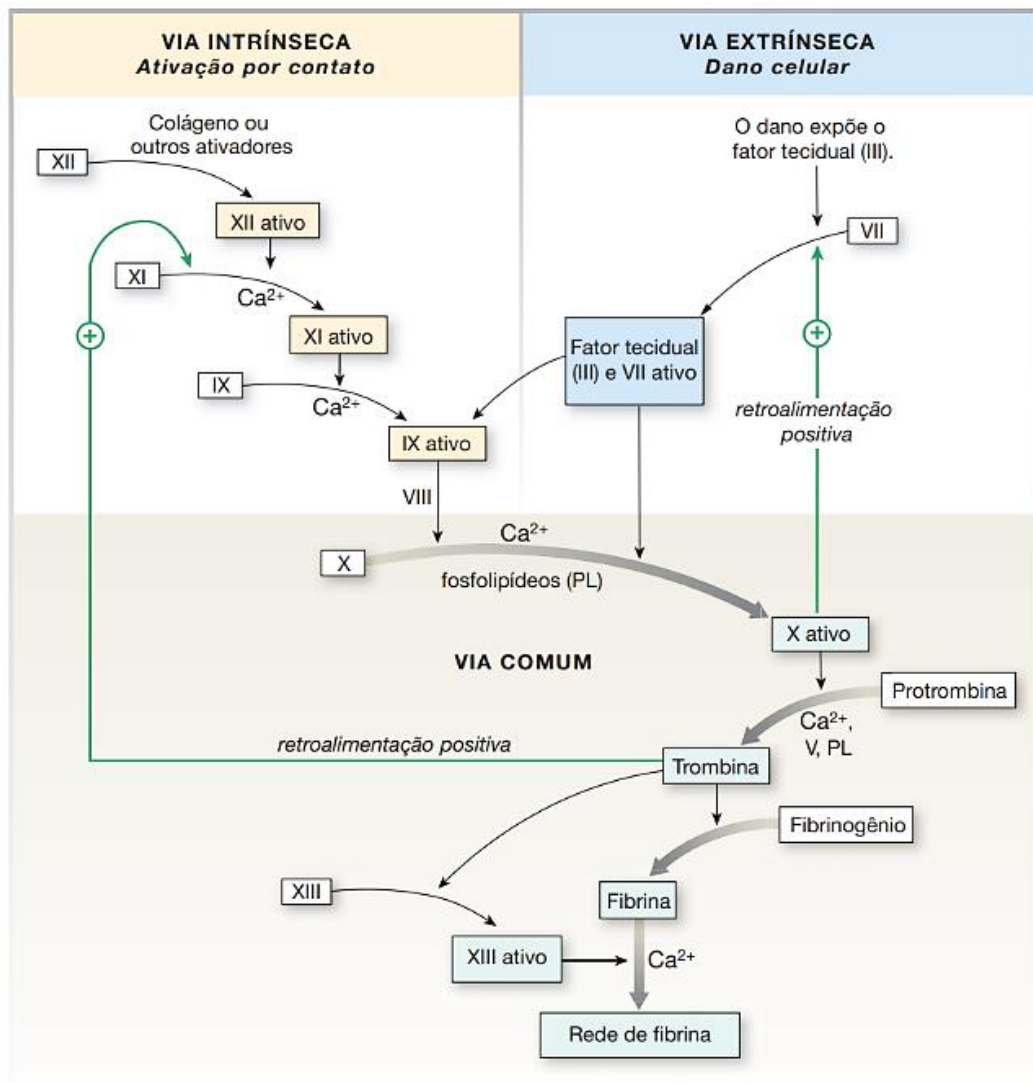
3.4 COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

A circulação sanguínea proporciona o transporte do sangue sem impedimento, mas quando há uma lesão dos vasos sanguíneos, a formação do tampão plaquetário e o desenvolvimento do coágulo sanguíneo viabilizam o retorno da hemostasia. A exposição do sangue ao colágeno e a tromboplastina tecidual (fator III) inicia a sinalização proteica e a cascata de coagulação sanguínea, para a ativação do ativador de protrombina, conversão da protrombina em trombina e a transformação do fibrinogênio em fibrina (ANTONIAK, 2018). A formação do ativador de protrombina pode acontecer pela via intrínseca, que é iniciada com a exposição do colágeno e ativação do fator XII ou extrínseca, que é desencadeada com a liberação do fator III e a ativação do fator VII. Essas vias, a partir do fator X, convergem para uma via comum que produz a trombina, para a conversão do fibrinogênio em fibrina (FERREIRA *et al.*, 2010).

O desequilíbrio desse sistema é prejudicial à saúde e responsável pelos distúrbios da coagulação sanguínea. Pouca hemostasia viabiliza o sangramento, enquanto muita hemostasia propicia a geração de trombos e coágulos, que são aderidos aos vasos sanguíneos e interrompem o fluxo sanguíneo. O tromboembolismo venoso (TEV) pode ser manifestado por meio da trombose venosa

profunda (TVP), que envolve as veias das extremidades inferiores e do tromboembolismo pulmonar (EP). O TEV é a terceira causa mais comum de mortalidade vascular e no Brasil, segundo o Ministério da Saúde, foram internados mais de 520 mil pacientes com a doença entre os anos de 2010-2021 (ALBRICKER et al., 2022; NICHOLSON et al., 2020). A Figura 6 mostra os iniciadores da via intrínseca e extrínseca para a ativação da cascata de coagulação sanguínea.

Figura 6 – Via Intrínseca e Extrínseca da Cascata de Coagulação Sanguínea.



Fonte: Silverthorn (2017).

A estase venosa, hipercoagulabilidade sanguínea, lesão endotelial e as plaquetas são fatores que predisõem o TEV (NAVARRETE et al., 2022). No entanto, o risco individual de um paciente depende de condições específicas, como a idade e o índice de massa corporal (IMC) e do contexto clínico, como a hospitalização,

e cirurgias. Esses aspectos também podem ser classificados como transitórios ou persistentes e determinam o risco do desenvolvimento do TEV e a profilaxia ideal, que inclui o uso de anticoagulantes, para a prevenção da embolia pulmonar e, por consequência, da morte. A taxa de letalidade por embolia pulmonar corresponde por praticamente toda a mortalidade relacionada ao TEV (NICHOLSON *et al.*, 2020).

Exames laboratoriais, como o Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (KPTT) e o Tempo de Trombina (TT), podem ser realizados para o acompanhamento. O TP avalia a via extrínseca e comum da coagulação e evidencia a deficiência dos fatores V, VII e X, enquanto o tempo de tromboplastina parcial ativada KPTT analisa os fatores da via intrínseca e comum da coagulação e indica a deficiência dos fatores II, V, VIII, IX, X, XI e XII, precalicreína, cininogênio e do fibrinogênio. O TT verifica o tempo que o fibrinogênio se transforma em fibrina. Os resultados, obtidos na forma de tempo em segundos (s), podem apresentar alterações em pacientes que fazem o uso de anticoagulantes orais (BRASIL, 2016).

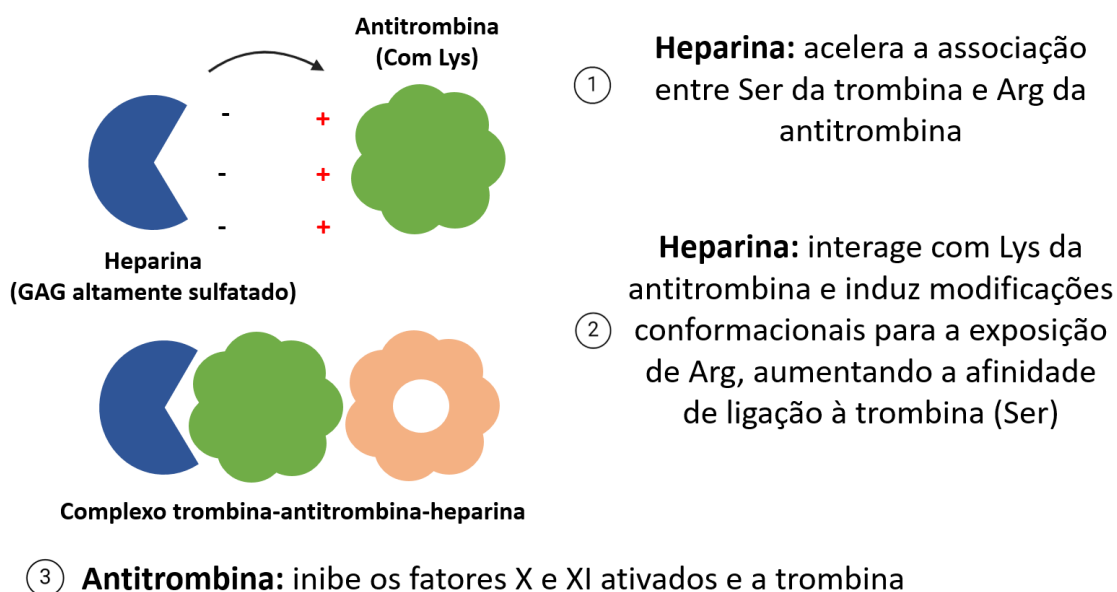
Os anticoagulantes orais, como a rivaroxabana, apixabana, edoxabana e a dabigatrana inibem o fator X e II ativados (YOSHIDA, 2016). A meia-vida curta desses medicamentos permite a administração em doses fixas, sem o monitoramento e o ajuste da dose (BECATTINI; AGNELLI, 2016). A heparina, por outro lado, possui a administração intravenosa ou subcutânea e a ação anticoagulante a partir da ligação com a antitrombina, que interage com a trombina e/ou o fator X ativado. A hemorragia é um evento adverso comum do uso dos anticoagulantes orais e injetáveis e impossibilita o início e a progressão do tratamento. Portanto, é imprescindível a busca por novas moléculas e/ou substâncias com propriedades anticoagulantes, com perfis de risco-benefício mais favoráveis e segurança para o uso prolongado, visto que a hemorragia restringe o fornecimento de terapias eficazes e pode levar os pacientes ao óbito (LEVY; CONNORS, 2021; NAHAIN *et al.*, 2018).

Em situações normais, a trombina transforma o fibrinogênio em fibrina, para a formação do tampão plaquetário e a antitrombina inibe diferentes proteases, incluindo a trombina e os fatores X e XI ativados (AL-AMER, 2022). Os polissacarídeos sulfatados atuam em pontos específicos da cascata de coagulação sanguínea e as interações eletrostáticas entre a carga negativa dos grupos sulfato dos polissacarídeos sulfatados e a carga positiva dos resíduos de aminoácidos da antitrombina viabilizam a formação do complexo polissacarídeo sulfatado-

antitrombina-trombina, que é transitório e melhora a ação anticoagulante. Com isso, os polissacarídeos sulfatados inibem a trombina e os fatores X, IX e XI ativados e, conseqüentemente, a trombose (HAO *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2020). A Figura 7 mostra a posição ação anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados devido a interação entre as cargas positivas e negativas.

Figura 7 – Mecanismo de Ação Anticoagulante da Heparina.

Possível mecanismo de ação dos polissacarídeos sulfatados:



Ghliissi *et al.* (2019) extraíram o polissacarídeo sulfatado da planta *Globularia alypum* L (GASP) e avaliaram a toxicidade e a atividade anticoagulante *in vitro* e *in vivo* dessa macromolécula. GASP era composta de 71,56% de açúcares totais, 13,29% de enxofre, 7,53% de teor de umidade e 6,3% de cinzas. Nos testes *in vitro*, GASP prolongou o KPTT, TT e o TP dependente da concentração. Já no hemograma de ratos, 2h após a injeção de GASP houve a diminuição do número de plaquetas, mas a contagem permaneceu dentro dos valores de referência. Nos ensaios *in vivo*, GASP também aumentou o KPTT, TT e o TP de acordo com a concentração. O perfil toxicológico da transaminase glutâmico-oxalacética (AST), alanina transferase (ALT) e da fosfatase alcalina (ALP) não demonstrou variação significativa. Já para a análise histopatológica do fígado, GASP induziu danos menores que a calciparina (controle). Dessa forma, GASP inibiu a as duas vias da coagulação e o TT, sem causar danos significativos ao fígado e por isso, expressa

bom perfil farmacológico.

Zhang *et al.* (2020) sulfataram com o complexo trióxido de enxofre-piridina, em diferentes temperaturas de reação para a sulfatação regioseletiva o β -D-glucano (GLP) do cogumelo *Ganoderma lucidum* e analisaram a atividade anticoagulante das amostras sulfatadas. Novas bandas nos espectros de FT-IR indicaram a presença dos grupos sulfato e o DS foi de 1,23, 1,72 e 1,74 para GLP1, GLP2 e GLP3, nessa ordem. Todos os derivados sulfatados inibiram a via extrínseca e intrínseca da cascata de coagulação sanguínea, mas GLP2 apresentou a melhor atividade anticoagulante, embora menos potente do que a heparina (controle). A forma nativa (GLP) não expressou qualquer efeito anticoagulante. Além do DS, outras características podem favorecer a atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados.

Wang *et al.* (2020) sulfataram com o complexo ácido clorossulfônico-piridina os polissacarídeos do gengibre (GP, GP1 e GP2) e verificaram a atividade anticoagulante das amostras sulfatadas (SGP, SGP1 e SGP2). Os espectros de FT-IR demonstraram novas bandas características dos grupos sulfato e o DS foi de 1,29, 0,86 e 0,77 para SGP2, SGP e SGP1, respectivamente. SGP e SGP2 prolongaram o KPTT e apresentaram efeito para a via intrínseca, à medida que GP aumentou o TP e o TT. Os polissacarídeos do gengibre e os derivados sulfatados demonstraram efeito na via intrínseca e extrínseca da cascata de coagulação sanguínea e, com isso, podem ser alternativas naturais de anticoagulantes.

3.5 AGENTES ANTIOXIDANTES

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são derivadas do oxigênio diatômico (O_2), favorecem a formação de radicais livres a partir da oxidação e/ou redução incompleta do oxigênio e podem ser de vários tipos, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), com a dismutação espontânea do superóxido; ânion superóxido (O_2^-), com o ganho de um elétron e o radical hidroxila (OH), com a aquisição de um próton. As moléculas oxidadas (que perderam elétrons) interagem com outras moléculas em busca de estabilidade. Em seguida, as moléculas oxidadas e transformadas em radicais livres, repetindo o processo, procuram e acometem outras moléculas para capturar os elétrons e alcançar a estabilidade novamente. Portanto, os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativas, com um ou mais

elétrons desemparelhados da última camada de valência (MARTELLI; NUNES, 2014; SHARIFI-RAD *et al.*, 2020; VELOSSA *et al.*, 2021).

A produção de radicais livres ocorre através de diferentes processos, como o metabolismo mitocondrial, processos isquêmicos e inflamatórios e a prática de exercício físico. Fatores externos, como o tabagismo, radiação e a poluição, todavia, também induzem a síntese dos radicais livres (VELOSSA *et al.*, 2021). À vista disso, os sistemas antioxidantes neutralizam e previnem a produção excessiva de radicais livres. O desequilíbrio entre os agentes oxidantes e as moléculas antioxidantes (equilíbrio redox), a favor dos agentes oxidantes, resulta no estresse oxidativo, com a diminuição da remoção dos radicais livres e, conseqüentemente, o aumento de lesões nas macromoléculas celulares, por reações com os lipídios, proteínas e os ácidos nucléicos (SHARIFI-RAD *et al.*, 2020; SIES, 2020).

Os mecanismos antioxidantes podem ser subdivididos em enzimáticos, de origem endógena (próprios do organismo) e não enzimáticos, de origem exógena (obtidos pela dieta) (VELLOSA *et al.*, 2020). As três principais enzimas são; a catalase (decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio), superóxido dismutase (SOD) (catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio) e a glutathione peroxidase (GPX) (reduz os hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos). Por outro lado, o ácido ascórbico, vitamina E e o betacaroteno, por exemplo, são antioxidantes não enzimáticos. Essas moléculas diminuem os danos celulares, com o encerramento das reações em cadeia, remoção dos radicais livres e ou a inibição de outras reações de oxidação (AZAB *et al.*, 2019).

A ação patológica das EROs, portanto, depende da concentração e do local de produção. O estresse oxidativo, por isso, tem sido relacionado com a doença de Alzheimer (DA), devido a peroxidação lipídica do docosahexaenóico (massa cinzenta cerebral) e do di-homo-isoprostanos do ácido eicosatetraenóico (substância branca cerebral); diabetes mellitus tipo 1 e 2, em razão da glicação das proteínas e da oxidação da glicose e a peroxidação lipídica, que favorecem a resistência à insulina e a arterosclerose em função da oxidação das lipoproteínas que induzem disfunções em células endoteliais e a ação do sistema imunológico (MALEKMOHAMMAN; SEWELL; RAFIEIAN-KOPAEI, 2019; PENÃ-BAUTISTA *et al.*, 2019; ULLAH; KHAN; KHAN, 2016). Logo, a identificação de novos agentes antioxidantes permite a criação de novas abordagens que eliminem as EROs, para a prevenção do desenvolvimento de diversas doenças (GULCIN, 2020).

Xiao *et al.* (2019) sulfataram com o complexo ácido clorossulfônico-piridina, em diferentes proporções do agente sulfatante o polissacarídeo da alga marinha *Sargassum pallidum* (SPP) e avaliaram a atividade antioxidante e hipoglicemiante das amostras sulfatadas (SPP₁₋₄, SPP₁₋₆, SPP₁₋₈). Os espectros de FT-IR confirmaram a sulfatação e o DS foi de 0,85 a 1,19. Todas as amostras eliminaram o radical DPPH e na concentração de 2mg/mL, as taxas de inibição foram de 91%, 96,53%, 92,04% e de 89,33% para o SPP, PP₁₋₄, SPP₁₋₆ e o SPP₁₋₈, respectivamente. Já para o radical ABTS, as amostras mostraram o efeito antioxidante dependente da dose e na concentração de 1mg/mL, as taxas de eliminação foram de 77,6%, 78,1%, 70,1% e de 70,8% para o SPP, PP₁₋₄, SPP₁₋₆ e o SPP₁₋₈, nessa ordem. No entanto, em baixas concentrações (0,0625 a 0,25mg/mL) todos os derivados sulfatados apresentaram maior eliminação dos radicais livres em comparação com o polissacarídeo nativo (SPP). Os resultados indicaram que a ação antioxidante dos polissacarídeos foi aumentada com o processo de sulfatação, mas outras características, além do valor do DS, também podem ter favorecido essa atividade.

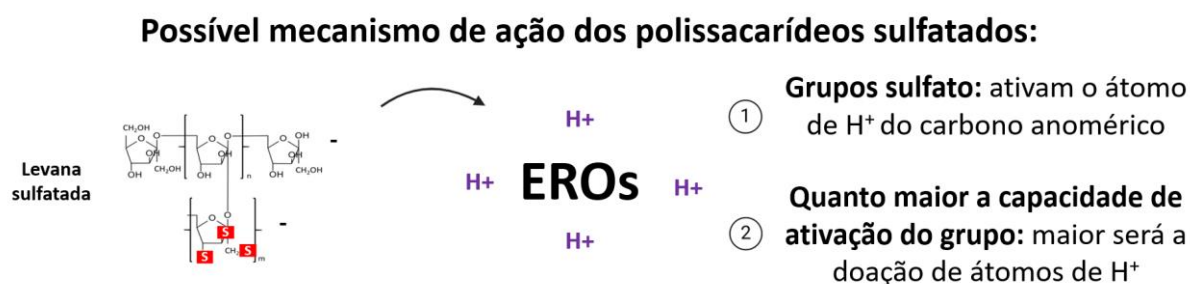
Chen e Huang (2019) sulfataram com o complexo ácido clorossulfônico-piridina, em diferentes proporções do agente sulfatante e temperaturas os polissacarídeos da abóbora (SP) e analisaram a atividade antioxidante das amostras sulfatadas (SP1 e SP2). A partir dos espectros de FT-IR foi confirmada a adição dos grupos sulfatos e o DS foi de 0,35 e 0,65 para SP1 e SP2, respectivamente. Todas as amostras apresentaram a eliminação do radical OH a partir da concentração de 0,4mg/mL. Todavia, o polissacarídeo nativo (SP) expressou a melhor taxa de inibição, sugerindo que a introdução dos grupos sulfato teve pouco impacto para o radical OH. Para a eliminação do ânion superóxido, SP2 apresentou a melhor capacidade de eliminação e neste caso, a adição dos grupos sulfato favoreceu a atividade antioxidante. Já para a capacidade redutora não houve diferença significativa entre o polissacarídeo nativo e os derivados sulfatados. Em alguns aspectos, a sulfatação melhorou a atividade antioxidante dos polissacarídeos de abóbora.

