

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - IQB
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA LICENCIATURA

WESLANY SOUZA ROCHA

**INIBIDORES DA 3CL^{pro} DO VÍRUS SARS-COV-2: UMA REVISÃO DA
LITERATURA**

Maceió – AL

2023

WESLANY SOUZA ROCHA

**INIBIDORES DA 3CL^{pro} DO VÍRUS SARS-COV-2: UMA REVISÃO DA
LITERATURA**

Monografia apresentada ao corpo docente do curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior

Maceió – AL

2023

**Catálogo na fonte Universidade
Federal de Alagoas Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

R672i Rocha, Weslany Souza.

Inibidores da 3CL^{pro} do vírus SARS-COV-2: uma revisão
da literatura /Weslany Souza Rocha. - 2023.
88 f. : il. color.

Orientador: Edeildo Ferreira da Silva Júnior.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química:
Licenciatura) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de
Química e Biotecnologia. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 74-88

1. SARS-Cov-2. 2. 3CL^{pro} (Protease). 3. Inibidores. I. Título

CDU: 54 : 578.834

*As minhas mães Jussara e Valtira (in memoriam)
por sempre estarem comigo em todos os momentos
da minha vida e apoiarem a minha trajetória de
vida como estudante.*

Dedico

Ao meu querido irmão Wesley pelo carinho, união, apoio e acima de tudo por sempre acreditar no meu sonho. Em especial, por buscarmos conforto e fortaleza nos últimos meses desse ano.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pela saúde, dom do estudo e forças para me manter focada nos objetivos todos os dias.

À minha amada família, as minhas mães, Jussara e Valtira (*in memoriam*) por todo amor incondicional, educação, exemplo, admiração e acreditarem no meu potencial. E, ao meu irmão Wesley, por sonhar comigo todos os dias, admiração e sem vocês a minha trajetória seria solitária e difícil.

A minha amiga Cleide, por sempre me apoiar e sonhar comigo todos os dias, admiração, cuidado, conselhos, carinho, exemplo de dedicação e profissionalismo e incontáveis conversas e momentos que levo para vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edeildo Ferreira, pela maestria na orientação, carinho, amizade, admiração, exemplo de dedicação e profissionalismo, por abrir as portas do Laboratório de Química Medicinal que faço parte e foi fundamental na minha afinidade com o mundo da Química Biológica e Molecular.

Ao Prof. Dr. João Xavier, pelas orientações, oportunidades agraciadas durante o meu tempo na iniciação científica e incentivo com a pesquisa no Laboratório de Química Medicinal.

Ao Prof. Dr. Thiago Aquino, pela parceria do seu laboratório RMN com o LQM, pelas ajudas com as amostras, reagentes e vidrarias.

A Prof^a. Dr^a. Ruth Rufino, pelo carinho, dedicação, orientações, amizade, dicas sábias, admiração, cuidado e por ter sido a primeira a me introduzir no mundo da pesquisa desde o início do curso quando fazia parte do Laboratório de Ecologia Química.

A Prof^a. Dr^a. Fabiane Caxico, pela parceria do seu laboratório LEMAN com o de Ecologia Química, pelas aulas durante a graduação, carinho, dedicação, amizade, cuidado, admiração, risadas únicas e conselhos que levo para vida toda.

Aos meus companheiros do LQM Jéssica, Wadja, Detti, Beatriz, Paulo, Davdson, Samuel, Leandro, Manuele e Érica pelo compromisso com a pesquisa, amizade e tornaram a jornada mais agradável como uma grande família. E, aos meus ex-companheiros do Laboratório de Ecologia Química, pelo empenho com a pesquisa, ajudas, carinho, respeito e amizade.

Aos técnicos José Joubert de Alencar Gonçalves pelas ajudas de coleta de campo e amizade, e ao Aldy dos Santos pelo trabalho com as vidrarias.

Aos meus bons amigos da graduação, Marta, Íris e Neuds pelas alegrias e tristezas compartilhadas e foram as minhas primeiras amigas na Química-bacharel. Em especial, à Rafaela, Delma, Lucas, Glenn, Evelyn, Alessandra, Wanessa, Pedro, Aline e Beatriz, suas

amizades foram um dos maiores ganhos, inspiração e alento no caminho universitário.

