



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FLÁVIA DEDUCH

**DERIVADOS OXIDADOS E SULFATADOS DA  
BOTRIOSFERANA COM POTENCIAL ATIVIDADE  
ANTIVIRAL**

---

Londrina  
2022

FLÁVIA DEDUCH

**DERIVADOS OXIDADOS E SULFATADOS DA  
BOTRIOSFERANA COM POTENCIAL ATIVIDADE  
ANTIVIRAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Orsato  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marcelle de Lima  
Ferreira Bispo

Londrina  
2022

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

D299d Deduch, Flávia.  
Derivados oxidados e sulfatados da botriosferana com potencial atividade antiviral / Flávia Deduch. - Londrina, 2022.  
78 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Orsato.  
Coorientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marcelle de Lima Ferreira Bispo.  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2022.  
Inclui bibliografia.

1. Beta-glucanas - Tese. 2. Atividade antiviral - Tese. 3. Miméticos do heparan sulfato - Tese. 4. Polissacarídeos oxidados - Tese. I. Orsato, Prof. Dr. Alexandre. II. de Lima Ferreira Bispo, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marcelle. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

FLÁVIA DEDUCH

**DERIVADOS OXIDADOS E SULFATADOS DA  
BOTRIOSFERANA COM POTENCIAL ATIVIDADE  
ANTIVIRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Química da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Anna Paola Butera  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Diogo R. Bazan Ducatti  
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Londrina, 19 de janeiro de 2022.

Dedico este trabalho à memória de minha mãe.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao Senhor, meu Deus, concededor de todas as coisas por me abençoar e me guiar até aqui.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Orsato, pela sabedoria, extrema paciência, atenção e dedicação e por sempre estar disposto a me ajudar nas minhas muitas dúvidas e dificuldades e principalmente pelos muitos ensinamentos.

Agradeço a minha coorientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcelle de Lima Ferreira Bispo pelo suporte na condução do trabalho de pesquisa.

A minha família querida pelo apoio.

Ao meu namorado Fernando pela paciência e carinho.

Ao pessoal do LaSMMed pela ajuda e muitas risadas.

A Universidade Estadual de Londrina (UEL-PR).

Ao laboratório de Química Prebiótica (LQP - UEL).

Ao Laboratório de Espectroscopia (ESPEC - UEL).

Ao Laboratório de Virologia da UEL. Prof.a. Ligia Carla Faccin Galhardi e Mário Gabriel Lopes Barboza. A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aneli M. B. Dekker pelo fornecimento da matéria-prima deste trabalho.

Aos Órgãos de Fomento (CAPES e CNPq).

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização deste estudo e não estão citados aqui.

**“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza”.**

**Marie Curie**

## RESUMO

DEDUCH, Flávia. **Derivados oxidados e sulfatados da botriosferana com potencial atividade antiviral**. 2022. 78 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

Dentre as doenças virais que ainda não têm cura farmacológica definitiva estão a dengue e a herpes simples. A infecção por estes vírus pode ser inibida por polissacarídeos carregados negativamente, muitos destes provenientes de algas marinhas. Nesse sentido, exopolissacarídeos microbianos destacam-se por apresentar notável potencial nesta aplicação. Desta forma, esse estudo optou por trabalhar com a derivatização de uma  $\beta$ -glucana fúngica, a botriosferana, para se obter miméticos do heparan sulfato, que é responsável pela entrada destes vírus envelopados nas células humanas. O objetivo deste trabalho foi sintetizar derivados oxidados e sulfatados da botriosferana para se obter potenciais compostos antivirais contra a dengue e a herpes simples. Desta forma, foram realizadas sínteses compreendendo reações de redução, oxidação e sulfatação a partir da botriosferana nativa. A reação de redução foi realizada como forma de proteção de eventuais interferências dos terminais redutores nas reações de modificação química. Como o polissacarídeo apresenta um álcool primário nas posições C-6, foi escolhida a reação de oxidação usando o reagente TEMPO na conversão destes grupamentos em grupos carboxilato. Em seguida, a reação de sulfatação foi realizada com o complexo de trióxido de enxofre-piridina e foram obtidos 2 compostos estruturalmente miméticos do heparan sulfato. A reação de oxidação foi confirmada por TF-IV com bandas características de grupos carboxilato em  $1601\text{ cm}^{-1}$ , correlação de integrais de RMN de HSQC e por titulometria, as quais indicaram grau de oxidação de aproximadamente 50% dos álcoois primários. Não há relatos na literatura sobre a oxidação da botriosferana. Para a reação de sulfatação, a análise por TF-IV indicou a presença de bandas características de grupos sulfato. O espectro de RMN de HSQC e o teste turbidimétrico indicaram grau de sulfatação de 0,3 a 0,8 para as amostras de polissacarídeo, confirmando a sulfatação. A avaliação da atividade antiviral revelou que os compostos preparados são inativos contra o vírus da dengue (DENV-2). Nos testes contra o vírus do herpes simples os compostos oxidados apresentaram inatividade antiviral e em contrapartida, os compostos oxidados e sulfatados de botriosferana, miméticos ao heparan sulfato, apresentaram atividade positiva para HSV-1, notando-se a necessidade dos grupos sulfatos para a atividade anti-herpética.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -glucanas; Antivirais; Miméticos do heparan sulfato; Polissacarídeos oxidados.

## ABSTRACT

DEDUCH, Flávia. **Oxidized and sulfated derivatives of botryosphaeran with potential antiviral activity**. 2022. 78 p. Dissertation (Master's degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

Dengue and herpes simplex are among the viral diseases lacking a permanent pharmacological cure. The infection with these viruses can be inhibited by negatively charged polysaccharides, many of which come from seaweeds. In this sense, microbial exopolysaccharides stand out by presenting a remarkable potential in this application. Thus, this study chose to work with the derivatization of a fungal  $\beta$ -glucan, botryosphaeran, to obtain mimetics of heparan sulfate which is responsible for the entry of these enveloped viruses into human cells. The objective of this work was to synthesize oxidized and sulfated botryosphaeran derivatives to obtain potential antiviral compounds against dengue and herpes simplex. Therefore, syntheses comprising reduction, oxidation and sulfation reactions were carried out from native botryosphaeran. The reduction reaction was carried out to protect the glucan against possible interference from the reducing terminals in chemical modification reactions. As the polysaccharide has primary alcohols at the C-6 positions, the oxidation reaction was chosen using the TEMPO reagent to convert these groups into carboxylate groups. Then, the sulfation reaction was carried out with the sulfur trioxide-pyridine complex and 2 structural mimetic compounds of heparan sulfate were obtained. The oxidation reaction was confirmed by FT-IR through characteristic bands of carboxylate groups at  $1601\text{ cm}^{-1}$ , correlation of HSQC NMR integrals and by titration, which indicated an oxidation degree of approximately 50% of the primary alcohols. There are no reports in the literature on the oxidation of botryosphaeran. For the sulfation reaction, FT-IR analysis indicated the presence of bands characteristic of sulfate groups. The HSQC NMR spectrum and the turbidimetric test showed sulfation degree values of 0,3 to 0,8 for the polysaccharide samples, confirming sulfation. The evaluation of the antiviral activity revealed that the compounds thus prepared are inactive against the dengue virus (DENV-2). In tests against herpes simplex virus, oxidized compounds showed antiviral inactivity and, on the other hand, oxidized and sulfated botryosphaeran compounds mimetic to heparan sulfate showed positive activity for HSV-1, noting the need for sulfate groups for anti-herpetic.

**Key-words:**  $\beta$ -glucans; Antivirals; Mimetics of heparan sulfate; Oxidized polysaccharides.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação estrutural da sequência de dissacarídeos encontrados no heparan sulfato.....	17
<b>Figura 2</b> – Representação da interação entre o vírus herpes simples e o HS presente na célula hospedeira. ....	18
<b>Figura 3</b> – Representação da formação da ligação glicosídica. ....	19
<b>Figura 4</b> – Representação da estrutura química da BOT .....	22
<b>Figura 5</b> – Representação do ciclo catalítico que ocorre durante a reação de oxidação com reagente TEMPO. ....	24
<b>Figura 6</b> – Representação da estrutura de polissacarídeos aniônicos miméticos ao heparan sulfato com atividade antiviral. ....	26
<b>Figura 7</b> – Representação da estrutura da BOT derivatizada por reação de sulfatação em posições aleatórias. ....	27
<b>Figura 8</b> – Representação da estrutura BOT derivatizada por reação de carboximetilação seguida de sulfatação.....	27
<b>Figura 9</b> – Representação do planejamento estrutural com material de partida (BOT Nativa), intermediário (BOT oxidada) e composto alvo mimético ao heparan sulfato (BOT oxidada e sulfatada). ....	32
<b>Figura 10</b> –Representação da ordem em que foram realizadas as rotas sintéticas para obtenção dos compostos derivados da BOT miméticos ao HS.....	43
<b>Figura 11</b> –Espectro de infravermelho (região entre 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ) da amostra de BOT nativa. ....	46
<b>Figura 12</b> –Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz) da amostra de BOT nativa em $\text{D}_2\text{O}$ , com adição de acetona como padrão interno ( $\delta = 2,22$ ppm para $^1\text{H}$ ) ....	47
<b>Figura 13</b> –Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (DEPT 135) da amostra de BOT nativa em $\text{D}_2\text{O}$ , com padrão interno de acetona ( $\delta = 30,89$ ppm para $^{13}\text{C}$ ). ....	48
<b>Figura 14</b> –Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da amostra de BOT nativa (BARBOSA et al., 2003). ....	49
<b>Figura 15</b> –Representação da estrutura da BOT nativa, destacando os C-6 livres com setas vermelhas e os C-6 ligados a ramificações com setas azuis. ....	49
<b>Figura 16</b> –Representação da reação de oxidação da BOT (AB1O). A estrutura da BOT foi simplificada de modo a tornar mais concisa a ilustração das reações.....	50
<b>Figura 17</b> –Espectros de infravermelho (região entre 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ) das amostras da BOT nativa (verde) e oxidada (AB1O, azul). ....	51
<b>Figura 18</b> –Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da amostra de BOT oxidada (AB1O). ....	52
<b>Figura 19</b> –Representação da reação de sulfatação da BOT oxidada (produto: AB1OS). ....	52
<b>Figura 20</b> –Espectro de infravermelho (região entre 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ) das amostras da BOT nativa (verde), oxidada (AB1O, azul) e sulfatação - 1ª tentativa (AB1OS*, azul claro). ....	53
<b>Figura 21</b> –Espectro de infravermelho (região entre 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ) das amostras da BOT nativa (verde), oxidada (AB10, azul), sulfatação - 1ª tentativa (ABIOS*, azul claro) e sulfatada (AB1OS, vermelho). ....	54
<b>Figura 22</b> –Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da amostra de BOT nativa. ....	55

<b>Figura 23</b> –Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da amostra de BOT oxidada que sofreu o segundo ciclo de sulfatação (AB1OS).....	56
<b>Figura 24</b> –Representação da previsão regioquímica do produto da reação de sulfatação (AB1OS) da BOT oxidada (AB1O).....	57
<b>Figura 25</b> –Representação da reação de redução da BOT nativa. ....	58
<b>Figura 26</b> –Espectro de infravermelho (região entre $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) das amostras da BOT nativa (verde) e reduzida/oxidada (AB2RO, azul).....	59
<b>Figura 27</b> –Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da amostra da BOT reduzida (AB2R) que passou por reação de oxidação (AB2RO).....	60
<b>Figura 28</b> –Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da amostra de BOT reduzida (AB2R) que passou por reação de oxidação (AB2RO). ....	61
<b>Figura 29</b> –Espectro de infravermelho (região entre $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) das amostras da BOT nativa (verde), oxidada (AB2RO, azul) e que passou por sulfatação - 1ª tentativa (AB2ROS*, azul claro).....	62
<b>Figura 30</b> –Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da amostra de BOT reduzida e oxidada que sofreu o primeiro ciclo de sulfatação (AB2ROS*). ....	63
<b>Figura 31</b> – Espectros de infravermelho (região entre $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) das amostras da BOT nativa (verde), oxidada (AB2RO, azul) e sulfatada (AB2ROS, vermelho). ....	64
<b>Figura 32</b> –Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da amostra de BOT reduzida e oxidada que sofreu o segundo ciclo de sulfatação (AB2ROS).....	65
<b>Figura 33</b> –Índice de inibição da infectividade viral expresso em porcentagem para HSV-1.....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Índice de inibição da infectividade viral expresso em porcentagem para HSV-1.....	67
-----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EPS	Exopolissacarídeos
BOT	Botriosferana
DENV	Vírus da dengue
DMF	Dimetilformamida
DS	Grau de sulfatação
DO	Grau de oxidação
GAGs	Glicosaminoglicanos
HSV-1	Vírus Herpes Simples-1
HSV-2	Vírus Herpes Simples-1
HS	Heparan Sulfato
HSPGs	Proteoglicanos de HS
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
PAHO	Pan American Health Organization
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SI	Índice de seletividade
SPs	Polissacarídeos sulfatados
WHO	World Health Organization
t.a.	Temperatura ambiente
TCA	Ácido tricloroacético
TEMPO	<i>N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina</i>
UV-Vis	Ultravioleta Visível
$\delta$	Deslocamento químico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
1.1	HEPARAN SULFATO	16
1.2	POLISSACARÍDEOS	19
1.2.1	Exopolissacarídeos	20
1.2.1.1	Botriosferana	21
1.2.2	Polissacarídeo Modificado	23
1.2.2.1	Oxidação e sulfatação de polissacarídeos naturais	23
1.2.3	Caracterização de Polissacarídeos Modificados	27
1.3	DOENÇAS VIRAIS	28
1.3.1	Dengue	28
1.3.2	Herpes Simples	29
1.4	APRESENTAÇÃO DA PROPOSTA DE TRABALHO	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	34
3.1.1	Obtenção da BOT	34
3.1.2	Reação de Redução em Meio Heterogêneo (DE ARAÚJO et al., 2013)	34
3.1.3	Reação de Oxidação (COSENZA et al., 2015)	34
3.1.4	Reação De Sulfatação, Adaptado da Metodologia Descrita por DE ARAÚJO e Colaboradores (2013).	35
3.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO NATIVO, REDUZIDO, OXIDADO E SULFATADO	36
3.2.1	Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho	36
3.2.2	Espectroscopia Ultravioleta na Região do Visível	36
3.2.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	36
3.2.4	Metodologias de Quantificação da Funcionalização	37
3.2.4.1	Quantificação de grupos carboxila adaptado de (TATONGJAI; LUMDUBWONG, 2010).	37

3.2.4.2	Quantificação dos grupos sulfato .....	38
3.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO .....	40
3.3.1	Células .....	40
3.3.2	Vírus da Herpes.....	40
3.3.3	Vírus da Dengue.....	40
3.3.4	Ensaio de Citotoxicidade .....	41
3.3.5	Avaliação da Atividade Anti-HSV e Anti DENV .....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
4.1	APRESENTAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS .....	43
4.2	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA BOT .....	45
4.2.1	Caracterização da BOT Nativa por Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (BARBOSA et al., 2003; SYNYTSYA; NOVAK, 2014; VASCONCELOS et al., 2008) .....	45
4.2.2	Caracterização da BOT Nativa por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN-400 MHz) de 1H e 13C (1D) e HSQC (2D) ..	46
4.3	DERIVATIZAÇÃO DA BOT .....	50
4.3.1	Reação de Oxidação da BOT Nativa (AB1O) .....	50
4.3.1.1	Reação de sulfatação (AB1OS) da BOT oxidada (AB1O). .....	52
4.3.2	Reação de Redução em Meio Heterogêneo da BOT Nativa .....	57
4.3.2.1	Reação de oxidação da BOT submetida a redução (AB2R) .....	58
4.3.2.2	Reação de sulfatação (AB2ROS) da BOT oxidada (amostra AB2RO). .....	61
4.4	ATIVIDADE ANTIVIRAL .....	66
4.4.1	Ensaio Realizado para DENV-2 em Células Vero .....	66
4.4.2	Ensaio Realizado para HSV-1 Cepa KOS em Células Vero .....	66
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os agentes virais humanos são causadores de diversas patologias, dentre as quais, herpes e dengue. Para estas doenças não há um tratamento eficaz que extermine os respectivos vírus e nem vacina segura e eficiente (ALKHARSAH, 2018). As doenças causadas por vírus são as principais causas de morte em todo o mundo (JIANG *et al.*, 2016).

De acordo com a Pan American Health Organization (PAHO, 2020), no ano de 2019 foram relatados mais de 3 milhões de casos de dengue na Região das Américas, destacando-se historicamente por ser o maior registro de casos, sendo 30 por cento maior que os casos observados no período epidêmico do biênio 2015-2016. Dentre esses dados, 2.226.865 casos foram notificados no Brasil, denotando-se um aumento de 486,4% de casos prováveis (737,4/100.000 habitantes) em relação ao mesmo período de 2018. Em escala global, o apontamento é de 390 milhões de infecções por dengue ao ano. Registra-se um aumento de 30 vezes do número de casos nos últimos 50 anos (WHO, 2012).

Em se tratando do vírus da herpes simples, sabe-se que as infecções pelos dois sorotipos do vírus da herpes simples (HSV-1 e HSV-2) são consideradas uma das enfermidades humanas mais comuns. Cerca de 60% a 95% da população mundial está infectada por um desses vírus (JIANG *et al.*, 2016).

A importância em desenvolver agentes antivirais superiores é relevante devido ainda não existir soluções para os impasses existentes, como: toxicidade, eficiência e custo (HAO *et al.*, 2019).

Na busca de antivirais eficientes, notou-se que os polissacarídeos sulfatados naturais apresentam amplo espectro de inibição para vírus envelopados, com potencial de importância terapêutica devido à capacidade de imitarem moléculas encontradas nas membranas celulares, como os glicosaminoglicanos (GAGs) (PUJOL *et al.*, 2007).

Os GAGs são polissacarídeos lineares polidispersos que exibem muitos grupos aniônicos em suas cadeias e são identificados em todos os seres vivos, desde *Caenorhabditis elegans* até os seres humanos, localizados especificamente no conjunto de moléculas extracelulares denominado de proteoglicanos e nas membranas basais atuando como arcabouço estrutural (ZHANG; ZHANG; LINHARDT, 2010).

## 1.1 HEPARAN SULFATO

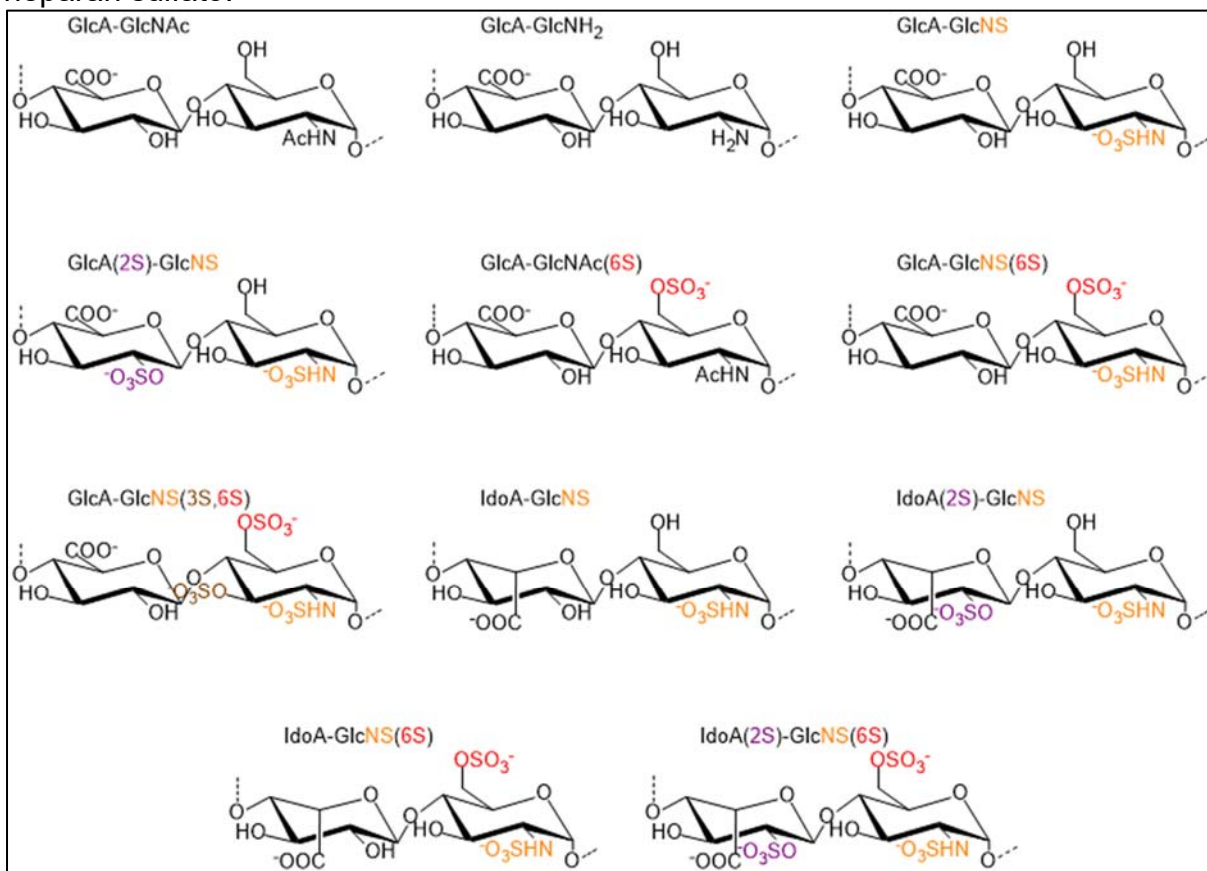
O heparan sulfato (HS), uma classe de GAGs (PUJOL *et al.*, 2007), é um polissacarídeo que apresenta grupos sulfato e carboxilato na sua estrutura (WANG *et al.*, 2021). A estrutura química do HS é formada por unidades contínuas de dissacarídeos constituídos por glucosamina (D-GlcN) e ácido urônico (D-GlcA) (LANGESLAY *et al.*, 2013; PONGENER *et al.*, 2021).

O HS apresenta microestrutura diversificada (MÜLLEN, 2015) (Figura 1), conforme descrição de Pongener e colaboradores (2021): a glucosamina (GlcN) pode apresentar-se como *N*-acetilada (D-GlcNAc) ou *N*-sulfatada (D-GlcNS), contendo ácido  $\beta$ -D-glucurônico (D-GlcA) ou seu epímero  $\alpha$ -L-idurônico (L-IdoA). As unidades glicosídicas podem ser substituídas de diferentes formas, como grupos O-sulfato no C6 (eventualmente no C3) de D-GlcN e em C2 de D-GlcA / L-IdoA.

O HS é sintetizado por grande parte de células do corpo (LANZI; CASSINELLI, 2018) e realiza consideráveis funções no sistema imunológico, como: mediação de sinais que são liberados por neutrófilos, interage auxiliando no extravasamento de quimiocinas e faz intermédio entre moléculas que são liberadas por neutrófilos e que são reativas (WANG *et al.*, 2021). Este GAG atua auxiliando na interatividade do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e como receptor de FGF para conter a proliferação celular (WANG *et al.*, 2021). As funções que o HS desempenha são coordenadas por suas cadeias laterais (grupos funcionais) (WANG *et al.*, 2021).

O polissacarídeo HS apresenta relevância em diversos processos fisiológicos e patológicos, uma vez que seus arcabouços estruturais são meios de acesso para a entrada de diversos vírus no meio celular (PUJOL *et al.*, 2007), como: vírus da hepatite C (HCV) (BARTH *et al.*, 2003), papilomavírus humano (HPV), (GIROGLOU *et al.*, 2001) vírus da imunodeficiência humana (HIV) (TYAGI *et al.*, 2001), vírus da dengue (DENV), vírus da herpes (HSV) (CAGNO *et al.*, 2019) e SARS-CoV-2 (MITRA *et al.*, 2021).