Khan *et al.* (2019) extraíram os galactanos sulfatados da alga vermelha *Gracilaria chouae* (GCP) e observaram a atividade antioxidante pela eliminação dos radicais DPPH, OH e ABTS. A amostra era composta de 52,63% de açúcares e de 7,9% de enxofre e os espectros de FT-IR indicaram a presença de grupos sulfato na estrutura do polissacarídeo. O biopolímero eliminou os radicais

DPPH, OH e ABTS dependente da concentração. Na maior concentração testada de 3mg/mL, GCP apresentou a inibição de 36,86%, 27,42% e de 19,05% para DPPH, OH e ABTS, respectivamente. Já na menor concentração testada (1mg/mL), GCP expressou 19,51%, 10,97%, 9,88% para DPPH, OH e ABTS, nessa ordem. Os resultados corresponderam com a capacidade de transferência de elétrons e efeito antioxidante do polissacarídeo e evidenciam que GCP possui potencial para ser utilizado como antioxidante na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Além de fixarem os radicais livres de forma eletrostática, os grupos sulfato dos polissacarídeos sulfatados podem apresentar maior capacidade de doação de moléculas de hidrogênio, que resultam na formação de radicais livres estáveis e na interrupção em cadeia das reações de oxidação (CALEGARI *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2010). A Figura 8 mostra o possível mecanismo de ação dos polissacarídeos sulfatados a partir da doação de átomos de hidrogênio as EROs.

Figura 8 – Possível Mecanismo de Ação Antioxidante dos Polissacarídeos Sulfatados.



4 MATERIAL E METÓDOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 *Bacillus subtilis* natto

Bacillus subtilis natto (CCT7712), isolada do alimento japonês natto no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná e identificada pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello – Campinas, São Paulo, foi utilizada para a produção da levana. A manutenção de *B. subtilis* natto foi realizada a cada 4 semanas e mantida à 4°C em meio de preservação (Tabela 2).

4.1.2 Vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1)

Herpes vírus simplex tipo 1 cepa KOS (HSV-1 KOS) (sensível ao aciclovir) cedido do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, foi utilizado para a avaliação da atividade antiviral da levana nativa (LN) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2). O HSV-1 KOS foi inoculado em células Vero (CCL-81) para o estoque viral, com cerca de 100µL e 10% (v/v) de glicerol. As culturas foram mantidas a -20°C.

4.1.3 Células Vero (CCL-18)

Células Vero (CCL-81) cedidas do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, foram utilizadas para a avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral da levana nativa (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2). As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco-BRL, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Gibco-BRL, EUA), 2mM de glutamina (Sigma Chemical Company, EUA), 100UI/mL de penicilina (Sigma Chemical Company, EUA), 100µL de estreptomicina (Gibco-BRL, EUA) e 2µg/mL de anfotericina B (Meizler Biopharma S/A, BR).

4.1.4 Meios de Cultura

Tabela 2 – Composição do Meio de Preservação para *B. subtilis* natto.

| Composição | g/L |
|------------------|-----|
| Peptona | 50 |
| Extrato de Carne | 30 |
| Ágar | 20 |

Tabela 3 – Composição do Meio de Ativação para *B. subtilis* natto.

| Composição | g/L |
|---|-----|
| Sacarose | 100 |
| Extrato de Levedura | 2 |
| KH ₂ PO ₄ | 2 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1 |
| MgSO ₄ (7H ₂ O) | 0,5 |

Fonte: Calazans *et al.* (2000).

Tabela 4 – Composição do Meio de Fermentação para *B. subtilis* natto.

| Composição | g/L |
|---|------|
| Sacarose | 400 |
| Extrato de Levedura | 2 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 3 |
| MgSO ₄ (7H ₂ O) | 0,6 |
| MnSO ₄ | 0,2 |
| Amônio Citrato | 0,25 |

Fonte: Euzenat, Guibert e Combes (2000) modificado.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Curva de Biomassa e Preparo do Inóculo

Para a curva de biomassa, duas alçadas de *B. subtilis* natto foram transferidas em frascos Erlenmeyer de 125mL, contendo 25mL do meio de

fermentação (Tabela 3) e incubadas a 150rpm, 37°C por 24h. O cultivo foi interrompido por centrifugação (Centrifuga Universal 320, Hettich, DE) a 9000rpm, 4°C por 15min. A biomassa foi ressuspensa em solução salina (NaCl) 0,9% e uma alíquota de 1mL foi diluída em diferentes concentrações para a leitura em espectrômetro (Genius, Thermo Fisher Scientific, EUA) a $\lambda=605\text{nm}$. Paralelamente, três alíquotas de 1mL foram distribuídas em cadinhos de alumínio previamente tarados e levados a estufa a 70°C até a obtenção do peso constante. Os dados foram plotados em um gráfico relacionando a absorbância (nm), na ordenada e o peso seco (g/L), na abcissa.

Para o inóculo, em frascos Erlenmeyer de 500mL, contendo 125mL do meio de ativação (Tabela 3) e incubadas a 150rpm, 37°C por 24h. O cultivo foi interrompido por centrifugação a 9000rpm, 4°C por 15min. A biomassa foi ressuspensa em solução salina (NaCl) 0,9% e a leitura realizada em espectrômetro a $\lambda=605\text{nm}$. A concentração foi comparada com a curva de calibração da biomassa e o inóculo padronizado a 0,2g/L.

4.2.2 Produção da Levana por Fermentação Submersa

Para a produção de levana foi preparado um planejamento Box-Behnken 3^3 incompleto, com 12 ensaios e 3 pontos centrais. As variáveis independentes foram: (X_1) tempo de fermentação (24, 48 e 72h), (X_2) concentração de sacarose (100, 250 e 400g/L) e (X_3) pH inicial (4, 6 e 8) (Tabela 5). Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125mL, contendo 25mL do meio de fermentação (Tabela 4), e incubados a 150rpm e 37°C (BERSANETI *et al.*, 2017). As variáveis resposta foram: (Y_1) crescimento microbiano (g/L), (Y_2) consumo de sacarose (g/L) e (Y_3) produção de levana (g/L). A melhor condição de produção, obtida a partir do delineamento experimental foi reproduzida em frascos Erlenmeyer de 1L, contendo 250mL do meio de fermentação (Tabela 4).

Tabela 5 – Planejamento Box-Behnken 3^3 para a Avaliação do: (X_1) Tempo de Fermentação (h), (X_2) Concentração de Sacarose (g/L) e do (X_3) pH inicial na Produção de Levana.

| Ensaio | Variáveis Codificadas | | | Variáveis Decodificadas | | |
|--------|-----------------------|-------|-------|--------------------------|--------------------------------|------------|
| | X_1 | X_2 | X_3 | Tempo de Fermentação (h) | Concentração de Sacarose (g/L) | pH Inicial |
| 1 | -1 | -1 | 0 | 24 | 100 | 6,0 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 72 | 100 | 6,0 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 24 | 400 | 6,0 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 72 | 400 | 6,0 |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 24 | 250 | 4,0 |
| 6 | 1 | 0 | -1 | 72 | 250 | 4,0 |
| 7 | -1 | 0 | 1 | 24 | 250 | 8,0 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 72 | 250 | 8,0 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 48 | 100 | 4,0 |
| 10 | 0 | 1 | -1 | 48 | 400 | 4,0 |
| 11 | 0 | -1 | 1 | 48 | 100 | 8,0 |
| 12 | 0 | 1 | 1 | 48 | 400 | 8,0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 48 | 250 | 6,0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 48 | 250 | 6,0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 48 | 250 | 6,0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 48 | 250 | 6,0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 48 | 250 | 6,0 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 48 | 250 | 6,0 |

4.2.3 Avaliação dos Parâmetros Fermentativos

Após a fermentação, os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 9000rpm, 4°C por 15min. O precipitado foi usado para determinar a biomassa (g/L) e o sobrenadante foi utilizado para avaliar o consumo de sacarose (g/L) e a produção de levana (g/L).

4.2.3.1 Biomassa e Consumo da Sacarose

O precipitado obtido na centrifugação foi ressuspenso em solução salina (NaCl) 0,9% e a leitura realizada em espectrofotômetro a $\lambda=605\text{nm}$. A concentração foi comparada com a curva de calibração da biomassa. Os açúcares totais (AT) foram dosados por Fenol-Sulfúrico a $\lambda=460\text{nm}$ (DUBOIS *et al.*, 1956) e os açúcares redutores (AR) foram quantificados por Somogyi-Nelson a $\lambda=540\text{nm}$ (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952). O consumo de sacarose foi estabelecido com base na equação 1 e 2:

(1)

$$[AT] - [AR] = [Sacarose\ Residual]$$

(2)

$$[Sacarose\ Inicial] - [Sacarose\ Residual] = [Consumo\ de\ Sacarose]$$

4.2.3.2 Precipitação e Quantificação da Levana

A levana produzida foi precipitada com o etanol absoluto na proporção de 3:1 (0,9mL de etanol absoluto:0,3mL do sobrenadante) a 4°C por 12h. O precipitado formado foi lavado duas vezes com o etanol absoluto, centrifugado a 9000rpm, 4°C por 15min e hidrolisado com 1mL de ácido clorídrico (HCl) 0,1M em banho-maria a 100°C por 1h (VIKARI; GISLER, 1986). A reação foi neutralizada com 0,1mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2M. A produção de levana foi quantificada por Somogyi-Nelson, utilizando a frutose como padrão (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952).

4.2.4 Separação da Levana

Para síntese das amostras sulfatadas (SL1 e SL2), a levana produzida foi precipitada com o etanol absoluto na proporção de 3:1 (etanol:sobrenadante) a 4°C por 12h. O precipitado foi centrifugado a 9000rpm, 4°C por 15min, dialisado contra água destilada por 48h, liofilizado e armazenado a -2°C.

4.2.5 Modificação Química da Levana

4.2.5.1 Reação de Sulfatação da Levana

Dois processos de sulfatação foram realizados de acordo com o protocolo descrito por De Araújo *et al.* (2013). Para cada sulfatação, cerca de 0,5g de levana nativa liofilizada foram solubilizadas em 250mL de dimetilformida anidro (DMF) sob atmosfera inerte por 48h. Para a levana sulfatada 1 (SL1), foram adicionados 3,9g do complexo trióxido de enxofre-piridina (SO₃-Py) (8 equivalente/unidades de frutose) e 1,1mL de trietilamina (Et₃N). Para a levana sulfatada 2 (SL2), foram transferidos 11,7g do complexo trióxido de enxofre-pirina (SO₃-Py) (24 equivalentes/unidades de frutose) e 1,1mL de trietilamina (Et₃N). As misturas foram mantidas sob agitação em temperatura ambiente por 7h e neutralizadas com a solução saturada de bicarbonato. Em seguida, foi adicionado 166,65mL de tampão fosfato 0,025mol/L (pH 7,0) em SL1 e SL2. As reações foram submetidas a diálise contra a solução de cloreto de sódio (NaCl) 1mol/L por 24h e água destilada por 96h, liofilizadas e armazenadas a -2°C. Os processos foram realizados no Laboratório de Síntese de Moléculas Medicinais (LasMMed) do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

4.2.5.2 Análise do Grau de Substituição (DS)

O grau de substituição (DS) das amostras sulfatadas (LS1 e LS2), que representa o número médio de grupos hidroxila substituídos por grupos sulfato foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Dodgson e Price (1962), com modificações. Inicialmente, 1mg de SL1 e SL2 foram hidrolisadas com HCl concentrado em banho termostático a 100°C por 10min. Para determinar o DS, 0,2mL dos hidrolisados foram solubilizados com 3,8mL de ácido tricloroacético (TCA), 1mL da solução protetora (6g de NaCl 6g, 0,5mL de HCl concentrado, gelatina 0,1 % m/v e 47mL de água destilada) e 0,03g de cloreto de bário (BaCl₂). O sulfato de bário resultante foi quantificado em espectrofotômetro a $\lambda=420\text{nm}$. O DS, que caracteriza o número médio de grupos sulfato em cada resíduo de frutose, foi estabelecido a partir do conteúdo de enxofre, com base nas equações 3 e 4, onde (%) = % enxofre.

(3)

$$S(\%) = \frac{BaSO_4(\mu g) \times 0,1374 \times 100}{Amostra (\mu g)}$$

(4)

$$DS = \frac{162 \times S}{3200 - 102 \times S}$$

Onde, 162 representa o peso molecular médio do resíduo glicosil do polissacarídeo; 3200 equivale a massa atômica do enxofre e 102 equivale ao mol médio dos grupos sulfato.

4.2.6 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada no Fourier (FT-IR)

A identificação dos grupos funcionais da levana nativa (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2) foi realizada em Espectrofotômetro no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) (IR PRESTIGE-21, Shimadzu, JP). A resolução foi de 2cm^{-1} , na faixa de $400\text{-}4000\text{cm}^{-1}$, e os resultados foram integrados através do software Origin (OriginLab, EUA). A NL foi usada como controle e antes da análise, as amostras foram incorporadas ao KBr e submetidas à alta pressão para a produção de pastilhas. Os testes foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da Central Multiusuário de Laboratórios de Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

4.2.7 Termogravimetria (TG)

Para verificar a perda e/ou ganho de massa da levana nativa (NL) e das amostras sulfatadas (LS1 e LS2), 10mg das amostras foram expostas ao programa de temperatura (TGA-50, Shimadzu, JP) com a faixa de temperatura de 0 a 900°C e a taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. A NL foi usada como controle. As análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da Central Multiusuário de Laboratórios de Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

4.2.8 Avaliação das Propriedades Biológicas

4.2.8.1 Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade da levana nativa (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2) foi realizada em células Vero (CCL-81) por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), de acordo com o protocolo descrito por Pauwels (1988) e De La Iglesia *et al.* (1988). As concentrações testadas foram de 0,062 a 0,5mg/mL e o controle foi preparado apenas com o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco-BRL, EUA). As células foram cultivadas em microplacas de 96 poços e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 24h, até alcançarem 90% de confluência. As amostras foram adicionadas e as placas incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 72h. Em seguida, foram transferidas 0,010mL do reagente do MTT e as placas incubadas a 37°C, CO₂ por 2h. Após esse período, foi adicionado 0,090mL do reagente MTT e as placas foram mantidas sob agitação por 15min. As análises foram preparadas em quintuplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a $\lambda=570\text{nm}$ e a $\lambda=690\text{nm}$. Os testes foram realizados no Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL). A porcentagem da viabilidade celular (%VC) foi estabelecida com base na equação 5:

$$(5) \quad VC(\%) = \frac{(\text{Média Abs da Amostra } 570\text{nm} - \text{Média Abs da Amostra } 690\text{nm})}{(\text{Média Abs do Controle } 570\text{nm} - \text{Média Abs do Controle } 690\text{nm})} \times 100$$

A citototoxicidade de 50% (CC₅₀), que representa a concentração capaz de matar 50% das células foi determinada em relação a concentração celular (CC), por análise de regressão linear (RECHENCHOSKI, 2020).

4.2.8.2 Atividade Antiviral

A atividade antiviral da levana nativa (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2) foi verificada em partículas virais do Herpes simplex vírus 1 cepa KOS (HSV-1 KOS) (sensível ao aciclovir) em meio extracelular, de acordo com o protocolo descrito por Pauwels (1988) e De La Iglesia *et al.* (1988). As concentrações testadas foram de 0,025 a 0,2mg/mL. As amostras foram incubadas com o vírus a 37°C, 5% de

CO₂ por 1h. Em seguida, as misturas foram diluídas para a obtenção de soluções contendo o vírus na diluição de 10⁻³ e a concentração não citotóxica das amostras (previamente encontrada no ensaio de citotoxicidade), para a inoculação das células (5x10⁴ células/poço). As placas foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 72h e após esse período, a atividade citotóxica foi realizada por MTT. Os testes foram realizadas no Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL). A porcentagem de inibição viral (IV) (%) foi verificada com base na equação 5:

$$(6) \quad IV (\%) = \frac{(AbsT \ 570nm - AbsT \ 690nm - AbsCV \ 570nm - AbsCV \ 690nm)}{(AbsCC \ 570nm - AbsCC \ 690nm - AbsCV \ 570nm - AbsCV \ 690nm)} \times 100$$

Onde, AbsT representa a absorbância das células inoculadas e tratadas com as amostras; AbsCV corresponde a absorbância do controle do vírus (células inoculadas e não tratadas) e AbsCC determina a absorbância do controle das células (células não inoculadas e não tratadas).

4.2.8.3 Atividade Anticoagulante

A atividade anticoagulante da levana nativa (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Vasconcelos *et al.* (2013), com modificações. O tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativado (KPTT) foram realizados em sistema automático de análise de coagulação do sangue (Sysmex CS-2500 System, Siemes Healthineers, DE). As concentrações testadas foram de 0,050 a 0,300mg/mL. O pool de soros foi preparado com amostras, com os parâmetros de TP e KPTT normais da rotina do Laboratório de Hematologia do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná da Universidade Estadual de Londrina (HU-UJEL). Para determinar a atividade anticoagulante, 0,50mL de cada amostra foi solubilizada em 0,450mL do pool de soros. No controle, 0,50mL do tampão OVB (diluente de fibrinogênio) foi solubilizado em 0,450mL do pool de soros. As análises foram preparadas em duplicatas.

4.2.8.4 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante da levana (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2) foi determinada pela captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picil-hidrazil), de acordo com o protocolo descrito por Srikanth *et al.* (2015). As concentrações testadas foram de 5 a 0,78mg/mL. Para determinar a atividade antioxidante, 1mL das amostras foi solubilizada em 0,3mL da solução de DPPH. No branco, 1mL de amostra foi solubilizada em 0,3mL de água destilada e no controle, 1mL de água destilada foi solubilizada em 0,3mL da solução de DPPH. As reações foram incubadas no escuro e em temperatura ambiente, por 30min. As análises foram realizadas em triplicata e as leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a $\lambda=514\text{nm}$. A taxa de inibição (%) do radical livre foi estabelecida com base na equação 7:

(7)

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(\text{Abs do Controle} - \text{Abs da Amostra})}{\text{Abs do Controle}} \times 100$$

4.2.9 Análise Estatística

Para o Planejamento Box-Behnken 3³, as análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA 9.0 (Statsoft, EUA). Já para as propriedades biológicas, a distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. A significância estatística dos resultados foi determinada pela análise de variância (ANOVA) e a diferença individual entre as médias foi analisada pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram efetuadas no software Prism (GraphPad, EUA). O nível de significância foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em formato de artigo científico e patente.

5.1 ARTIGO: PROCESSO DE SULFATAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIVIRAL, ANTICOAGULANTE E ANTIOXIDANTE DA LEVANA DE *BACILLUS SUBTILIS* NATTO.

O artigo será enviado para a revista International Journal of Biological Macromolecules (Qualis A1 na Biotecnologia).