A todos que me marcaram nos diversos projetos e intentos que participei na UFAL.

A FAPPEAL, UFAL e CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica durante o período de pesquisa.

A todos os professores do Instituto de Química e Biotecnologia pelos ensinamentos transmitidos, direta ou indiretamente.

E, por fim, com imenso carinho a todos que auxiliaram diretamente ou indiretamente na minha formação acadêmica.

RESUMO

Os coronavírus (CoVs) são vírus pertencentes à família *Coronaviridae* (subfamília: *Coronavirinae*) e ordem *Nidovirales*. O SARS-CoV-2 é responsável por causar a COVID-19, que teve início em dezembro de 2019 em Wuhan na China, sendo declarada como pandemia em março de 2020. Dentre as formas de contaminação, pode-se citar objetos infectados, gotículas expelidas no ar e o contato direto com o indivíduo contaminado (inalação de aerossóis). O SARS-CoV-2 possui 3 proteínas estruturais e 16 não estruturais, em que a protease principal (3CL^{pro}) desempenha papel crucial na replicação desse vírus. Dessa forma, a inibição deste alvo se caracteriza como um promissor ponto de partida para o desenvolvimento de compostos antivirais, em adição às vacinas. Então, o objetivo desse trabalho foi agrupar estudos por meio de pesquisas na literatura sobre inibidores da 3CL^{pro} do SARS-CoV-2 e organiza-los de acordo com a origem dos mesmos, podendo ser natural, sintética, semissintética e obtidos por triagem virtual. A escolha dos estudos foi por meio de pesquisas nas bases de dados Science Direct, Google Scholar, Springer, PubMed, Nature, SciFinder e as escolhas do material científico por palavras-chave e critério de inclusão/exclusão. Assim, foi possível compilar e encontrar estudos das quatro diferentes origens de inibidores da 3CL^{pro} do SARS-COV-2. Por fim, o presente trabalho representa uma rica fonte de acesso a diversas pesquisas científicas no foco de desenvolvimento de inibidores da 3CL^{pro} do SARS-CoV-2 para fins terapêuticos, que por meio da visão da química medicinal essas moléculas poderão ser usadas para estudos futuros afim de ter compostos promissores para o desenvolvimento de fármacos.

Palavras-chave: COVID-19. 3CL^{pro}. Inibidores. Naturais. Sintéticos. Semissintéticos. Triagem virtual. Revisão.

ABSTRACT

Coronaviruses (CoVs) are viruses belonging to *Coronaviridae* family (subfamily: *Coronavirinae*) and *Nidovirales* order. SARS-CoV-2 is responsible for causing COVID-19, which began in December 2019 in Wuhan, China, and was declared a pandemic in March 2020. Among the forms of contamination, one can mention contaminated objects, droplets expelled in the air, and direct contact with the infected individual (inhalation of aerosols). SARS-CoV-2 has three structural and 16 non-structural proteins, in which the main protease (3CL^{pro}) plays a crucial role in the replication of this virus. Thus, the inhibition of this target is characterized as a promising starting point for the development of antiviral compounds, in addition to vaccines. So, the objective of this work was to compile studies through research in the literature on SARS-CoV-2 3CL^{pro} inhibitors and organize them according to their origin, which can be natural, synthetic, semi-synthetic, and obtained by virtual screening. The choice of studies was based on searches in the Science Direct, Google Scholar, Springer, PubMed, Nature, SciFinder databases and the choices of scientific material by Keywords, and inclusion/exclusion criteria. Thus, it was possible to compile and find studies of the four different origins of SARS-COV-2 3CL^{pro} inhibitors. Finally, the present work represents a rich source of access to several scientific researches focused on the development of SARS-CoV-2 3CL^{pro} inhibitors for therapeutic purposes, which through the vision of medicinal chemistry these molecules can be used for future studies in order to have promising compounds for drug development.