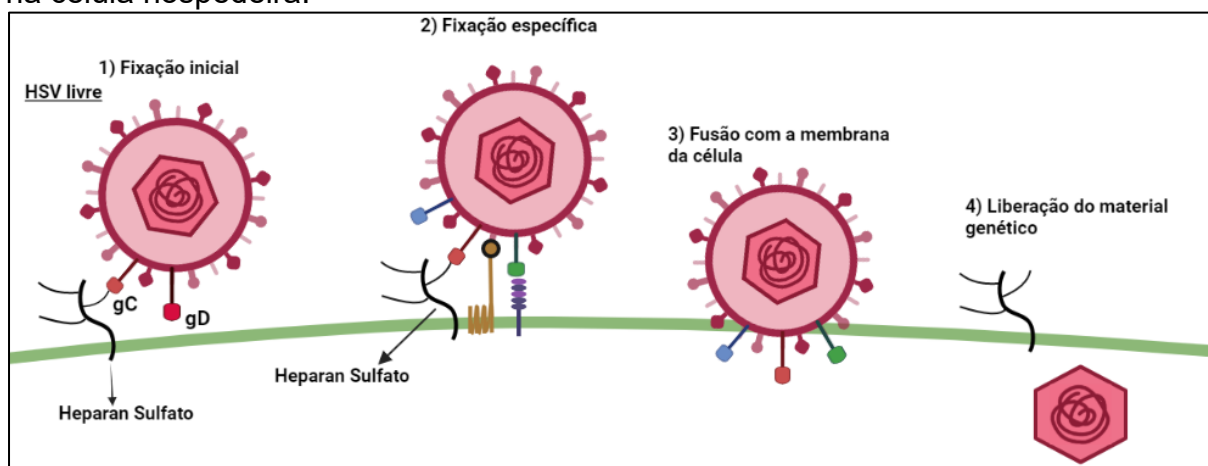
**Figura 1** – Representação estrutural da sequência de dissacarídeos encontrados no heparan sulfato.



Fonte: Modificado de Mullen (2015).

Conforme discutido por Trybala e colaboradores (2000), a possível interação entre o vírus da herpes simples e o HS é explicada pelas cargas negativas dos grupos presentes no HS, tais como carboxilatos e sulfatos, que interagem eletrostaticamente com as cargas positivas das glicoproteínas gC e gB constituintes do envelope viral (Figura 2). Já no vírus da dengue, o heparan sulfato interage com a glicoproteína E presente no envoltório do vírus (HILGARD; STOCKERT, 2000).

**Figura 2** – Representação da interação entre o vírus herpes simples e o HS presente na célula hospedeira.



**Fonte:** Modificado de Ceña-Díez e colaboradores (2016).

Segundo Arlov e colaboradores (2021), estudos com GAGs naturais apresentam algumas desvantagens como: isolados com baixa estabilidade química e rápida degradação em meio fisiológico, síntese limitada devido à complexidade, padrões de sulfatação diversificados devido a modificação pós-biossintética específica de algumas células e difícil purificação, além de poderem ocasionar reações imunológicas.

Conforme Wang e colaboradores (2021), os avanços em pesquisas sintéticas com oligossacarídeos de HS com estruturas homogêneas possibilitaram estudos de novas terapêuticas fundamentadas no heparan sulfato. Sendo assim, passou-se a desenvolver análogos e miméticos de HS (GAGs naturais) capazes de interagirem por ligações multivalentes com diversos alvos biológicos (ARLOV *et al.*, 2021).

Uma grande relevância dos estudos com polissacarídeos sulfatados (SPs) consiste na sua capacidade de inibição da entrada viral. Sabe-se que eles apresentam potencial de competição por pontos de interação das glicoproteínas virais que eventualmente seriam preenchidos por GAGs (PUJOL *et al.*, 2007).

Os SPs obtidos de algas marinhas destacam-se na literatura por apresentarem atividade antiviral para os vírus da dengue e herpes simples (FARIA - TISCHER *et al.*, 2006). No entanto, a obtenção de polissacarídeos de algas é um processo sujeito à sazonalidade (TALARICO *et al.*, 2004).

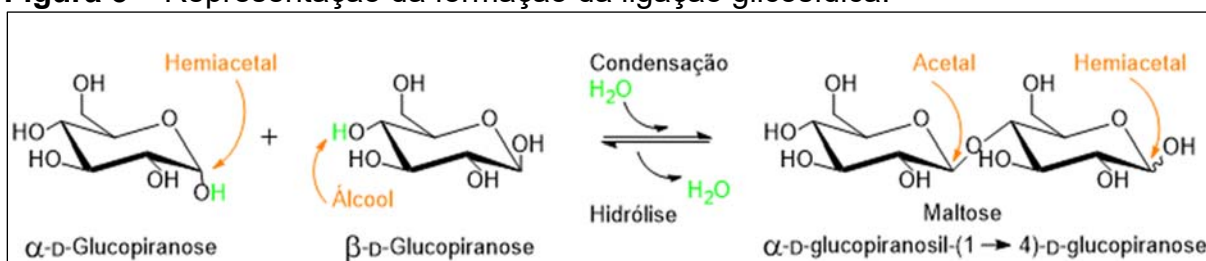
Dentre as diversas fontes de polissacarídeos existentes, as  $\beta$ -D-glucanas não celulósicas obtidas de fungos são muito estudadas. Como exemplo, a

botriosferana (BOT), um exopolissacarídeo cuja produção ocorre de forma simples através de fermentação usando meio nutriente de baixo custo (DEKKER *et al.*, 2019).

## 1.2 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos ou glicanos são polímeros de açúcar encontrados na natureza (NELSON; COX, 2014), formados por unidades repetidas de monossacarídeos (acima de 10), como: D-glucose, D-galactose, D-frutose, D-manose, D-xilose, L-galactose e L-arabinose, que são interligadas por ligações glicosídicas (KNIREL *et al.*, 2019), conforme apresentado na Figura 3.

**Figura 3** – Representação da formação da ligação glicosídica.



**Fonte:** Modificado de Müllen, (2015).

Os polissacarídeos apresentam ampla variedade em suas propriedades, funções e estruturas devido à diversidade de sequências monoméricas, tipos de ramificações e tipos de ligações glicosídicas (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

Os polissacarídeos apresentam bioatividades naturais que são estabelecidas pela estrutura físico-química (estrutura química: grupos funcionais e ligações químicas que tem papel de sustentação e interação com células e tecidos, já a estrutura física: compreende a viscosidade, taxa de cisalhamento e lubricidade), o que contribui para sua vasta gama de aplicações (LUO *et al.*, 2021).

Seu emprego apresenta biocompatibilidade, não toxicidade quando equiparados a proteínas e outros polímeros exógenos, e geralmente são biodegradáveis (LUO *et al.*, 2021). Apresentam atividades biológicas como: antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral, antiviral, além de prevenir doenças coronárias (SUN *et al.*, 2020) e apresentar efeitos imunorregulatórios (LI *et al.*, 2021).

Os polissacarídeos classificam-se como uma das quatro macromoléculas de importância nos sistemas vivos, juntamente com as proteínas,

polinucleotídeos e lipídeos. Participam de várias funções fisiológicas e podem ser obtidos de plantas, fungos, bactérias, animais e algas marinhas (ULLAH *et al.*, 2019).

Grande parte dos polissacarídeos usados em escala industrial na produção de alimentos, fármacos e cosméticos são obtidos de fontes vegetais como: amido, goma arábica, goma guar ou são obtidos de algas marinhas como: carragenana, alginato e ágar (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Porém, os exopolissacarídeos (EPS) obtidos de microrganismos constituem um mercado promissor, em razão de apresentarem razoável solubilidade em água com propriedades físicas e químicas apropriadas e produção voltada para química verde (BARCELOS *et al.*, 2020).

### 1.2.1 Exopolissacarídeos

Exopolissacarídeos são “biomacromoléculas de carboidratos exocelulares secretadas por espécies microbianas (bactérias, fungos e microalgas) no meio de cultura (caldo de fermentação) quando são cultivadas em condições de fermentação submersa” (DEKKER *et al.*, 2019. p. 434).

Os exopolissacarídeos que são incorporados à parte externa da parede celular são classificados como capsulares, e os que são fabricados como limos soltos em grande volume fora da parede celular e sem impedimento para o ambiente extracelular são classificados como biofilmes (DEKKER *et al.*, 2019).

Nas últimas décadas exopolissacarídeos microbianos vêm se destacando por apresentarem notável inovação na bioaplicabilidade (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). São considerados uma fonte alternativa de polissacarídeos obtidos de plantas ou algas marinhas, pois sua produção ocorre em um intervalo de tempo menor, mesmo em grandes quantidades (OSEMWEIGIE *et al.*, 2020). Não necessitam de tecnologia complexa para sua extração, além de serem multifuncionais, estarem prontamente à disposição e consistirem em recursos bioenergéticos de grande valia (OSEMWEIGIE *et al.*, 2020), livres de pragas e doenças (CHEN; HUANG, 2018).

Osemwegie e colaboradores (2020) destacam alguns exopolissacarídeos obtidos de fungos que são estudados, como: botriosferana (*Botryosphaeria sp*), pululana (*Aureobasidium pullulans*), esquizofila (*Comuna de schizophyllum*), galactosaminoglucana (*Aspergillus fumigatus*), quitina e quitosana

(*Candida albicans*, *Zygosaccharomyces rouxii*, fungos filamentosos) e pleurana (*Pleurotus ostreatus*).

Existem diversos estudos sobre a aplicabilidade de exopolissacarídeos fúngicos sobre diversas áreas, como: na indústria de alimentos, cosméticos, laticínios e têxtil; na área da saúde para produzir produtos farmacêuticos e medicamentos; no meio ambiente para aplicação de flocculantes e remediação; e na agricultura como microbicidas, bioerbicidas e conservantes (OSEMWEGIE *et al.*, 2020).

Hyde e colaboradores (2019) apontam os polissacarídeos obtidos de fungos e seus produtos como estratégias contra doenças humanas que podem ser usados como: antibióticos antibacterianos, antimicóticos e fungicidas, inibidores de biofilme, agentes anticâncer, antidiabético, melhorar o funcionamento do sistema nervoso, controle de doenças cardiovasculares por fungos, agentes antivirais, agentes imunossupressores e imunomoduladores.

Leung e colaboradores (2009) observaram em estudos o potencial de EPS produzido em cultura líquida micelial pelo fungo *Cordyceps sinensis*, constatando-se que o exopolissacarídeo possui atividade antioxidante equivalente ao Trolox. Concluíram que biopolímeros de fermentação micelial apresentam-se como uma fonte de antioxidantes naturais com valor potencial para alimentos saudáveis e terapêuticos.

Em estudos de Li e colaboradores (2020) foi verificado que o EPS produzido por *Cordyceps sinensis*, um tipo de fungo medicinal, apresentou atividade anti-inflamatória e antisséptica. Já ZHANG e colaboradores (2018) identificaram que EPS de fungos do tipo *Auricularia auricula-judae* apresentam potencial imunomodulador.

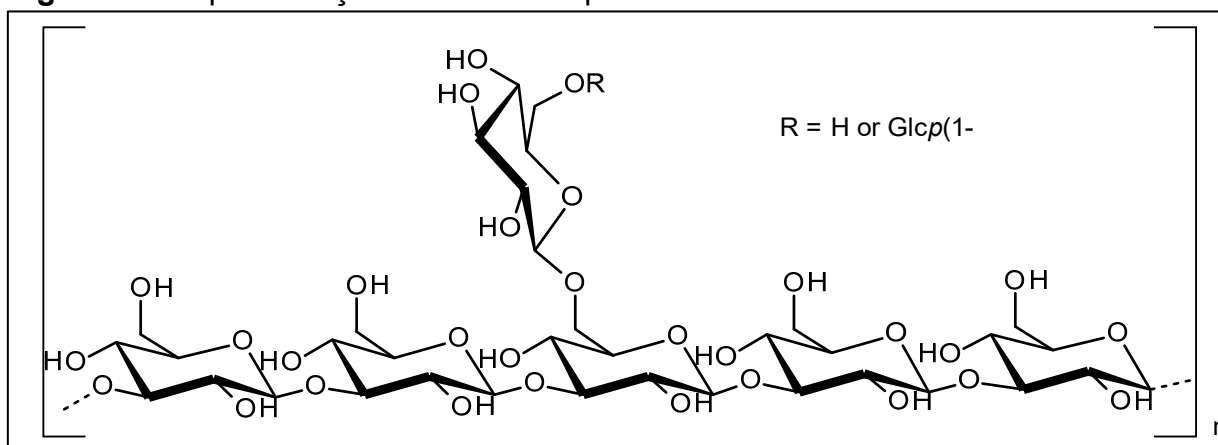
Exopolissacarídeos obtidos do fungo *Aspergillus terreus* foram avaliados como potenciais moduladores de determinadas funções de macrófagos, observando que esse fungo já é usado na indústria farmacêutica na produção de lovastatina e outros metabólitos secundários (COSTA *et al.*, 2019).

#### 1.2.1.1 Botriosferana

A BOT (botriosferana) é um exopolissacarídeo microbiano produzido pelo fungo *Botryosphaeria sp.* Sua estrutura é caracterizada como uma  $\beta$ -glucana por

apresentar monômeros de D-glucose interligados por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) no esqueleto principal e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) nas ramificações laterais. As ramificações são formadas de glucose ou gentiobiose e dispostas sobre o esqueleto principal a cada 5 ou 6 unidades de glucose na posição 6 (BARBOSA *et al.*, 2003) conforme a Figura 4.

**Figura 4** – Representação da estrutura química da BOT.



Fonte: A autora (2021).

Mendes e colaboradores (2009) verificaram que a BOT apresenta ação anticoagulante. Pesquisas recentes vêm mostrando que esse polissacarídeo apresenta efeitos antimutagênicos e antiaterogênicos *in vivo* (SILVA-SENA *et al.*, 2018), melhora distúrbios funcionais na obesidade e na síndrome metabólica após ser ingerido (SILVA *et al.*, 2018), além de reduzir o desenvolvimento de tumor em pesquisas com ratos (GERALDELLI *et al.*, 2020), podendo ser um agente terapêutico promissor (SILVA-SENA *et al.*, 2018).

A BOT não apresenta grupos sulfato conforme sua caracterização realizada por Barbosa e colaboradores (2003), porém, através da modificação molecular por sulfatação, sua ação antiviral é otimizada, passando a apresentar alto índice de seletividade (SI) com potencial para tornar-se um fármaco antiviral (SACCHELLI *et al.*, 2019). Adicionalmente, os polissacarídeos, quando modificados, passam a apresentar diferentes propriedades físico-químicas (DEKKER *et al.*, 2019).

Em estudos, Sacchelli e colaboradores (2019) demonstraram a atividade antiviral da BOT, no qual os polissacarídeos derivados sulfatados apresentaram forte atividade antiviral para a dengue e para a herpes simples, apresentando valores de IC<sub>50</sub> para HSV entre 0,2 e 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Esta faixa corresponde

aos valores de IC<sub>50</sub> de polissacarídeos sulfatados com propriedades anti-herpéticas obtidos de fonte natural.

### 1.2.2 Polissacarídeo Modificado

A possibilidade de modificar o polissacarídeo permite aprimorar o peso molecular, estrutura, forma de ligação e caráter iônico. E quando esses parâmetros são modificados, novas propriedades físico-químicas e funcionais são obtidas, melhorando as propriedades químicas e biológicas dos polissacarídeos (AHMAD, 2021). A derivatização de  $\beta$ -glucanas é um meio de se obter funções diferentes e ampliar o espectro de aplicações na área química, médica e farmacêutica (DEKKER et al., 2019).

Polissacarídeos podem ser modificados quimicamente, inserindo grupos funcionais específicos (bioativos) para modificar a solubilidade, modificar reações celulares, inserir fármacos no organismo de forma controlada, dentre outras funções almejavéis (LUO et al., 2021).

As modificações químicas podem ser através de reações que incluem: carboximetilação, fosforilação, sulfonação, acetilação (KAGIMURA et al., 2014) e oxidação (BEDINI; LAEZZA; IADONISI, 2016). Os polissacarídeos podem apresentar grupos funcionais em sua estrutura, como amino (-NH<sub>2</sub>), carboxila (-COOH) e hidroxila (-OH) que podem facilitar a reação química de derivatização (SUN et al., 2020).

#### 1.2.2.1 Oxidação e sulfatação de polissacarídeos naturais

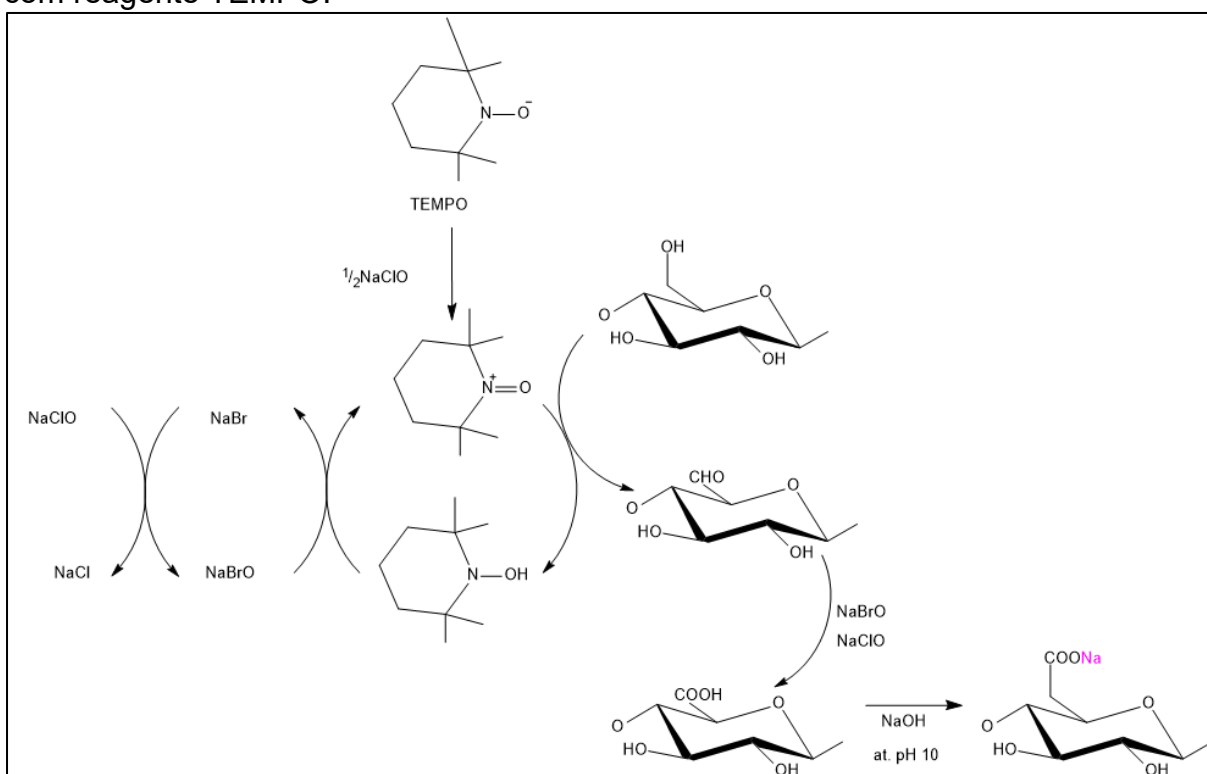
Os polissacarídeos podem ser modificados estruturalmente através da reação de oxidação, que pode ocorrer de várias formas, como em oxidações em hidroxilas primárias que geram polissacarídeos com ácido urônicos. São empregados na oxidação de álcoois primários métodos químicos e enzimáticos. A clivagem oxidativa de 1,2-dióis é uma opção para oxidação de C-2 e C-3, por exemplo em xilose, celulose ou amilose, causando a abertura do anel e formando compostos dicarbonilados (CUMPSTEY, 2013).

A reação de oxidação que emprega o reagente TEMPO, juntamente com o co-oxidante NaClO e NaBr, é uma metodologia de oxidação regioseletiva de álcoois primários presentes em polissacarídeos neutros. Esse sistema apresenta

vantagens como: reações com alto nível de oxidação, elevado rendimento e também seletividade para hidroxilas primárias (TAVERNIER et al., 2008).

O reagente TEMPO é um radical nitroxil estável solúvel em água, e tem o papel de catalizador, enquanto que o NaClO atua regenerando o TEMPO, (COSENZA *et al.*, 2015); (BRAGD; VAN BEKKUM; BESEMER, 2004) conforme esquema da figura 5.

**Figura 5** – Representação do ciclo catalítico que ocorre durante a reação de oxidação com reagente TEMPO.



**Fonte:** Esquema do ciclo catalítico parcialmente modificado de Isogai e colaboradores (2018).

No sistema do esquema apresentado na figura 5, observa-se a formação do íon oxomônio, pela ação do NaClO (oxidante primário) que oxida o TEMPO. O íon oxomônio oxida o álcool primário (do polissacarídeo) em aldeído. O NaBrO formado pela oxidação do NaClO com NaBr oxida o TEMPO. A oxidação do aldeído obtido ocorre então pelo NaClO, formando o ácido carboxílico. Observa-se que no decorrer da reação de oxidação, o NaClO é consumido e o TEMPO e o NaBr são usados como catalizadores (ISOGAI, 2022).

Diversos polissacarídeos já foram oxidados com reagente TEMPO com resultados satisfatórios, como: amilopectina, amilodextrina, amido, amilose,

dextrano, pululano, inulina, quitina, quitosana e celulose. Os valores de grau de oxidação (DO) obtidos em reações de oxidação usando reagente TEMPO costumam ser próximos de 1,0, significado de conversão total (CUMPSTEY, 2013).

A reação de sulfatação também é um método de modificação de polissacarídeos. As modificações ocorrem em função das características existentes nos polissacarídeos. Como polissacarídeos apresentam em sua estrutura átomos de oxigênio, provenientes de grupos hidroxila, que agem como nucleófilos, os polissacarídeos, então, realizam ataque nucleofílico (SIMSEK *et al.*, 2021).