Com as seguintes normas: <https://www.sciencedirect.com/journal/international-journal-of-biological-macromolecules/publish/guide-for-authors>.

Processo de sulfatação para avaliação das propriedades antiviral, anticoagulante e antioxidante da levana de *Bacillus subtilis* natto

Beatriz Ticiani Vieira Pereira^a, Tainã de Oliveira Ferreira^a, Cristiani Baldo^a, Gabrielle Cristina Calegari^b, Alexandre Orsato^b, Dionísio Borsato^b, Ligia Carla Faccin-Galhardi^c, Maria Emília Favero^d, José Wander Breganó^d, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{a*}

^a Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas (CCE), Universidade Estadual de Londrina – Londrina, PR.

^b Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas (CCE), Universidade Estadual de Londrina – Londrina, PR.

^c Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Estadual de Londrina – Londrina, PR.

^d Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Hospital Universitário Regional Do Norte Do Paraná – Londrina, PR.

A levana é um exopolissacarídeo (EPS) de frutose e devido às suas propriedades biológicas e aplicações biotecnológicas, o objetivo deste trabalho foi produzir, sulfatar e avaliar as propriedades biológicas da levana nativa e das amostras sulfatadas de *Bacillus subtilis* natto. A levana foi produzida utilizando um planejamento Box-Behnken 3³ incompleto variando: (X₁) tempo de fermentação (h), (X₂) concentração de sacarose (g/L) e (X₃) pH inicial. A levana sintetizada foi submetida a dois processos de sulfatação, com diferentes proporções do agente sulfatante e as amostras sulfatadas foram testadas quanto a atividade antiviral, contra o Herpes simplex vírus tipo 1; anticoagulante, frente aos ensaios de tempo de tromboplastina parcial ativado (KPTT) e tempo de protrombina (TP) e antioxidante pelo método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). A condição ótima foi de 24 h, 400 g/L e pH 7,0, com a produção de 26,86 g/L. A sulfatação foi confirmada por FT-IR e o grau de substituição (DS) foi de 1,36 e 1,37. A sulfatação melhorou a resistência térmica da amostra, aumentando a temperatura de carbonização de 578 °C para 740 °C. A atividade antiviral aumentou com a diminuição da concentração inibitória de 50% (IC₅₀) em 57 % e a atividade anticoagulante foi dependente da concentração testada no ensaio de KPTT, que representa a via intrínseca da cascata de coagulação sanguínea. A atividade antioxidante aumentou em 52 % com a sulfatação. Esses resultados indicam que o processo de sulfatação melhorou as bioatividades da levana, que pode ser aplicada na área da saúde.

Palavras-chave: Frutana; Modificação Química; Heparina; Herpes simplex vírus tipo 1; DPPH; Biotecnologia.

1 Introdução

Os exopolissacarídeos (EPS) são sintetizados como resposta a situações de estresse bióticos e abióticos, para a formação do biofilme ao redor das células microbianas. Esses biopolímeros apresentam diversas propriedades biológicas, além da biodegradabilidade, biocompatibilidade e atoxicidade, que os tornam bioativos ideais para diversas aplicações biotecnológicas [1, 2]. A levana, por sua vez, é um EPS de frutose produzido pela enzima levanasacarase (E.C 2.4.1.10) e formado por resíduos de β -D-frutofuranosil, unidos por ligações glicosídicas β -(2 \rightarrow 6) e com ramificações β -(2 \rightarrow 1) [3, 4].

A polimerização da levana pode ser realizada por diferentes espécies microbianas, destacando a bactéria *B. subtilis* natto que foi isolada do alimento japonês Natto [5]. Como a produção é de origem microbiana, planejamentos estatísticos podem ser empregados para a identificação de variáveis significativas e a otimização do processo de síntese, para a diminuição dos custos de produção e o aumento do EPS produzido por processo de fermentação. Modelos experimentais, dessa forma, avaliam a integração entre os diferentes parâmetros e fatores para a identificação das condições ótimas de produção [6].

Essa macromolécula apresenta características como a formação de filmes, retenção de água e a atividade imunomoduladora, prebiótica, antimicrobiana e anticancerígena e por isso, se torna um ativo vantajoso para a aplicação em diferentes setores industriais, como a alimentícia, farmacêutica, cosmeceutica e a química [7]. Essas bioatividades são dependentes das suas propriedades físico-químicas, que são atribuídas pela configuração da cadeia principal, tipo de ligação glicosídica, massa molecular, isto é, da sua conformação estrutural [8]. Dessa maneira, a modificação química dessa molécula pode potencializar ou agregar novas atividades biológicas, a partir da inserção de novos grupos funcionais [9].

A sulfatação, por exemplo, pode ser realizada utilizando diferentes parâmetros de reação. A síntese ocorre basicamente em uma única etapa e envolve o uso de um agente sulfatante e de um solvente orgânico [10]. Os métodos mais utilizados incluem o uso do ácido sulfâmico, ácido sulfúrico concentrado, complexo ácido clorossulfônico-piridina e do complexo trióxido de enxofre-piridina. Como resultado, alguns grupos hidroxila da cadeia polissacarídica dos polissacarídeos são substituídos por grupos sulfato [11].

Após a modificação química, o grau de substituição (DS) indica a quantidade de grupos sulfato que foram obtidos. Esse valor pode ser alterado através das condições utilizadas durante a reação e os polissacarídeos com o valor de DS mais elevado, na maioria das vezes, manifestam melhores propriedades biológicas, como a atividade antiviral, anticoagulante, antioxidante e a antitumoral [3]. O método da Gelatina-Bário de Dogson e Price (1962) é o mais estudado para calcular o valor de DS, onde os íons de bário na presença dos grupos sulfato formam o cloreto de bário [11].

Os EPS sulfatados, além de expressarem diferentes bioatividades, também manifestam baixa citotoxicidade e menores efeitos colaterais quando comparados com os medicamentos já utilizados e com isso, oferecem boas perspectivas farmacológicas para o desenvolvimento de novas metodologias terapêuticas e o tratamento de diversas doenças [12]. À vista disso, o objetivo deste trabalho foi produzir a levana de *B. subtilis* natto por um planejamento Box-Behnken 3³ incompleto e a partir da melhor condição, sulfatar com diferentes proporções do agente sulfatante complexo trióxido de enxofre-piridina e avaliar a ação antiviral, anticoagulante e antioxidante da levana nativa e das amostras sulfatadas para potencial aplicação na área da saúde.

2. Material e Métodos

2.1 Material

2.1.1 Microrganismos e Células

Bacillus subtilis natto (CCT 7712), isolada do alimento japonês Natto pelo Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) – Londrina, Paraná e identificada pela Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia (FAT) – Campinas, São Paulo foi cultivada em meio contendo 50 g/L de peptona, 30 g/L de extrato de carne e 20 g/L de ágar, mantida a 4 °C, renovada a cada 45 dias e utilizada para a produção da levana.

Herpes vírus simplex tipo 1 cepa KOS (HSV-1 KOS) (sensível ao aciclovir), cedido pelo Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná foi inoculado em células Vero (CCL-81) para o estoque viral, com cerca de 100 µL e 10

% (v/v) de glicerol, mantido a -20 °C e utilizado para a análise da atividade antiviral da levana nativa (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2).

Células Vero (CCL-81), fornecidas pelo Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco-BRL, EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Invitrogen, Gibco-BRL, EUA), 2 mM de glutamina (Sigma Chemical Company, EUA), 100 UI/mL de penicilina (Sigma Chemical Company, EUA), 100 µL de estreptomicina (Gibco-BRL, EUA) e 2 µg/mL de anfotericina B (Meizler Biopharma S/A, BR) e utilizadas para a avaliação da citotoxicidade da levana nativa (LN) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2).

2.2 Métodos

2.2.1 Produção de Levana

A produção da levana foi realizada por um planejamento Box-Behnken 3³ incompleto, com 12 ensaios e 3 pontos centrais. As variáveis independentes foram: (X₁) tempo de fermentação (24, 48 e 72 h), (X₂) concentração de sacarose (100, 250 e 400 g/L) e (X₃) pH inicial (4,0, 6,0 e 8,0) (Tabela 1). Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL dos diferentes meios líquidos (g/L): 100/250/400 de sacarose, 2 de extrato de levedura, 2 de KH₂PO₄, 1 de (NH₄)₂SO₄ e 0,5 de MgSO₄(7H₂O). O inóculo foi padronizado a 0,2 g/L e preparado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL do meio líquido (g/L): 100 de sacarose, 2 de extrato de levedura, 2 de KH₂PO₄, 1 de (NH₄)₂SO₄ e 0,5 de MgSO₄(7H₂O) [13 modificado]. A agitação e a temperatura foram mantidos em 150 rpm e 37 °C, respectivamente [14]. As variáveis resposta foram: (Y₁) consumo de sacarose (g/L), (Y₂) biomassa (g/L) e (Y₃) produção de levana (g/L). A melhor condição foi transferida para frascos Erlenmeyer de 1 L, contendo 250 mL do meio de fermentação. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação (Centrifuga Universal 320, Hettich, Alemanha) a 9000 rpm, 4 °C por 15 min. A levana presente no sobrenadante foi precipitada com o etanol absoluto na proporção de 3:1 (etanol:sobrenadante) a 4 °C por 12 h. O precipitado foi centrifugado, ressuspensão em água destilada, dialisado contra a água destilada por 72 h e liofilizado [15].

2.2.1.1 Biomassa e Consumo do Substrato e Produção de Levana

Os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 9000 rpm, 4 °C por 15 min. A biomassa foi ressuspensa em solução salina (NaCl 0,9 %), lida por espectrofotômetro (Genius, Thermo Fisher Scientific, EUA) a $\lambda=605$ nm e comparada a curva de biomassa em g/L. O consumo do substrato foi determinado por açúcares totais (AT), pelo método de Fenol-Sulfúrico a $\lambda=460$ nm [16] e açúcares redutores (AR), pela metodologia de Somogyi-Nelson a $\lambda=540$ nm [17, 18], onde o [AT] – [AR] corresponde a sacarose residual e [sacarose inicial] – [sacarose residual] equivale com a sacarose consumida.

A levana produzida foi precipitada com o etanol absoluto na proporção de 3:1 (0,9 mL de etanol absoluto:0,3 mL do sobrenadante) a 4 °C por 12 h. O precipitado formado foi hidrolisado com 1 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M em banho-maria a 100 °C por 1 h, neutralizado com 0,1 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2 M [19] e quantificado por Somogyi-Nelson, utilizando a frutose como padrão [17, 18].

2.3 Sulfatação

A levana precipitada e liofilizada foi utilizada para as reações de sulfatação. Foram testados dois processos, com duas proporções diferentes do agente sulfatante complexo trióxido de enxofre-piridina de acordo com de Araújo [20]. Para cada sulfatação, 0,5 g da levana nativa foram solubilizadas em 250 mL de dimetilformida anidro (DMF) sob atmosfera inerte por 48 h. Para a levana sulfatada 1 (SL1), foram adicionados 3,9 g do complexo trióxido de enxofre-piridina ($\text{SO}_3\text{-Py}$) (8 equivalentes/unidades de frutose) e 1,1 mL de trietilamina (Et_3N). Para a levana sulfatada 2 (SL2) foram transferidos 11,7 g do complexo trióxido de enxofre-piridina ($\text{SO}_3\text{-Py}$) (24 equivalentes/unidades de frutose) e 1,1 mL de trietilamina (Et_3N). As misturas foram mantidas sob agitação em temperatura ambiente por 7 h e neutralizadas com a solução saturada de bicarbonato de sódio. Em seguida, foi adicionado 166,65 mL de tampão fosfato 0,025 mol/L (pH 7,0) nas duas sulfatações (SL1 e SL2). As reações foram submetidas a diálise contra a solução de cloreto de sódio (NaCl) 1 mol/L por 24 h e água destilada por 96 h. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas, armazenadas a -2 °C e utilizadas para as análises seguintes.

2.3.1 Análise do Grau de Substituição (DS)

O grau de substituição (DS) das amostras sulfatadas (SL1 e SL2), que representa o número médio de grupos hidroxila substituídos por grupos sulfato foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Dodgson e Price [21], com modificações. Inicialmente, 1 mg de SL1 e SL2 foram hidrolisadas com HCl concentrado em banho termostatizado a 100 °C por 10 min. Para determinar o DS, 0,2 mL dos hidrolisados foram solubilizados com 3,8 mL de ácido tricloroacético (TCA), 1 mL da solução protetora (6 g de NaCl, 0,5 mL de HCl concentrado, gelatina 0,1 % m/v e 47 mL de água destilada) e 0,03 g de cloreto de bário (BaCl₂). O sulfato de bário resultante foi quantificado em espectrofotômetro a $\lambda=420$ nm. O DS, que caracteriza o número médio de grupos sulfato em cada resíduo de frutose, foi estabelecido a partir do conteúdo de enxofre, com base nas equações 1 e 2, onde (%) = % enxofre.

(1)

$$S(\%) = \frac{BaSO_4(\mu g) \times 0,1374 \times 100}{Amostra (\mu g)}$$

(2)

$$DS = \frac{162 \times S}{3200 - 102 \times S}$$

Onde, 162 representa o peso molecular médio do resíduo glicosil do polissacarídeo; 3200 equivale a massa atômica do enxofre $\times 100$ e 102 equivale ao mol médio dos grupos sulfato

2.4 Caracterização Química

As amostras sulfatadas (SL1 e SL2) foram caracterizados por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada no Fourier (FT-IR) (IR PRESTIGE-21, Shimadzu, JP) em pastilhas de KBr e Termogravimetria (TG) em programa de temperatura (TGA-50, Shimadzu, JP). A levana nativa (NL) foi usada como controle para os testes. As análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da Central Multiusuário de Laboratórios de Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

2.5 Propriedades Biológicas

2.5.1 Citotoxicidade

A citotoxicidade da levana nativa (LN) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2) foram avaliadas em células VERO (CCL-81) pelo método do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio), de acordo com o protocolo descrito por Pauwels [22] e de La Iglesia [23]. As concentrações testadas foram de 0,062 a 0,5 mg/mL e o controle foi preparado somente com o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco-BRL, EUA). As análises foram realizadas em quintuplicata e as leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a $\lambda=570$ nm e a $\lambda=690$ nm. A viabilidade celular foi estabelecida com base na equação 3:

$$(3) \quad VC(\%) = \frac{(Média\ Abs\ da\ Amostra\ 570nm - Média\ Abs\ da\ Amostra\ 690nm)}{(Média\ Abs\ do\ Controle\ 570nm - Média\ Abs\ do\ Controle\ 690nm)} \times 100$$

A citotoxicidade de 50 % (CC_{50}), que representa a concentração capaz de eliminar 50 % das células foi determinada em relação a concentração celular (CC) por análise de regressão linear [24].

2.5.2 Atividade Antiviral

A atividade antiviral da levana nativa (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2) foi verificada em partículas do Herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1) em meio extracelular, de acordo com o protocolo descrito por Pauwels [22] e de La Iglesia [23]. As concentrações testadas foram de 0,025 a 0,2 mg/mL. As amostras foram incubadas com o vírus a 37 °C, 5 % CO_2 por 1 h. As células foram inoculadas a 5×10^4 células/poço, para a concentração não citotóxica das amostras (obtida no ensaio de citotoxicidade). As placas foram incubadas a 37 °C, 5 % CO_2 por 72 h e a avaliação da citotóxica foi realizada por MTT. A porcentagem de inibição viral (IV) (%) foi verificada com base na equação 4:

$$(4) \\ IV (\%) = \frac{(AbsT\ 570nm - AbsT\ 690nm - AbsCV\ 570nm - AbsCV\ 690nm)}{(AbsCC\ 570nm - AbsCC\ 690nm - AbsCV\ 570nm - AbsCV\ 690nm)} \times 100$$

Onde, AbsT representa a absorvância das células inoculadas e tratadas com as amostras, AbsCV corresponde a absorvância do controle do vírus (células inoculadas e não tratadas) e AbsCC determina a absorvância do controle das células (células não inoculadas e não tratadas).

2.5.3 Atividade Anticoagulante

A atividade anticoagulante da levana nativas (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2) foi avaliada de acordo com o protocolo descrito por Vasconcelos [25], com modificações. O tempo de tromboplastina parcial ativado (KPTT) e o tempo de protrombina (TP) foram realizados em sistema automático de análise de coagulação do sangue (Sysmex CS-2500 System, Siemes Healthineers, DE). As concentrações testadas foram de 0,050 a 0,300 mg/mL e o pool de soros foi preparado com amostras, com os parâmetros de KPTT e TP normais da rotina do Laboratório de Hematologia do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná da Universidade Estadual de Londrina (HU-UEL). Para o teste, 0,50 mL de cada amostra foram solubilizadas em 0,450 mL do pool de soros e para o controle, 0,50 mL do tampão OVB (diluyente de fibrinogênio) foi misturado em 0,450 mL do pool de soros. As análises foram preparadas em duplicatas.

2.5.4 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante da levana nativa (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2) foi determinada por DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), de acordo com o protocolo descrito por Srikanth [26]. As concentrações testadas foram de 5 a 0,78 mg/mL. Para o teste, 1 mL de cada amostra foi solubilizada em 0,3 mL da solução de DPPH. Para o branco, 1 mL de amostra foi misturada em 0,3 mL de água destilada e para o controle, 1 mL de água destilada foi transferida em 0,3 mL da solução de DPPH. As análises foram realizadas em triplicata e as leituras foram efetuadas em espectrofotômetro (Genius, Thermo Fisher Scientific, EUA) a $\lambda=514$ nm. A taxa de inibição (%) para os radicais livres foi estabelecida com base na equação 5:

(5)

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(\text{Abs do Controle} - \text{Abs da Amostra})}{\text{Abs do Controle}} \times 100$$

2.6 Análise Estatística

Para o Planejamento Box-Behnken 3^3 incompleto, as análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA 9.0 (Statsoft, EUA). Para as propriedades biológicas, a distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. A significância estatística dos resultados foi determinada pela análise de variância (ANOVA) e a diferença individual entre as médias foi analisada pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram efetuadas no software Prism (GraphPad, EUA). O nível de significância foi de ($p < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

3.1 Produção de Levana

A Tabela 1 mostra o delineamento experimental Box-Behnken 3^3 incompleto, com as variáveis independentes: (X_1) tempo de fermentação (24, 48 e 72 h), (X_2) concentração de sacarose (100, 250 e 400 g/L) e (X_3) pH inicial (4,0, 6,0 e 8,0) e as variáveis resposta: (Y_1) consumo de sacarose (g/L), (Y_2) biomassa (g/L) e (Y_3) produção de levana (g/L). A maior produção de levana ocorreu no ensaio 3 (24 h, 400 g/L e pH 6,0) com 25,73 g/L. Já melhor crescimento microbiano (biomassa) aconteceu no ensaio 7 (24 h, 250 g/L e pH 8,0) com 19,64 g/L, enquanto o melhor consumo de substrato decorreu no ensaio 3 (24 h, 400 g/L e pH 8,0) com 398,50 g/L.