Keywords: COVID-19. 3CL^{pro}. Inhibitors. Natural. Synthetic. Semisynthetic. Virtual screening. Review.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arquitetura molecular do vírus SARS-CoV-2.....	18
Figura 2. Comparação entre as estruturas genômicas do SARS-CoV, MERS-Co e SARS-CoV-2	19
Figura 3. As estruturas genômicas dos membros dos gêneros de CoVs.....	20
Figura 4. A figura explica sobre as mutações de amino ácidos reportadas na região RBD de diferentes cepas de SARS-CoV-2.....	21
Figura 5. Distribuição geográfica da OMS sobre o COVID-19 no ano de 2022.....	22
Figura 6. Distribuição geográfica da OMS sobre o COVID-19 no ano de 2022 após aplicação das vacinas.....	28
Figura 7. Montagem do complexo de replicação e transcrição (RTC) do SARS-CoV-2 e mecanismos moleculares relacionados à produção de proteínas não estruturais e estruturais (nsps).....	30
Figura 8. Proteínas do hospedeiro SARS-CoV-2.....	31
Figura 9. Simulação da superposição das estruturas do SARS-CoV-2 3CL ^{pro} , SARS-CoV 3CL ^{pro} e MERS-CoV 3CL ^{pro}	34
Figura 10. Mapas da densidade eletrônica dos inibidores de aldeído da 3CL ^{pro} no resíduo Cys ¹⁴⁵	39
Figura 11. Estrutura 2D do inibidor (1) interagindo com a do SARS-CoV 3CL ^{pro}	41
Figura 12. Molécula 1 – Estrutura dos inibidores de origem natural.....	41
Figura 13. Molécula 2 - Estrutura dos inibidores de origem natural.....	42
Figura 14. Estrutura 2D do inibidor (3) interagindo com a do SARS-CoV.....	44
Figura 15. Molécula 3 - Estrutura dos inibidores de origem natural.....	45
Figura 16. Estruturas complexas previstas e as representações 2D de SARS-CoV 3CL ^{pro} ..	46
Figura 17. Molécula 4 - Estrutura dos inibidores de origem natural.....	46
Figura 18. Análise de docking molecular <i>in silico</i> do composto 6 que se liga ao SARS-CoV 3CL ^{pro} (A) e PL ^{pro} (B).....	48
Figura 19. Molécula 5 e 6 - Estrutura dos inibidores de origem natural.....	48
Figura 20. Molécula 7 e 8 – Estrutura dos inibidores de origem natural.....	50
Figura 21. Molécula 9 – Estrutura dos inibidores de origem natural.....	51
Figura 22. Molécula 10 – Estrutura dos inibidores de origem natural.....	52
Figura 23. Molécula 11.a, 11.b e 11.c – Inibidor natural.....	53
Figura 24. Modelagem computacional dos compostos (12) (A) que se ligam ao SARS-CoV	