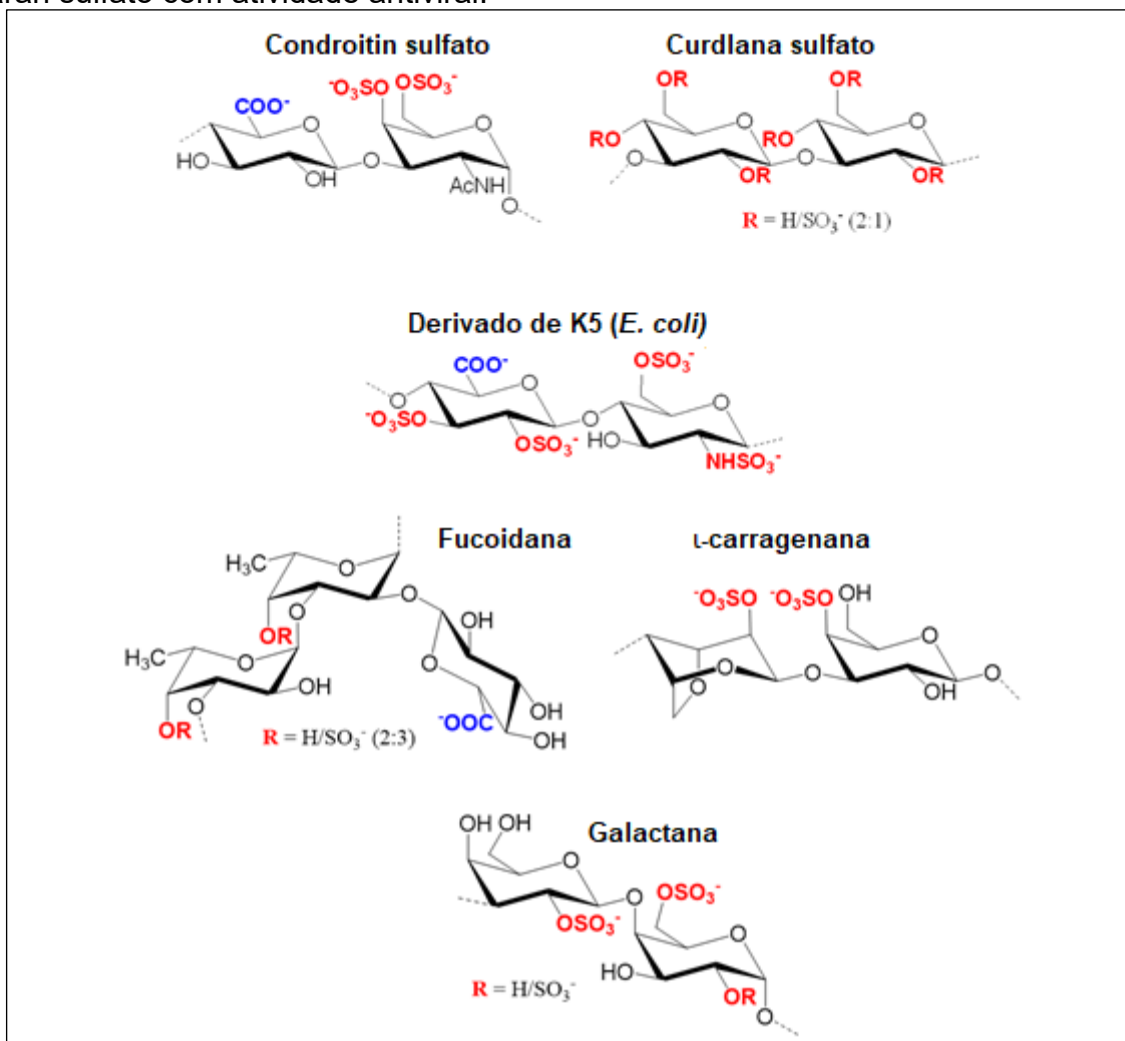
A síntese de sulfatação ocorre através da substituição por grupos sulfato em grupos existentes no polissacarídeo, como: grupos hidroxilas, carboxila ou amino terminais. Os principais métodos empregados para a sulfatação são: método DMF, método (CSA)-piridina, método SO<sub>3</sub>-piridina, líquidos iônicos-CSA-piridina e método (ASA)-piridina (LI *et al.*, 2016).

Os polissacarídeos sulfatados projetados (ESPs) (não identificados na natureza), são polissacarídeos que não possuíam grupos sulfato anteriormente em sua estrutura. Os ESPs, quando comparados com os polissacarídeos sulfatados naturais, na sua grande maioria, têm suas propriedades inovadas ou melhoradas, como as interações biológicas. Os polissacarídeos já constituídos de grupos sulfato também podem ter suas interações biológicas aperfeiçoadas, como por dessulfatação, alteração da estrutura para aperfeiçoamento ou reparo das propriedades e sulfatação regioseletiva (ARLOV *et al.*, 2021)

Os polissacarídeos derivatizados por sulfatação comumente apresentam atividade antimicrobiana, anticoagulante e antioxidante. (DEKKER *et al.*, 2019). Os polissacarídeos sulfatados naturais e ou modificados estruturalmente pertencem à categoria mais estudada de polissacarídeos com atividades antivirais (CHEN; HUANG, 2018).

Diversos polissacarídeos aniônicos miméticos ao heparan sulfato com potencial de inibição para a dengue foram relatados na literatura (Figura 6) como: condroitin sulfato com EC<sub>50</sub> (DENV1-4) de 0,3 µg mL<sup>-1</sup>, polissacarídeo sulfatado K5 com EC<sub>50</sub> (DENV-2) de 0,11 µg mL<sup>-1</sup>, curdlana sulfato com EC<sub>50</sub> (DENV-2) de 7 µg mL<sup>-1</sup>, fucoidana com IC<sub>50</sub> (DENV-2) de 4,7 µg mL<sup>-1</sup>, galactana com IC<sub>50</sub> (DENV-2) de 4,7 µg mL<sup>-1</sup> (DE LA GUARDIA; LLEONART, 2014) e carragenana com EC<sub>50</sub> (DENV-2,3) de 0,4-1,0 µg mL<sup>-1</sup> (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

**Figura 6** – Representação da estrutura de polissacarídeos aniônicos miméticos ao heparan sulfato com atividade antiviral.



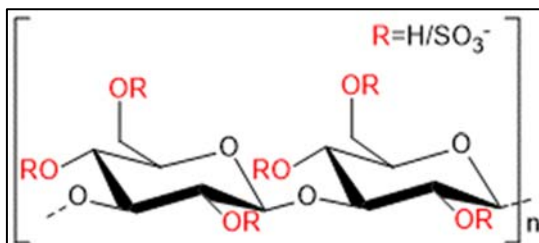
Fonte: ORSATO, 2021.

Mercorelli e colaboradores (2010) sintetizaram polissacarídeos quimicamente sulfatados de *Escherichia coli* (derivados K5, sulfatados em posições específicas) com atividade antiviral para citomegalovírus humano (HCMV) com EC<sub>50</sub> de 76,9 e 12,7 nM, sem efeito tóxico e com índice de seletividade favorável para os compostos testados. No mesmo trabalho a heparina inibiu a replicação do HCMV com EC<sub>50</sub> de 28,1 nM. Os derivados K5 apresentam estrutura central igual aos seus precursores biossintéticos heparan sulfato e heparina (MERCORELLI *et al.*, 2010).

Em estudos, Sacchelli e colaboradores (2019) (que fazem parte do grupo de pesquisa do presente trabalho) demonstraram a atividade antiviral da BOT, no qual amostras do polissacarídeo, após serem sulfatados em posições aleatórias (figura 7), passaram a apresentar forte atividade antiviral para o DENV-3 com IC<sub>50</sub> de 66,5-78,5 µg mL<sup>-1</sup> e para HSV-1 com IC<sub>50</sub> de 2,4-7,3 µg mL<sup>-1</sup>. Recorda-se que

polissacarídeos sulfatados oriundos de fontes naturais, que exercem inibição para herpes, costumam apresentar valores de IC<sub>50</sub> na faixa obtida.

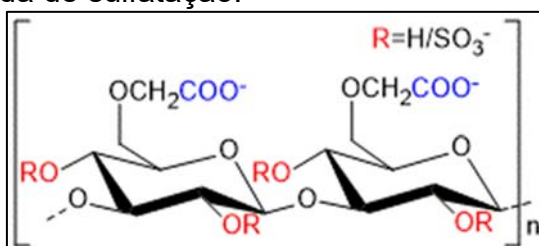
**Figura 7** – Representação da estrutura da BOT derivatizada por reação de sulfatação em posições aleatórias.



Fonte: SACCHELLI et al., 2019.

Lopes e colaboradores (2021) (que fazem parte do grupo de pesquisa do presente trabalho) sintetizaram o polissacarídeo botriosferana por reação de carboximetilação em posições específicas, seguida de sulfatação. Obteve-se compostos (Figura 8) com atividade antiviral para HSV-1 com IC<sub>50</sub> de 12,4-56,0 µg mL<sup>-1</sup> e DS variando de 0,1-0,4 e atividade antiviral para DENV-2 com IC<sub>50</sub> de 64 µg mL<sup>-1</sup> e DS de 0,2. Os derivados obtidos não apresentaram citotoxicidade em células Vero (100 µg mL<sup>-1</sup>).

**Figura 8** – Representação da estrutura da BOT derivatizada por reação de carboximetilação seguida de sulfatação.



Fonte: LOPES et al., 2021.

### 1.2.3 Caracterização de Polissacarídeos Modificados

A caracterização estrutural de glucanas pode ser realizada por métodos espectroscópicos, como RMN e TF-IV. Na técnica de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, cada tipo de polissacarídeo apresenta um espectro específico e na análise por infravermelho é possível identificar características estruturais específicas, como por

exemplo: grupos funcionais, como sinais característicos de carboxilas, e ligações glicosídicas (CORRADI DA SILVA *et al.*, 2006).

Conforme Synytsya e Novak (2014) a espectroscopia por infravermelho é uma ferramenta importante na caracterização estrutural de polissacarídeos, devido ao método apresentar sensibilidade à posição e configuração anomérica das ligações glicosídicas em glucanas.

A caracterização estrutural de polissacarídeos possui duas regiões importantes no espectro de infravermelho, sendo: a região característica de açúcar que apresenta bandas entre  $(1200-950) \text{ cm}^{-1}$  e a região anomérica com bandas entre  $(950-750) \text{ cm}^{-1}$  (SYNYTSYA; NOVAK, 2014).

De acordo com Corradi da Silva e colaboradores (2006) a ressonância magnética nuclear (RMN) vem sendo empregada com êxito na caracterização estrutural. Esta técnica baseia-se na capacidade de núcleos magnéticos (ex:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) absorverem energia em determinadas frequências, quando expostos a um campo magnético forte. Pois, a frequência de ressonância (expressa como deslocamento químico,  $\delta$ ) do núcleo específico, apresenta sensibilidade ao ambiente químico da molécula ao qual foi exposto (CORRADI DA SILVA *et al.*, 2006).

A comprovação da modificação estrutural do polissacarídeo por sulfatação geralmente é determinada por espectroscopia de RMN, determinação do grau de substituição dos grupos hidroxila (DS) (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013), que é a forma de medir a eficácia da modificação do polissacarídeo (SIMSEK *et al.*, 2021); e através da técnica de Infravermelho (CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019), que proporciona informações qualitativas sobre os picos de absorção das ligações características de S=O em torno de  $1300-1000 \text{ cm}^{-1}$  e ligações características de C-O-S em torno de  $900-800 \text{ cm}^{-1}$  (ARLOV *et al.*, 2021).

### 1.3 DOENÇAS VIRAIS

#### 1.3.1 Dengue

O agente etiológico da dengue é um arbovírus da família Flaviviridae e gênero Flavivirus. A transmissão da dengue ocorre quando o ser humano é picado pela fêmea do mosquito *Aedes aegypti* (BRASIL, 2010), seu principal vetor, porém,

outras espécies de *Aedes* também são capazes de transmitir a dengue em diferentes estados de gravidade (CHAKRABORTY, 2008).

Existem cinco sorotipos do vírus da dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e DENV-5. Dentre os quais, o DENV-5 é responsável pela doença com gravidade leve (NORMILE, 2013), já os demais sorotipos são considerados de gravidade leve mas podem evoluir para gravidade severa da doença (CRUZ, 2021). O anticorpo que uma pessoa adquire para o vírus após a infecção de um determinado sorotipo não concede imunidade diante dos demais sorotipos, elevando a probabilidade de reinfecção da doença com gravidade elevada a partir de um sorotipo de vírus diferente (NORMILE, 2013).

Devido à urbanização os números de casos de dengue vêm crescendo cada vez mais na medida em que o mosquito usa como criadouro qualquer ambiente que acumule água parada, como por exemplo, pneus e calhas (NORMILE, 2013).

A dengue ainda não tem cura farmacológica e os sintomas são tratados com soro, analgésicos e antipiréticos, conforme a gravidade do paciente. Sendo assim, as principais ações usadas para combater o vetor *Aedes aegypti* implicam em: “inspeções domiciliares, eliminação e tratamento de criadouros, associadas a atividades de educação em saúde e mobilização social” (BRASIL, 2010).

A infecção por dengue pode vir ou não sucedida de sintomas, os quais podem ser casos médicos com estados graves ou não. Os sintomas aparecem após o período de incubação, que dura em média de 4 a 10 dias, passando pela fase febril, fase crítica e pela fase de recuperação (OPAS, 2021).

### 1.3.2 Herpes Simples

Os vírus HSV-1 e HSV-2 pertencem à subfamília alfa-herpesvírus da família herpesviridae, e podem permanecer em estado latente dentro de neurônios (MADAVARAJU *et al.*, 2021). Todos os herpes vírus humanos infectam apenas o ser humano na natureza, ou seja, a propagação se dá de um indivíduo para outro (STRAUSS; STRAUSS, 2002).

O HSV-1 e HSV-2 são responsáveis por lesões recorrentes, o HSV-1 está relacionado a lesões orofaciais mas pode causar herpes genital e o tipo HSV-2

ocorre principalmente como lesões genitais, no entanto, também pode ocasionar herpes orolabial.

Essas infecções por HSV são obtidas através do contato direto com áreas que propagam o vírus e também através de fluídos mucocutâneos com vírus (AGELIDIS; SHUKLA, 2015). Grande parte dos casos de HSV-2 ocorre por transmissão sexual e o fator responsável por essa infecção é a eliminação viral que ocorre de forma assintomática. O HSV-2 também pode atuar como cofator para a contaminação por HIV (AZWA; BARTON, 2009).

Os herpes vírus são vírus de DNA envelopados que apresentam glicoproteínas que ajudam na adesão e entrada viral. Desta forma, os vírus HSV invadem as células hospedeiras através da fusão de seus envelopes com a membrana plasmática da célula hospedeira e, assim, o nucleocapsídeo e o tegumento invadem o citoplasma (AGELIDIS; SHUKLA, 2015).

A herpes ainda não tem cura e os medicamentos existentes são usados para tratar e prevenir os sintomas. Devido à resistência aos antivirais existentes, como exemplo o aciclovir, se faz necessária a busca por terapias novas e eficazes (GARBER; BARNARD; PICKRELL, 2021).

#### 1.4 APRESENTAÇÃO DA PROPOSTA DE TRABALHO

O potencial antiviral da botriosferana e seus derivados aniônicos contra DENV-2,3 e HSV-1 já foi observado em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, os quais foram realizados por Sacchelli e colaboradores (2019) e Lopes e colaboradores (2021). Esses resultados prévios deram respaldo para a continuação dos estudos sobre a modificação do polissacarídeo BOT para potencializar sua atividade antiviral. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo dar sequência na otimização da atividade antiviral da BOT tornando-a mimética ao heparan sulfato, a partir da introdução de grupos aniônicos, como carboxilatos e sulfatos, em sua estrutura.

A diferença entre o presente estudo e estudos anteriores do grupo de pesquisa está na obtenção de derivados diferentes da BOT. Sacchelli e colaboradores (2019) realizaram reações de sulfatação aleatória na BOT, para a obtenção de derivados sulfatados com diversos graus de sulfatação. Lopes e colaboradores (2021)

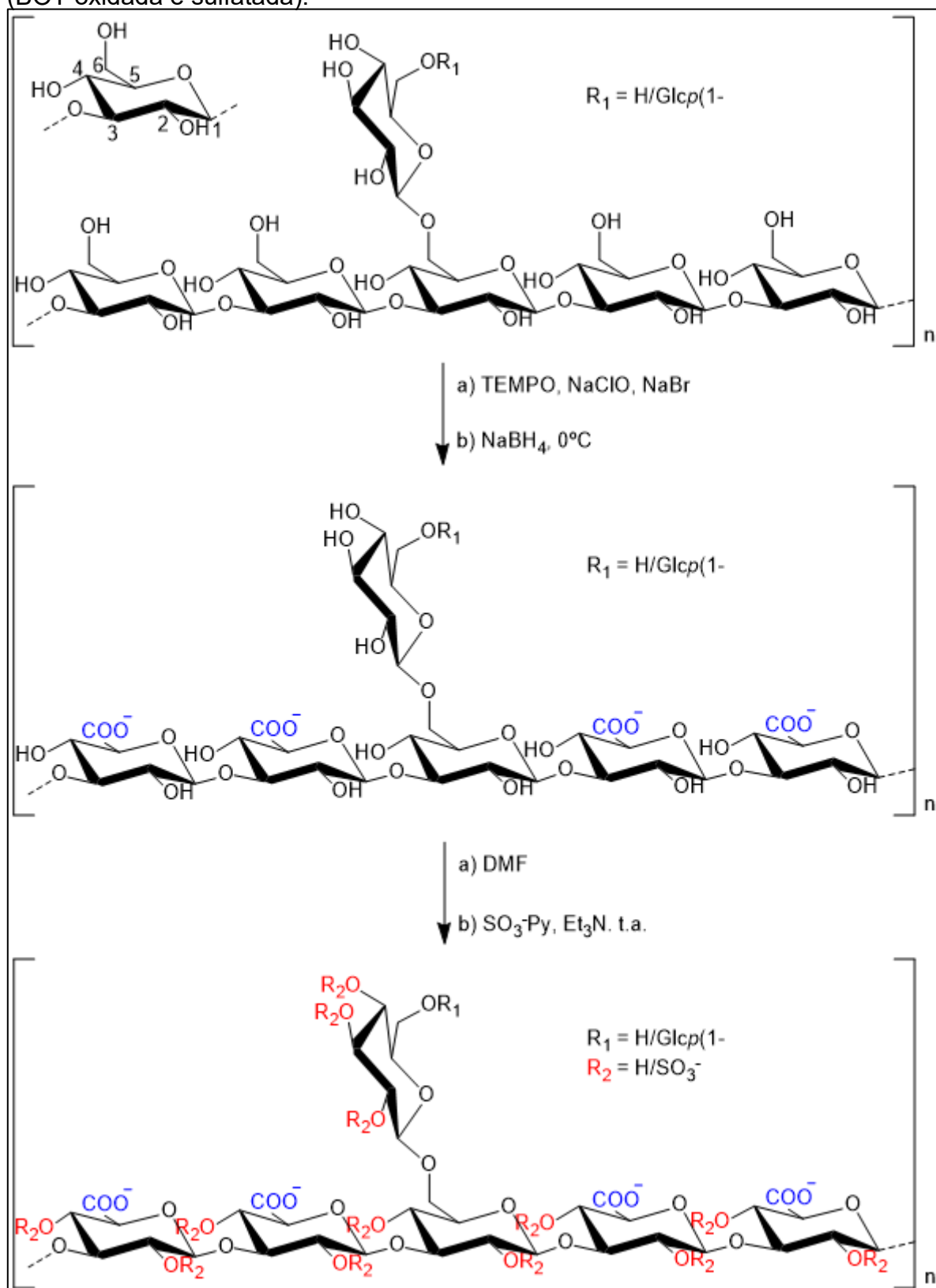
modificaram a hidroxila ligada ao C-6 por reações de carboximetilação com introdução de grupos carboximetila (-CH<sub>2</sub>COOH) em álcoois primários. Em sequência, realizaram reações de sulfatação, para a obtenção de derivados carboximetilados e sulfatados da BOT. No estudo aqui descrito, modificou-se quimicamente o C-6 das unidades de glucose da BOT por reação de oxidação, para obter-se ácidos glucurônicos. Posteriormente, os derivados oxidados nas posições C-6 foram submetidos à reação de sulfatação, no intuito de tornar os produtos de reação análogos estruturais do heparan sulfato.

Pela reação de sulfatação ocorre a adição do grupo sulfonato ao radical glicosil do polissacarídeo, com possível alteração da sua atividade biológica (CHEN; HUANG, 2018). Os grupos sulfato inseridos no polissacarídeo apresentam carga negativa em extensa faixa de pH (4 a 12), e isso permite que eles se liguem eletrostaticamente a biomoléculas com cargas positivas (CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019).

Glucanas podem ser oxidadas a ácidos carboxílicos por meio da conversão de álcoois primários em carboxilas. Esta oxidação resulta em derivados que dispõem de ácidos urônicos, os quais imitam o esqueleto estrutural de ácidos poliurônicos naturais (CUMPSTEY, 2013). Os ácidos urônicos são encontrados na forma ionizada em pH fisiológico (BHAGAVAN, 2002) e fazem parte da estrutura do HS (PONGENER *et al.*, 2021).

A figura 9 a seguir apresenta o planejamento estrutural da proposta de trabalho do presente estudo.

**Figura 9** – Representação do planejamento estrutural com material de partida (BOT nativa), intermediário (BOT oxidada) e composto alvo mimético ao heparan sulfato (BOT oxidada e sulfatada).



Fonte: A autora (2021).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter derivados aniônicos sulfatados e oxidados de botriosferana, miméticos do heparan sulfato, com atividade antiviral para dengue e herpes.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar miméticos do heparan sulfato a partir da BOT empregando reações de oxidação e sulfatação.
- Caracterizar a estrutura química dos compostos obtidos por técnicas espectroscópicas.
- Avaliar o potencial antiviral dos compostos obtidos frente aos vírus da dengue e da herpes simples.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1.1 Obtenção da BOT

As amostras de BOT nativa usadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aneli de Mello Barbosa Dekker, atualmente proprietária da startup *Beta-Glucan Produtos Farmoquímicos Eireli* (Londrina-PR).

As amostras fornecidas apresentavam mais de 95% de pureza e encontravam-se no estado sólido (liofilizadas).

Foram seguidas duas rotas sintéticas para obtenção de dois produtos, produto 1: oxidado e sulfatado; e produto 2: reduzido, oxidado e sulfatado. Observa-se que houve uma primeira tentativa de sulfatação para cada amostra (AB1O e AB2RO) que ao serem caracterizadas não foram constatados grupos sulfato, devido a isso, estas tentativas de reação de sulfatação não foram consideradas para a descrição dos resultados a seguir.

#### 3.1.2 Reação de Redução em Meio Heterogêneo (DE ARAÚJO *et al.*, 2013)

Em um balão de fundo redondo de 250 mL, foram adicionados 350,3 mg de amostra BOT, 70 mL de água deionizada e 53 mg de NaBH<sub>4</sub> e então mantidos em agitação magnética à t.a. por 24 h. Após 24 h foi adicionado 0,35 mL de ácido acético glacial, mantendo-se a agitação por 10 minutos (DE ARAÚJO *et al.*, 2013). A amostra foi dialisada contra água deionizada sob agitação magnética por 7 dias. Seu volume foi reduzido em rotaevaporador, sendo então liofilizada.

#### 3.1.3 Reação de Oxidação (COSENZA *et al.*, 2015)

Primeiramente foi preparada a solução oxidante e em um béquer de 250 mL foram adicionados 5,17 mL de água deionizada e 5,17 mL de NaClO 0,338 M. Foi então ajustado o pH para 10 com HCl 1 M e a solução foi reservada.

Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 217 mg de amostra BOT, 77,5 mL de água deionizada e mantidos sob agitação magnética. Em seguida, foram adicionados 8,3 mg de TEMPO (0,039 equivalente por unidade glicosídica) e 103,4 mg de NaBr, e o pH ajustado para 10 com NaOH 0,1 M. A solução

oxidante previamente preparada foi adicionada em um funil de separação de 60 mL e gotejada por aproximadamente 18 min sobre a solução de BOT. Então, o balão foi colocado em banho de gelo e mantido em agitação magnética por 4 h. Após o tempo decorrido, foram adicionados 517 mg de  $\text{NaBH}_4$  mantendo-se as condições reacionais citadas por mais 2 horas. A amostra foi dialisada em água corrente durante a noite, e depois colocada em diálise contra água deionizada e sob agitação magnética por 2 dias. Por fim, foi liofilizada.

Para se obter a amostra AB2RO, a reação de oxidação foi realizada igualmente como descrita para a obtenção da amostra AB1O, mantendo-se as mesmas proporções usadas no procedimento acima.

#### 3.1.4 Reação de Sulfatação, Adaptado da Metodologia Descrita por DE ARAÚJO e Colaboradores (2013).

Em um balão de fundo redondo com atmosfera inerte, 73 mg de amostra AB1O foram solubilizados em 37 mL de DMF (dimetilformamida) e na sequência adicionado 1,2065 g de complexo  $\text{SO}_3\text{-Py}$  (0,038 equivalente de  $\text{SO}_3\text{-Py}$  por unidade glicosídica) e 0,16 mL de trietilamina e, então, deixado em agitação magnética a temperatura ambiente por 7 horas sob atmosfera inerte. Após o tempo decorrido, a mistura foi neutralizada com a adição de bicarbonato de sódio saturado. Na sequência, foram adicionados 24 mL de tampão fosfato 0,025 mol/L (pH 7). A amostra foi dialisada contra solução de NaCl 1 M por 24 h, decorrido o tempo, então, foi colocada em diálise de água deionizada sob agitação magnética por 96 horas. Por fim, a amostra foi evaporada e dialisada.