Tabela 1 – Respostas do Planejamento Box-Behnken 3³ incompleto, com o (Y₁) consumo de sacarose (g/L), (Y₂) biomassa (g/L) e (Y₃) produção de levana (g/L).

| | Factor Level | | | Response | | |
|----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | Y ₁ | Y ₂ | Y ₃ |
| 1 | -1 | -1 | 0 | 16.84 | 37.95 | 2.41 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 16.24 | 41.19 | 2.19 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 16.43 | 398.50 | 25.73 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 16.38 | 355.07 | 22.70 |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 13.14 | 202.70 | 2.41 |
| 6 | 1 | 0 | -1 | 13.24 | 182.35 | 2.84 |
| 7 | -1 | 0 | 1 | 19.78 | 155.27 | 11.87 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 19.64 | 143.67 | 11.61 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 13.16 | 71.24 | 3.33 |
| 10 | 0 | 1 | -1 | 13.68 | 265.89 | 7.55 |
| 11 | 0 | -1 | 1 | 17.52 | 31.95 | 4.30 |
| 12 | 0 | 1 | 1 | 18.99 | 286.29 | 12.56 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 17.03 | 173.93 | 13.95 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 18.04 | 198.25 | 12.56 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 16.27 | 181.26 | 16.11 |

| Code | Variables | Coded Variables Levels | | |
|----------------|--------------------------------|------------------------|-----|-----|
| | | -1 | 0 | 1 |
| X ₁ | Time (h) | 24 | 48 | 72 |
| X ₂ | Concentration sucrose (g/L) | 100 | 250 | 400 |
| X ₃ | pH | 4.0 | 6.0 | 8.0 |

O menor tempo de fermentação (24 h), maior concentração de sacarose (400 g/L) e o pH neutro (6,0) resultaram na maior produção de levana, com 25,73 g/L (ensaio 3). A alta concentração de sacarose (400 g/L) estimulou a polimerização da levana e os resultados obtidos estão em concordância com as pesquisas de Srikanth *et al.* [26] e Bersaneti *et al.* [14]. A mesma condição, com o maior tempo de fermentação (72 h) (ensaio 4) não demonstrou aumento na síntese de levana, ou seja, o prolongamento do tempo de fermentação não é positivo para o

processo de produção. A baixa concentração de sacarose e o pH ácido também não foram positivos para a biomassa e a polimerização da levana.

Esses dados estão de acordo com o estudo de Phengnoi *et al.* [27], que observaram que a alta concentração de sacarose induzia o aumento da biomassa e da atividade de transfrutossilacção da levanasacarase de *Bacillus siamensis*. A sacarose sinaliza positivamente a síntese da enzima levanasacarase e da levana, ou seja, a produção é diretamente proporcional com a concentração de sacarose disponibilizada [28]. Logo, a hidrólise da sacarose, diminuição do substrato enzimático e a polimerização da levana provocam a diminuição da atividade enzimática [29]. A Tabela 2 mostra a análise de variância (ANOVA) ajustada para a produção da levana, com a soma dos quadrados (SS), graus de liberdade (df), quadrado médio (MS) e o F calculado e o *p*-value.

Tabela 2 – Análise de Variância (ANOVA) para a Produção de Levana.

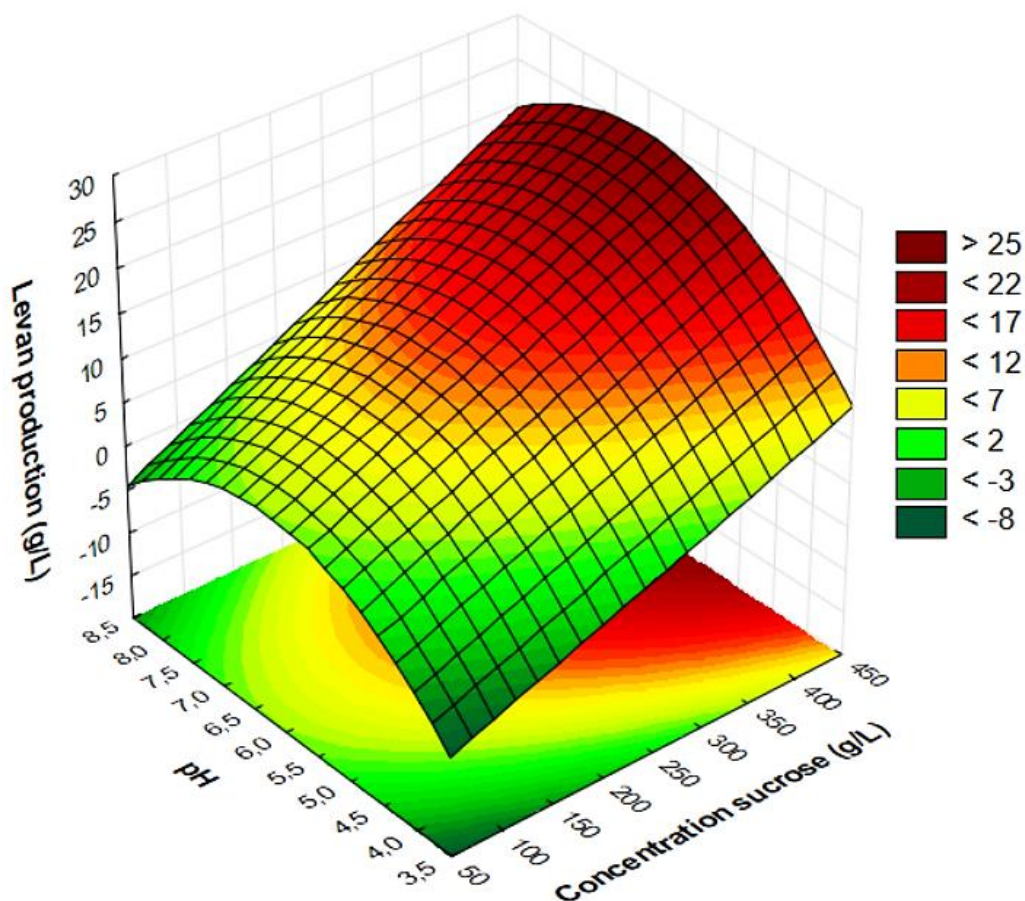
| Factor | SS | df | MS | F | P |
|--------------------|----------|----|----------|----------|---------|
| X ₁ (L) | 1.1849 | 1 | 1.1849 | 0.3697 | 0.6049 |
| X ₂ (L) | 396.4154 | 1 | 369.4154 | 123.7058 | 0.0079* |
| X ₃ (L) | 73.2103 | 1 | 73.2103 | 22.8461 | 0.0410* |
| X ₃ (Q) | 162.8894 | 1 | 162.8894 | 50.8314 | 0.0191* |
| 1L by 2L | 1.9769 | 1 | 1.9769 | 0.6169 | 0.5144 |
| 2L by 3L | 4.0811 | 1 | 4.0811 | 1.2736 | 0.3762 |
| Lack of Fit | 144.7778 | 6 | 24.1296 | 7.5299 | 0.1218 |
| Pure Error | 6.4090 | 2 | | | |
| Toral | 790.9448 | 14 | | | |

SS: soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média quadrada; F: F calculado; P: p valor.

*Significativo ao nível de 5%.

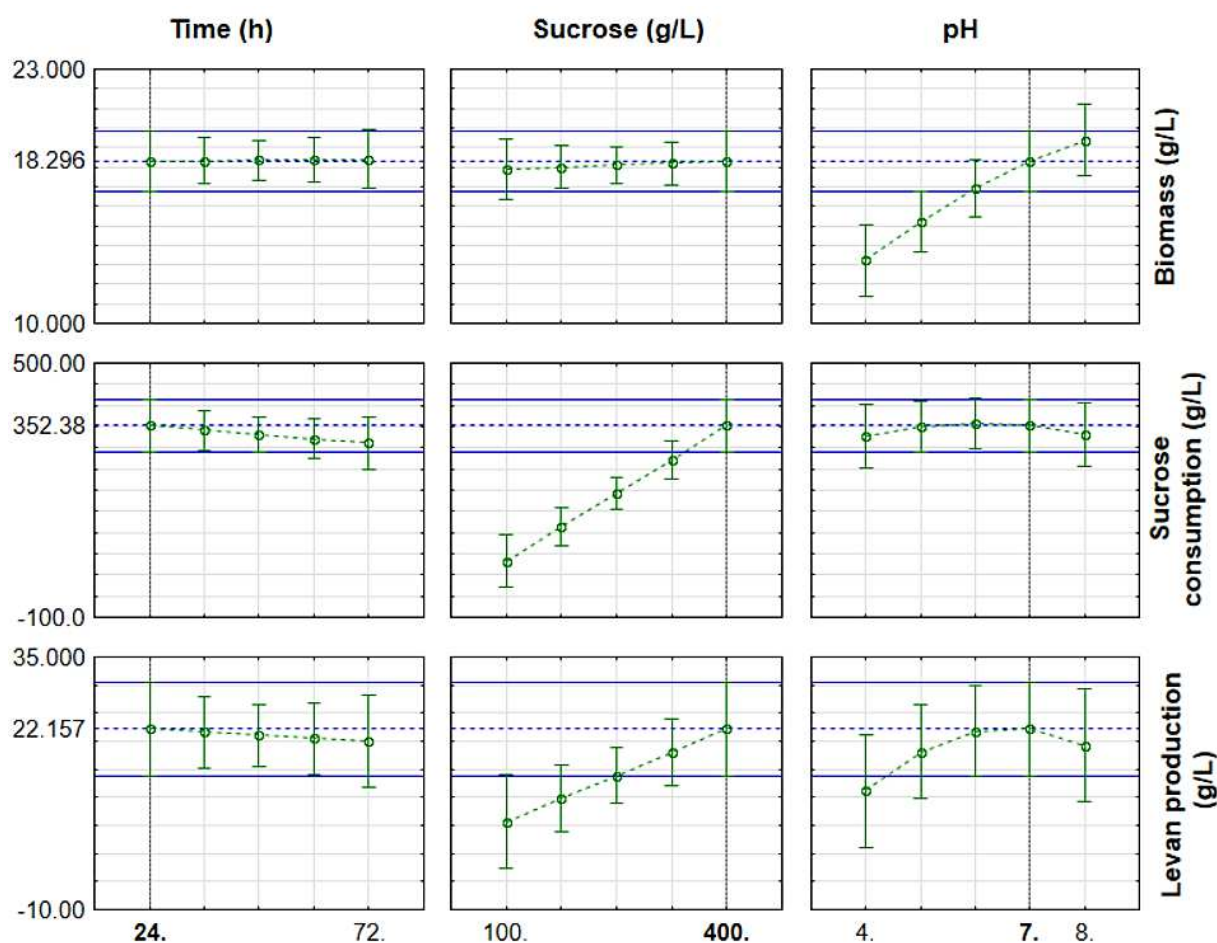
A ANOVA (Tabela 2) exhibe que a concentração de sacarose (g/L) (X₂) e o pH (X₃) foram significativos para a produção de levana ($p < 0,5$) e que o desvio da regressão não é significativo, demonstrando que o modelo pode ser utilizado para fins preditivos. A Figura 1 mostra a superfície de resposta (MSR) para a produção de levana (g/L), considerando a concentração de sacarose (g/L) e o pH. Devido a não significância na ANOVA, a variável tempo de fermentação (h) foi fixada em 24 h.

Figura 1 – Superfície de Resposta (MSR) para a Produção de Levana (g/L), considerando a Concentração de Sacarose (g/L) e o pH e fixando o Tempo de Fermentação (h).



A otimização conjunta por MSR, avaliando a concentração de sacarose (g/L) e o pH demonstra que o aumento da concentração de sacarose (>400 g/L) e o pH inicial próximo do neutro (entre 6,0 e 7,0) são significativos para a produção de levana, enquanto a baixa concentração de sacarose e o pH ácido ou básico não são significativos (Figura 1). A Figura 2 apresenta o perfil de valores previstos para a biomassa (g/L), consumo de sacarose (g/L) e produção de levana (g/L) a partir da condição estabelecida como ótima.

Figura 2 – Perfil de Valores Previstos para a Biomassa (g/L), Consumo de Sacarose (g/L) e a Produção de Levana (g/L).



O perfil de valores previstos para a biomassa (g/L), consumo de sacarose (g/L) e a produção de levana (g/L) indica que a condição ótima é de 24 h, 400 g/L e o pH 7,0, com 18,29 g/L de biomassa, 352,38 g/L de consumo de sacarose e 22,15 g/L de produção de levana (Figura 2). Esses resultados estão em concordância com o estudo de Berté *et al.* [30], que descreveram que a concentração de sacarose (300 g/L) e o pH (6,0) influenciaram na síntese de levana por *B. subtilis* (ATCC 6633). O pH inicial do meio de fermentação interfere no crescimento microbiano e na produção de produtos do metabolismo, em razão das modificações estruturais e funcionais das enzimas [31].

A faixa de pH ideal para o crescimento de *B. subtilis* natto é de 5,0 a 9,0 e para a atividade enzimática da levanasacarase é de 5,0 a 7,0 [12, 32]. Para a validação da resposta produção de levana, além disso, foram realizados três ensaios utilizando a condição ótima de 24 h, 400 g/L e pH 7,0. O teste T para amostras simples

confirmou que não existe diferença significativa entre a média dos três ensaios de validação (24,34 g/L) e o valor ótimo previsto de 22,15 g/L, apresentando o *p*-value igual a 0,16.

3.2 Sulfatação e Análise do Grau de Substituição (DS)

O grau de substituição (DS), após a sulfatação, representa o número médio de grupos sulfato adicionados por unidade monomérica de frutose e com isso, o DS foi de 1,36 para a levana sulfatada 1 (SL1) e 1,37 para a levana sulfatada 2 (SL2). Como o valor do DS foi maior que 1, cada monossacarídeo de frutose recebeu ao menos um grupo sulfato e estima-se que a cada 10 unidades de frutose haja aproximadamente catorze grupos sulfato. Estruturalmente, a levana dispõe de três possíveis regiões de substituição e com isso, 3 é o DS máximo que poderia ser atingido por monossacarídeo de frutose. No entanto, das três hidroxilas (OH) encontradas na cadeia monossacarídica, uma é um álcool primário e duas são álcoois secundários. O impedimento estérico dos álcoois secundários dificulta a ação do agente sulfatante para a adição dos grupos sulfato.

Considerando que a massa molecular da frutose é de 180,16 g/mol, da unidade repetitiva de frutose (levana) é de 162 g/mol (considerando a perda de água da ligação glicosídica) e de uma levana sulfatada com o DS de 1,4 deveria ser de 306,33 g/mol, o rendimento da reação de sulfatação foi de 44 % e 41 % para SL1 e SL2, nessa ordem. Esses dados estão de acordo com o estudo de Erginer *et al.* [32], que sulfataram a levana de *Halomanas smyrnensis* utilizando o ácido clorossulfônico (HSO_3Cl) como agente sulfatante e a piridina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) como catalisador, em diferentes proporções e obtiveram o DS de 0,50 a 2,37. Por outro lado, Gomes *et al.* [33], sulfaram a levana de *H. smyrnensis* empregando o HSO_3Cl e a $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ e atingiram o DS de 1,36.

Além das características estruturais dos EPS e da dificuldade de controlar o processo químico de sulfatação, as variações das condições da reação, como o agente sulfatante, razão molar entre os reagentes e o tempo e temperatura de síntese influenciam diretamente no número de grupos sulfato obtidos durante a sulfatação [35].

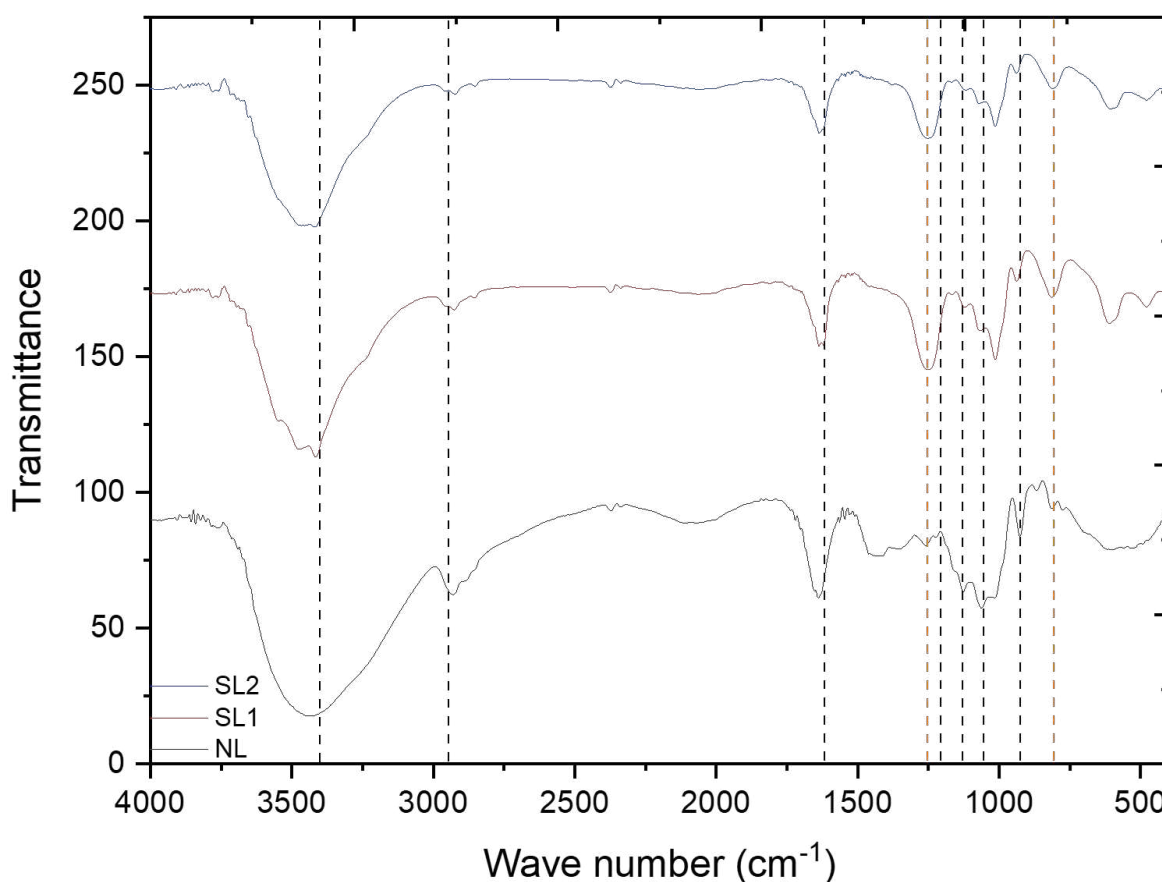
3.3 Caracterização Química

A caracterização química da levana (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2) foram realizadas pelas técnicas de FT-IR e da Termogravimetria (TG).

3.3.1 FT-IR

A Figura 3 mostra os espectros de FT-IR, entre 4000 e 400 cm^{-1} da levana nativa (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2), com bandas características para a levana e o processo de sulfatação. A banda próxima de 3400 cm^{-1} representa a vibração de estiramento O-H [36]. A banda próxima de 2950 cm^{-1} indica a vibração de estiramento C-H e é específica da frutose [26]. A banda próxima de 1600 cm^{-1} evidencia a curvatura angular das moléculas de água [37]. As bandas próximas de 1127 e 1053 cm^{-1} mostram a ligação C-H e as ligações glicosídicas, nessa ordem [38]. As bandas próximas de 1200 e 900 cm^{-1} são específicas para os carboidratos [39]. As amostras sulfatadas (SL1 e SL2), ainda, apresentaram novas bandas que confirmam a sulfatação da levana. As bandas próximas de 808 e 1238 cm^{-1} representam o dobramento assimétrico C-O-S e a vibração de estiramento assimétrico S=O, respectivamente [40].

Figura 3 – Espectros de FT-IR para a Levana Nativa (NL), Levana Sulfatada 1 (SL1) e Levana Sulfatada 2 (SL2).