3CL ^{pro}	55
Figura 25. Molécula 12 – Estrutura dos inibidores de origem natural.....	55
Figura 26. Molécula 13 – Estrutura dos inibidores de origem natural.....	56
Figura 27. Molécula 14 e 15 – Estrutura dos inibidores de origem natural.....	57
Figura 28. Molécula 1 e 2 – Estrutura dos inibidores de origem semissintética.....	59
Figura 29. Molécula 3 e 4 – Estrutura dos inibidores de origem semissintética.....	61
Figura 30. Modelagem computacional dos compostos (5) (B) com o sítio catalítico da SARS-CoV 3CL ^{pro}	62
Figura 31. Molécula 5 – Estrutura dos inibidores de origem semissintética.....	62
Figura 32. Molécula 1, 2, 3 e 4 – Estrutura dos inibidores de origem sintética.....	63
Figura 33. Molécula 5 – Estrutura dos inibidores de origem sintética.....	64
Figura 34. Molécula 6 – Estrutura dos inibidores de origem sintética.....	64
Figura 35. Molécula 7 – Estrutura dos inibidores de origem sintética.....	65
Figura 36. Molécula 8 – Estrutura dos inibidores de origem sintética.....	66
Figura 37. Molécula 9 – Estrutura dos inibidores de origem sintética.....	66
Figura 38. Molécula 10, 11, 12, 13 – Estrutura dos inibidores de origem sintética.....	67
Figura 39. Molécula 14 – Estrutura dos inibidores de origem sintética.....	68
Figura 40. Molécula 7 e 8 – Estrutura dos inibidores de origem sintética.....	70
Figura 41. Molécula 9, 10 e 11 – Estrutura dos inibidores de origem sintética.....	71
Figura 42. Molécula 12 – Estrutura dos inibidores de origem sintética.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquematização da taxonomia de <i>Coronaviridae</i>	16
Tabela 2. Algumas das principais vacinas para COVID-19 aprovadas para uso emergencial e total no mundo.....	24
Tabela 3. As 16 proteínas não estruturais dos coronavírus e as suas funções.....	31/32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. Histórico Evolutivo, Definição e Genética dos Coronavírus	14
2.2. Epidemiologia do SARS-CoV-2 e vacinas	20
2.3. Modo de Transmissão e Ciclo Viral do SARS-CoV-2	26
2.4. Proteínas Estruturais e Não Estruturais do SARS-CoV-2	30
2.5. A protease 3CL ^{Pro} (ou protease principal, M ^{Pro})	33
3. OBJETIVOS	35
4. MÉTODOS	36
4.1. Revisão Bibliográfica	36
4.2. Palavras-chaves Utilizadas	36
4.3. Ferramentas de Busca Utilizadas	36
4.4. Critérios de Inclusão/Exclusão	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
5.1. Inibidores da 3CL ^{Pro} Encontrados na Literatura	38
5.2. Inibidores da 3CL ^{Pro} de Origem Natural	39
5.3. Inibidores da 3CL ^{Pro} de Origem Semissintética	58
5.4. Inibidores da 3CL ^{Pro} de Origem Sintética	63
5.5. Inibidores da 3CL ^{Pro} Descobertos por Triagem Virtual	68
6. CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

Desde o primeiro relato da doença do coronavírus 2019 (COVID-19) em dezembro de 2019, a pandemia tem se espalhado pelo mundo todo. Pesquisas intensivas estão atualmente em progresso para encontrar terapias aceitáveis e eficazes para o tratamento da infecção por Coronavírus e das complicações causadas por essa doença. À vista disso, a COVID-19 é uma doença altamente infecciosa causada pela síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), um vírus próximo ao vírus SARS-CoV relatado nas epidemias de 2002 e 2003. Em 15 de Março de 2020, a pandemia se espalhou por muitos países quase meio bilhão de pessoas foram diagnosticadas com a infecção no mundo inteiro. O SARS-CoV-2 se espalha principalmente por meio de gotículas (aerossóis) expelidas por indivíduos infectados, quando respiram, espirram ou tosse. Esses indivíduos infectados podem ser assintomáticos ou desenvolver sintomas comuns de COVID-19, como febre, tosse, fadiga, falta de ar e perda do olfato e, em casos graves, pode manifestar complicações, tais como pneumonia, síndrome do desconforto agudo, falência de múltiplos órgãos e morte. A taxa de mortalidade é estimada entre 3% e 6%. Com isso, o SARS-CoV-2 possui três proteínas estruturais e 16 não-estruturais, em que a protease principal (3CL^{pro}) é responsável pela replicação viral. Desse modo, a inibição desse alvo se mostra promissor ponto de partida para o desenvolvimento de compostos antivirais, em adição às vacinas.

Dessarte, percebe-se o quanto é necessário, iminente e de grande importância a revisão de literatura com os estudos voltados para a 3CL^{pro}, visto que é necessário prevenir e tratar a recorrência de epidemias de Coronavírus. Nesse sentido, o atual trabalho representa uma rica fonte de informações acerca de diversas pesquisas científicas focadas em desenvolver inibidores contra a 3CL^{pro} do SARS-CoV-2. Assim, por meio da visão da química medicinal, tais moléculas poderão ser usadas para estudos futuros afim de ter compostos promissores para o desenvolvimento de fármacos. Os estudos foram compilados e organizados considerando a origem dos compostos, sendo natural, semissintética, sintética e descobertos por estudos de triagem virtual. Deste modo, esse estudo fornece descobertas de inibidores de 3CL^{pro} que podem ser desenvolvidos futuramente como compostos líderes de fármacos contra o SARS-CoV-2.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico Evolutivo, Definição e Genética dos Coronavírus

Em 1º de novembro de 2002, na região Sudeste do continente Asiático, na Província de Guangdong - China, houve o primeiro relato do século XXI de uma pneumonia atípica, cujo posteriormente foi atribuída ao CoV como agente causador desta (CHENG et al., 2004; HIGHLIGHTS, 2022; RAJEEV et al., 2020; SILVA et al., 2020a).