Para se obter a amostra AB2ROS, a reação de sulfatação foi realizada igualmente à descrita para a obtenção da amostra AB1OS, mantendo-se as mesmas proporções usadas no procedimento acima.

## 3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO NATIVO, REDUZIDO, OXIDADO E SULFATADO

### 3.2.1 Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho

As medidas dos espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho das amostras de BOT modificadas foram obtidas no espectrofotômetro FT-IR IR Prestige-21 (Shimadzu) no intervalo de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando pastilhas de KBr. O equipamento pertence ao Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da UEL. As medidas também foram obtidas no Laboratório de Química Prebiótica (LQP) da UEL, usando o espectrofotômetro FT-IR Bruker – Vertex 70 equipado com acessório ATR com cristal Ge 45°, no intervalo de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.2 Espectroscopia Ultravioleta na Região do Visível

As medidas dos espectros de UV-Vis foram obtidas no espectrofotômetro U-3000, Hitachi, em 360 nm. Essas medidas foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina – UEL.

### 3.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As medidas de RMN foram realizadas em Espectrômetro Bruker Mod. Avance III operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , na temperatura de 298 K. Essas medidas foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da Universidade Estadual de Londrina – UEL. As amostras foram preparadas pela dissolução em  $\text{D}_2\text{O}$  e liofilização, procedimento que foi repetido três vezes para cada amostra.

### 3.2.4 Metodologias de Quantificação da Funcionalização

#### 3.2.4.1 Quantificação de grupos carboxila adaptado de (TATONGJAI; LUMDUBWONG, 2010).

Preparo da coluna: foi adicionada resina Amberlite® IR-120 Na<sup>+</sup> em água ultrapura e então vertido em uma bureta pequena até atingir 12 cm de resina, sem deixá-la secar. A coluna então foi lavada com 100 mL de água ultrapura em um fluxo de aproximadamente 60 gotas por minuto. Depois, a coluna foi lavada com 100 mL de HCl 1 M no mesmo fluxo e forma anterior. Por último, a coluna foi lavada com 500 mL de água ultrapura, e a resina foi evaporada e levada para liofilizar. O pH foi medido ao término da lavagem com 100 mL de água ultrapura e ao término da lavagem com 500 mL de água ultrapura, pois o valor de pH final tem que estar igual ao pH inicial.

Preparo da amostra: 23,6 mg de amostra AB1O foram solubilizados em 100 mL de água ultrapura sob agitação magnética por 14 h. Após obter boa dissolução, a amostra foi centrifugada. Em seguida, foi separado o sobrenadante e descartado o precipitado. A amostra de 100 mL (volume do sobrenadante completado com água ultrapura) preparada previamente foi eluída pela bureta contendo Amberlite®. Em seguida foram eluídos 400 mL de água ultrapura pela bureta. Durante a eluição, de tempos em tempos, foi recolhido 0,5 mL da amostra eluída e adicionado em um tubo contendo 0,5 mL fenol 5% e 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, até teste de fenol-sulfúrico negativo. Por último, a amostra foi evaporada sob pressão reduzida e liofilizada.

Análise da amostra por titulação indireta: 7,7 mg da amostra AB1O (massa obtida após a liofilização da etapa anterior) foram solubilizados em 100 mL de água ultrapura. Em uma bureta graduada de 25 mL, foi adicionado HCl 0,1 M e em um erlermeyer de 250 mL foi adicionado 100 mL da amostra, 3 gotas de fenolftaleína, 2 mL de metanol e 15 mL de NaOH 0,1 M. Então, foi realizada a titulação do branco e da amostra, ambos em triplicata, e anotados os volumes de HCl 0,1 M para titulação. Observando-se que para a amostra AB2RO, o procedimento foi o mesmo e nas mesmas proporções (TATONGJAI; LUMDUBWONG, 2010), mudando apenas a massa inicial (disponível) e a massa obtida após a liofilização da amostra AB2RO. Os

cálculos para determinar o grau de oxidação de hidroxilas foram realizados a partir das equações 1 e 2 a seguir.

$$WC = \frac{C \times M_C \times (V_B - V_S) \times 100\%}{m} \quad (1)$$

$$DS = \frac{W_C \times M_A}{((100\% - W_C) \times M_C)} \quad (2)$$

\* Legenda:

W<sub>C</sub>= quantidade de grupos carboxila presentes na solução da amostra (m/m %);

C= concentração da solução de HCl (0,1 M) utilizada na titulação;

M<sub>C</sub>= massa molar adicional do grupo funcional carboxila em relação ao álcool primário do polissacarídeo (14 g/mol);

M<sub>A</sub>= massa molar de uma unidade de glucose anidra;

V<sub>B</sub>= volume de HCl utilizado na titulação do branco (mL);

V<sub>S</sub>= volume de HCl utilizado na titulação da amostra (mL);

m = massa da amostra de BOT oxidada após a liofilização (mg);

D<sub>S</sub>= grau de substituição por grupos carboxila na amostra.

### 3.2.4.2 Quantificação dos grupos sulfato

O teste de quantificação de grupos sulfato foi desenvolvido por Dodgson (1961) com o intuito de determinar pequenas quantidades de sulfato inorgânico em estudos com hidrólise de glicose de potássio sulfatado. É uma metodologia adaptada pelo autor para estudar a hidrólise não enzimática de sulfatos de carboidratos simples, no entanto, essa mesma metodologia pode ser modificada para outras determinações como em ensaios de glicosulfatase e microanálise de sulfatos de éster. A metodologia usada nesse trabalho é a metodologia A do trabalho citado, que determina grupos sulfato em soluções aquosas no intervalo de 0-200 µg (DODGSON; PRICE, 1962).

Um dia antes de realizar as análises, foram preparadas soluções de HCl 1 M, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mg/mL em HCl 1 M, TCA 3% (m/V) e gelatina-bário: a gelatina Oxoid 5 mg/mL foi dissolvida em água deionizada aquecida entre 60 e 70 °C e deixada

em repouso durante à noite. O  $BaCl_2$  foi dissolvido no fluido semigelatinoso e a solução turva resultante foi deixada em repouso durante 3 horas antes de ser usada. Então, para a curva analítica foram preparadas sete soluções com volume total de 5 mL, contendo 3,8 mL de TCA 3%, 1 mL de solução de gelatina-bário e 200  $\mu$ L de HCl 1 M (contendo 0-200  $\mu$ g de  $SO_4^{2-}$ ).

Uma massa conhecida da amostra do polissacarídeo sulfatado foi hidrolisada em 1 mL de HCl 1 M em tubos (vedados) para hidrólise por 5 horas em banho de óleo sob aquecimento entre 100-110 °C. Após o tempo descrito, foram preparadas soluções da amostra em tubos de vidro contendo 3,8 mL de TCA 3%, 1 mL de solução gelatina-bário e 200  $\mu$ L da amostra hidrolisada. Então, as soluções foram deixadas em repouso por 20 min e posteriormente realizada a leitura no espectrofotômetro em 360 nm, observando que as amostras foram preparadas em triplicatas (DODGSON; PRICE, 1962).

Com os dados de absorvância obtidos no espectrofotômetro, foi construída a curva analítica e obtida a equação da reta. E então, determinou-se a quantidade de sulfato presente nas alíquotas de 200  $\mu$ L. Para a obtenção da porcentagem de enxofre em massa (S%) e o grau de substituição do polissacarídeo (DS), foram utilizadas as equações a seguir (DODGSON; PRICE, 1962; MENDES *et al.*, 2009).

$$S\% = SO_4^{2-}(\mu g) \frac{0,1374 \times 100}{m} \quad (3)$$

$$DS = \frac{162,14 \times S\%}{3200 - (102 \times S\%)} \quad (4)$$

\* Legenda:

S%= fração de massa do átomo de enxofre (S) enxofre;

$SO_4^{2-}$  = massa de íons sulfato obtida pela interpolação do gráfico (em  $\mu$ g);

m = massa da amostra derivada da BOT ( $\mu$ g)

DS= grau de sulfatação da amostra, ou seja, número médio de grupos sulfato em cada resíduo de açúcar.

### 3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

#### 3.3.1 Células

Células Vero (células epiteliais de rim de macaco verde africano, ATCC CCL81) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – Invitrogen-Gibco, USA) suplementado com soro bovino fetal 10% (Invitrogen-Gibco, USA), glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich, USA) e tratados com estreptomicina 100 µg mL<sup>-1</sup> (Gibco BRL, USA) penicilina 100 IU mL<sup>-1</sup> (Nova farma, Brasil) e anfotericina B 2,5 µg mL<sup>-1</sup> (Meizler Biopharma S/A, Brasil). As culturas de células Vero foram mantidas a 37 °C com uma tensão de CO<sub>2</sub> 5% até obter uma monocamada de células.

#### 3.3.2 Vírus da Herpes

O vírus do herpes simples tipo 1 (HSV-1) cepas KOS (sensível ao ACV) e AR-29 (resistente ao ACV) foram fornecidas pelo Dep. de Ciências Básicas da Saúde, Universidade de Maringá. O poliovírus (PV) era de uma cepa Sabin. Os estoques de HSV-1 e PV foram obtidos pela inoculação em células Vero até conseguir observar o efeito citopatológico (cerca de 90%), e aliqüotados com glicerol (10%). As alíquotas de teste foram mantidas a -20 °C por um período curto e os estoques foram armazenados a -80 °C. A titulação foi realizada em células Vero usando um ensaio TCID<sub>50</sub> padrão (dose infectante para a cultura celular a 50%) (REED; MUENCH, 1938). Diluições seriais (1:10) da suspensão do estoque viral foram preparadas em microtubos (450 µL de DMEM + 50 µL da suspensão viral). Então, 100 µL de cada diluição foi adicionada à monocamada de células Vero previamente formada em placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 37 °C em CO<sub>2</sub> 5% e examinadas diariamente sob microscópio invertido para se notar o efeito citopático. O TCID<sub>50</sub> para cada vírus foi calculado pelo método de Reed e Muench (REED; MUENCH, 1938).

#### 3.3.3 Vírus da Dengue

O vírus da dengue (DENV-2) foi fornecido pelo Instituto Evandro Chagas (Ananideua-PA, Brasil). O estoque viral foi obtido através da inoculação em células Vero até conseguir observar o efeito citopatológico (cerca de 90%), e

aliquotados com glicerol (10%). As alíquotas de teste foram mantidas a -20 °C por um período curto e os estoques foram armazenados a -80 °C. A titulação foi realizada em células Vero usando um ensaio TCID<sub>50</sub> padrão (dose infectante para a cultura celular a 50%) (REED; MUENCH, 1938). Diluições seriadas (1:10) da suspensão do estoque viral foram preparadas em microtubos (450 µL de DMEM + 50 µL da suspensão viral). Então, 100 µL de cada diluição foi adicionada à monocamada de células Vero previamente formada em placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 28 °C em 5% de CO<sub>2</sub> e examinadas diariamente em microscópio invertido para observar o efeito citopático. A dose infecciosa de 50% da cultura de tecidos (TCID<sub>50</sub>) para cada vírus foi calculada pelo método de Reed e Muench (REED; MUENCH, 1938).

### 3.3.4 Ensaio de Citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos abordados foi avaliada pelo método do MTT (MOSMANN, 1983; SIEUWERTS *et al.*, 1995). Culturas confluentes (2 x 10<sup>4</sup> células/poço) em microplacas de 96 poços (Techno Plastic Products, Suíça) foram expostas a diferentes concentrações dos compostos testados (6 – 100 µg mL<sup>-1</sup>). O reagente de MTT (10 µL, concentração final de 1,25 mg mL<sup>-1</sup>) foi adicionado a cada poço, seguido por um período de incubação de 2 h a 37 °C, tempo no qual o MTT solúvel em água se converte na formazana insolúvel. A solução de solubilização do MTT (TritonX-100 + isopropanol acidificado, 90 µL) foi adicionada para dissolver os cristais de formazana. Após agitação vigorosa por 15 min, a absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, USA) a 570 e 690 nm.

A porcentagem de viabilidade celular (CV%) foi calculada pela fórmula:

$$CV\% = (At_{570nm} - At_{690nm} / Acc_{570nm} - Acc_{690nm}) \times 100$$

Onde: At e Acc são a absorbância dos compostos testados e das células-controle (células não tratadas), respectivamente, nos comprimentos de onda indicados.

A concentração citotóxica a 50% (CC<sub>50</sub>) foi calculada como a concentração dos compostos necessária para a redução da viabilidade das células Vero em 50%, determinada por análise de regressão linear.

### 3.3.5 Avaliação da Atividade Anti-HSV e Anti DENV

A atividade antiviral contra as cepas KOS e AR do HSV-1 e de DENV-2 foi determinada por TCID<sub>50</sub> pela redução do título viral (DE LA IGLESIA *et al.*, 1998; XU *et al.*, 2017) e pelo ensaio de MTT (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991), com pequenas modificações. Células Vero ( $1 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup>) foram cultivadas em microplacas de 96 poços por 24 h a 37 °C sob CO<sub>2</sub> 5%. O meio foi removido e 100 µL de uma mistura contendo o vírus (MOI 1) e diferentes concentrações dos compostos testados (6 – 100 µg mL<sup>-1</sup>) foram simultaneamente adicionadas às células Vero. Controles celular (CC) e viral (VC) foram analisados pela adição de 100 µL de DMEM ou suspensão viral, respectivamente.

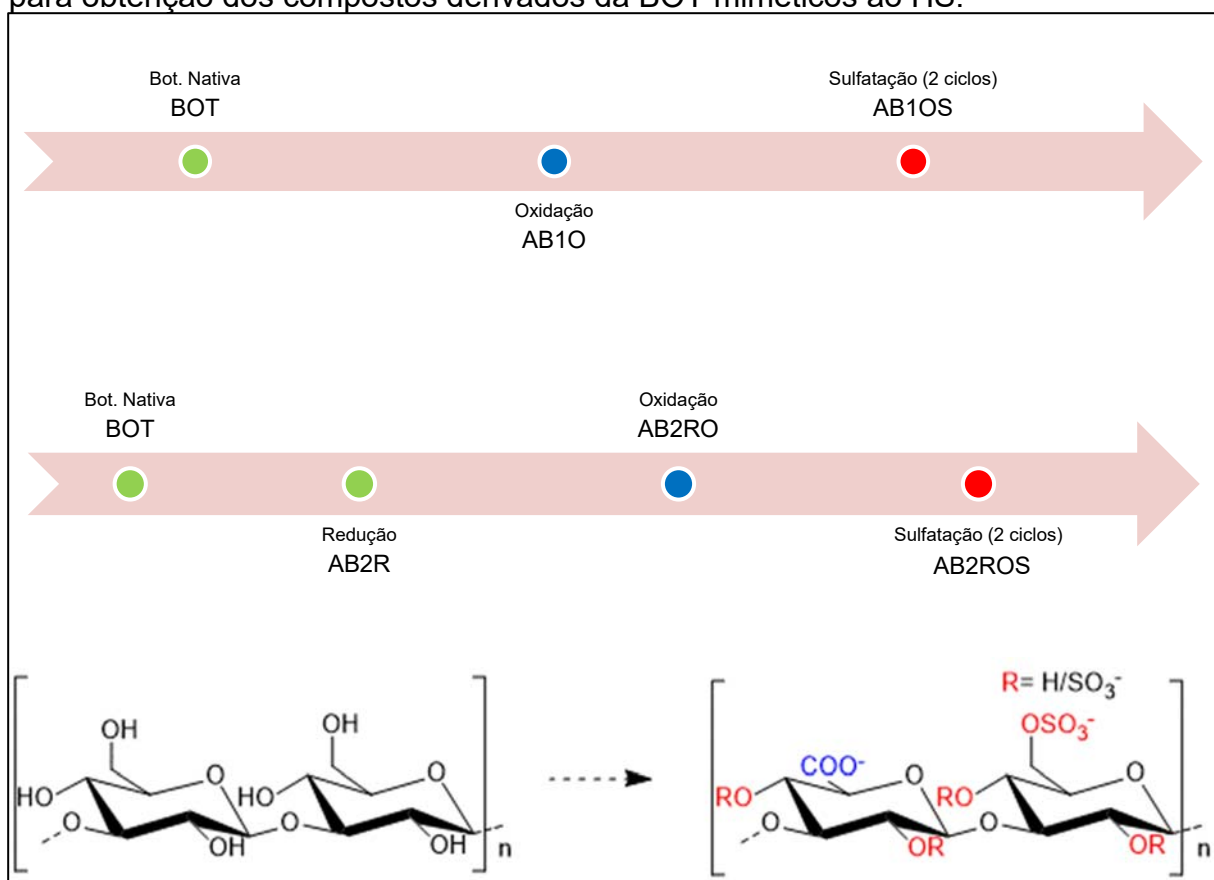
As microplacas foram incubadas por 72 h, sob as mesmas condições de temperatura e CO<sub>2</sub>, e a porcentagem de inibição viral (VI) foi calculada segundo Sacchelli e colaboradores (2019). A concentração capaz de reduzir a infecção viral em 50% (IC<sub>50</sub>), comparada com os controles celular e viral, foi determinada usando análise de regressão linear. O índice de seletividade (SI) foi calculado pela relação: CC<sub>50</sub> / IC<sub>50</sub>. A análise estatística de ANOVA seguida pelo teste de Tukey foram aplicados para determinar a diferença entre os compostos testados e os grupos de controle. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 APRESENTAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS

As amostras de botriosferana miméticas ao heparan sulfato foram obtidas por duas vias, conforme ilustra o esquema a seguir (Figura 10).

**Figura 10** – Representação da ordem em que foram realizadas as rotas sintéticas para obtenção dos compostos derivados da BOT miméticos ao HS.



Fonte: A autora (2021).

Neste estudo optou-se por trabalhar com a BOT, por ser um polissacarídeo que apresenta potencial antiviral, conforme já observado pelo nosso grupo de pesquisa (SACCHELLI *et al.*, 2019) e por apresentar hidroxilas em ambientes químicos diferentes na sua estrutura que permitem possíveis modificações estruturais. Desta forma, foi pensado em sintetizar miméticos do heparan sulfato, devido a essa classe de glicosaminoglicanos possuir grupos com cargas negativas que se ligam eletrostaticamente com as cargas positivas presentes nas glicoproteínas do envelope viral (DUARTE *et al.*, 2004). Pensando na estrutura do heparan sulfato, foram

inseridos no polissacarídeo grupos carboxilato e grupos sulfato. A inserção destes grupos ocorreu através das reações de oxidação e sulfatação, respectivamente. A reação de oxidação foi realizada primeiramente pelo fato de o polissacarídeo apresentar uma função álcool primário no C-6 da grande maioria das suas unidades de glucose, exceto aquelas com ramificação.

Por este estudo, foram sintetizados dois derivados da glucana botriosferana miméticos do heparan sulfato. Para maior clareza, a seguir será apresentada a descrição das siglas de identificação de cada um dos produtos de reações obtidos neste trabalho.

\* Legenda das siglas usadas na identificação das amostras:

BOT – Amostra de botriosferana nativa

AB1O – Amostra de BOT oxidada

AB1OS\* - Amostra de BOT oxidada que passou por tentativa não sucedida de sulfatação

AB1OS – Amostra de BOT oxidada e sulfatada

AB2R – Amostra de BOT reduzida (submetida a reação de redução)

AB2RO - Amostra de BOT reduzida e oxidada

AB2ROS\* - Amostra de BOT reduzida e oxidada que passou por tentativa não sucedida de sulfatação

AB2ROS – Amostra de BOT reduzida, oxidada e sulfatada

Observações: A amostra descrita como reduzida não foi caracterizada pois a modificação resultante é de difícil detecção, por ocorrer unicamente nos terminais redutores, que são quantitativamente pouco expressivos. Sendo assim, neste trabalho ela é considerada apenas como “amostra que foi submetida à reação de redução”.

Para a obtenção do primeiro mimético, partiu-se da amostra BOT, que sofreu reação de oxidação (AB1O), tentativa não sucedida de reação de sulfatação (AB1OS\*) e reação de sulfatação (AB1OS). Na obtenção do segundo análogo, também se partiu de uma amostra BOT, a qual foi submetida a reação de redução (AB2R), reação de oxidação (AB2RO), tentativa não sucedida de reação de sulfatação (AB2ROS\*) e reação de sulfatação (AB2ROS). Considerou-se, assim, que cada via sintética envolveu dois ciclos de sulfatação (Figura 10).

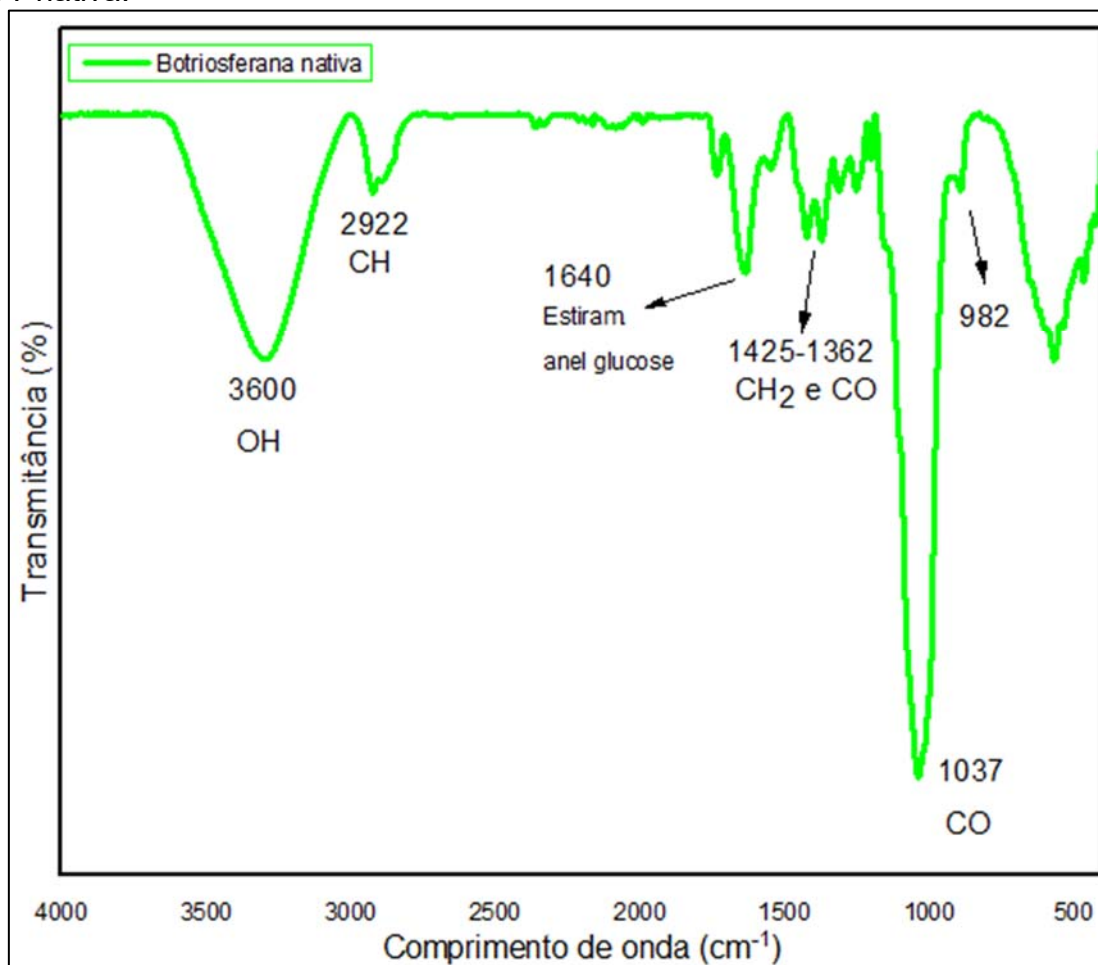
## 4.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA BOT

### 4.2.1 Caracterização da BOT Nativa por Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (BARBOSA *et al.*, 2003; SYNYTSYA; NOVAK, 2014; VASCONCELOS *et al.*, 2008)

A fim de verificar informações sobre o polissacarídeo, foi realizado espectro de TF-IV no intervalo de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  para identificar os grupos presentes na BOT (Figura 11). A BOT apresenta bandas vibracionais de hidroxila (grupo funcional presente) em 3600  $\text{cm}^{-1}$ . Na região de 2999-2780  $\text{cm}^{-1}$  há a presença do estiramento C-H. O estiramento em 1640  $\text{cm}^{-1}$  é característico de anel de glucose e de presença de H<sub>2</sub>O na molécula. As deformações da vibração assimétrica dos grupos CH<sub>2</sub> e COH encontram-se na região de 1425-1362  $\text{cm}^{-1}$  que são características de  $\beta$ -glucanas. A banda fortemente intensa em 1037  $\text{cm}^{-1}$  equivale a estiramento C-O de álcool e do anel da glucose. (BARBOSA *et al.*, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2008).