3.3.2 TG

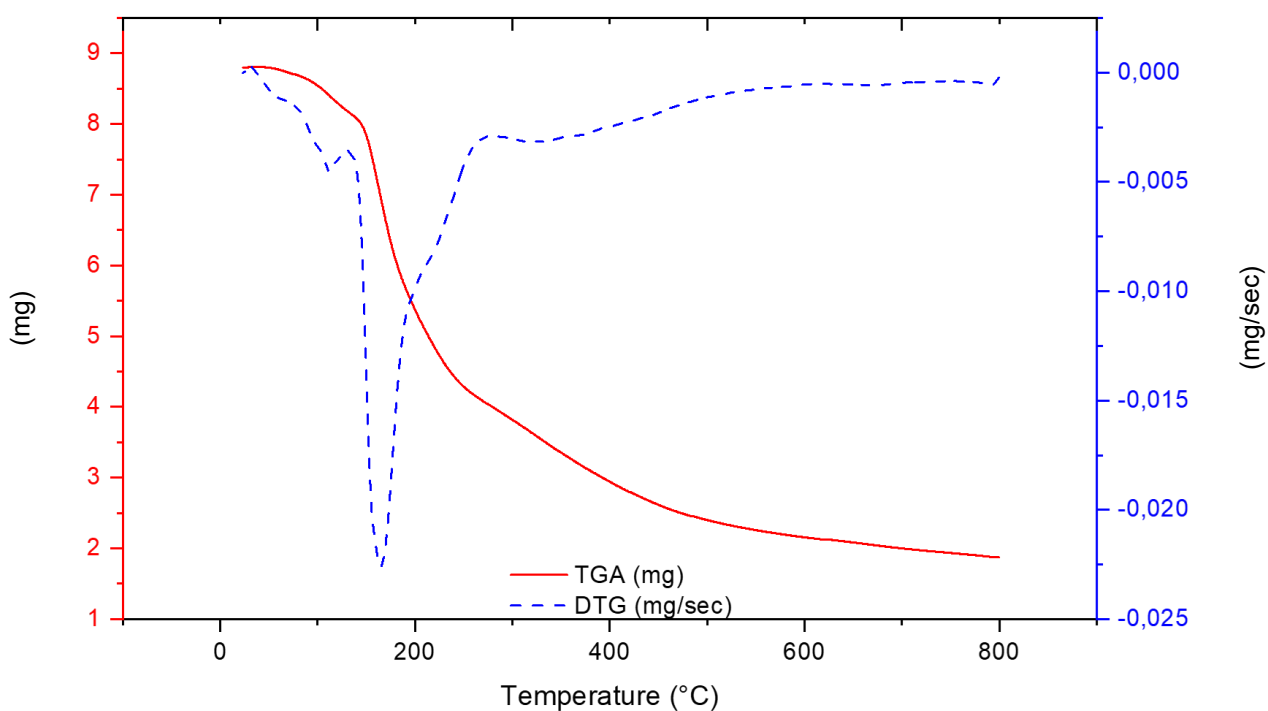
A Figura 4 mostra o perfil térmico da levana nativa (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2), com as curvas termogravimétricas (TGA) e termogravimétricas derivadas (DTG). NL apresentou três estágios de perda de massa nas curvas de TGA e DTG (Figura 4A). O primeiro estágio ocorreu até 112 °C e corresponde à eliminação de água de hidratação. O segundo estágio iniciou com um pequeno declínio, em aproximadamente 132 °C e um pico máximo em 165 °C (curva DTG), ponto que a massa variou rapidamente e representa a decomposição térmica da amostra. Já o terceiro estágio iniciou em 318 °C e terminou em 578 °C e condiz com a decomposição final, que é a etapa de carbonização da amostra.

A sulfatação promoveu algumas mudanças no perfil térmico das amostras sulfatadas (SL1 e SL2) (Figura 4B e 4C), com cinco estágios de perda de massa. O primeiro estágio, que é típico da eliminação de água ocorreu até 103 °C para SL1 e 105 °C para SL2. O segundo estágio aconteceu até 140 °C, com um pico

máximo em 118 °C (Curva DTG) e demonstra a decomposição térmica de SL1 e SL2. Já o terceiro estágio ocorreu até próximo de 290 °C para SL1 e SL2, com dois picos rápidos de caimento (Curva DTG) em aproximadamente 210 e 240 °C. O quarto estágio aconteceu em torno de 540 °C e o quinto estágio, que é característico da carbonização das amostras finalizou em aproximadamente 740 °C, com um pico máximo em 720 °C (Curva DTG). Apesar do primeiro estágio ter demonstrado uma menor resistência térmica das amostras sulfatadas, os estágios seguintes revelaram o aumento da estabilidade térmica decorrente do processo de sulfatação [41].

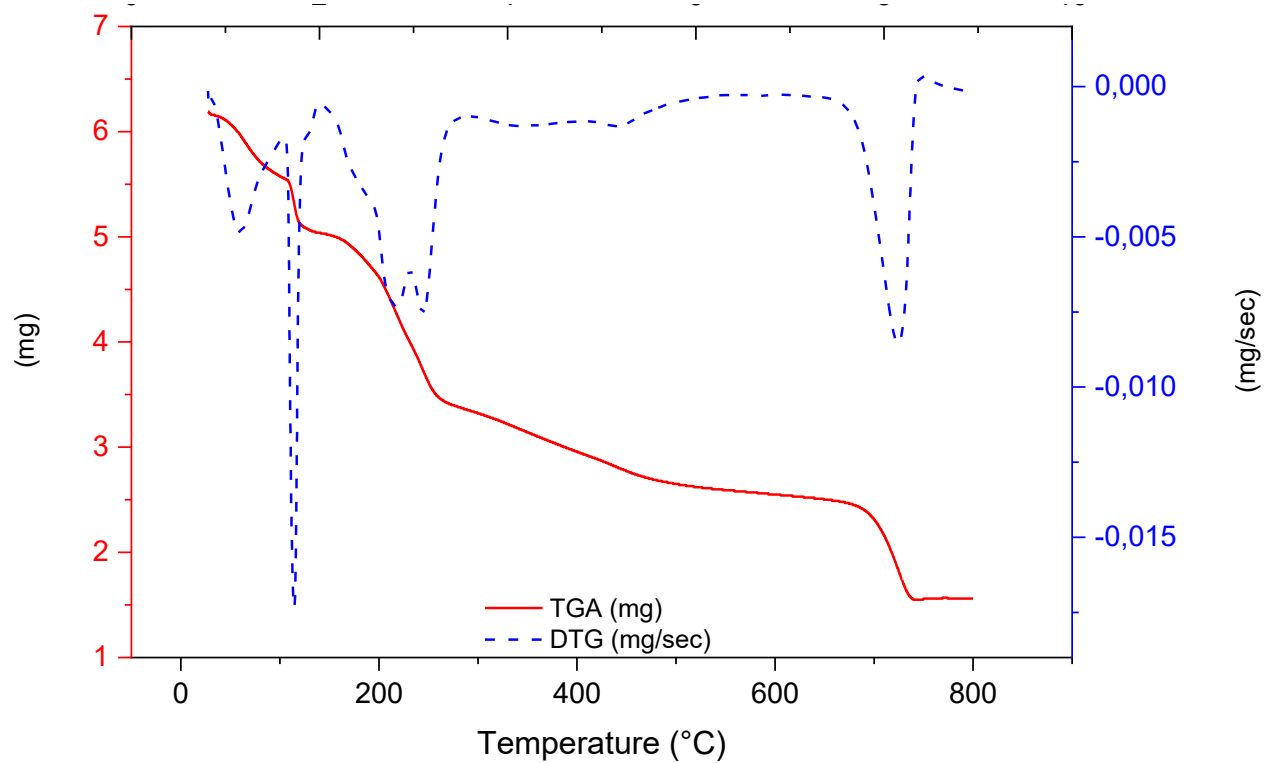
Figura 4 – Perfis térmicos (TGA e DTG) da Levana Nativa (NL) (A), Levana Sulfatada 1 (SL1) (B) e da Levana Sulfatada 2 (SL2) (C).

A)



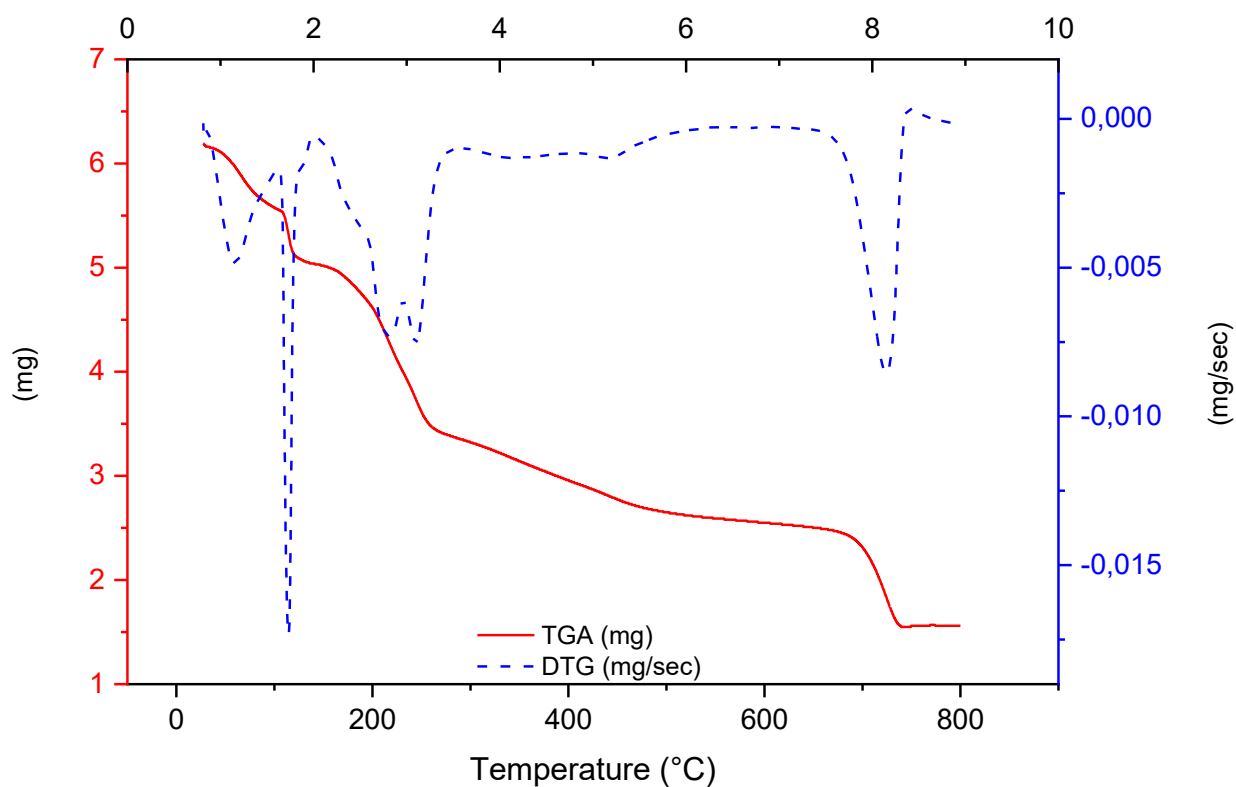
DTA: análise térmica diferencial; DTG: termogravimetria derivada.

B)



DTA: análise térmica diferencial; DTG: termogravimetria derivada.

C)



DTA: análise térmica diferencial; DTG: termogravimetria derivada.

3.4 Propriedades Biológicas

3.4.1 Avaliação da Citotoxicidade e Atividade Antiviral

Os antivirais interrompem o processo de replicação e o progresso da infecção viral. No entanto, a resistência microbiana é um problema de saúde pública e torna indispensável a identificação de novas moléculas e/ou substâncias com a ação antiviral. Dessa forma, diferentes concentrações da levana nativa (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2) foram triadas contra o Herpes simplex tipo 1 cepa KOS (HSV-1 KOS), que é sensível ao aciclovir. A efetividade do tratamento foi observada com a inibição da replicação viral e a preservação da viabilidade das células Vero células Vero (CCL-81) pelo MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

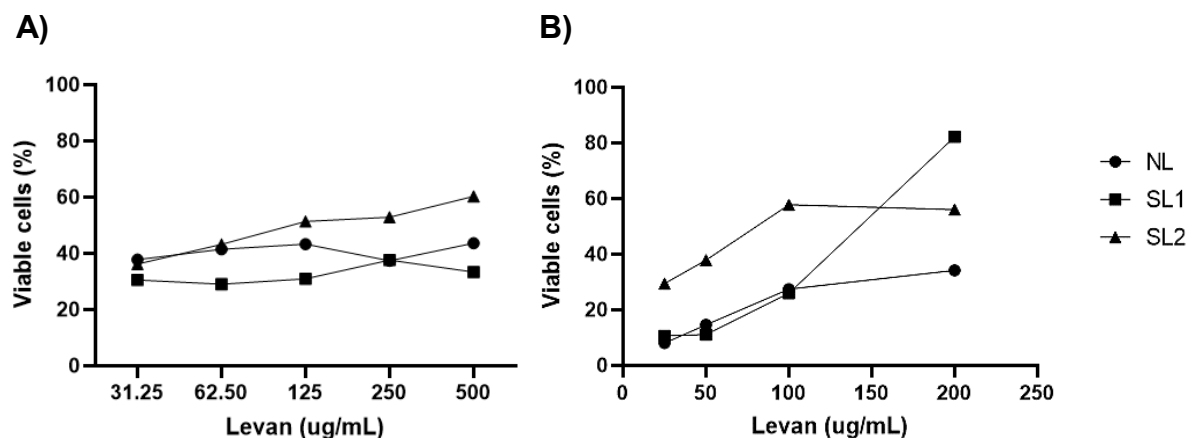
A citotoxicidade também foi analisada por MTT, uma vez que os polissacarídeos sulfatados podem apresentar a ação citotóxica e provocar danos e induzir a morte celular. Com os resultados, foi possível determinar a concentração citotóxica de 50 % (CC₅₀), concentração antiviral de 50 % (IC₅₀) e o índice de seletividade (SI) para NL, SL1 e SL2. A Tabela 3 mostra os valores de CC₅₀, IC₅₀ e SI e as Figura 5 mostra a porcentagem de células viáveis após a avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral da NL, SL1 e da SL2.

Tabela 3 – CC₅₀, C₅₀ e SI para a Levana Nativa (NL), Levana Sulfatada 1 (SL1) e Levana Sulfatada 2 (SL2).

| Levan | CCL-81 | HSV-1 KOS | |
|-------|-----------------------------|-----------------------------|---|
| | CC ₅₀ (µg/mL) | IC ₅₀ (µg/mL) | SI (CC ₅₀ /IC ₅₀) |
| NL | 500 | >200 | >2.50 |
| SL1 | 500 | 172 | 2.90 |
| SL2 | 295 | 86.50 | 3.41 |

CC₅₀: concentração citotóxica de 50%; IC₅₀: concentração inibitória de 50%; SI: índice de seletividade.

Figura 5 – Citotoxicidade para as Células Vero (CCL-81) (A) e Atividade Antiviral contra o Herpes Simplex Vírus tipo 1 cepa KOS (HSV-1 KOS) (B) para a Levana Nativa (NL), Levana Sulfatada 1 (SL1) e a Levana Sulfatada 2 (SL2).



O CC_{50} para as células Vero (CCL-81) foi de 500 $\mu\text{g/mL}$ para NL e SL1 e de 295 $\mu\text{g/mL}$ para SL2 (Tabela 3). A baixa toxicidade e a alta biocompatibilidade e biodegradabilidade da levana favorecem as diferentes aplicações biotecnológicas dessa macromolécula [42]. Os polissacarídeos sulfatados, no entanto, possuem a citotoxicidade relacionada com o valor do DS [43]. No ensaio de 0 h (com a adição simultânea da infecção viral e do tratamento), NL e as amostras sulfatadas (SL1 e SL2) apresentaram a ação antiviral contra o HSV-1 KOS, mas apenas a SL1 e a SL2 expressaram o efeito inibitório de 50 % até a última concentração testada (250 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 5). Esses dados estão de acordo com o estudo de Gamal *et al.* [44], que constataram que a levana bruta, dialisada e sulfatada de *E. faecalis* possuíam a atividade antiviral contra o vírus da doença de Newcastle, sugerindo que a presença de grupos hidroxila na estrutura química da levana facilitava a adesão e obstrução do sítio ativo de fusão das proteínas virais e a inibição da penetração viral nas células.

Os polissacarídeos são biologicamente ativos e as suas propriedades biológicas são relacionadas com a sua estrutura química [45]. Em alguns casos, devido aos custos e o rendimento alcançado por produção, a eficiência das atividades biológicas não é satisfatória. Assim, as reações químicas para a modificação dos polissacarídeos estabelecem a formação de derivados sulfatados que possuem melhores e/ou novas características biológicas, a partir da substituição de grupos funcionais. Para a sulfatação, por exemplo, os grupos hidroxila presentes nas unidades monoméricas da cadeia polissacarídica são substituídas por grupos sulfato

[45, 46].

Na maior concentração testada deste estudo (200 µg/mL), SL1 obteve o melhor efeito antiviral de 60.70 %, enquanto SL2 atingiu 56.24 % e NL 42.63 %. Os resultados apresentaram diferença estatística entre NL, SL1 e SL2 na concentração de 50 µg/mL ($p < 0,5$). Ainda, SL2 e NL mostraram inibição constante (cerca de 50 % para SL2 e de 40 % para NL) entre as concentrações de 100 e 200 µg/mL, enquanto SL1 exibiu uma curva de inibição proporcional com a concentração avaliada. Esses resultados estão em concordância com a pesquisa de Faccin-Galhardi *et al.* [47], que descreveram que os polissacarídeos naturais e as amostras sulfatadas de *Azadirachta indica* possuíam diferentes padrões de inibição para o HSV-1.

O IC₅₀ foi de >200 µg/mL e o SI foi de >2.50 para NL; de 172 µg/mL e de 2.90 para SL1 e de 86.50 µg/mL e de 3.41 para SL2 (Tabela 3). O IC₅₀ diminuiu 24 %, de NL para SL1 e 57 %, de NL para SL2. Esses dados estão de acordo com o estudo de Sacchelli *et al.* [48], que constataram que os derivados sulfatados de botriosferana do fungo *Botryosphaeria rhodina* possuíam o IC₅₀ menor para o HSV-1 KOS, quando comparados com a botriosferana nativa. A presença de grupos sulfato confere a carga negativa aos polissacarídeos sulfatados e promove interações eletrostáticas com as biomoléculas com a carga positiva, para uma série de resultados quimicamente importantes [49]. Desse modo, os polissacarídeos sulfatados impactam o ciclo de infecção dos vírus envelopados [50].

Durante os estágios iniciais da infecção pelo HSV, as glicoproteínas virais, que possuem a carga positiva resultante dos resíduos de aminoácidos lisina (Lys) e arginina (Arg) interagem com o heparan sulfato, que é um dos receptores de membrana utilizados pelos vírus para a entrada nas células hospedeiras. Devido à carga negativa dos grupos sulfato dos polissacarídeos sulfatados ser semelhante à carga negativa do heparan sulfato, esses biopolímeros podem mimetizar esse receptor e bloquear a etapa de adsorção [51, 48]. À vista disso, os grupos sulfato interferem eletrostaticamente na capacidade inicial de ligação entre os vírus envelopados e as células adjacentes [52].

Contudo, as bioatividades dos polissacarídeos são dependentes de seus parâmetros estruturais, como o valor do DS, massa molecular, posição de substituição dos grupos sulfato e a estrutura e conformação estrutural final [24]. Como o valor do DS foi de 1.36 e 1.37 para SL1 e SL2, nessa ordem, outras particularidades, como a falta de controle da reação química de sulfatação, razão molar entre as

unidades de frutose e o agente sulfatante complexo trióxido de enxofre-piridina e outros fatores que podem ter sido transformados durante a síntese em condição ácida podem ter favorecido a hidrólise da cadeia polissacarídica e/ou a modificação das regiões de sulfatação, promovendo a heterogeneidade dos derivados sulfatados produzidos e, por consequência, da atividade antiviral.