Em julho de 2003, foi possível conter a disseminação da doença, em que o último caso foi reportado nos EUA. No total, 17 países espalhados pelos 5 continentes somaram um total de 8.096 casos confirmados, sendo 774 de óbitos (CHENG et al., 2004; RAJEEV et al., 2020; SILVA et al., 2020a). Ainda nesse período, a transmissão do vírus se dava pelo contato direto com pessoas infectadas ou objetos contaminados gotículas e aerossóis liberados por indivíduos doentes. (CHENG et al., 2004; SILVA et al., 2020a).

Após a epidemia de SARS-CoV em 2002-2003, o MERS-CoV apareceu em Jeddah, Arábia Saudita em 2012, causando infecções no sistema respiratório inferior semelhantes às causadas pelo SARS-CoV, e também com transmissão semelhante (GROOT et al., 2013). Análises filogenéticas concluíram que o genoma do MERS-CoV tem proximidade quase idêntica ao vírus encontrado nos dromedários, animal muito utilizado no Oriente Médio e, portanto, tem contato direto com humanos (AZHAR et al., 2014; STALIN RAJ et al., 2014a). Os sintomas também são semelhantes aos do SARS-CoV e, em casos mais graves, há progressão para uma síndrome aguda de desconforto respiratório, choque séptico, falência múltipla de órgãos e morte (DE GROOT et al., 2013; GROOT et al., 2013; ZAKI et al., 2012). A doença do coronavírus, COVID-19, é uma infecção causada pelo vírus SARS-CoV-2 (SILVA et al., 2020a; WHO, 2022a). Os coronavírus (CoVs) são vírus pertencentes à família *Coronaviridae* (subfamília: *Coronavirinae*) e ordem *Nidovirales*. A subfamília possui quatro gêneros, *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* e *Deltacoronavirus*, isso com base em suas estruturas genômicas e análises filogenéticas (SILVA et al., 2020a; WHO, 2022a).

Sabe-se que os CoVs infectam morcegos, roedores e podem ser transmitidos para mamíferos (*Alfa e Betacoronavirus*), pássaros (*Gamma e Deltacoronavirus*). Além disso, esses quatro gêneros infectam humanos e tem sido rapidamente espalhados e detectados em vários países (GHOSH; NANDI; SAHA, 2022; GULARTE et al., 2022; KUO et al., 2000; RAMBAUT et al., 2020). As variantes recentes, *Gamma*, *Delta* e *Omicron*, surgiram em alguns países no ano de 2021, incluindo Brasil, Índia e Inglaterra (GHOSH; NANDI; SAHA,

2022; KUO et al., 2000; RAMBAUT et al., 2020).

A OMS tem acompanhado a evolução do SARS-CoV-2 desde sua aparição em 2019, bem como o surgimento de novas variantes, que representam um risco potencial para a saúde pública global. Dessa forma, levou o número de análises para caracterização de Variantes de Interesse (VOIs) e Variantes de Preocupação (VOCs) específicas, com o objetivo de priorizar as pesquisas e os monitoramentos globais, assim, informando dados sobre o progresso da pandemia da COVID-19 (RAMBAUT et al., 2021).

As novas variantes do SARS-CoV-2 nomeadas como VOCs são *Alpha* (B.1.1.7), *Beta* (B.1.351), *Gamma* (P1), *Delta* (B.1.617.2) e *Omicron* (B.1.1.529) (GHOSH; NANDI; SAHA, 2022; RAMBAUT et al., 2020; WHO, 2022). Anteriormente, em 1966 houve a primeira descrição dos quatro Coronavírus que infectam humanos HCoV_s (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, HKU1), os quais apresentavam sintomas leves (“International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV”, 2022; SILVA et al., 2020a; WHO, 2022a) (“International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV”, 2022; SILVA et al., 2020; WHO, 2022a).