A banda de vibração em 982  $\text{cm}^{-1}$  que ocorre na região de 1040-890  $\text{cm}^{-1}$  indica a presença de unidades de glucopiranosose interligadas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), que são características de polissacarídeos obtidos de fungos (BARBOSA *et al.*, 2003; SYNYTSYA; NOVAK, 2014; VASCONCELOS *et al.*, 2008).

**Figura 11** – Espectro de infravermelho (região entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) da amostra de BOT nativa.



Fonte: A autora (2021).

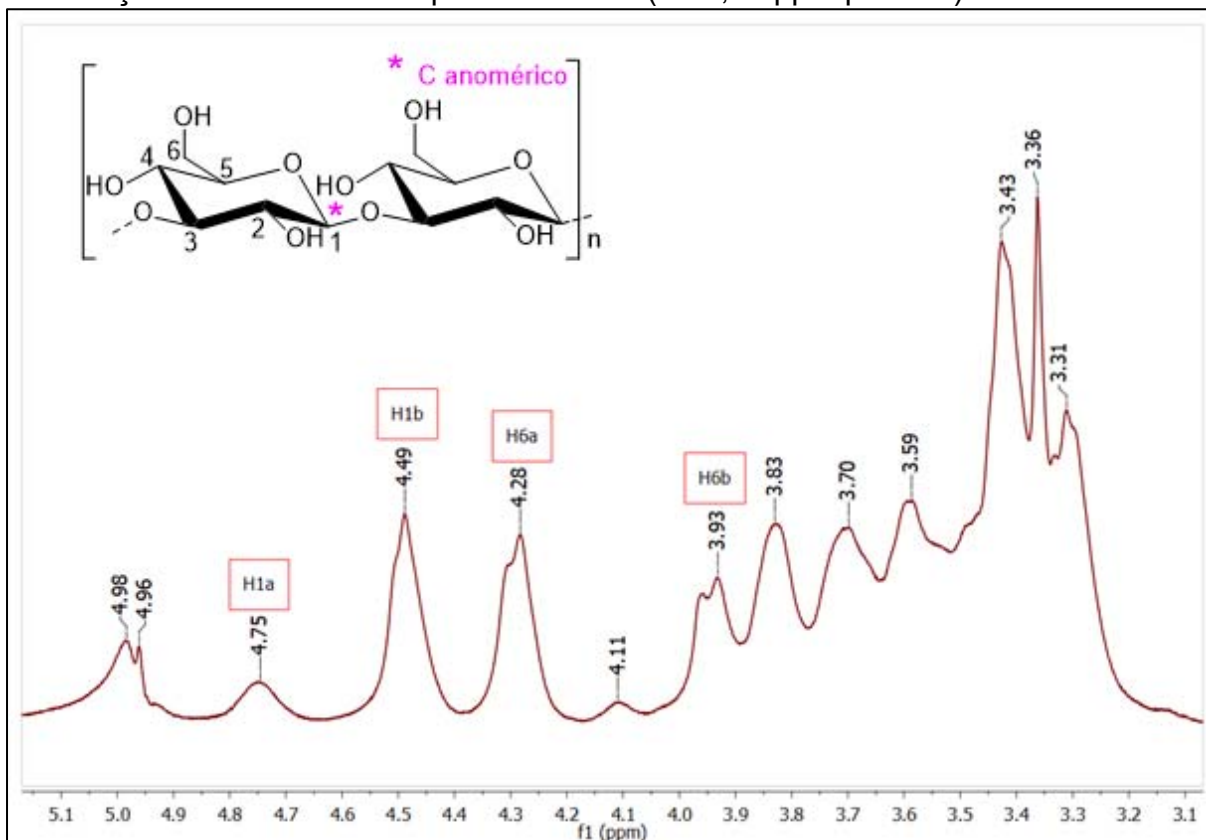
#### 4.2.2 Caracterização da BOT Nativa por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN-400 MHz) de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (1D) e HSQC (2D)

A caracterização da BOT nativa foi realizada através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HSQC, os quais contribuíram com informações relevantes sobre o polissacarídeo, tais como determinação da configuração anomérica de unidades de glucopiranosose e a forma de ligação glicosídica entre ambas (SYNYTSYA; NOVAK, 2014).

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 12) observa-se a presença de sinais em 4,75 ppm (H1a) e 4,49 ppm (H1b), os quais são característicos de sinais de hidrogênios anoméricos dos resíduos  $\beta$ -D-glucanas (SYNYTSYA; NOVAK, 2014). Os sinais em 4,28 ppm (H6a) e 3,93 ppm (H6b) pertencem aos H-6 (ligados ao C-6) (VAN LEEUWEN et al., 2008). Os sinais que aparecem em 4,98 ppm

e 4,96 ppm são indícios de água, indicando que a supressão da mesma não foi completa.

**Figura 12** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) da amostra de BOT nativa em  $\text{D}_2\text{O}$ , com adição de acetona como padrão interno ( $\delta = 2,22$  ppm para  $^1\text{H}$ ).

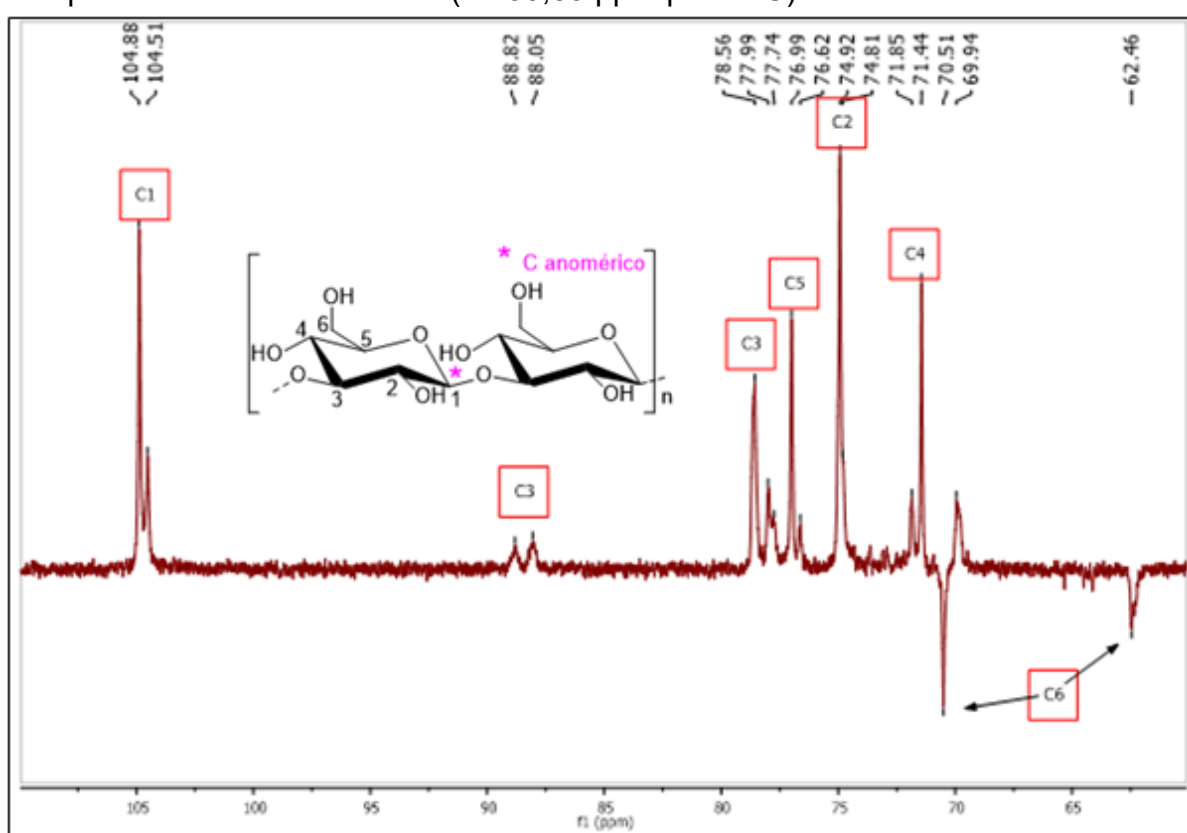


Fonte: A autora (2021).

De acordo com Barbosa e colaboradores (2003), a BOT é constituída por unidades de glicose distintas, a cadeia principal (linear) é formada por monômeros  $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-}$  interligados e a cada 5 a 6 resíduos a uma ramificação  $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-}$  (glicosil ou gentiobiose). Ao analisar o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DEPT 135) apresentado na figura 13, observa-se que os sinais equivalem aos de uma  $\beta$ -glucana, conforme descritos a seguir: o sinal de maior intensidade em 104,88 ppm é atribuído ao C-1 anomérico da unidades de glicose  $\rightarrow3\text{-Glcp-}(1\rightarrow$ , o sinal em 104,51 ppm equivale a unidade C-1 de unidades de glicose  $\rightarrow6\text{-Glcp-}(1\rightarrow$  na ramificação da cadeia principal, o sinal em 88,82 ppm é referente ao C-3 desprovido de substituições  $\rightarrow3\text{-Glcp-}(1\rightarrow$ , já o sinal em 88,05 ppm é referente ao C-3 do resíduo de glicose  $\rightarrow3,6\text{-Glcp-}(1\rightarrow$  substituído. O sinal em 70,51 ppm equivale ao C-6 substituído do resíduo de glicose  $\rightarrow6\text{-Glcp-}(1\rightarrow$  e o sinal em 62,46 ao C-6 livre de resíduo de

glucose  $\rightarrow 3$ )-Glc $p$ -(1 $\rightarrow$ ). Os sinais em: 76,62 ppm, 74,92 ppm e 69,94 ppm são equivalentes aos C-5, C-2 e C-4 de resíduos de glucose  $\rightarrow 3,6$ )-Glc $p$ -(1 $\rightarrow$  substituídos, respectivamente, e 76,99 ppm, 74,81 ppm e 71,44 ppm equivalem aos C-5, C-2 e C-4 respectivamente de resíduos de glucose  $\rightarrow 6$ )-Glc $p$ -(1 $\rightarrow$  substituídos. Os sinais aqui descritos, de acordo com resultados de caracterização apresentados por Corradi da Silva e colaboradores (2008), Synytsya e Novak (2013) e Sacchelli e colaboradores (2019), confirmam a caracterização da BOT nativa.

**Figura 13** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DEPT 135) da amostra de BOT nativa em  $\text{D}_2\text{O}$ , com padrão interno de acetona ( $\delta = 30,89$  ppm para  $^{13}\text{C}$ ).

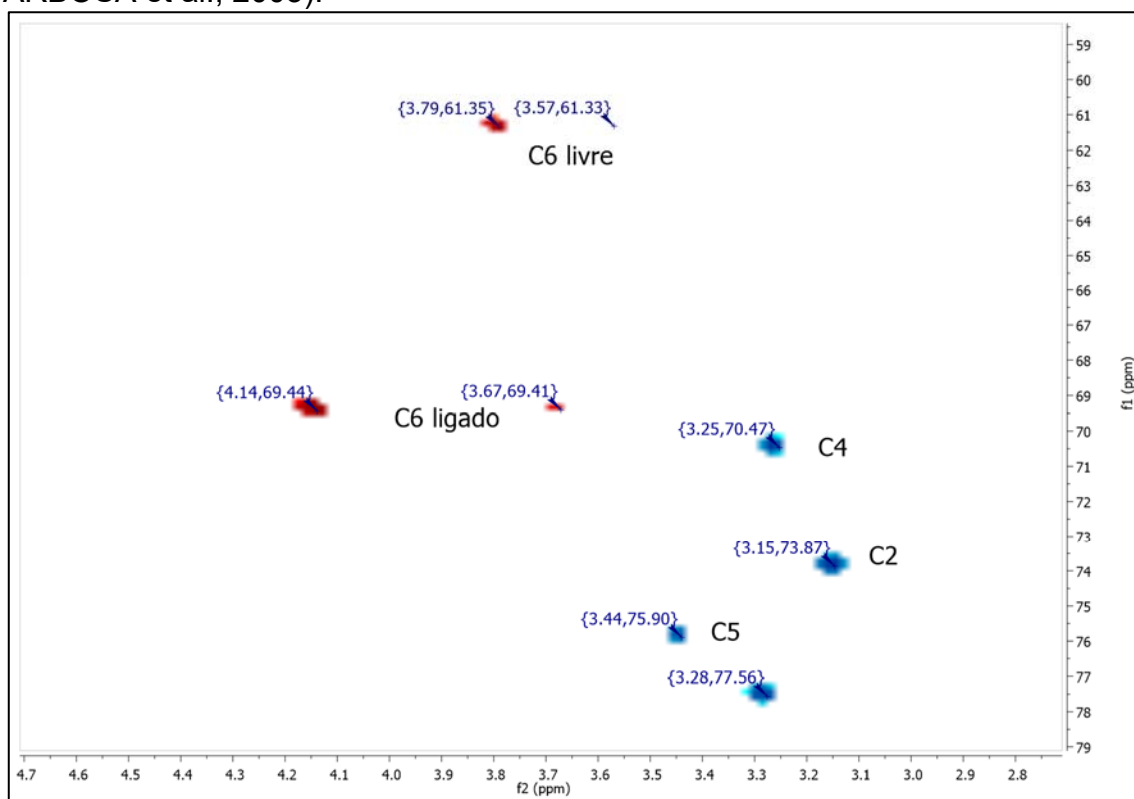


Fonte: A autora (2021).

Analisando o espectro de RMN de HSQC (Figura 14), observam-se as correlações em 69,44/4,14 e 69,41/3,67 ppm, que correspondem a C-6/H-6ab relacionado aos C-6 ligados às ramificações, e as correlações em 61,35/3,79 e 61,33/3,57 ppm, que correspondem a C-6/H-6ab dos C-6 livres. As demais correlações são: C-2/H-2 em 73,87/3,15 ppm, C-3/H-3 em 77,56/3,28 ppm (unidades com ramificação), C-4/H-4 em 70,47/3,25 ppm e C-5/H-5 em 75,90/3,44 ppm, que estão de acordo com a caracterização realizada por Barbosa e colaboradores (2003).

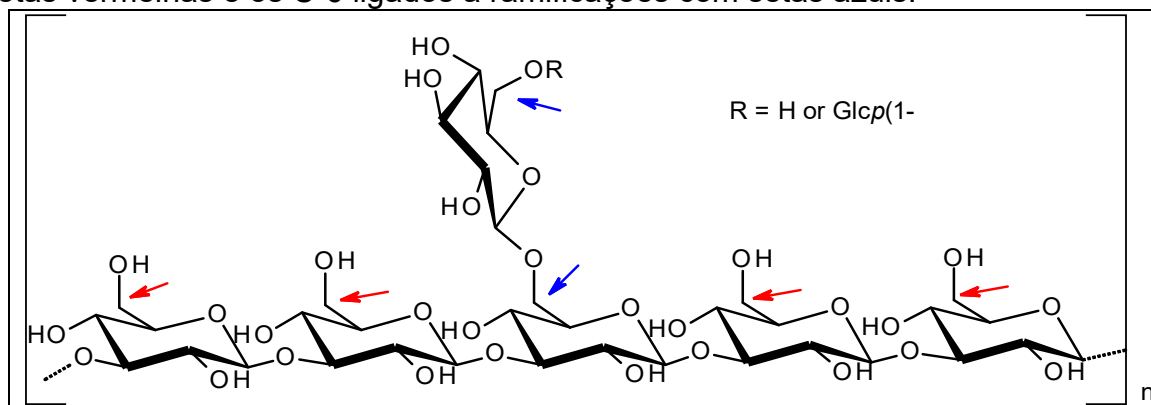
A posição dos C-6 livres e ramificados citados acima pode ser observada na estrutura da BOT (Figura 15).

**Figura 14** – Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da amostra de BOT nativa (BARBOSA et al., 2003).



Fonte: A autora (2021).

**Figura 15** – Representação da estrutura da BOT nativa, destacando os C-6 livres com setas vermelhas e os C-6 ligados a ramificações com setas azuis.



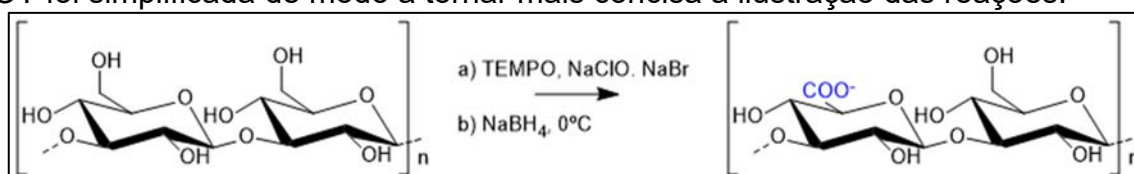
Fonte: A autora (2021).

### 4.3 DERIVATIZAÇÃO DA BOT

#### 4.3.1 Reação de Oxidação da BOT Nativa (AB1O)

A reação de oxidação (Figura 16) foi escolhida para iniciar a modificação do polissacarídeo pensando-se no produto final desejado, como derivados da BOT miméticos ao HS. Reações de oxidação com reagente TEMPO ocorrem regioselectivamente em álcoois primários formando ácido glucurônico, tal como observado no HS (TAVERNIER et al., 2008). Já a reação de sulfatação pode ocorrer em qualquer hidroxila do polissacarídeo, por isso a ordem escolhida. Para a reação de oxidação foi usado o reagente *N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina* (TEMPO) e o co-oxidante hipoclorito de sódio (NaClO).

**Figura 16** – Representação da reação de oxidação da BOT (AB1O). A estrutura da BOT foi simplificada de modo a tornar mais concisa a ilustração das reações.

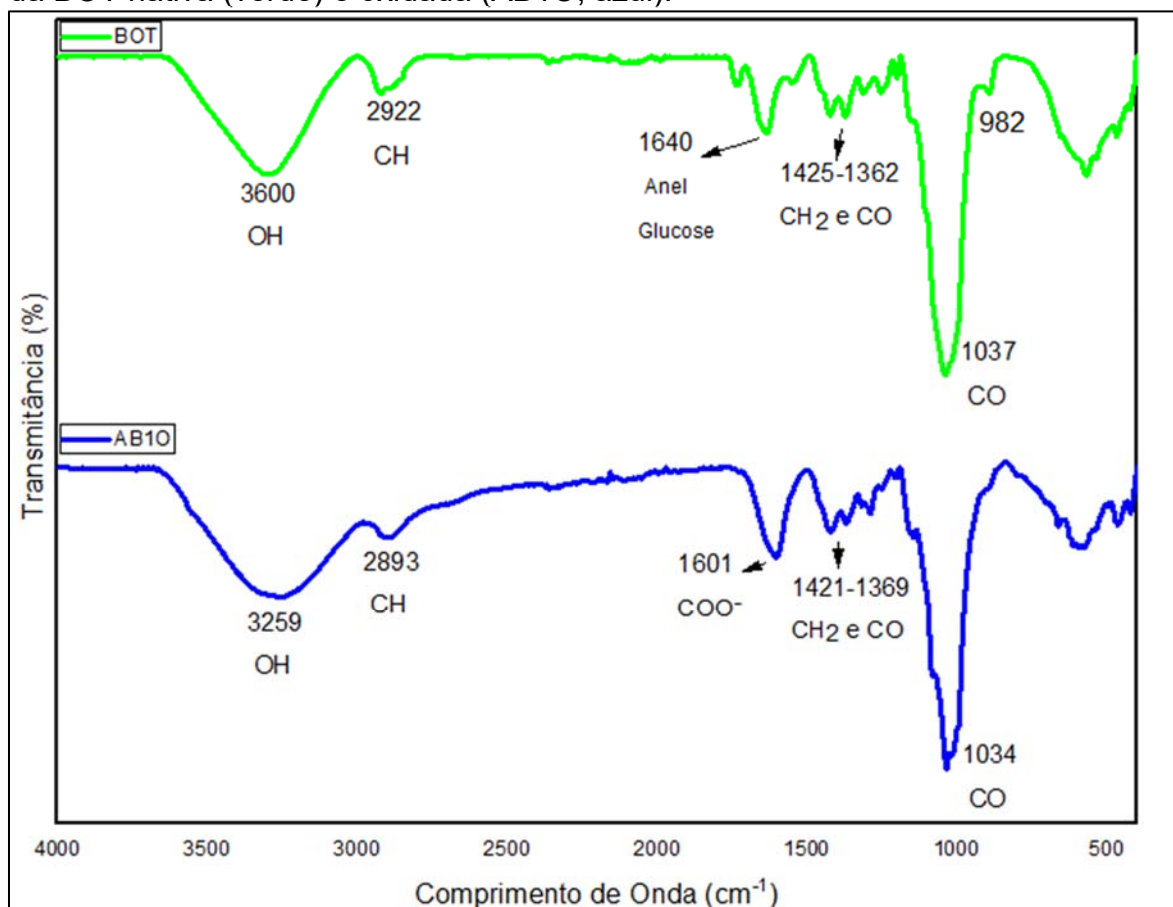


Fonte: A autora (2021).

O produto obtido da reação de oxidação (AB1O) foi caracterizado por TF-IV, RMN e titulometria.

Conforme análise do espectro de IV da amostra AB1O (Figura 17), a banda em  $1601\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramento simétrico  $\text{COO}^-$ , indica a presença de grupos carboxilato no polissacarídeo. As demais bandas indicam o estiramento do grupo OH em  $3259\text{ cm}^{-1}$ , estiramento CH em  $2893\text{ cm}^{-1}$ , estiramento  $\text{CH}_2$  e CO em  $1421\text{-}1369\text{ cm}^{-1}$  e o estiramento CO em  $1034\text{ cm}^{-1}$  (THEIS et al., 2019).

**Figura 17** – Espectros de infravermelho (região entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) das amostras da BOT nativa (verde) e oxidada (AB10, azul).