3.4.2 Atividade Anticoagulante

Os anticoagulantes interferem na cascata de coagulação sanguínea e podem ser verificados a partir de exames laboratoriais que mensurem o tempo necessário para a formação do coágulo de fibrina em segundos (s). A influência da levana nativa (NL) e das amostras sulfatadas (SL1 e SL2) na via extrínseca foi avaliada pelo tempo de protrombina (TP), enquanto na via intrínseca foi analisada pelo tempo de tromboplastina parcial ativado (KPTT). Neste ensaio, os valores de referência (VR) para KPTT e TP são de 25.1 a 36.5 s e de 10 a 14 s, respectivamente e a ação anticoagulante de NL, SL1 e SL2 pode ser constatada por meio do prolongamento desses valores. A Tabela 4 mostra os resultados da atuação da NL, SL1 e SL2 na via intrínseca e extrínseca da cascata de coagulação sanguínea.

Tabela 4 – Atividade Anticoagulante da Levana Nativa (NL), Levana Sulfatada 1 (SL1) e Levana Sulfatada 2 (SL2) na via Extrínseca e Intrínseca da Cascata de Coagulação Sanguínea.

| Samples | µg/mL | Clotting time (s) | |
|----------------|-------|-------------------|------------------|
| | | PT | KPTT |
| Control | | (12.15 ± 0.07) | (30.05 ± 0.21) |
| | 50 | (11.90 ± 0.14) | (29.80 ± 0.14) |
| | 100 | (11.80 ± 0.00) | (29.70 ± 0.14) |
| NL | 150 | (11.85 ± 0.21) | (29.55 ± 0.07) |
| | 200 | (11.80 ± 0.14) | (29.65 ± 0.07) |
| | 250 | (11.70 ± 0.00) | (29.65 ± 0.00) |
| | 300 | (11.70 ± 0.00) | (29.70 ± 0.00) |
| | 50 | (11.90 ± 0.28) | (68.30 ± 1.56)* |
| | 100 | (13.30 ± 0.28) | (109.20 ± 1.70)* |
| SL1 | 150 | (14.50 ± 0.57) | (163.65 ± 5.02)* |
| | 200 | (16.40 ± 0.14) | - |
| | 250 | (16.00 ± 0.28) | - |
| | 300 | (17.35 ± 0.35) | - |
| | 50 | (11.85 ± 0.07) | (61.70 ± 1.13)* |
| | 100 | (12.90 ± 0.28) | (98.90 ± 2.97)* |
| SL2 | 150 | (13.50 ± 0.28) | (139.65 ± 2.19)* |
| | 200 | (14.10 ± 0.55) | - |
| | 250 | (14.80 ± 0.42) | - |
| | 300 | (15.35 ± 0.49) | - |

TP: tempo de protrombina; KPTT: tempo de tromboplastina parcial ativado.

* Significativo ao nível de 5% pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados mostraram que a NL não foi capaz de aumentar o KPTT e o TP em nenhuma das concentrações testadas, apresentando os valores próximos do controle e dentro dos valores de referência (VR), isto é, não expressando a atividade anticoagulante. Os polissacarídeos, normalmente, são biocompatíveis e atóxicos e quando sulfatados naturalmente, desempenham diferentes bioatividades dependentes da sua estrutura e das interações que realizam com as biomoléculas. Como a sulfatação aprimora e/ou estabelece diferentes propriedades, os EPS

sulfatados por via sintética podem apresentar melhores características biológicas, quando comparados com os polissacarídeos sulfatados naturalmente [53, 54, 10].

A relevância da sulfatação para a atividade anticoagulante pode ser observada devido ao grande número de trabalhos que investigam essa propriedade nos polissacarídeos sulfatados e buscam identificar novos análogos à heparina, um antitrombótico bem conhecido e utilizado clinicamente desde a sua descoberta no século XX [10]. Assim, a substituição de grupos hidroxila por grupos sulfato pode ser no melhoramento das atividades biológicas dos polissacarídeos [55].

SL1 e SL2 prolongaram o KPTT em todas as concentrações testadas, quando comparadas com NL (Tabela 4) e demonstraram diferença significativa entre NL e SL1 e NL e SL2 para KPTT ($p < 0,5$). Esses resultados estão de acordo com a pesquisa de Erginer *et al.* [33], que descreveram a incapacidade da levana nativa da bactéria *H. smyrnensis* aumentar o KPTT e TP, ao mesmo tempo que os derivados sulfatados prolongaram proporcionalmente com a concentração testada. O aumento do KPTT indica a inibição da via intrínseca da cascata de coagulação sanguínea, que representa os fatores VIII, IX, XI e VIII e a pré-caliceína [56, 57].

Acima de 150 µg/mL, SL1 e SL2 tornaram o sangue incoagulável para o KPTT, impossibilitando a avaliação pelo sistema automático de análise de coagulação do sangue. Como o valor do DS foi de 1.36 e 1.37 para SL1 e SL2, nessa ordem não houve diferença significativa entre os efeitos anticoagulantes. Polissacarídeos sulfatados que possuem um maior valor de DS dispõem de uma maior quantidade de grupos sulfato na sua cadeia polissacarídica e manifestam melhores características biológicas [3]. No caso da atividade anticoagulante, quanto maior o DS, maior a interação para a formação do complexo polissacarídeo sulfatado-antitrombina-trombina [58].

A atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados está associada com a formação de um complexo entre os cofatores plasmáticos inibidores da cascata de coagulação, antitrombina e a trombina [59]. A heparina é um glicosaminoglicano altamente sulfatado (GAG) que acelera a associação entre os aminoácidos serina (Ser) da trombina e arginina (Ar) da antitrombina, para a ação anticoagulante [60]. Desse modo, a heparina interage com os aminoácidos lisina (Lys) da antitrombina, induz modificações conformacionais para a exposição dos aminoácidos Arg, aumentando a afinidade de ligação à trombina [61, 62].

A trombina é a última enzima da cascata de coagulação e é

responsável por clivar o fibrinogênio em fibrina, para a formação do coágulo de fibrina e ativar o fator XIII, V, VIII e XI [63]. A antitrombina, por sua vez, é uma inibidora das proteases, mas os seus alvos primários são a trombina e os fatores X e XI ativados [64]. Com isso, o mecanismo de ação dos polissacarídeos sulfatados pode ser relacionado com a carga negativa dos grupos sulfato, que neutraliza a carga positiva dos aminoácidos da antitrombina e forma o complexo polissacarídeo sulfatado-antitrombina-trombina. Essa interação é transitória e envolve a dissociação e a associação para a formação de novos complexos [62, 65].

Por outro lado, SL1 e SL2 não prolongaram de forma significativa o PT. Esses dados estão em concordância com o estudo de Vasconcelos *et al.* [25], que observaram que o derivado sulfatado do fungo *Lasiodiplodia theobromaei* aumentou o KPTT e o tempo de trombina (TT) de acordo com a concentração avaliada e assim como a heparina e outros polissacarídeos sulfatados, não prolongou o TP.

Da mesma forma como para a atividade antiviral, diferentes fatores dos polissacarídeos sulfatados, além do valor do DS, como o posicionamento dos grupos sulfato adicionados, composição dos monossacarídeos, tipo de ligação glicosídica da cadeia principal e a massa molecular podem interferir nas interações entre os polissacarídeos sulfatados e a antitrombina [3]. Existe uma relação entre a estrutura e a atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados [65]. Ainda, a concentração de 150 µg/mL poderia ser utilizada como agente anticoagulante, já que o CC50 para as células Vero (CCL-81) foi de 500 e 295 µg/mL para SL1 e SL2, respectivamente.

3.4.2 Atividade Antioxidante

Os agentes antioxidantes eliminam as espécies reativas de oxigênio (EROs), diminuindo a formação de radicais livres e estresse oxidativo celular. Dessa forma, foi analisada a atividade antioxidante da levana nativa (NL), levana sulfatada 1 (SL1) e da levana sulfatada 2 (SL2) pela inibição do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). O DPPH apresenta a coloração púrpura, devido aos elétrons deslocalizados e após a sua redução expressa a coloração amarela. A Tabela 5 mostra a taxa de inibição (%) do DPPH, que representa a atividade antioxidante da NL, SL1 e SL2.

Tabela 5 – Atividade Antioxidante pela Inibição (%) do DPPH da Levana Nativa (NL), Levana Sulfatada 1 (SL1) e da Levana Sulfatada 2 (SL2).

| Samples | mg/mL | Antioxidant activity | |
|----------------|-------|------------------------|----------------|
| | | $\Lambda=515\text{nm}$ | Inhibition (%) |
| Control | | (0.491 ± 0.004) | |
| NL | 0.31 | (0.462 ± 0.009) | 6 |
| | 0.63 | (0.465 ± 0.006) | 5 |
| | 1.25 | (0.463 ± 0.003) | 6 |
| | 2.50 | (0.453 ± 0.012) | 8 |
| | 4.00 | (0.446 ± 0.025) | 9 |
| SL1 | 0.31 | (0.459 ± 0.014) | 7 |
| | 0.63 | (0.463 ± 0.001) | 6 |
| | 1.25 | (0.454 ± 0.005) | 8 |
| | 2.50 | (0.430 ± 0.019) | 12 |
| | 4.00 | (0.400 ± 0.004) | 19 |
| SL2 | 0.31 | (0.467 ± 0.018) | 5 |
| | 0.63 | (0.451 ± 0.022) | 8 |
| | 1.25 | (0.455 ± 0.007) | 7 |
| | 2.50 | (0.452 ± 0.004) | 8 |
| | 4.00 | (0.436 ± 0.011) | 11 |

NL, SL1 e SL2 expressaram a atividade antioxidante (Tabela 5). Esses dados estão em conformidade com o estudo de Abdel-Fattah *et al.* [66], que verificaram o potencial antioxidante da levana nativa e do derivado sulfatado com ácido clorossulfônico de *B. subtilis* NCR1aza pelo ensaio de DPPH. A produção de energia pelas células é acompanhada da formação de radicais livres, que são átomos ou moléculas instáveis que realizam reações de oxidação para a captura de elétrons e a estabilidade. Os indivíduos naturalmente possuem mecanismos antioxidantes, que diminuem a sua efetividade com o passar dos anos e o desequilíbrio redox, a favor dos agentes antioxidantes resulta no estresse oxidativo associado com várias doenças, como o Alzheimer, Diabetes Mellitus tipo 1 e 2 e a aterosclerose [67, 68, 69].

Algumas moléculas possuem a ação antioxidante e transformam os

óxidos em substâncias pouco tóxicas por reações de oxirredução [70]. O efeito antioxidante dos polissacarídeos, por exemplo, decorre da sua habilidade de doar elétrons/átomos de hidrogênio aos radicais livres, descontinuando as reações de oxidação [6]. Como essas bioatividades são associadas com a sua estrutura e conformação, as modificações químicas podem melhorar e/ou promover o aparecimento de novas propriedades biológicas a essas macromoléculas. Dessa forma, a adição de grupos sulfato por meio da sulfatação pode aumentar de forma significativa a eliminação do DPPH [49].

Na última concentração testada (4 mg), a inibição foi de 9 %, 19 % e 11 % para NL, SL1 e SL2, respectivamente, ou seja, o processo de sulfatação aumentou a propriedade antioxidante em 52 % e 18 %, comparando com NL (Tabela 5). Esses resultados estão de acordo com a pesquisa de Huang *et al.* [55], que descreveram que o derivado sulfatado de *Mesona chinensis* expressava maior capacidade antioxidante, quando comparada com o polissacarídeo nativo. A adição dos grupos sulfato, além de alterar a estrutura e a conformação da cadeia polissacarídica, aumenta a solubilidade em água e resulta no melhoramento das bioatividades. Assim, a possível ação antioxidante dos polissacarídeos sulfatados é devido aos grupos sulfato, que poderiam ativar o átomo de hidrogênio do carbono anomérico e quanto maior a capacidade de ativação, maior seria a sua capacidade antioxidante [71].

Apesar do valor do DS ser um dos fatores responsáveis pelo efeito antioxidante dos polissacarídeos sulfatados, o processo de sulfatação pode aumentar o peso molecular dos derivados sulfatados sintetizados, prejudicando a sua capacidade antioxidante [72]. Xie *et al.* [73] observaram que os polissacarídeos sulfatados da planta *Cyclocarya paliurus* com menor valor de DS e baixo peso molecular possuíam melhor atividade antioxidante. Considerando o valor de DS e os resultados obtidos para a atividade antiviral e anticoagulante, é importante destacar que a complexidade estrutural dos polissacarídeos sulfatados é importante para a expressão das suas propriedades biológicas [71, 49].

3.5 Referências Bibliográficas

- [1] Rana, S. Upadhyay, L. S. B. Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 157 (2020) 577-583. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.084>.
- [2] Kaur, N. Dey, P. Bacterial exopolysaccharide as emerging bioactive macromolecules: from fundamentals to applications. *Research in Microbiology*. 174 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.104024>.
- [3] Wang, Z. Xie, J. Shen, M. Nie, S. Xie, M. Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization, and bioactivities. *Trends in Food Science & Technology*. 74 (2018) 147-157. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.010>.
- [4] Agarwal, N. Thakur, M. Mishra, B. B. Singh, S. P. Preparation and characterization of biodegradable films based on levan polysaccharide blended with gellan gum. *Environmental Technology & Innovation*. 31 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103231>.
- [5] Melo, F. C. B. C. Borsato, D. Macedo Junior, F. C. Mantovani, M. S. Luiz, R. C. Celligoi, M. A. P. C. Study of levan productivity from *Bacillus subtilis* Natto by surface response methodology and its antitumor activity against HepG2 cells using metabolomic approach. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 28 (2015) 1917-1926. PMID: 26639487.
- [6] Bouallegue, A. Casillo, A. Chaari, F. Gatta, A. L. Lonsetta, R. Corsaro, M. M. Bachoual, R. Ellouz-Chaabouni, S. Levan from a new isolated *Bacillus subtilis* AF17: Purification, structural analysis, and antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*. 144 (2020) 316-342. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.108>.
- [7] Domzal-Kedzia, M. Ostrowska, M. Lewinska, A. Lukaszewicz, M. Recent Developments and Applications of Microbial Levan, A Versatile Polysaccharide-Based Biopolymer. *Molecules*. 28 (2023). <https://doi.org/10.3390/molecules28145407>.
- [8] Li, S. Xiong, Q. Lai, X. Li, X. Wan, M. Zhang, J. Yan, Y. Cao, H. Lu, L. Guan J. Zhang, D. Lin, Y. Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15 (2016). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12161>.
- [9] Prasad, S. Purohit, S. R. Microbial exopolysaccharide: Sources, stress conditions, properties and application in food and environment: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 242 (2023).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124925>.

[10] Arlov, O. Rüttsche, D. Korayem, M. A. Öztürk, E. Zenobi-Wong, M. Engineered Sulfated Polysaccharides for Biomedical Applications. *Advanced Functional Materials*. 31 (2021). <https://doi.org/10.1002/adfm.202010732>.

[11] Niu, C. M. Liu, U. Yang, R. Li, T. Advances in sulfonated modification and bioactivity of polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*. 253 (2023) 6. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126400>.

[12] Lu, M. Ren, L. Chen, S. Ji, X. Huang, He. Effect of media componentes and morphology of *Bacillus natto* on menaquinone-7 synthesis in submerged fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 21 (2016) 777-786. [10.1007/s12257-016-0202-9](https://doi.org/10.1007/s12257-016-0202-9).

[13] Calazans, G. M. T. Lima, R. C. França, F. P.; Lopes, C. E. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules*. 27 (2000) 245-247. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(00\)00125-2](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(00)00125-2).

[14] Bersaneti, G. T. Pan, N. C. Baldo, C. Celligoi, M. A. C. Co-production of Fructooligosaccharides and Levan by Levansucrase from *Bacillus subtilis* natto with Potential Application in the Food Industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 184 (2018) 838-851. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2587-0>.

[15] Porrás-Domínguez, J.R. Ávila-Fernández, A. Miranda-Molina, A. Rodríguez-Alegría, M.E. Munguía, A.L. *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levanmolecular weight. *Carbohydrate Polymers*. 132 (2014) 338-344. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.056>.

[16] Dubois, M. Gilles, K. A. Hamilton, J. K. Rebers, P. A. Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytic Chemistry*. 28 (1956) 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.

[17] Nelson, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 153 (1944) 375-380. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71980-7).

[18] Somogyi, M. A New Reagent for Determination of Sugars. *Journal of Biological Chemistry*. (1945) 61-68. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)43097-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43097-9).

[19] Viikari, L. Gisley R. By-products in the fermentation of different *Zymomonas*-strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 23 (1986) 240-244. <https://doi.org/10.1007/BF00261922>.

[20] De Araújo, C. A. Nosedá, 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*. 92 (2013) 438-491. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.034>.

[21] Dodgson, K. S. Price, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochemical Journal*. 84 (1962) 106-110. [10.1042/bj0840106](https://doi.org/10.1042/bj0840106).

[22] Pauwells, R. Balzarini, J. Baba, M. Snoeck, R. Schols, D. Herdewijn, P. Desmyter, J. Clercq, D. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *Journal of Virological Methods*. 20 (1968) 309-321. [10.1016/0166-0934\(88\)90134-6](https://doi.org/10.1016/0166-0934(88)90134-6).

[23] De La Iglesia, P. Melón, S. Lopéz, B. Rodríguez, M. Blanco, M. I. Mellado, P. ÓNA, M. Rapid Screening Tests for Determining In Vitro Susceptibility of Herpes Simplex Virus Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 36 (1998). <https://doi.org/10.1128/jcm.36.8.2389-2391.1998>.

[24] Rechenchoski, D. Z. Agostinho, K. F. Faccin-Galhardi, L. C. Lonni, A. A. S. G. Cunha, A. P. Ricardo, N. M. P. S. Nozawa, C. Linhares, R. E. C. Antihherpetic Effect of Topical Formulations Containing Sulfated Polysaccharide from *Adenanthera pavonina*. *Indian Journal of Microbiology*. 59 (2019) 417-421, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00815-z>.

[25] Vasconcelos, A. F. D. Dekker, R. F. H. Barbosa, A. M. Carbonero, E. R. Silveira, J. L. M. Glauser, B. Pereira, M. S. Silva, M. L. C. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular β -(1-6)-D-glucan (Iasiodiplodan). *Carbohydrate Polymers*. 92 (2013) 1908-1914. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.034>.

[26] Srikanth, R. Siddartha, G. Reddy, C. H. S. S. Harish, B. S. Ramaiah, M. J. Uppuluri, K. B. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NXCIM2526 and its statistical optimization. *Carbohydrate Polymers*. 123 (2015) 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.079>.

[27] Phengnoi, P. Thakham, N. Rachphirom, T. Teerakulkittipong, N. Lirio, G. A. Jangiam, W. Characterization of levansucrase produced by novel *Bacillus siamensis* and optimization of culture condition for levan biosynthesis. *CellPress*. 8 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12137>.

[28] Ramya, P. Sangeetha, D. Anooj, E. S. Gangadhar, L. Studies on the production and optimization of levan from bacillus sp. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*. 23 (2020) 1188-1197. [10.36295/asro.2020.23744](https://doi.org/10.36295/asro.2020.23744).

[29] Vega, R. Zuniga-Hanser, M. E. A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructooligosaccharides from sucrose. *Biochemical Engineering Journal*. 82 (2014) 158-165.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.11.012>.

[30] Berté, S. D. Borsato, D. Silva, P. B. Vignoli, J. A. Celligoi, M. A. P. C. Statistical optimization of levansucrase production from *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using response surface methodology. *African Journal of Microbiology Research*. 10 (2013) 898-904. 10.5897/AJMR.