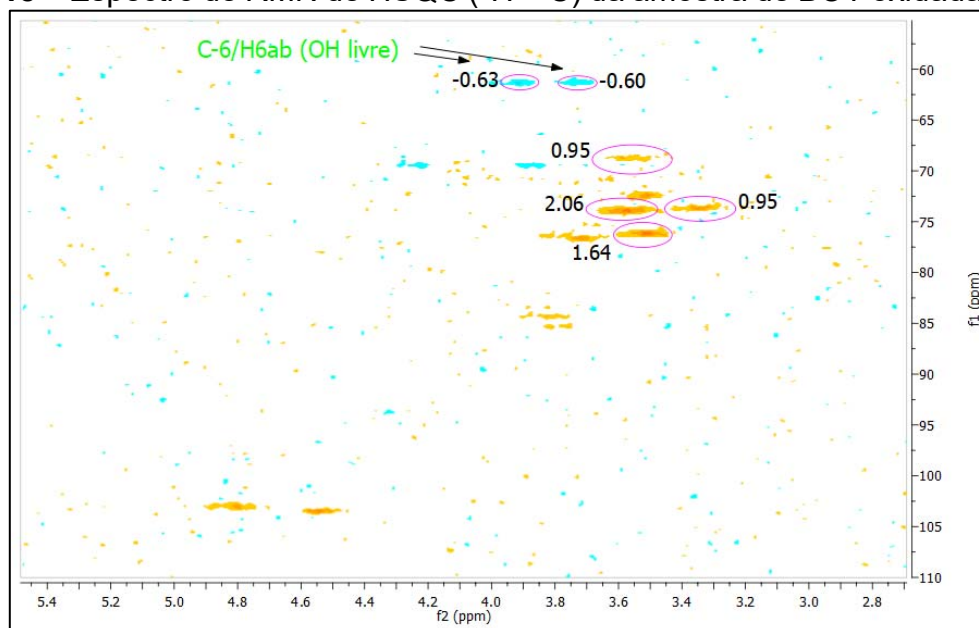
Fonte: A autora (2021).

Analisando o espectro de RMN de HSQC da amostra oxidada AB10 (Figura 18), também é possível afirmar que ocorreu a oxidação do polissacarídeo, conforme o enfraquecimento da correlação de C-6/H-6ab das unidades glicosídicas não ramificadas. A reação de oxidação só acontece em C-6, devido à BOT apresentar um álcool primário nesta posição. A BOT apresenta uma relação de tipos de C-6 de 5 para 1, ou seja, para cada cinco OH-6 livres, há um O-6 ramificado. No espectro de HSQC, comparando-se a integral da correlação C-6/H-6ab (ligados a OH livre) com as integrais das demais correlações das unidades  $\rightarrow 3\text{-Glc}p\text{-(1}\rightarrow$ , percebe-se que houve uma diminuição para quase a metade da primeira integral (uma relação de quase 1:2).

No espectro de HSQC da BOT nativa (Figura 14), esta relação é de aproximadamente 1:1. Esses dados de RMN de HSQC estão de acordo com o grau de oxidação (DO) de 0,45 encontrado na caracterização por titulometria, indicando a oxidação de quase metade das OH-6 livres, como ilustrado na Figura 18. A

caracterização por titulometria foi realizada por titulação indireta usando a metodologia adaptado de Tatongjai; L. (2010). A confiança em resultados por teste de titulação é maior devido ao seu caráter analítico. Os dados de HSQC relatados corroboram para esta interpretação, de que houve a oxidação em torno de determinada faixa, mesmo os resultados não sendo exatamente iguais.

**Figura 18** – Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da amostra de BOT oxidada (AB1O).

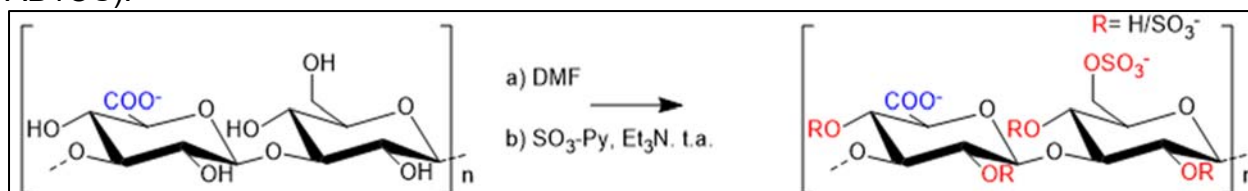


Fonte: A autora (2021).

#### 4.3.1.1 Reação de sulfatação (AB1OS) da BOT oxidada (AB1O).

A reação de sulfatação foi realizada com DMF e  $\text{SO}_3\text{-Py}$ , conforme representação do esquema de reação de sulfatação apresentado na figura 19.

**Figura 19** – Representação da reação de sulfatação da BOT oxidada (produto: AB1OS).



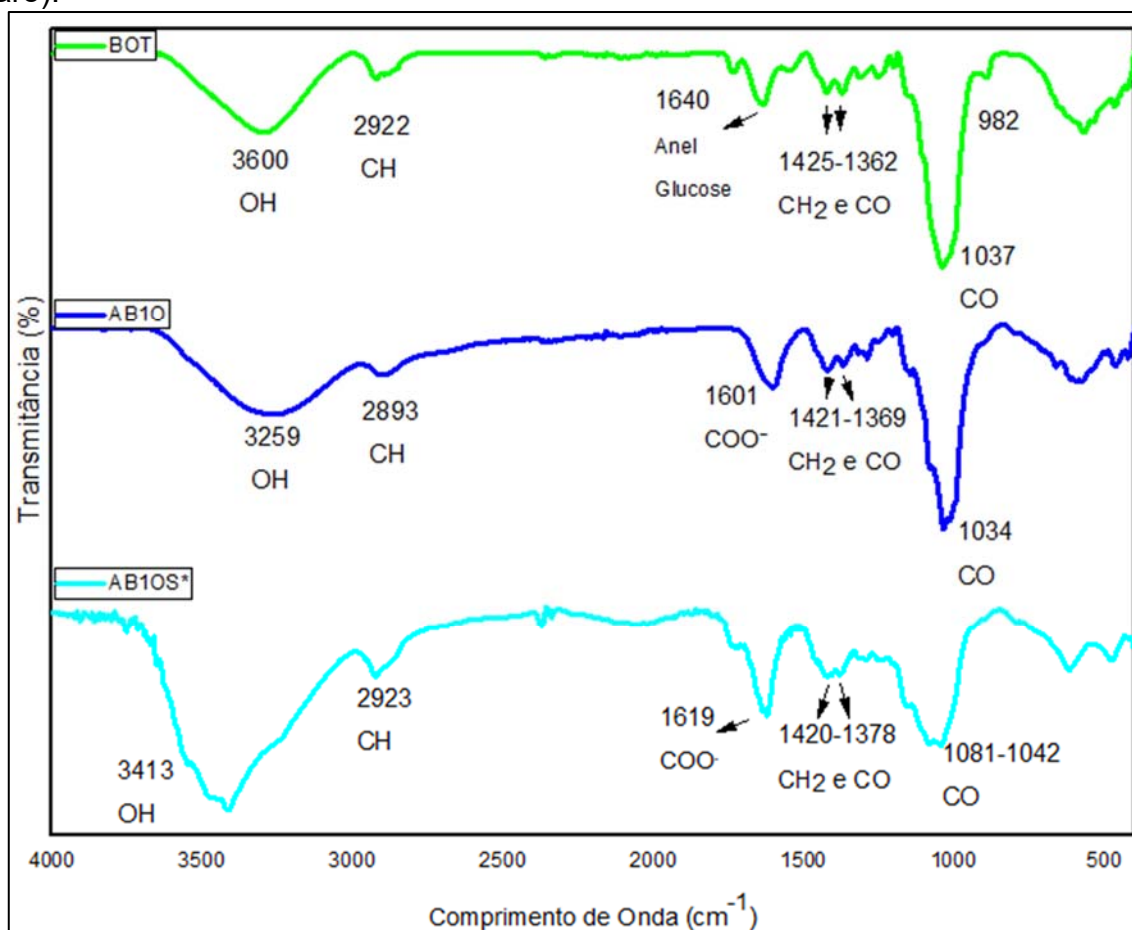
Fonte: A autora (2021).

A seguir será descrita a reação de sulfatação para a tentativa que não obteve um produto sulfatado (AB1OS\*) e para a tentativa que obteve sucesso, com o

produto sulfatado (amostra AB1OS). Durante a caracterização da tentativa malsucedida de reação de sulfatação (AB1OS\*) não foram observadas bandas características de grupos sulfato. Sendo assim, foi realizado outro ciclo de reação de sulfatação (AB1OS), o qual foi possível observar bandas características de grupos sulfato.

A caracterização da tentativa não sucedida de reação de sulfatação (AB1OS\*) foi realizada através da análise do espectro de TF-IV da amostra AB1OS\* (Figura 20). Nele não foi observada banda intensa em  $810\text{ cm}^{-1}$  que é característica de vibração assimétrica do grupo C-O-S.

**Figura 20** – Espectro de infravermelho (região entre  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) das amostras da BOT nativa (verde), oxidada (AB1O, azul) e sulfatação - 1ª tentativa (AB1OS\*, azul claro).



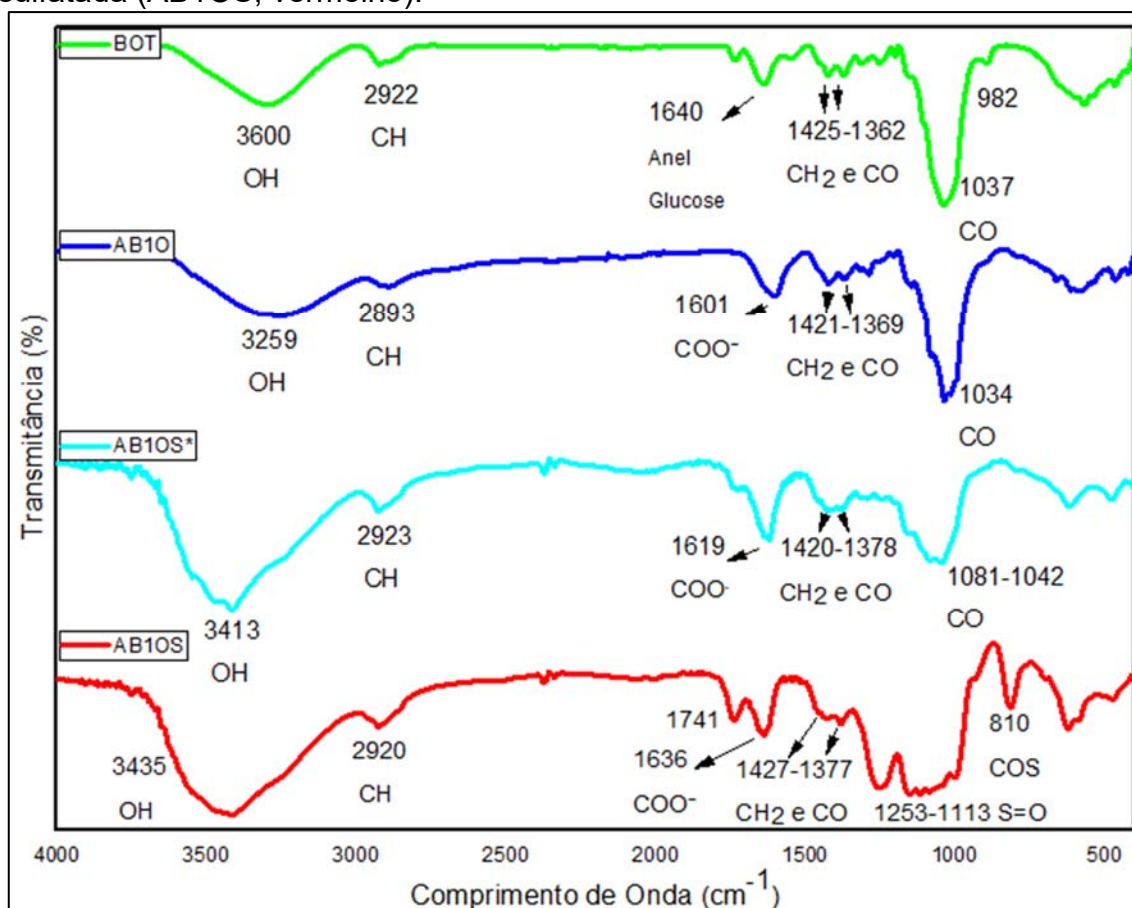
Fonte: A autora (2021).

Como o espectro não apresentou bandas de indicativo de grupos sulfato, as caracterizações por RMN e método turbidométrico não foram realizadas. Optou-se então por realizar um outro ciclo de sulfatação da amostra.

A sulfatação foi realizada igualmente como para o primeiro ciclo, não havendo diferenças nas condições reacionais. O que pode explicar o sucesso somente na segunda tentativa de sulfatação, de acordo com Dekker e colaboradores (2019), é que ao refazer o passo de sulfatação há a possibilidade de se obter graus de sulfatação superiores, como foi encontrado para a BOT após ressulfatação: teor de enxofre e DS de 15,4% e 1,54, respectivamente, aumentaram para 15,9% e 1,64, respectivamente. Uma outra explicação pode ser a pouca solubilidade da BOT no solvente polar aprótico dimetilformamida, que poderia ter aumentado na segunda tentativa.

No espectro de IV apresentado na figura 21 para o produto de reação AB10S, é observada uma banda em  $810\text{ cm}^{-1}$  referente a estiramento assimétrico do grupo C-O-S e bandas entre 1253-1113 referentes a estiramento assimétrico S=O, o que indica a presença de grupos sulfato ligados à molécula de polissacarídeo (ARLOV *et al.*, 2021).

**Figura 21** – Espectro de infravermelho (região entre  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) das amostras da BOT nativa (verde), oxidada (AB10, azul), sulfatação - 1ª tentativa (AB10S\*, azul claro) e sulfatada (AB10S, vermelho).

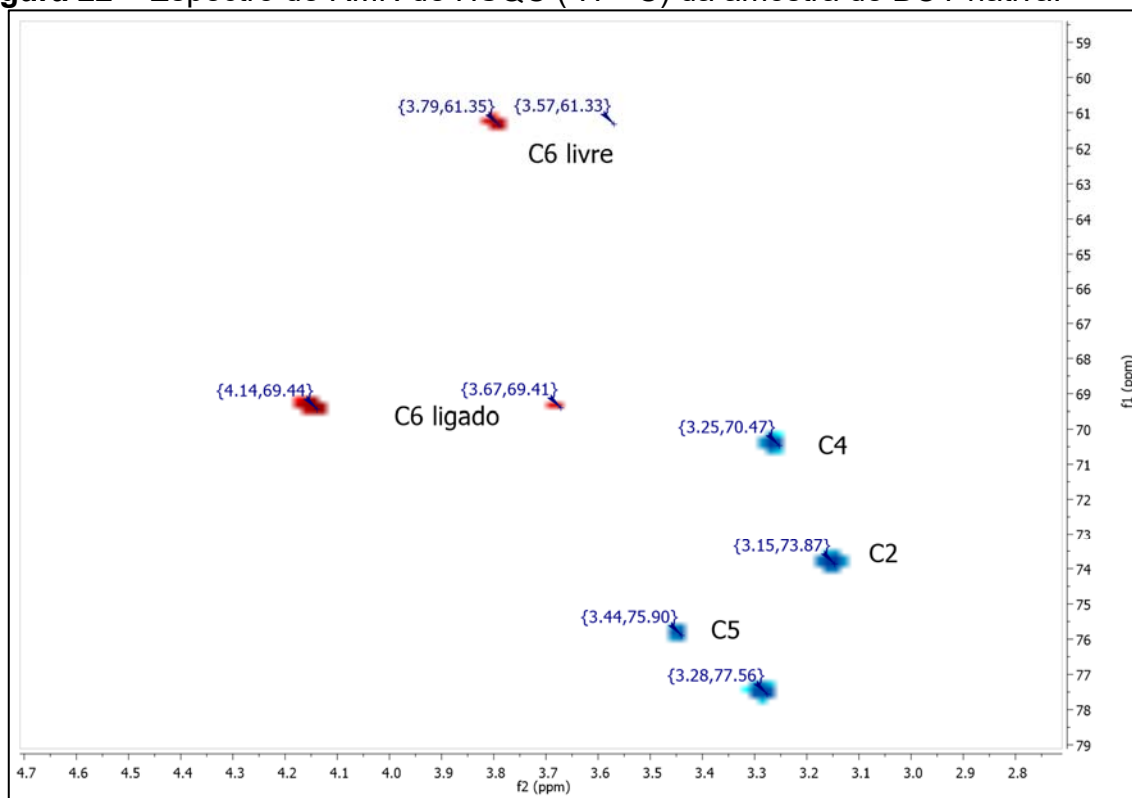


Fonte: A autora (2021).

Como foi observado pela técnica de infravermelho resultados característicos de grupos sulfato, foi dada sequência na caracterização por RMN e DS conforme será descrito a seguir.

Para obter a caracterização do produto resultante da reação de sulfatação é necessário primeiramente revisar a análise do espectro de RMN de HSQC da amostra BOT (Figura 22). Nota-se no espectro de RMN de HSQC da BOT nativa a relação das integrais de correlação de C-6/H-6. A proporção é de 1:1 das integrais de correlação de C-1/H-1, C-2/H-2, C-3/H-3, C-4/H-4, C-5/H-5 e C-6/H-6a/b, correspondente à proporção dos hidrogênios presentes na estrutura da BOT.

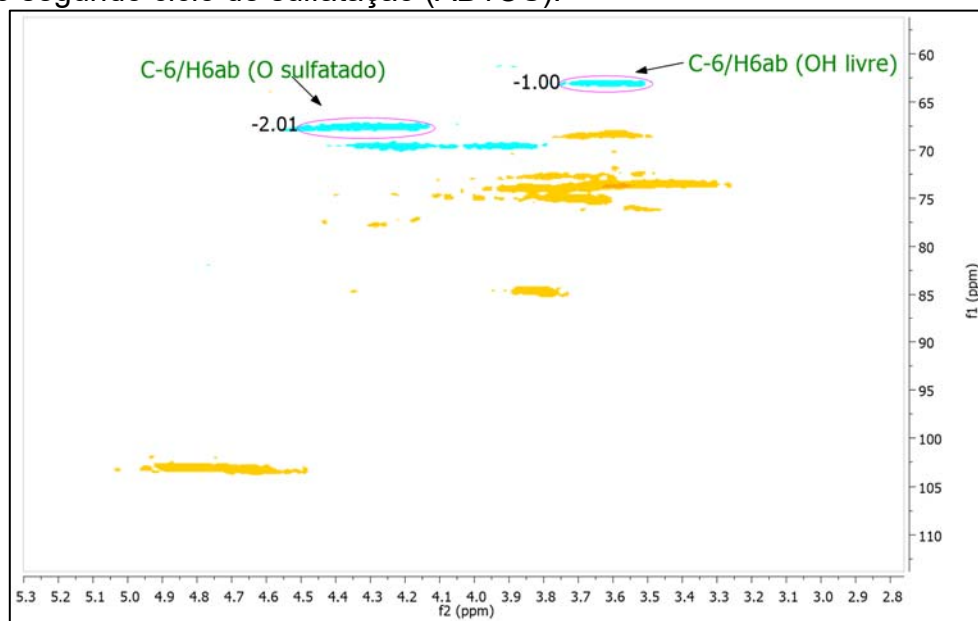
**Figura 22** – Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da amostra de BOT nativa.



Fonte: A autora (2021).

Em comparação ao espectro de HSQC do produto de sulfatação AB1OS (figura 23), nota-se, então, o aparecimento de uma nova correlação em 67,58/4,31 ppm, atribuída ao C-6 sulfatado. Percebeu-se que há uma relação da integral de C-6 sulfatado para C-6 livre de dois para um (2:1). Isso leva à interpretação regioquímica de que uma boa parte dos grupos sulfato resultaram posicionados na posição C-6, devido ao aparecimento do sinal do C-6 sulfatado.

**Figura 23** – Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da amostra de BOT oxidada que sofreu o segundo ciclo de sulfatação (AB10S).



Fonte: A autora (2021).

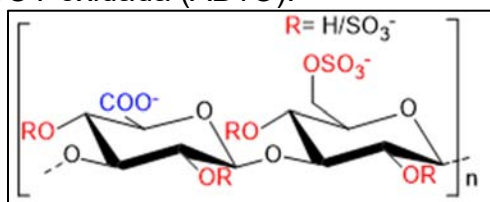
Estes resultados estão de acordo com Synytsya e Novák (2013) que dizem que a sulfatação de glucanas obtidas de fungos é geralmente alcançada com complexos, como o trióxido de enxofre-piridina (usado neste estudo) em meio de dimetilsulfóxido e que a reação pode ocorrer nas hidroxilas ligadas ao C-2, C-3, C-4 e preferivelmente no C-6.

Para o teste turbidométrico foi encontrado um  $\text{DS}=0,82$ , o que quer dizer que existem 8 grupos sulfato a cada 10 unidades de glucose presentes na molécula do polissacarídeo. Este valor de DS obtido é considerado satisfatório, pois Sacchelli e colaboradores (2019), em estudos de sulfatação da BOT, obtiveram atividade antiviral para o vírus da dengue e da herpes simples com DS de 0,4 e 1,1. Conforme Caputo e colaboradores (2019) a atividade antiviral do polissacarídeo será maior quanto maior for o valor do DS obtido.

De acordo com Arlov e colaboradores (2021) a obtenção de um valor maior de DS está sujeita a diversos fatores, como: solubilidade do polissacarídeo ao solvente escolhido, do local existente para ocorrer a sulfatação na estrutura do polissacarídeo, da reatividade e se existem grupos funcionais volumosos que possam causar impedimento estérico. Glucanas podem apresentar DS mais alto devido às hidroxilas livres nos C-6. A atividade antiviral do polissacarídeo sulfatado depende da massa, da composição do esqueleto e principalmente do grau de sulfatação e da

posição dos grupos sulfato (CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019). A sulfatação dos C-6 da BOT (Figura 24) é um resultado valioso, pois o heparan sulfato também apresenta essa posição na sua estrutura com grupos sulfato. O grau de sulfatação foi medido através da metodologia A do trabalho Dodgson e Price, (1962).

**Figura 24** – Representação da previsão regioquímica do produto da reação de sulfatação (AB1OS) da BOT oxidada (AB1O).



Fonte: A autora (2021).

Como o DS da amostra AB1OS foi de 0,82, e considerando que quase metade dos C-6 encontravam-se oxidados previamente à reação de sulfatação, pode-se afirmar que a sulfatação também ocorreu nas demais hidroxilas livres do polissacarídeo, nas posições 2 e 4.

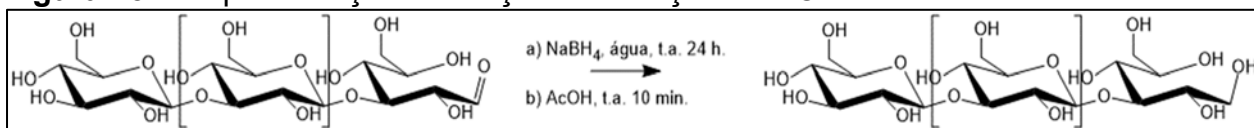
Sendo assim, conclui-se que nesta parte do trabalho foi sintetizado um mimético do heparan sulfato a partir das reações de oxidação e sulfatação do polissacarídeo BOT. Cabe destacar que não há relatos na literatura sobre reações de oxidação da BOT.

A seguir será apresentada a caracterização dos produtos de oxidação e sulfatação derivados da BOT reduzida. Ressalta-se que estas reações foram realizadas da mesma forma que para a BOT nativa.

#### 4.3.2 Reação de Redução em Meio Heterogêneo da BOT Nativa

A amostra de BOT nativa foi submetida ao processo de reação de redução (Figura 25) para evitar possíveis interferências dos seus terminais redutores sobre as reações de modificação química realizadas nos grupos hidroxila presentes no polissacarídeo.