[31] Ju, S. Cao, Z. Wong, C. Liu, Y. Foda, M. F. Zhang, Z. Li, J. Isolation and Optimal Fermentation Condition of the *Bacillus subtilis* Subsp. *Natto* Strain WTC016 for Nattokinase Production. *Fermentation*. 5 (2019).
<https://doi.org/10.3390/fermentation5040092>.

[32] Liu, Q. Yu, S. Zhang, T. Jiang, B. Mu, W. Efficient biosynthesis of levan from sucrose by a novel levansucrase from *Brenneria goodwinii*. *Carbohydrate Polymers*. 157 (2017) 1732-1740. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.057>.

[33] Erginer, M. Akcay, A. Coskuhan, B. Morova, T. Rende, D. Bucak, S. Baysal, N. Ozisik, R. Eroglu, M. S. Agirbasli, M. Oner, E. Y. Sulfated levan from *Halomonas smyrnensis* as a bioactive, heparin-mimetic glycan for cardiac tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*. 149 (2019) 289-296.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.092>.

[34] Gomes, T. D. Caridade, S. G. Sousa, M. P. Azevedo, S. Kandur, M. Y. Oner, E. T. Alves, N. M. Mano, J. F. Adhesive free-standing multilayer films containing sulfated levan for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. 69 (2018) 183-195.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.01.027>.

[35] Mestechkina, N. M. Scherbukhin, V. D. Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 46 (2010) 267-273. 10.1134/S000368381003004X.

[36] Chen, X. Gao, H.; Plhoehn, H. J. Montmorillonite-levan nanocomposites with improved thermal and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*. 101 (2014) 565-573. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.073>.

[37] Barone, J. R. Medynets, M. Thermally processed levan polymers. *Carbohydrate Polymers*. v.69 (2007) 554-561. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.01.017>.

[38] Fellah, A. Anjukandi, P. Waterland, M. R. Williams, M. A. K. Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR-FT-IR: Methodology optimisation and comparison with theoretical calculations. *Carbohydrate Polymers*. 78 (2009) 847-853. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.003>.

[39] Romano, N. Santos, M. Mobili, P. Vega, R. Gómez-Zavaglia. Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructo-oligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis. *Food Chemistry*.

202 (2016) 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.002>.

[40] Sacchelli, B. A. L. Faccin-Galhardi, L. C. Ito, V. Y. Lopes, J. L. Dekker, R. F. H. Barbosa-Dekker, A. M. Orsato, A. Botryosphaeran and sulfonated derivatives as novel antiviral agentes for herpes simplex and dengue fever. *International Journal of Biological Macromolecules*. 138 (2019) 334-339. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.084>.

[41] Xu, M. Pan, L. Zhou, Z. Han, Y. Structural characterization of levan synthesized by a recombinant levansucrase and its application as yogurt stabilizers. *Carbohydrate Polymers*. 291 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119519>.

[42] Siqueira, E. C. Rebouças, J. S. Pinheiro, I. O. Formiga, F. R. Levan-sabed nanostructured systems: Na overview. *International Journal of Pharmaceutics*. 580 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119242>.

[43] Wan-Mohtar, W. A. A. Q. Young, L. Abbott, G. M. Clements, C. Harvey, L. M. Mcneil, B. Antimicrobial Properties and Cytotoxicity of Sulfated (1,3)- β -D-Glucan from the Mycelium of the Mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26 (2020). <https://doi.org/10.4014/jmb.1510.10018>.

[44] Gamal, A.A. Hashem, A. M. El-Safty, M. M. Soliman, R. A. Esawy, M. A. Evaluation of the antiviral activity of *Enterococcus faecalis* Esawy levan and its sulfated form. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 28 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101735>.

[45] Xu, Y. Wu, Y. Sun, P. Zhang, F. Linhardt, R. J. Zhang, A. Chemically modified polysaccharides: Synthesis, characterization, structure activity relationships of action. *International Journal of Biological Macromolecules*. 132 (2019) 970-977. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.213.7>.

[46] Xie, L. Shen, M. Hong, Y. Ye, H. Huang, L. Xie, J. Chemical modifications of polysaccharides and ther anti-tumor activities. *Carbohydrate Polymers*. 299 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115436>.

[47] Faccin-Galhardi, L. C. Ray, S. Lopes, N. Ali, I. Espada, S. F. Santos, J. P. Ray, B. Linhares, R. E. C. Nozawa, C. Assessment of antiherpetic activity of nonsulfated and sulfated polysaccharides from *Azadirachta indica*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 137 (2019) 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.129>.

[48] Sacchelli, B. A. L. Faccin-Galhardi, L. C. Ito, V. Y. Lopes, J. L. Dekker, R. F. H. Barbosa-Dekker, A. M. Orsato, A. Botryosphaeran and sulfonated derivatives as novel antiviral agentes for herpes simplex and dengue fever. *International Journal of Biological Macromolecules*. 138 (2019) 334-339. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.084>.

- [49] Zhao, T. Yang, M. Ma, L. Liu, X. Ding, Q. Chai, G. Lu, Y. Wei, H. Zhang, S. Ding, C. Structural Modification and Biological Activity of Polysaccharides. *Molecules*. 28 (2023). <https://doi.org/10.3390/molecules28145416>.
- [50] Lu, W. Yang, Z. Chen, J. Wang, D. Zhang, Y. Recent advances in antiviral activities and potential mechanisms of sulfated polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 272 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118526>.
- [51] Brynes, A. P.; Griffin, D. E. Large-Plaque Mutants of Sindbis Virus Show Reduced Binding to Heparan Sulfate, Heightened Viremia, and Slower Clearance from the Circulation. *Journal of Virology*. 72 (2000). <https://doi.org/10.1128/jvi.74.2.644-651.2000>.
- [52] Lopes, N. Ray, S. Espada, S. F. Bomfim, W. A. Ray, B. Faccin-Galhardi, L. C. Linhares, R. E. C. Nozawa, C. Green seaweed *Enteromorpha compressa* (*Chlorophyta, Ulvaceae*) derived sulphated polysaccharides inhibit herpes simplex virus. *International Journal of Biological Macromolecules*. 102 (2017) 605-612. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.043>.
- [53] Gao, N. Chen, R. Mou, R. Xiang, J. Zhou, K. Li, Z. Zhao, J. Purification, structural characterization and anticoagulant activities of four sulfated polysaccharides from sea cucumber *Holothuria fuscopunctata*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 164 (2020) 3421-3428. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.150>.
- [54] Kazzachenko, A. S. Vasilieva, N. Y. Borovkova, V. S. Fetisova, O. Y. Issaoui, N. Malyar, Y. N. Elsuf'ev, E. V. Karacharov, A. A. Skripnikov, A. M. Miroshnikova, A. V. Kazachenko, A. S. Zimonin, D. V. Lonin, V. A. Food Xanthan Polysaccharide Sulfation Process with Sulfamic Acid. *Foods*. 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/foods10112571>.
- [55] Huang, L. Huang, M. Shen, M. Wen, P. Wu, T. Hong, Y. Yu, Q. Chen, Y. Xie, J. Sulfated modification enhanced the antioxidant activity of *Mesona chinensis* Benth polysaccharide and its protective effect on cellular oxidative stress. *International Journal of Biological Macromolecules*. 135 (2019) 1000-1006. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.199>.
- [56] Mendes, S. F. Santos Jr, O. Barbosa, A. M. Vasconcelos, A. F. D. Aranda-Selverio, G. Monteiro, N. K. Dekker, R. F. H. Pereira, M. S. Tovar, A. M. Mourão, P. A. S. Silva, M. L. C. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. *International Journal of Biological Macromolecules*. 45 (2009) 305-309. [10.1016/j.ijbiomac.2009.06.004](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.06.004).
- [57] Zhang, Z. Tang, Q. Wu, D. Zhou, S. Yang, Y. Feng, N. Tang, C. Wang, J. Yan, M. Liu, Y. Zhang, J. Regioselective sulfation of β -glucan from *Ganoderma lucidum* and structure-anticoagulant activity relationship of sulfated derivatives. *International*

Journal of Biological Macromolecules. 155 (2020) 470-478.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.234>.

[58] Zhang, Y. Liu, Y. Ni, G. Xu, J. Tian, Y. Liu, X. Gao, J. Gao, Q. Shen, Y. Yan, Z. Sulfated modification, basic characterization, antioxidant and anticoagulant potentials of polysaccharide from *Sagittaria trifolia*. *Arabian Journal of Chemistry*. 16 (2023).
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104812>.

[59] Qin, L. He, M. Yang, Y. Fu, Z. Tang, C. Shao, Z. Zhang, J. Mao, W. Anticoagulant-active sulfated arabinogalactam from *Chaetomorpha linum*: Structural characterization and action on coagulation factors. *Carbohydrate Polymers*. 242 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116394>.

[60] Damus, P. S. Hicks, M. Rosenberg, R. D. Anticoagulant Action of Heparin. *Nature*. 246 (1973) 355-357. <https://doi.org/10.1038/246355a0>.

[61] Li, W. Johnson, D. J. D. Esmon, C. T. Huntington, J. A. Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nature Structural & Molecular Biology*. 11 (2004) 857-862.
<https://doi.org/10.1038/nsmb811>.

[62] Hao, C. Xu, H. Yu, L. Zhang, L. Heparin: An essential drug for modern medicine. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 163 (2019) 1-19.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.02.002>.

[63] Al-Amer, O. M. The role of thrombin in haemostasis. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 33 (2022) 145-148. [10.1097/MBC.0000000000001130](https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000001130).

[64] Rezaie, A. R. Giri, H. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 18 (2020) 3142-3153.
<https://doi.org/10.1111/jth.15052>.

[65] Li, H. Wang, X. Xiong, Q. Yu, Y. Peng, L. Sulfated modification, chracterization, and potential bioactivities of polysaccharide from the fruiting bodies of *Russula virescens*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 154 (2020) 1438-1447.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.025>.

[66] Abdel-Fattah, Z. M. Gamal-Eldeen, A. A. Helmy, W. A. Esawy, M. A. Antitumor and antioxandt activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRCT1aza. *Carbohydrate Polymers*. 89 (2012) 314-322, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.041>.

[67] Ullah, A. Khan, A. Khan, A. Diabetes mellitus and oxidative stress – A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 24 (2016) 547-553.
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>.

- [68] Penã-Bautista, C. Maquero, M. Vento, M. Chãfer-Pericás, C. Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. *Clinica Chimica Acta*. 419 (2019) 85-90. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.01.021>.
- [69] Malekmohamman, K. Sewell, R. D. E. Rafieian-Kopare, M. Antioxidants and Atherosclerosis: Mechanistic Aspects. *Biomolecules*. 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/biom9080301>.
- [70] Mu, S. Yang, W. Huang, G. Antioxidant activities and mechanisms of polysaccharides. *Chemical Biology & Drug Design*. 97 (2020) 628-632. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13798>.
- [71] Wang, J. Guo, H. Zhang, J. Wang, X. Zhao, B. Yao, J. Wang, Y. Sulfated modification, characterization and structure-antioxidant relationships of *Artemisia shaerocephala* polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 81 (2010) 897-905. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.002>.
- [72] Xing, R. Liu, S. Guo, Z. Yu, H. Wang, P. Li, C. Li, Z. Li, P. Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13 (2005) 1573-1577. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.12.022>.
- [73] Xie, J. H. Wang, Z. J. Shen, M. Y. Nie, S. P. Gong, B. Li, H. Zhao, Q. Li, W. Xie, M. Y. Sulfated modification, characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*. *Food Hydrocolloids*. 53 (2016) 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.018>.

5.2 PATENTE: LEVANA SULFATADA DE *BACILLUS SUBTILIS* NATTO COM CAPACIDADE ANTIVIRAL, ANTICOAGULANTE E ANTIOXIDANTE

Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Beatriz Ticiani Vieira Pereira, Alexandre Orsato, Gabrielle Cristina Calegari, Briani Giselle Bigoto, Tainã de Oliveira Ferreira, Cristiani Baldo, Maria Emília Favero, José Wander Breganó, Lúgia Carla Faccin-Gualhardi.

(Em processo)

Resumo: Essa invenção consiste na sulfatação da levana produzida por *B. subtilis* natto. A levana foi produzida em meio contendo a sacarose, precipitada com o etanol absoluto, liofilizada e submetida à duas sulfatações, com duas proporções diferentes do complexo trióxido de enxofre-piridina. A sulfatação da levana foi confirmada por Espectroscopia com Transformada do Fourier (FT-IR) e o grau de substituição (DS) foi determinado pelo método da gelatina cloreto-bárico. O DS foi de 1,36 e 1,37 para a sulfatação branda e exaustiva, respectivamente estimando que para cada 10 unidades de frutose aproximadamente 14 grupos sulfatos foram adicionados. A atividade antiviral aumentou com a sulfatação exaustiva, diminuindo a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) em 57%. A levana nativa não apresentou atividade anticoagulante em nenhuma das concentrações testadas, enquanto as amostras sulfatadas demonstraram o prolongamento do tempo parcial de tromboplastina ativada (KPTT) dependente da concentração. A atividade antioxidante, definida pela eliminação do radical livre DPPH aumentou em 52% com levana sulfatada. O processo de sulfatação melhorou e adicionou propriedades biológicas na levana, propondo uma nova molécula multifuncional que pode ser utilizada em novas metodologias terapêuticas para a área da saúde.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pelo planejamento Box-Behnken 3³ mostrou que as variáveis: (X₂) concentração de sacarose (g/L) e (X₃) pH foram significativas em nível de 5%. A condição ótima foi de 24h, 400g/L de sacarose e pH 7,0, com a produção de levana de 26,88g/L.

A levana foi sulfatada, com diferentes proporções do agente sulfatante complexo trióxido enxofre-piridina e o DS, que indica a quantidade de grupos sulfato obtidos por unidade de frutose foi de 1,36 e 1,37 para SL1 e SL2, respectivamente.

A sulfatação foi confirmada pelos espectros de FT-IR, com o aparecimento de novas bandas que não são encontradas na levana nativa. Ainda, a adição dos grupos sulfato melhorou a resistência térmica da levana, elevando a temperatura de carbonização de 578°C para aproximadamente 740°C.

A atividade antiviral aumentou com a sulfatação, diminuindo a IC₅₀ em até 57%. NL não apresentou a atividade anticoagulante em nenhuma das concentrações testadas, enquanto SL1 e SL2 demonstraram a atividade proporcional com a concentração no ensaio de KPTT. Esse resultado indica que houve a inibição da via intrínseca da cascata de coagulação sanguínea. A sulfatação também aumentou a atividade antioxidante em até 52%, melhorando a capacidade de inibição do DPPH.

Os resultados deste trabalho mostram que o processo de sulfatação melhorou a atividade antiviral e antioxidante e agregou a atividade anticoagulante e podem colaborar para a criação de novas metodologias terapêuticas voltadas para a área da saúde. No entanto, novos estudos devem ser realizados para melhor caracterização da estrutura e das atividades biológicas de SL1 e SL2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, N.; THAKUR, M.; MISHRA, B. B.; SINGH, S. P. Preparation and characterization of biodegradable films based on levan polysaccharide blended with gellan gum. **Environmental Technology & Innovation**. v.31, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103231>.
- AL-AMER, O. M. The role of thrombin in haemostasias. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**. v.33, p.145-148, 2022. Doi: 10.1097/MBC.0000000000001130.
- ALBRICKER, A. C. L.; FREIRE, C. M. V.; SANTOS, S. N.; ALCÂNTRA, M. L.; SALEH, M. H.; CANTISANO, A. L.; TEODOR, J. A. R.; PORTO, C. L. L.; AMARAL, S. I.; VELOSO, O. C. G.; PETISCO, A. C. G. P.; BARROS, F. S.; BARROS, M. V. L.; SOUZA, A. J.; SOBREIRA, M. L.; MIRANDA, R. B.; MORAES, D.; VERRASTRO, C. G. Y.; MANÇANO, A. D.; LIMA, R. S. L.; MUGLIA, V. F.; MATUSHITA, C. S.; LOPES, R. W.; COUTINHO, A. M. N.; PIANTA, D. B.; SANTOS, A. A. S. M. D.; NAVES, B. L.; VIEIRA, M. L. C.; ROCHITTE, C. E. Diretriz Conjunta sobre Tromboembolismo Venoso – 2022. **Aquivos Brasileiros de Cardiologia**. v.118, n.4, p.797-857, 2022. Doi: 10.36660/abc.20220213.
- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.42, n.3, p.291-297, 1999. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-89131999000300004>.
- ANTONIAK, S. The coagulation system in host defense. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**. v.2, n.3, p.549-557, 2018. Doi: 10.1002/rth2.12109.
- ARLOV, O.; RÜTSCHKE, D.; KORAYEM, M. A.; ÖZTÜRK, E.; ZENOBI-WONG, M. Engineered Sulfated Polysaccharides for Biomedical Applications. **Advanced Functional Materials**. v.31, n.19, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1002/adfm.202010732>.
- AZAB, A. E.; ADWAS, A. A.; ELSAYED, A. S. I.; QUWAYDIR, F. A. Oxidative stress and antioxidante mechanisms in human body. **Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering**. v.6, n.1, p.43-47, 2019. Doi: 10.15406/jabb.2019.06.00173.
- BECATTINI, C.; AGNELLI, G. Treatment of Venous Thromboembolism With New Anticoagulant Agents. **Journal of the American College of Cardiology**. v.67, n.16, p.1941-1955, 2016. Doi: 10.1016/j.jacc.2016.01.072.
- BERSANETI, G. T.; PAN, N. C.; BALDO, C.; CELLIGOI, M. A. P. C. Co-production of Fructooligosaccharides and Levan by Levansucrase from *Bacillus subtilis* natto with Potential Application in the Food Industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.184, p.838-851, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2587-0>.
- BERSANETI, G. T.; GARCIA, S.; MALI, S.; CELLIGOI, M. A. P. Evaluation of the prebiotic activities of edible starch films with the addition of nystose from *Bacillus subtilis* natto. **LWT**. v.116, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108502>.

BOUALLEGUE, A.; CASILLO, A.; CHAARI, F.; CIMINI, D.; CORSARO, M. M.; BACHOUAL, R.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S. Statistical optimization of levan: Influence of the parameter on levan structure and antiotensin I-converting enzyme inhibitory. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.158, p.945-952, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.232>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Manual de diagnóstico laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R. C.; FRANÇA, F. P.; LOPES, C. E. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.27, n.4, p.245-247, 2000. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(00\)00125-2](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(00)00125-2).

CASTREJÓN-CARRILLO, S.; MORALES-MORENO, L. A.; RODRÍGUEZ-ALEGRÍA, M. E.; ZAVALA-PADILLA, G. T.; BELLO-PERÉZ, L. A.; MORENO-ZARAGOZA, J.; MUNGUÍA, A. L. Insights into the heterogeneity of levan polymers synthesized by levansucrase Bs-SacB from *Bacillus subtilis* 168. **Carbohydrate Polymers**. v.323, 2024. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121439>.

CHAMBERT, R.; GONZY-TRÉBOUL, G. Levansucrase of *Bacillus subtilis*: kinetic and thermodynamics aspects of transfructosylation processes. **European Journal Biochemical**. v.62, p.55-64, 1976. Doi: [10.1111/j.1432-1033.1976.tb10097.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10097.x).

CHEN, L.; HUANG, G. Antioxidant activities of sulfated pumpkin polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.126, p.743-746, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.261>.

CONOLLY, S. A.; JARDETZKY, T. S.; LONGNECKER, R. The structural basis of herpesvirus entry. **Nature Reviews Microbiology**. v.19, p.110-121, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00448-w>.

DE ARAÚJO, C. A.; NOSEDA, M D.; CIPRIANI, T. R.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R.; DUCATTI, D. R. B. Selective sulfation os carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**. v.92, p.438-491, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.034>.

DOMZAL-KEDZIA, M.; OSTROWSKA, M.; LEWINSKA, A.; LUKASZEWICZ, M. Recent Developments and Applications of Microbial Levan, A Versatile Polysaccharide-Based Biopolymer. **Molecules**. v.28, n.14, 2023. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28145407>.

DRONINA, J.; SAMUKAITE-BUBNIENE, U.; RAMANAVICIUS, A. Advances and insights in the diagnosis of viral infections. **Journal of Nanobiotechnology**. v.19, n.348, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01081-2>.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F.

- Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytic Chemistry**. v.28, n.3, p.350-356, 1956. Doi: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- ERKORKMAZ, B. A.; KIRTIL, O.; DURU, O. A.; ÖNER, E. T. Development of a cost-effective production process for *Halomonas* levan. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v.41, p.1247-1259, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1952-x>.
- EUZENAT, O.; GUIBERT, A.; COMBES, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**. v.32, n.3, p.237-243, 1997. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00058-1).
- FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. O.; DUSSE, L. M. S.; CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.32, n.5, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010000500016>.
- FIUME, M. M.; HELDRETH, B.; BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; HILL, R. A.; KLAASSEN, C. D.; LIEBLER, D. C.; MARKS JR, J. G.; SHANK, R. C.; SLAGA, T. J.; SNYDER, P. W.; ANDERSEN, F. A. Safety Assessment of Microbial Polysaccharide Gums as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**. v.35, n.1, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1177/1091581816651606>.
- GAMAL, A. A.; HASHEM, A. M.; EL-SAFETY, M. M.; SALIMAN, R. A.; ESAWY, M. A. Evaluation of the antiviral activity of enterococcus faecalis Esawy levan and its sulfated form. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.28, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101735>.
- GAO, X.; XIA, Y.; LIU, X.; XU, Y.; LU, P.; DONG, Z.; LIU, J.; LIANG, G. A perspective on SARS-CoV-2 virus-like particles vaccines. **International Immunopharmacology**. v.115, 2023. Doi: [10.1016/j.intimp.2022.109650](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109650).
- GHALY, A. E., ARAB, F., MAHMOUD, N. S., HIGGINS, J. Production of levan by *B. licheniformis* for use as a soil sealant in Earthen Manure Structures. **American Journal of Biotechnology and Biochemistry**. v.3, n.2, p.47-54, 2007. Doi: <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2007.47.54>.
- GHLISSI, Z.; KRICHEN, F.; KALLEL, R.; AMOR, I. B.; BOUDAWARA, T.; GARGOURI, K.; ZEGHAL, K.; HAKIM, A.; BOUGATEF, A.; SAHNOUN, Z. Sulfated polysaccharide isolated from *Globularia alypum* L.: Structural characterization, in vivo and in vitro anticoagulant activity, and toxicological profile. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.123, p.335-342, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.044>.
- GULCIN, I. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**. v.94, p.651-715, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>.
- HAN, Y. W. Microbial Levan. **Advances In Applied Microbiology**. v. 35, p. 171 - 194, 1990. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70244-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70244-2).

- HANDY, A. A.; ELATTAL, N. A.; AMIN, M. A.; ALI, A. E.; MANSOUR, N. M.; AWAD, G. E. A.; FARRAG, A. R. H.; ESARY, M. A. *In vivo* assessment of possible probiotic properties of *Bacillus subtilis* and prebiotic properties of levan. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.13, p.190-197, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.12.001>.
- HAO, C.; XU, H.; YU, L.; ZHANG, L. Heparin: An essential drug for modern medicine. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. v.163. p.1-19, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.02.002>.
- HERTADI, R.; PERMATASARI, N. U.; RATNANINGSIH, E. Box-Wilson Design for Optimization of *in vitro* Levan Production and Levan Application as Antioxidant and Antibacterial Agents. **Iranian Biomedical Journal**. v.25, n.3, p.202-212, 2021. Doi: [10.52547/ibj.25.3.202](https://doi.org/10.52547/ibj.25.3.202).
- IGLESIA, P.; MELÓN, S.; LÓPEZ, B.; RODRIGUEZ, M.; BLANCO, M. I.; MELLADO, P.; ÑONA, M. Rapid screening tests for determining *in vitro* susceptibility of herpes simplex virus clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, p.2389-2391, 1998. Doi: [10.1128/JCM.36.8.2389-2391.1998](https://doi.org/10.1128/JCM.36.8.2389-2391.1998).
- JALAN, N.; VARSHNEY, L.; MISRA, N.; PAUL, J.; MITRA, D.; RAIKHWADA, D. D.; BHATHENA, Z.; KUMAR, V. Studies on production of fructo-oligosaccharides (FOS) by gamma radiation processing of microbial levan. **Carbohydrate Polymers**. v.96, n.1, p.365-360, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.057>.
- JIANG, J.; MENG, F.; HE, Z.; NING, Y.; LI, X.; SONG, H.; WANG, J.; ZHOU, R. Sulfated modification of *longan* polysaccharide and its immunomodulatory and antitumor activity *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.67, p.323-329, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.030>.
- KHA, B. M.; QIU, H.; WANG, X.; LIU, Z.; ZHANG, J.; GUO, Y.; CHEN, W.; LIU, W.; CHEONG, K. Physicochemical characterization of *Gracilaria chouae* sulfated polysaccharides and their antioxidant potential. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.134, p.255-261, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.055>.
- KIM, S.; BAE, P. K.; CHOI, M.; KEEM, J. O.; CHUNG, W.; SHIN, Y. Fabrication and Application of Levan-PVA Hydrogel for Effective Influenza Virus Capture. **APPLIED MATERIALS & INTERFACES**. v.12, n.26, p.29103-29109, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1021/acsami.0c08333>.
- KRISHNAN, R.; STUART, P. M. Developments in Vaccination for Herpes Simplex Virus. **Frontiers in Microbiology**. v.12, 2021. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.798927>.
- LEVY, J. H.; CONNORS, J. M. Heparin Resistance – Clinical Perspectives and Management Strategies. **The New England Journal of Medicine**. v.385, p.826-832, 2021. Doi: [10.1056/NEJMra2104091](https://doi.org/10.1056/NEJMra2104091).

LI, H.; WANG, X.; XIONG, Q.; YU, Y.; PENG, L. Sulfated modification, characterization, and potential bioactivities of polysaccharide from the fruiting bodies of *Russula virescens*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.154, p.1438-1447, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.025>.

LI, M.; SEO, S.; KARBOUNE, S. *Bacillus amyloliquefaciens* levansucrase-catalyzed the synthesis of fructooligosaccharides, oligolevan and levan in maple syrup-based reaction systems. **Carbohydrate Polymers**, v.133, p. 203–212, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.010>.

LI, S.; DAI, S.; SHAH, N. P. Sulfonation and Antioxidative Evaluation of Polysaccharides from *Pleurotus* Mushroom and *Streptococcus thermophilus* Bacteria: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.16, n.2, p 282–294, 2017. Doi: [10.1111/1541-4337.12252](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12252).

LI, S.; XIONG, Q.; LAI, X.; LI, X.; WAN, M.; ZHANG, J.; YAN, Y.; CAO, H.; LU, L.; GUAN, J.; ZHANG, D.; LIN, Y. Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.15, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12161>.

LIU, Q.; YU, S.; ZHANG, T.; JIANG, B.; MU, W. Efficient biosynthesis of levan from sucrose by a novel levansucrase from *Brenneria goodwinii*. **Carbohydrate Polymers**. v.157, p.1732-1740, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.057>.

LIU, Z.; DONG, L.; JIA, K.; ZHAN, H.; ZHANG, Z.; SHAH, N. P.; TAO, X.; WEI, H. Sulfonation of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 exopolysaccharide amplifies its antioxidant activities in vitro and in a Caco-2 cell model. **Journal of Dairy Science**. v.102, n.7, p.5922-5932, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15831>.

LU, W.; YANG, Z.; CHEN, J.; WANG, D.; ZHANG, Y. Recent advances in antiviral activities and potential mechanisms of sulfated polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**. v.272, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118526>.

LU, Y.; WANG, D.; HU, Y.; HUANG, X.; WANG, J. Sulfated modification of epimedii polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV. **Carbohydrate Polymers**, v.71, n.2, p.180–186, 2008. Doi: [10.1016/j.carbpol.2007.05.024](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.05.024).

MALAGOLI, B. G.; CARDOZO, F. T. G. S.; GOMES, J. H. S.; FERRAZ, V. P.; SIMÕES, C. M. O.; BRAGA, F. C. Chemical characterization and antiherpes activity of sulfated polysaccharides from *Lithothamnion muelleri*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.66, p.332-337, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.053>.

MALEKMOHAMMAN, K.; SEWELL, R. D. E.; RAFIEIAN-KOPAREI, M. Antioxidants and Atherosclerosis: Mechanistic Aspects. **Biomolecules**. v.9, n.8, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3390/biom9080301>.

MANTOVAN, J. **MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LEVANA DE ALTA**

MASSA MOLECULAR PRODUZIDA POR *Bacillus subtilis* natto PARA POTENCIAL APLICAÇÃO BIOMÉDICA. 2016. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

MANTOVAN, J.; BERSANETI, G. T.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; CELLIGOI, M. A. P. C.; MALI, S. Use of microbial levan in edible films based on cassava starch. **Food Packaging and Shelf Life.** v.18, p.31-36, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.08.003>.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura.** v.66, n.3, 2014. Doi: <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252014000300017>.

MARTÍNEZ-FLEITES, C.; ORTÍZ-LOMBARDÍA, M.; PONS, T.; TARBOURIECH, N.; TAYLOR, E. J.; ARRIETA, J. G.; HERNÁNDEZ, L.; DAVIES, G. J. Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Biochememical Journal**, n. 390, p. 19 - 27, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1042/BJ20050324>.

MELO, F. C. B. C.; BORSATO, D.; MACEDO JÚNIOR, F. C.; MANTOVANI, M. S.; LUIZ, R. C.; CELLIGOI, M. A. P. C. Study of levan productivity from *Bacillus subtilis* Natto by surface response methodology and its antitumor activity against HepG2 cells using metabolomic approach. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.** v.28, n.6, p.1917-1926, 2015.

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

MUKHERJEE, S.; JANA, S.; KHAWAS, S.; KICUNTOD, J.; MARSCHALL, M.; RAY, B.; RAY, S. Synthesis, molecular features and biological activities of modified plant polysaccharides. **Carbohydrate Polymers.** v.289, 2022. Doi: [10.1016/j.carbpol.2022.119299](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119299).

MUSCHIN, T.; BUDRAGCHAA, D.; KANAMOTO, T.; NAKASHIMA, H.; ICHIYAMA, K.; YAMAMOTO, N.; SHUGIN, H.; YOSHIDA, T. Chemically sulfated natural galactomannans with specific antiviral and anticoagulant activities. **International Journal of Biological Macromolecules.** v.89, p.415-420, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.005>.

NAHAIN, A. A.; IGNJATOVIC, V.; MONAGLE, P.; TSANAKTSIDIS, J.; FERRO, V. Heparin mimetics with anticoagulante activity. **Medicinal Research Reviews.** v.38, n.5, p.1582-1613, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1002/med.21489>.

NAVARRETE, S.; SOLAR, C.; TAPIA, R.; PEREIRA, J.; FUENTES, E.; PALOMO, I. Pathophysiology of deep vein thrombosis. **Clinical and Experimental Medicine.** v.23, p.645-654, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00829-w>.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**. v.153, p.375-80, 1944. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71980-7).

NICHOLSON, M.; CHAN, N.; BHAGIRATH, V.; GINSBERG, J. Prevention of Venous Thromboembolism in 2020 and Beyond. **Journal of Clinical Medicine**. v.9, n.8, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3390/jcm9082467>.

NIU, C. M.; LIU, Y.; YANG, Y.; WANG, R.; LI, T. Advances in sulfonated modification and bioactivity of polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.253, p.6, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126400>.

OLIVEIRA, M. R.; SILVA, R. S. S. F.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**. v.37, n.2, p.177-183, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.04.009>.

ÖNER, E. T.; HERNÁNDEZ, L.; COMBIE, J. Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. **Biotechnology Advances**. v.34, n.5, p.827-844, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.002>.

PAUWELLS, R.; BALZARINI, J.; BABA, M.; SNOECK, R.; SCHOLS, D.; HERDEWIJN, P.; DESMYTER, J.; CLERCQ, D. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. **Journal of Virological Methods**. v.20, p. 309-321, 1968. Doi: [10.1016/0166-0934\(88\)90134-6](https://doi.org/10.1016/0166-0934(88)90134-6).

PENÃ-BAUTISTA, C.; MAQUERO, M.; VENTO, M. CHÁFER-PERICÁS, C. Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. **Clinical Chimica Acta**. v.419, p.85-90, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.01.021>.

PIRET, J.; BOIVIN, G. Pandemics Throughout History. **Frontiers in Microbiology**. v.11, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.631736>.

PRASAD, S.; PUROHIT, S. R. Microbial exopolysaccharide: Sources, stress conditions, properties and application in food and environment: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.242, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124925>.

RECHENCHOSKI, D. Z.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Herpesvirus: an underestimated virus. **Folia Microbiológica**. v.62, n.2, p.151-156, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0482-7>.

SACCHELLI, B. A. L.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; ITO, V. Y.; LOPES, J. L.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA-DEKKER, A. M.; ORSATO, A. Botryosphaeran and sulfonated derivatives as novel antiviral agents for herpes simplex and dengue fever. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.138, p.334-339. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.084>.

SAHYOUN, A. M.; MIN, M. W.; XU, K.; GEORGE, S.; KARBOUNE, S.

Characterization of levans produced by levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Gluconobacter oxydans*: structural, Techno-functional, and anti-inflammatory properties. **Carbohydrate Polymers**. v.323, 2024. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121332>.

SAND, L.; BORMANN, M.; SCHMITZ, Y.; HEILINGLOH, C. S.; WITZKE, O.; KRAWCZYK, A. Antiviral Active Compounds Derived from Natural Sources against Herpes Simples Viruses. **Viruses**. V.13, n.7, 2021. Doi: <https://doi.org/10.3390/v13071386>.

SANTOS-MORIANO, P.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; POVEDA, A.; JIMENEZ-BARBERO, J.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: effect of reaction conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.119, p.18–25, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.05.011>.

SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R. Na Introduction to Virus Infections and Human Cancer. **Viruses and Human Cancer: From Basis Science to Clinical Prevention**. v.217, p.1-11, 2020. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-57362-1_1.

SHARIFI-RAD, M.; KUMAR, N. V. A.; ZUCCA, P.; VARONI, E. M.; DINI, L.; PANZARINI, E.; RAJKOVIC, J.; FOKOU, P. V. T.; AZZINI, E.; PELUSO, I.; MISHRA, A. P.; NIGAM, M.; RAYESS, Y.; BEYROUTHY, M.; POLITO, L.; IRITI, M.; MARTINS, N.; MARTORELL, M.; DOCEA, A. O.; SETZER, W. N.; CALINA, D.; CHO, W. C.; SHARIFI-RAD, J. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. **Frontiers in Physiology**. v.11, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>.

SIES, H. Oxidative Stress: Concept and Some Pratical Aspects. **Antioxidants**. v.9, n.9, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3390/antiox9090852>.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 22 mar. 2017.

SIQUEIRA; E. C.; ONER, E. T. Co-production of levan with other high-value bioproducts: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.235, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123800>.

SOMOGY, M. A New Reagent for Determination of Sugars. **Journal of Biological Chemistry**. p.61-68, 1945. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)43097-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43097-9).

SRIKANTH, R.; SIDDARTHA, G.; REDDY, C. H. S.; HARISH, B. S.; RAMAIAH, M. J.; UPPULURI, K. B. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. **Carbohydrate polymers**, v.123, p.8–16, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.079>.

ULLAH, A.; KHAN, A.; KHAN, A. Diabetes mellitus and oxidative stress – A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v.24, n.5, p.547-553, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>.

VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E.

R.; SILVEIRA, J. L. M.; GLAUSER, B.; PEREIRA, M. S.; SILVA, M. L. C. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular β -(1-6)-D-glucan (lasiodiplodan). **Carbohydrate Polymers**. v.92, p.1908-1914, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.034>.

VELLOSA, J. C. R.; BIAVATTI, M.; FRANÇÓIA, P. C. O.; MELLO, B. J.; ALMEIDA, A. C.; BUENO, G. E. Oxidative stress: na introduction to the state of art. **Brazilian Journal of Development**. v.7, n.1, p.10152-10168, 2021. Doi: 10.34117/bjdv7n1-688.

VIIKARI, L.; GISLEY, R. By-products in the fermentation of diferente *Zymomonas*-strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.23, p.240-244, 1986. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF00261922>.

WANG, C.; HE, Y.; TANG, X.; LI, N. Sulfation, structural analysis, and anticoagulant bioactivity of ginger polysaccharides. **Journal of Food Science**. v.85, n.8, p.2427-2434. Doi: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15338>.

WANG, Y.; ZHOU, Z.; HAN, Y. Levan-chitosan blend films: Preparation, structural, physical properties and application in pork packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.217, p.624-632, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.049>.

WANG, Z.; XIE, J.; SHEN, M.; NIE, S.; XIE, M. Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization and bioactivities. **Trends in Food Science & Technology**. v.74, p.147-157, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.010>

WASILEWSKI, T.; SEWERYN, A.; PANNERT, D.; KIERUL, K.; DOMZAL-KEDZIA, M.; HORDYJEWICZ-BARAN, Z.; LUKASZEWICZ, M.; LEWINSKA, A. Application of Levan-Rich Digestate Extract in the Production of Safe-to-Use and Funcional Natural Body Wash Cosmetics. **Molecules**. v.27, n.9, 2022. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27092793>.

WILMS, L.; WEBOLLEK, K.; PEETERS, T. B.; YAZDI, A. S. Infections with Herpes simplex and Varicella zoster vírus. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**. v.20, n.10, p.1327-1351, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1111/ddg.14917>.

XIAO, H.; FU, X.; CAO, C.; LI, C.; CHEN, C.; HUANG, Q. Sulfated modification, characterization, antioxidante and hypoglycemic activities of polysaccharides from *Sargassum pallidum*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.121, p.407-414, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.197>.

XU, M.; PAN, L.; ZHOU, Z.; HEN, Y. Structural characterization of levan synthesized by a recombinant levansucrase and its application as yogurt stabilizers. **Carbohydrate Polymers**. v.291, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119519>.

XU, Y.; WU, Y.; SUN, P.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J.; ZHANG, A. Chemically modified polysaccharides: Synthesis, characterization, structure activity relationships

of action. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.132, p.970-977, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.213>.

YOSHIDA, W. B. Anticoagulantes orais diretos no tratamento do tromboembolismo venoso em pacientes com câncer. **Jornal Vascular Brasileiro**. V.15, n.4, p.263-264, 2016. Doi: 10.1590/1677-5449.080916.

ZHANG, Y.; LIU, Y.; NI, G.; XU, J.; TIAN, Y.; LIU, X.; GAO, J.; GAO, Q.; SHEN, Y.; YAN Z. Sulfated modification, basic characterization, antioxidante and anticoagulante potentials of polysaccharide from *Sagittaria trifolia*. **Arabian Journal of Chemistry**. v.16, n.7, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104812>.

ZHANG, Z.; TANG, Q.; WU, D.; ZHOU, S.; YANG, Y.; FENG, N.; TANG, C. WANG, J.; YAN, M.; LIU, Y.; ZHANG, J. Regioselective sulfation of β -glucan from *Ganoderma lucidum* and structure-anticoagulant activity relationship of sulfated derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.155, p.470-478, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.234>.

ZHU, S.; VIEJO-BORBOLLA, A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex vírus. **Virulence**. v.12, n.1, p.2670-2702, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1982373>.