**Figura 25** – Representação da reação de redução da BOT nativa.



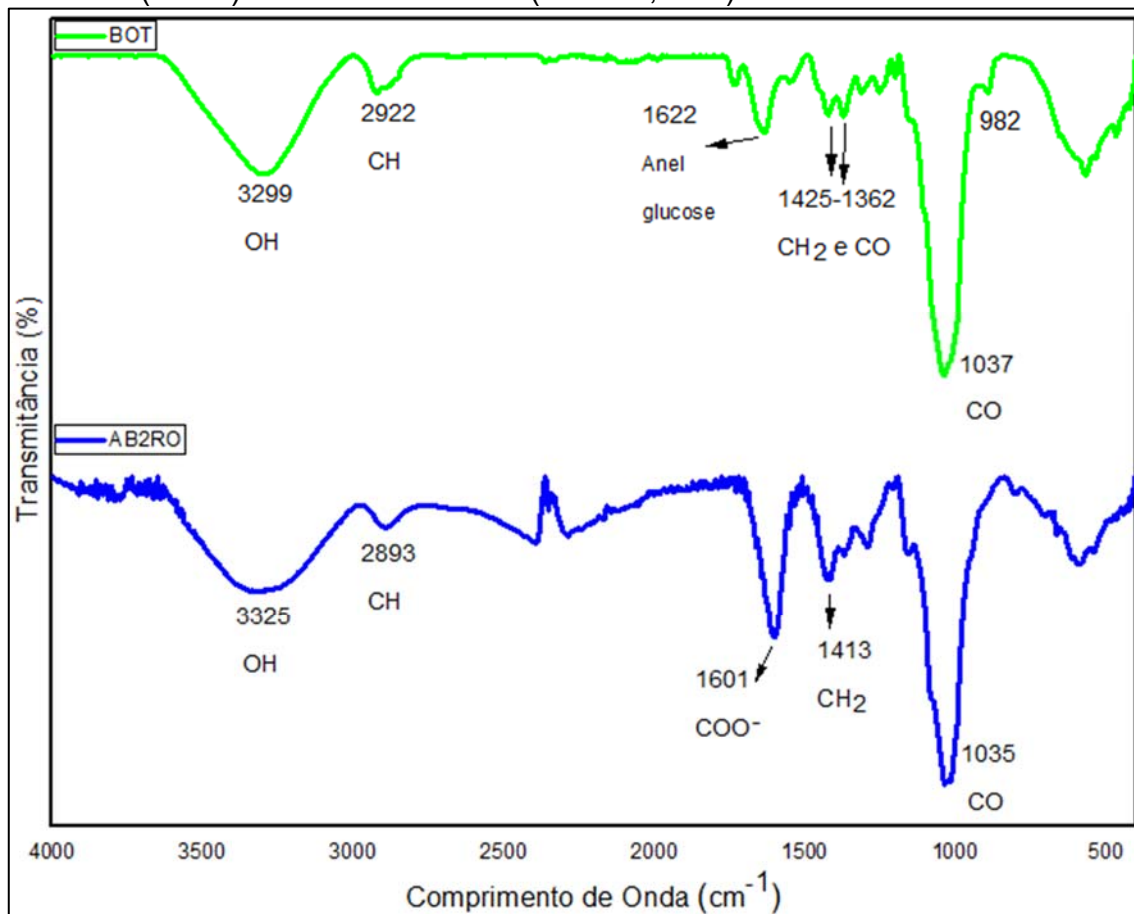
Fonte: A autora (2021).

O produto do processo de reação de redução foi nomeado como AB2R. Essa amostra não foi caracterizada estruturalmente, pois como já mencionado, a mudança estrutural é tão discreta que nenhum espectro mostraria alteração significativa. Desta forma, após esta etapa, a amostra AB2R foi submetida à reação de oxidação, conforme descrição a seguir.

#### 4.3.2.1 Reação de oxidação da BOT submetida a redução (AB2R)

O produto obtido da reação de oxidação (AB2RO) foi caracterizado por TF-IV, RMN e titulometria. Conforme a figura 26, a vibração simétrica em 1601 cm<sup>-1</sup> indica a presença de grupos carboxilato (COO<sup>-</sup>) no polissacarídeo. As demais bandas indicam o estiramento do grupo OH em 3325 cm<sup>-1</sup>, estiramento CH em 2893 cm<sup>-1</sup>, estiramento CH<sub>2</sub> em 1413 cm<sup>-1</sup> e o estiramento CO em 1035 cm<sup>-1</sup> (THEIS *et al.*, 2019).

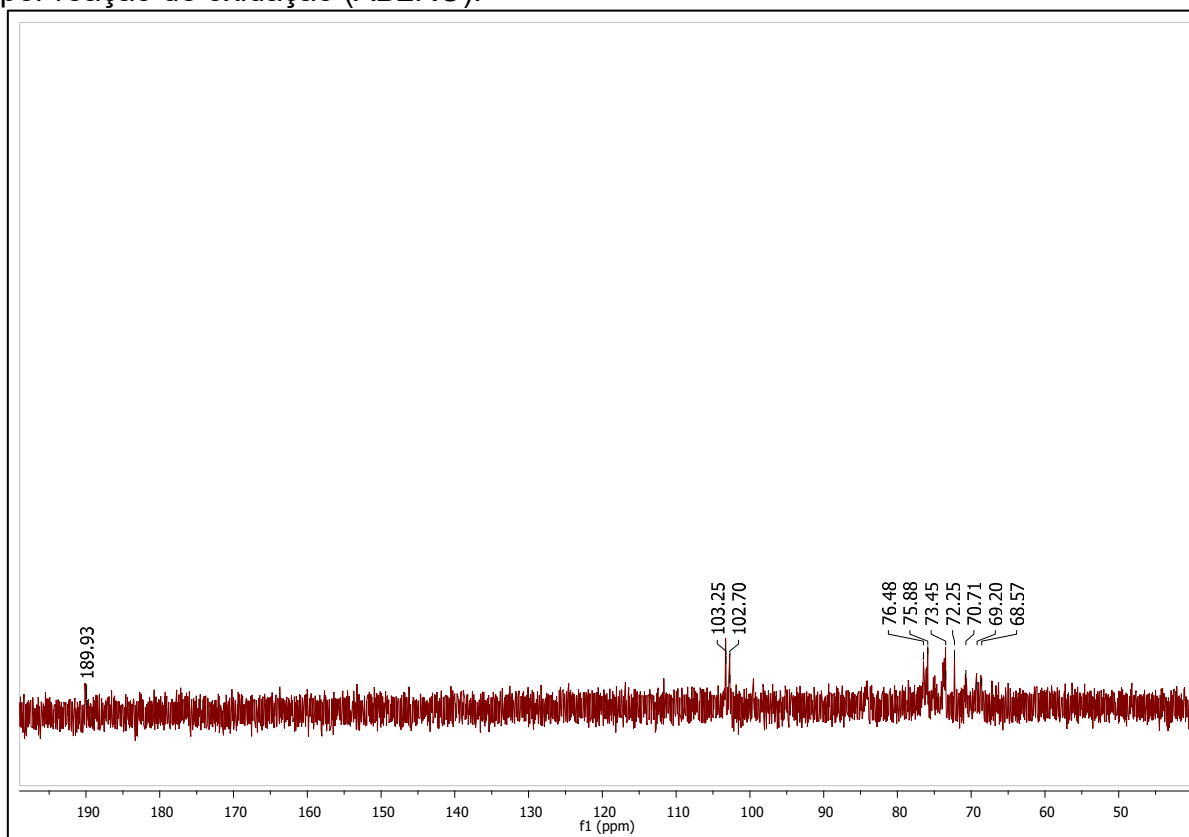
**Figura 26** – Espectro de infravermelho (região entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) das amostras da BOT nativa (verde) e reduzida/oxidada (AB2RO, azul).



Fonte: A autora (2021).

Observando-se o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 27) da amostra oxidada (AB2RO), percebe-se o surgimento do sinal em 189,9 ppm, referente ao C da carboxila identificado na região da carbonila próximo a 180 ppm, sendo então, um indicativo de sucesso na reação. Observando-se que o grupo carboxila na forma de sal de carboxilato possui um átomo de carbono com menor blindagem que aquele de uma carboxila protonada. Assim, justifica-se seu deslocamento químico maior em ppm (WHISTLER, 1976).

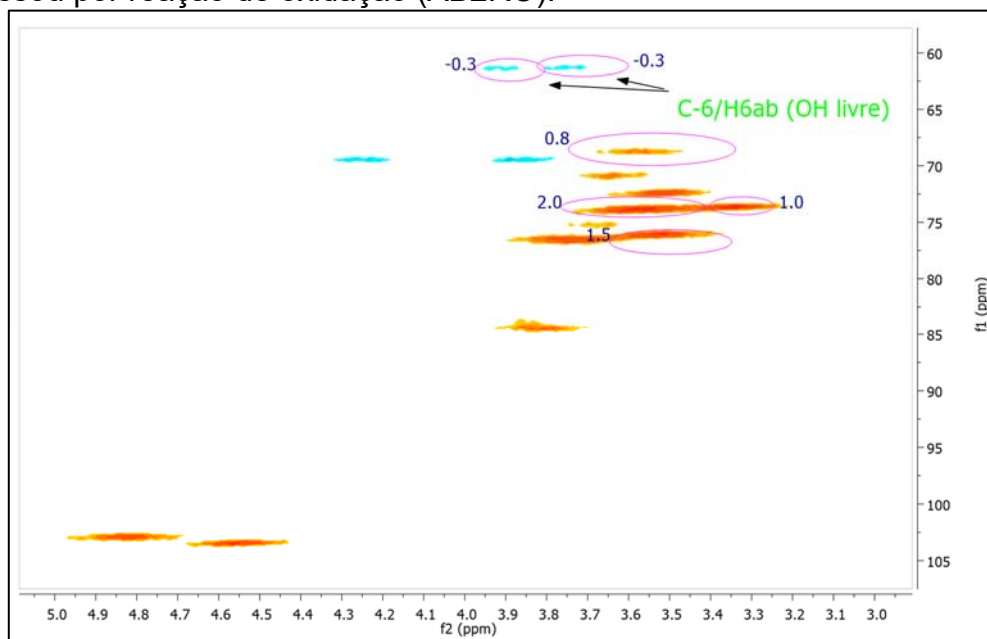
**Figura 27** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra da BOT reduzida (AB2R) que passou por reação de oxidação (AB2RO).



Fonte: A autora (2021).

Analisando o espectro de RMN de HSQC da amostra oxidada AB2RO (Figura 28) e comparando-o com o espectro de RMN de HSQC da BOT nativa apresentado na figura 22, também é possível afirmar que ocorreu a oxidação do polissacarídeo, pois observa-se o enfraquecimento da correlação de C-6/H-6ab. No espectro de HSQC, fazendo a comparação da integral da correlação C-6/H-6ab (unidos a OH livre) com as integrais das demais correlações das unidades  $\rightarrow 3$ -GlcP-(1 $\rightarrow$ ), percebe-se que houve uma diminuição de aproximadamente metade da primeira integral (uma relação de quase 1:2). Os sinais no espectro estão sobrepostos dificultando a identificação da variação do deslocamento químico no HSQC, como foi realizado para a posição primária. Esses dados de RMN de HSQC estão de acordo com o grau de oxidação (DO) de 0,49 obtido na caracterização por titulometria, indicando a oxidação de quase metade dos C-6 livres.

**Figura 28** – Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da amostra de BOT reduzida (AB2R) que passou por reação de oxidação (AB2RO).

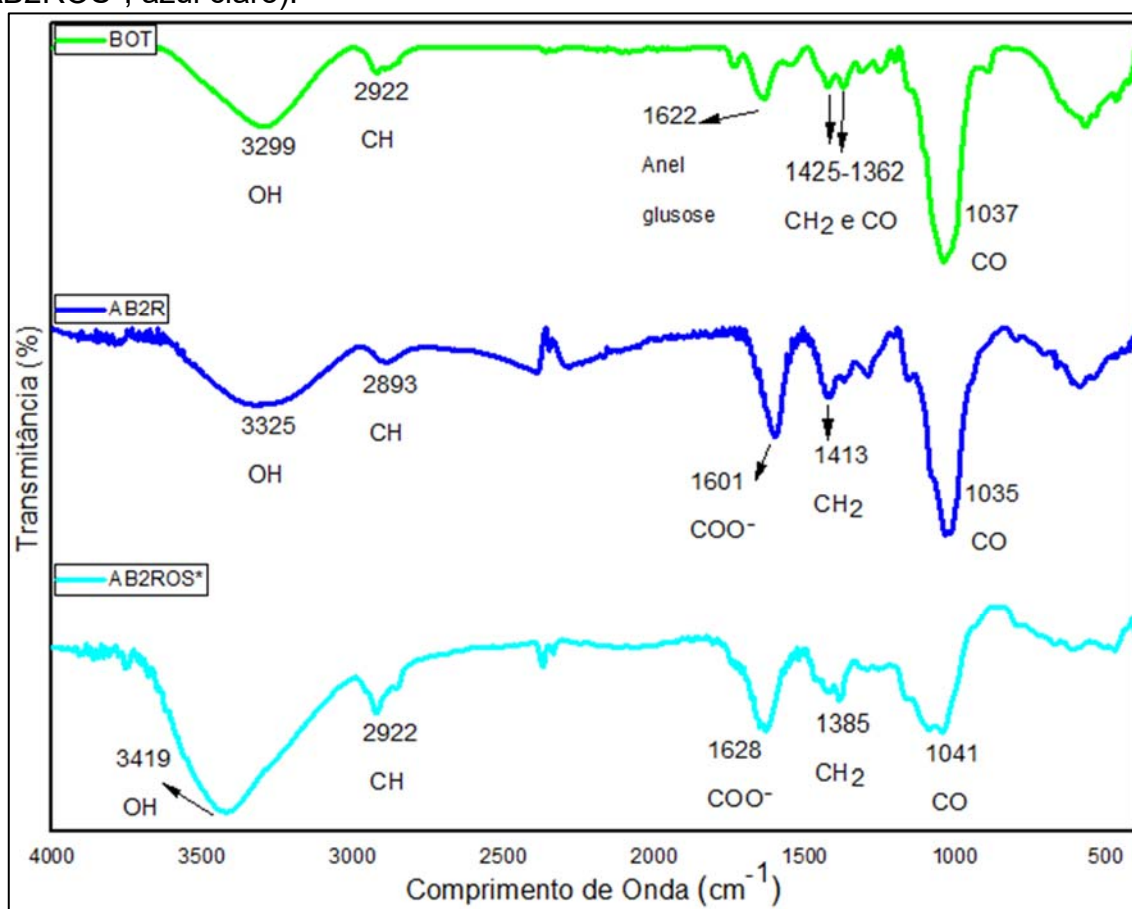


Fonte: A autora (2021).

#### 4.3.2.2 Reação de sulfatação (AB2ROS) da BOT oxidada (amostra AB2RO).

Após a primeira tentativa de sulfatação de AB2RO, conforme o espectro de TF-IV da amostra obtida AB2ROS\* (Figura 29), não foi observada banda referente a vibração assimétrica do grupo C-O-S em  $810\text{ cm}^{-1}$ , característica de grupos sulfato.

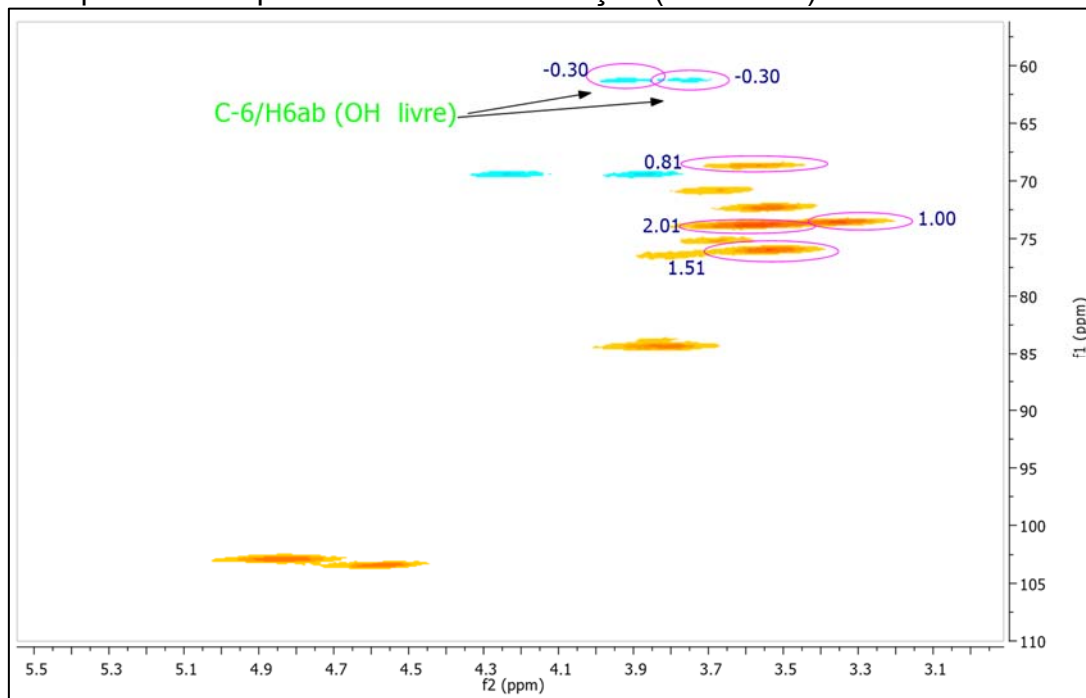
**Figura 29** – Espectro de infravermelho (região entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) das amostras da BOT nativa (verde), oxidada (AB2RO, azul) e que passou por sulfatação - 1ª tentativa (AB2ROS\*, azul claro).



Fonte: A autora (2021).

Sobre o espectro de RMN da amostra AB2ROS\* (Figura 30), observou-se que apareceram as mesmas correlações observadas para o produto de oxidação (AB2RO). Então, não foi possível identificar grupos sulfato na molécula de polissacarídeo. Referente à caracterização pelo método turbidimétrico, foi encontrado um  $\text{DS}=0,05$ , o que equivale a um resultado próximo a zero e, portanto, negligível. Desta forma optou-se por ressulfatar o polissacarídeo.

**Figura 30** – Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da amostra de BOT reduzida e oxidada que sofreu o primeiro ciclo de sulfatação (AB2ROS\*).



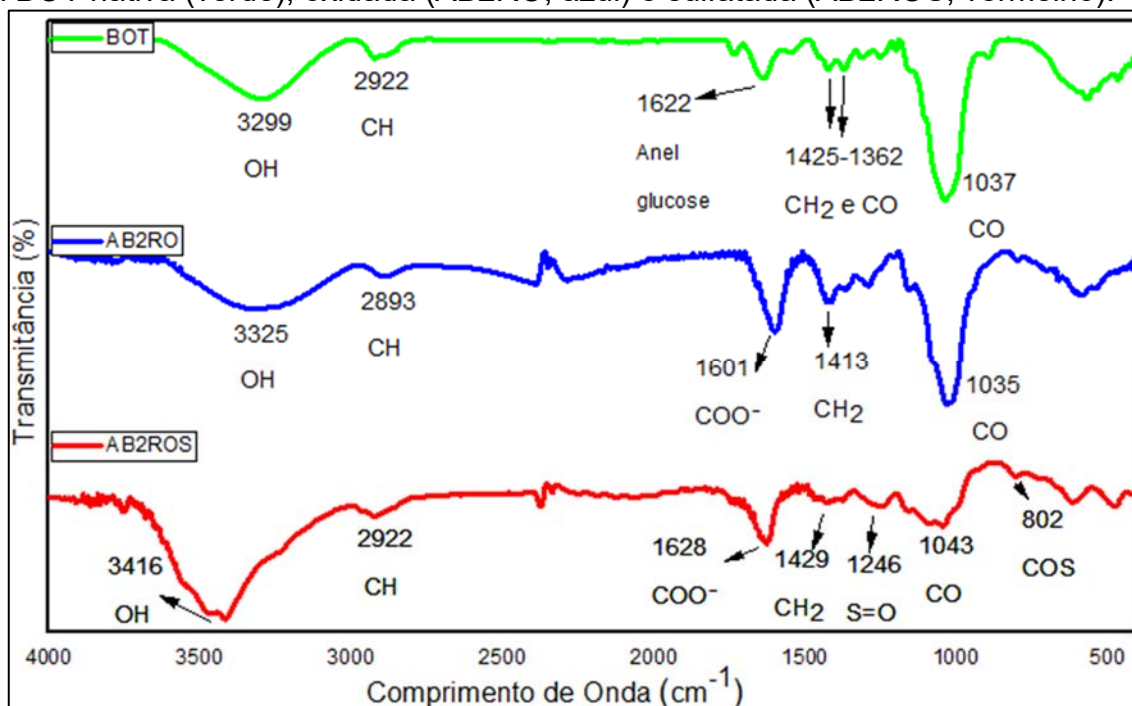
Fonte: A autora (2021).

A explicação para o sucesso da sulfatação obtendo o produto de reação AB2ROS somente na segunda tentativa segue a mesma explicação realizada para o produto de reação AB1OS, pois não houve diferenças nas condições reacionais.

A caracterização da amostra AB2ROS foi realizada por TF-IV, RMN e por teste de turbidimetria, conforme descrito a seguir.

Conforme os espectros de TF-IV (Figura 31) da amostra AB2ROS, observa-se uma banda em  $802\text{ cm}^{-1}$  característica de vibração simétrica do grupo C-O-S e uma banda em  $1246\text{ cm}^{-1}$  de vibração assimétrica de S=O, indicando a presença de grupos sulfato na molécula.

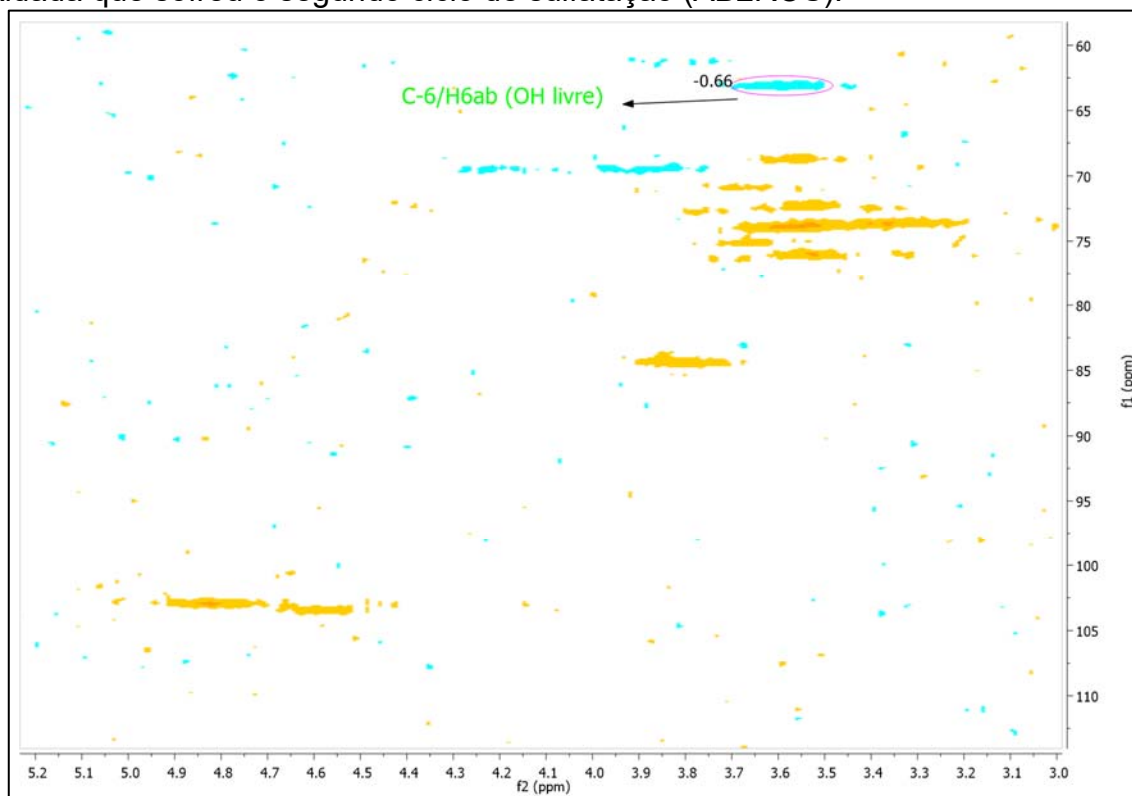
**Figura 31** – Espectros de infravermelho (região entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) das amostras da BOT nativa (verde), oxidada (AB2RO, azul) e sulfatada (AB2ROS, vermelho).



Fonte: A autora (2021).

Através do teste de turbidimetria foi encontrado um DS de 0,27 indicando que existem aproximadamente 3 grupos sulfato a cada 10 unidades de glucose do polissacarídeo. Nos espectros de RMN de HSQC (Figura 32) nota-se a falta do sinal de C-6 sulfatado (67,58/4,31 ppm), portanto, acredita-se que a sulfatação tenha ocorrido nas posições 2 e/ou 4. O motivo para a não ocorrência de sulfatação em C-6 permanece a ser descoberto.

**Figura 32** – Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da amostra de BOT reduzida e oxidada que sofreu o segundo ciclo de sulfatação (AB2ROS).



**Fonte:** A autora (2021).

Na primeira via foi obtido um DS maior e na segunda via uma DS menor. Teoricamente, o produto da segunda via está protegido, pela redução, da despolimerização gerada pelos reagentes de oxidação e sulfatação. Então, supõe-se que ele seja de tamanho molecular maior em relação ao produto da primeira via sintética e, conseqüentemente, apresenta menor solubilidade no meio de sulfatação, resultando em um DS menor. O polissacarídeo da primeira via pode ter sido degradado e adquirido um tamanho molecular menor e, conseqüentemente, sendo mais solúvel no meio reacional, sua sulfatação resultaria em um DS maior. Essa relação de causa e efeito é uma proposta para explicar a diferença entre os DS obtidos, pois o tamanho molecular final destes produtos obtidos por duas vias não foi caracterizado estruturalmente. No entanto, essa possível explicação pode ser considerada, pois, conforme dados da literatura, a reação de oxidação realizada com reagente TEMPO, co-oxidante NaOCl e NaBr, pode ocasionar a despolimerização não desejada no polissacarídeo (SPIER et al., 2017).

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIVIRAL

A avaliação da atividade antiviral dos derivados de BOT obtidos frente aos vírus da dengue e do herpes simples foi realizada pelo Laboratório de Virologia (Dep. de Microbiologia – UEL).

##### 4.4.1 Ensaio Realizado para DENV-2 em Células Vero

Para o teste anti-dengue foram testados os compostos AB1OS, AB1O, AB2ROS e AB2RO. As amostras de polissacarídeo testadas apresentaram atividade antiviral nula contra o vírus da dengue (DENV-2).

No teste de citotoxicidade, realizado por MTT, todas as substâncias, em todas as concentrações testadas (500 µg/mL, 250 µg/mL, 125µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL), resultaram em  $CC_{50} > 500$  µg/mL, mostrando-se potencialmente seguras para uso.

Neste e em outros testes realizados pelo nosso grupo (LOPES *et al.*, 2021; SACCHELLI *et al.*, 2019) com sorotipos do vírus da dengue, percebeu-se que este vírus é mais resistente a derivados de glucanas carregados negativamente do que o vírus do herpes simples.

##### 4.4.2 Ensaio Realizado para HSV-1 Cepa KOS em Células Vero

Para o teste anti-herpético foram testados os compostos AB1OS, AB1O, AB2ROS e AB2RO.

A avaliação da citotoxicidade dos quatro compostos novamente revelou que nenhum demonstrou citotoxicidade significativa até a maior concentração testada ( $CC_{50} > 500$  µg/mL). Este resultado está de acordo com Chen e Huang (2018) que ressaltam que polissacarídeos extracelulares (EPS) apresentam menor toxicidade para células Vero, além de serem considerados mais seguros.

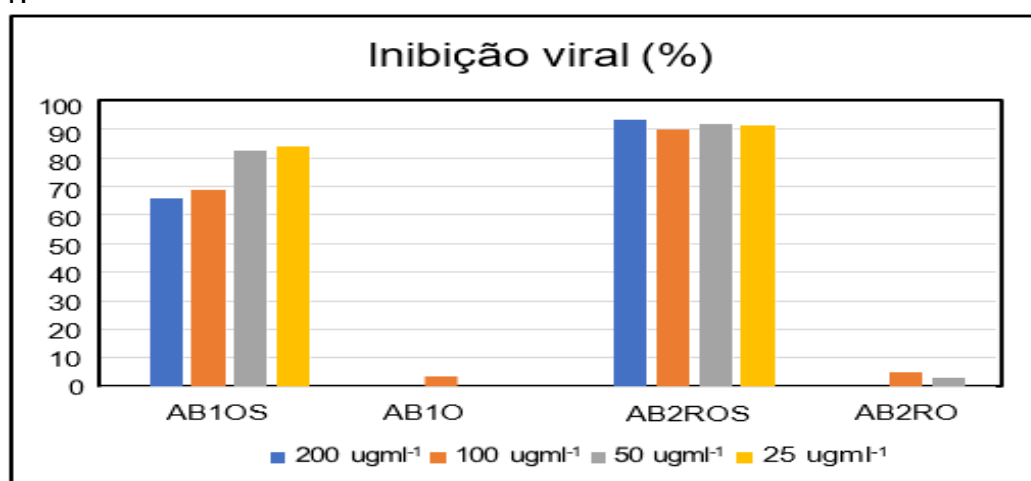
A seguir são apresentados os dados (Tabela 1 e Figura 33) da inibição viral em porcentagem para os compostos testados.

**Tabela 1** – Índice de inibição da infectividade viral expresso em porcentagem para HSV-1.

Concentrações	Inibição viral % (IV%)			
	AB1OS	AB1O	AB2ROS	AB2RO
200 µg mL <sup>-1</sup>	65,58	0	93,22	0
100 µg mL <sup>-1</sup>	68,65	3,39	89,64	4,9
50 µg mL <sup>-1</sup>	82,2	0	91,55	3
25 µg mL <sup>-1</sup>	83,61	0	91,15	0

Fonte: A autora (2021).

**Figura 33** – Índice de inibição da infectividade viral expresso em porcentagem para HSV-1.



Fonte: A autora (2021).

Analisando os dados contidos na tabela 1 e expressos no gráfico da figura 33 para melhor visualização, observa-se que as amostras oxidadas e sulfatadas AB1OS e AB2ROS apresentaram atividade antiviral para HSV-1 com altas porcentagens de inibição viral para todas as concentrações testadas. Por sua vez, as substâncias somente oxidadas AB1O e AB2RO apresentaram inibição viral praticamente nula.

A presença de grupos sulfato na estrutura do polissacarídeo é primordial para obter atividade antiviral eficiente, conforme foi verificado em estudos de Sacchelli e colaboradores, (2019) no qual verificaram que as amostras de BOT sulfatadas apresentaram maior potência antiviral para HSV-KOS, HSV-AR e DENV-3, quando comparadas com a atividade do polissacarídeo nativo. A atividade antiviral

está relacionada ao grau de sulfatação presente no polissacarídeo (CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019).

Em estudos, Sacchelli e colaboradores (2019) obtiveram atividade crescente para o DENV-3 com polissacarídeos sulfatados com DS de 0,4 e 1,1. Lopes e colaboradores (2021) relataram atividade antiviral para DENV-2 com DS de 0,2 de derivados sulfatados-carboximetilados, observando que a presença de grupos carboxila e sulfato na estrutura do polissacarídeo está relacionada com a atividade antiviral. No presente estudo, ficou nítido que a simples presença dos grupos carboxila (AB1O e AB2RO) não é suficiente para a obtenção da atividade antiviral, mostrando-se necessária a presença dos grupos sulfato.

Comparando os resultados anti-herpes (HSV-1) obtidos neste estudo com os resultados para HSV-1 de estudos realizados no nosso grupo de pesquisa, foi obtida atividade anti-herpética com DS de 0,1-0,4 (LOPES e colaboradores, 2021) e agora, com DS de 0,3-0,8, obteve-se alta porcentagem de atividade antiviral. Entretanto, a comparação ainda não pode ser plenamente realizada devido à falta dos dados de  $IC_{50}$  dos derivados deste trabalho, ainda assim as porcentagens de inibição apontam para  $IC_{50}$  bastante baixos, o que é um grande destaque.

## 5 CONCLUSÃO

O presente estudo, amparado em resultados prévios do grupo de pesquisa, deu sequência em estudos de otimização da atividade antiviral da BOT modificada estruturalmente. Através de novas rotas sintéticas, grupos aniônicos como carboxilatos e sulfatos foram inseridos na BOT nativa, resultando em derivados aniônicos da BOT miméticos do HS. Os produtos da reação regioseletiva de oxidação realizada nos C-6 livres da BOT foram caracterizados por TF-IV, RMN e titulometria, obtendo-se  $DO=0,45$  para a amostra AB1O e  $DO=0,49$  para a amostra AB2RO. Não há relato na literatura de derivados oxidados da BOT, portanto, estas substâncias são inéditas. Os produtos de reação de sulfatação foram caracterizados por TF-IV, RMN e turbidimetria, obtendo-se  $DS=0,8$  para a amostra AB1OS e  $DS=0,27$  para a amostra AB2ROS. Propostas de regioseletividade para as reações de sulfatação foram discutidas.

A reação de redução realizada com o intuito de proteção da cadeia polissacarídica pode ter influenciado nos resultados obtidos de DO e DS. O meio reacional usando TEMPO é descrito na literatura como possível causador da degradação do polissacarídeo durante a reação.

O teste antidengue (DENV-2) resultou em atividade nula para os derivados testados. Contudo, no teste de citotoxicidade realizado, as amostras de polissacarídeo mimético ao heparan sulfato mostraram-se potencialmente seguras para uso.

Para o teste anti-herpético (HSV-1) os compostos miméticos oxidados e sulfatados AB1OS e AB2ROS apresentaram atividade positiva com inibição viral elevada. Já os derivados somente oxidados não exerceram atividade antiviral. A presença dos grupos sulfato foi considerada essencial para esta atividade.

As amostras oxidadas e sulfatadas (miméticos do HS) obtidas mostraram-se seletivas apenas para o vírus da herpes. O que pode ter acontecido é que as glicoproteínas do vírus da dengue não tenham reconhecido os derivados da BOT miméticos ao HS, pois de acordo com Kalia (2011), os HSPGs presentes na superfície celular podem apresentar-se em quantidades e composição diferentes, dependendo dos tipos de células, tecidos e etapas de desenvolvimento. Essa seletividade sugere que novos estudos poderiam ser realizados, visto que a atividade antiviral foi preponderante em apenas um tipo de modelo experimental.

O vírus da dengue parece ser mais resistente aos derivados da BOT miméticos de HS obtidos nesse estudo, o que condiz com resultados de outros trabalhos do grupo de pesquisa.

Todos os derivados miméticos ao heparan sulfato deste trabalho são inéditos na literatura.

## REFERÊNCIAS

- AGELIDIS, A. M.; SHUKLA, D. Cell entry mechanisms of HSV: What we have learned in recent years. **Future Virology**, v. 10, n. 10, p. 1145–1154, 2015.
- AHMAD, M. M. Recent trends in chemical modification and antioxidant activities of plants-based polysaccharides: A review. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, n. 2020, p. 100045, 2021.
- ALKHARSAH, K. R. VEGF upregulation in viral infections and its possible therapeutic implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 2018.
- ARLOV, Ø. et al. Engineered Sulfated Polysaccharides for Biomedical Applications. **Advanced Functional Materials**, v. 31, n. 19, p. 1–52, 2021.
- AZWA, A.; BARTON, S. E. Aspects of herpes simplex virus: A clinical review. **Journal of Family Planning and Reproductive Health Care**, v. 35, n. 4, p. 237–242, 2009.
- BARBOSA, A. M. et al. Structural characterization of Botryosphaeran: A (1→3;1→6)- $\beta$ -D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 16, p. 1691–1698, 2003.
- BARCELOS, M. C. S. et al. Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 9, p. 1475–1495, 2020.
- BARTH, H. et al. Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41003–41012, 2003.
- BEDINI, E.; LAEZZA, A.; IADONISI, A. Chemical Derivatization of Sulfated Glycosaminoglycans. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2016, n. 18, p. 3018–3042, 2016.
- BHAGAVAN, N. V. Simple Carbohydrates. In: **Medical Biochemistry**. 4. ed. San Diego, USA: Elsevier, 2002. p. 133–151.
- BRAGD, P. L.; VAN BEKKUM, H.; BESEMER, A. C. TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides: Survey of methods and applications. **Topics in Catalysis**, v. 27, n. 1–4, p. 49–66, 2004.
- BRASIL, M. DA S. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Ministério ed. Brasília: v. 1. 8 ed.
- CAGNO, V. et al. Heparan sulfate proteoglycans and viral attachment: True receptors or adaptation bias? **Viruses**, v. 11, n. 7, p. 1–23, 2019.
- CAPUTO, H. E.; STRAUB, J. E.; GRINSTAFF, M. W. Design, synthesis, and biomedical applications of synthetic sulphated polysaccharides. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 8, p. 2338–2365, 2019.

CEÑA-DÍEZ, R. et al. Dendrimeric based microbicides against sexual transmitted infections associated to heparan sulfate. **RSC Advances**, v. 6, n. 52, p. 46755–46764, 2016.

CHAKRABORTY, T. **Deadly Diseases and Epidemics: Dengue Fever and Other Hemorrhagic Viruses**. New York: Infobase Publishing, 2008. v. 1

CHEN, L.; HUANG, G. The antiviral activity of polysaccharides and their derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 77–82, ago. 2018.

CORRADI DA SILVA, M. DE L. et al. Chemical characterization and biotechnology applications of fungal glucans. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 85–92, 2006.

CORRADI DA SILVA, M. DE L. et al. Structural characterization of the cell wall d-glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 4, p. 793–798, 2008.

COSENZA, V. et al. Partial and total C-6 oxidation of gelling carrageenans. Modulation of the antiviral activity with the anionic character. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 199–206, 2015.

COSTA, C. R. L. D. M. et al. Exopolysaccharides from *Aspergillus terreus*: Production, chemical elucidation and immunoactivity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 654–664, 2019.

CRUZ, I. O. **O vírus**. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>>. Acesso em: 1 maio. 2021.

CUMPSTEY, I. Chemical Modification of Polysaccharides. **ISRN Organic Chemistry**, v. 2013, p. 1–27, 10 set. 2013.

DE ARAÚJO, C. A. et al. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 483–491, 2013.

DE LA GUARDIA, C.; LLEONART, R. Progress in the Identification of Dengue Virus Entry/Fusion Inhibitors. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–13, 2014.

DE LA IGLESIA, P. et al. Rapid screening tests for determining in vitro susceptibility of herpes simplex virus clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 8, p. 2389–2391, 1998.

DEKKER, R. F. H. et al. **Botryosphaeran – A Fungal Exopolysaccharide of the (1→3)(1→6)-β-D-Glucan Kind: Structure and Biological Functions**. 12. ed. Switzerland: Springer, 2019.

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

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

1962.

DUARTE, M. E. R. et al. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 2, p. 335–347, 2004.

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

GARBER, A.; BARNARD, L.; PICKRELL, C. Review of Whole Plant Extracts With Activity Against Herpes Simplex Viruses In Vitro and In Vivo. **Journal of Evidence-Based Integrative Medicine**, v. 26, p. 1–57, 2021.

GERALDELLI, D. et al. Botryosphaeran, a (1 → 3)(1 → 6)-β-D-glucan, reduces tumor development and cachexia syndrome in obese male rats by increasing insulin sensitivity and FOXO3a activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 985–994, 2020.

GIROGLOU, T. et al. Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. **Journal of Virology**, v. 75, n. 3, p. 1565–1570, 2001.

HAO, C. et al. Marine glycan-based antiviral agents in clinical or preclinical trials. **Reviews in Medical Virology**, v. 29, n. 3, p. 1–9, 2019.

HILGARD, P.; STOCKERT, R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. **Hepatology**, v. 32, n. 5, p. 1069–1077, 2000.

HYDE, K. D. et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, v. 97, n. 1, p. 1–136, 2019.

ISOGAI, A. et al. Review: Catalytic oxidation of cellulose with nitroxyl radicals under aqueous conditions. **Progress in Polymer Science**, v. 86, p. 122–148, nov. 2018.

ISOGAI, A. TEMPO-catalyzed oxidation of polysaccharides. **Polymer Journal**, v. 54, n. 4, p. 387–402, 29 abr. 2022.

JIANG, Y. C. et al. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. **International Journal of Oral Science**, v. 8, p. 1–6, 2016.

KAGIMURA, F. Y. et al. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588–598, 2014.

KALIA, M.; JAMEEL, S. Virus entry paradigms. **Amino Acids**, v. 41, n. 5, p. 1147–1157, 15 nov. 2011.

KNIREL, Y. A. et al. Chemical methods for selective cleavage of glycosidic bonds in the structural analysis of bacterial polysaccharides. **Russian Chemical Reviews**, v. 88, n. 4, p. 406–424, 2019.

LANGESLAY, D. J. et al. Characterizing the microstructure of heparin and heparan

sulfate using N -sulfoglucosamine 1H and 15N NMR chemical shift analysis. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 1247–1255, 2013.

LANZI, C.; CASSINELLI, G. Heparan Sulfate Mimetics in Cancer Therapy: The Challenge to Define Structural Determinants and the Relevance of Targets for Optimal Activity. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2915, 2018.

LEUNG, P. H. et al. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1251–1256, 2009.

LI, L. Q. et al. Anti-inflammation activity of exopolysaccharides produced by a medicinal fungus *Cordyceps sinensis* Cs-HK1 in cell and animal models. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 1042–1050, 2020.

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

LI, X. et al. Application of nonthermal processing technologies in extracting and modifying polysaccharides: A critical review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, p. 1–23, 2021.

LOPES, J. L. et al. Sulfonated and carboxymethylated  $\beta$ -glucan derivatives with inhibitory activity against herpes and dengue viruses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, p. 1–14, 2021.

LUO, M. et al. Modifications of polysaccharide-based biomaterials under structure-property relationship for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 266, p. 118097, 2021.

MADAVARAJU, K. et al. Herpes Simplex Virus Cell Entry Mechanisms: An Update. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 1–18, 2021.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. **Microbiology Insights**, v. 6, p. MBI.S10957, 2013.

MENDES, S. F. et al. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 3, p. 305–309, 2009.

MERCORELLI, B. et al. Sulfated Derivatives of *Escherichia coli* K5 Capsular Polysaccharide Are Potent Inhibitors of Human Cytomegalovirus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4561–4567, 2010.

MITRA, D. et al. The degree of polymerization and sulfation patterns in heparan sulfate are critical determinants of cytomegalovirus entry into host cells. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 8, p. 1–23, 2021.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MÜLLEN, K. **Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, v. 342, n. October, p. 415, 2013., v. 342, p. 415, 2013.

OPAS. **Casos de dengue nas Américas chegam a 1,6 milhão, o que destaca a necessidade do controle de mosquitos durante a pandemia**. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6205:casos-de-dengue-nas-americas-chegam-a-1-6-milhao-o-que-destaca-a-necessidade-do-controle-de-mosquitos-durante-a-pandemia&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6205:casos-de-dengue-nas-americas-chegam-a-1-6-milhao-o-que-destaca-a-necessidade-do-controle-de-mosquitos-durante-a-pandemia&Itemid=812)>. Acesso em: 1 jun. 2021.

ORGANIZATION, W. H. **Treatment, prevention and control global strategy for dengue prevention and control 2**. 1. ed. Geneva: World Health Organization, 2012.

ORSATO, A. **Derivatização química de polissacarídeos para aplicação contra o vírus da Dengue**. In: **Jornada das Arboviroses**. Londrina Actas, 2021.

OSEMWEGIE, O. O. et al. Exopolysaccharides from bacteria and fungi: current status and perspectives in Africa. **Heliyon**, v. 6, n. 6, p. e04205, 2020.

PAHO. Epidemiological Update Dengue. **Who**, p. 1–14, 2020.

PONGENER, I. et al. Developments in the Chemical Synthesis of Heparin and Heparan Sulfate. **The Chemical Record**, v. 21, n. 11, p. 3238–3255, 2021.

PUJOL, C. A. et al. Natural Sulfated Polysaccharides for the Prevention and Control of Viral Infections. **Bioactive Heterocycles V**, v. 11, p. 259–281, 2007.

REED, L. J.; MUENCH, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS<sup>12</sup>. **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.

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

SIEUWERTS, A. M. et al. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC<sub>50</sub>-Values and Cell Survival. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 33, n. 11, p. 813–824, 1995.

SILVA-SENA, G. G. et al. In vivo antimutagenic and antiatherogenic effects of the (1 → 3)(1 → 6)-β-D- glucan botryosphaeran. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 826, p. 6–14, 2018.

SILVA, A. Z. et al. Botryosphaeran reduces obesity, hepatic steatosis, dyslipidaemia,

insulin resistance and glucose intolerance in diet-induced obese rats. **Life Sciences**, v. 211, p. 147–156, 2018.

SIMSEK, M. et al. Progress in Bioactive Polysaccharide-Derivatives: A Review. **Food Reviews International**, published online 07/06/2021.

SPIER, V. C. et al. Polysaccharide depolymerization from TEMPO-catalysis: Effect of TEMPO concentration. **Carbohydrate Polymers**, v. 170, p. 140–147, 2017.

STRAUSS, J.; STRAUSS, E. **VIRUSES AND HUMAN DISEASE**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2002.

SUN, Y. et al. Versatile types of polysaccharide-based drug delivery systems: From strategic design to cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 1–21, 2020.

SYNYTSYA, A.; NOVAK, M. Structural analysis of glucans. **Annals of Translational Medicine**, v. 2, n. 2, p. 1–14, 2014.

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

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

TALARICO, L. B. et al. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, n. 1–2, p. 63–71, 2004.

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

TAVERNIER, M. L. et al.  $\beta$ -(1,4)-Polyglucuronic Acids – An Overview. **The Open Biotechnology Journal**, v. 2, n. 1, p. 73–86, 2008.

TEIXEIRA, R. et al. Natural Products as Source of Potential Dengue Antivirals. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8151–8176, 2014.

THEIS, T. V. et al. Fungal Exocellular (1-6)- $\beta$ -D-glucan: Carboxymethylation, Characterization, and Antioxidant Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2337, 2019.

TRYBALA, E. et al. Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Differ in Their Interaction with Heparan Sulfate. **Journal of Virology**, v. 74, n. 19, p. 9106–9114, 2000.

TYAGI, M. et al. Internalization of HIV-1 Tat Requires Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 5, p. 3254–3261, 2001.

ULLAH, S. et al. Sources, Extraction and Biomedical Properties of Polysaccharides. **Foods**, v. 8, n. 304, p. 1–23, 2019.

VAN LEEUWEN, S. S. et al. Development of a <sup>1</sup>H NMR structural-reporter-group concept for the primary structural characterisation of α-d-glucans. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 6, p. 1114–1119, 2008.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. Three exopolysaccharides of the β-(1→6)-d-glucan type and a β-(1→3;1→6)-d-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 14, p. 2481–2485, 2008.

WANG, Z. et al. Investigation of the biological functions of heparan sulfate using a chemoenzymatic synthetic approach. **RSC Chemical Biology**, v. 2, n. 3, p. 702–712, 2021.

WHISTLER, R. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. ACADEMIC P ed. Oval Road, London: ACADEMIC PRESS, INC. (LONDON) LTD., 1976. v. 7

XU, H.-T. et al. Evaluation of Sofosbuvir (β-D-2'-deoxy-2'-α-fluoro-2'-β-C-methyluridine) as an inhibitor of Dengue virus replication #. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6345, 2017.

ZHANG, F.; ZHANG, Z.; LINHARDT, R. J. Glycosaminoglycans. **Handbook of Glycomics**, p. 59–80, 2010.

ZHANG, Y. et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of exopolysaccharides from submerged culture of *Auricularia auricula-judae*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 978–984, 2018.