Já no século XXI, mais dois HCoV_s foram identificados como sendo altamente capazes de infectar humanos, sendo estes SARS-CoV e MERS-CoV. Esses dois vírus são altamente patogênicos e causam severa síndrome respiratória em humanos, enquanto HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 e HKU1 apenas induzem um quadro de doenças moderadas do trato respiratório superior em hospedeiros imunocompetentes (RAJEEV et al., 2020; SILVA et al., 2020a; WHO, 2022b, 2022a). Sempre que a mutação é significativa, ocorre uma mudança na estrutura do vírus, resultando em uma nova linhagem ou variante deste (PAULES; MARSTON; FAUCI, 2020; RAMBAUT et al., 2021; TAN et al., 2020; ZHU et al., 2020). A mutação do SARS-CoV-2 está acontecendo ao longo do tempo, assim resultando em novas variantes (SHEN et al., 2020; TAN et al., 2020; ZHU et al., 2020). Sempre que surge uma nova variante, esta pode ser chamada de “variante emergente”, a qual tem algumas consequências potenciais para uma população, como no aumento da transmissibilidade, morbidade e mortalidade (PAULES; MARSTON; FAUCI, 2020; TAN et al., 2020; ZHU et al., 2020). Algumas dessas variantes têm sido categorizadas como VOCs, VOIs ou ainda variantes sob monitoramento (VUM) baseado em suas transmissibilidades (PAULES; MARSTON; FAUCI, 2020; SHEN et al., 2020; TAN et al., 2020; ZHU et al., 2020).

Atualmente, além das VOCs que são *Alpha* (B.1.17), *Beta* (B.1.351), *Gamma* (P.1), *Delta* (B.1.617.2) e a *Omicron* (B.1.1529), existem as VOIs, que são *Lambda* (C.37) e *MU* (B.1.621), as VUM, que são B.1.1.318, C.1.2 e B.1.640. Além desses, outras variantes monitoradas estão ilustradas na tabela 1 (SHEN et al., 2020).

Tabela 1. Variantes globais para a família *Coronaviridae*.

Variantes			
VOC	VOI	VUM	Outras variantes monitoradas
Alpha (B.1.17)	<i>Lambda</i> (C.37)	B.1.1.318	AV.1, AT.1, P.2, P.3
Beta (B.1.351)	<i>MU</i> (B.1.621)	C.1.2	R.1, B.1.466.2, B.1.1519, C.36.3
Gamma (P.1)		B.1.640	B.1.214.2, B.1.427/B.1.429, B.1.1523
Delta (B.1.617.2)			B.1.619, B.1.620, B.1.526, B.1.525
Omicron (B.1.1529)			B.1.617.1, B.1.630

Fonte: Autora, 2022. Representação e definição dos nomes das variantes de SARS-CoV-2 pelo mundo desde Janeiro de 2020 até 7 de Março de 2022. VOC: Variante de preocupação, VOI: Variantes de interesse e VUM: Variantes sob monitoramento.

Análises de sequenciamento genético para os SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-NL63 e HCoV-229E apontaram tais vírus como originados de morcegos, enquanto HCoV-OC43 e HKU1 são originados de roedores. (SILVA et al., 2020a; WHO, 2022a).

Em adição, é amplamente aceito que os vírus têm existido em seus reservatórios naturais por muito tempo. Entretanto, a transmissão destes para hospedeiros não naturais, como os humanos, é, em grande parte, devido às atividades da civilização moderna, nas quais as atividades agrícolas e de urbanização de regiões rurais possuem imenso impacto sobre esta variável (JONES et al., 2008).

Ainda, considera-se também que, a origem da transmissão dos CoVs a humanos pode ocorrer por meio de um hospedeiro reservatório que, posteriormente, infecta um hospedeiro intermediário. Mesmo que até o momento atual não tenham sido encontrados hospedeiros, o SARS-CoV-2 pode ser controlado, pois sabendo como o vírus se espalha e funciona, haveria uma maior probabilidade de conseguir conter a disseminação deste pelo mundo (HAIDER et al., 2020; JONES et al., 2008; PERBOLIANACHIS et al., 2022).

Assim, a determinação quanto a origem do SARS-CoV-2 ainda é prematura, o que se sustenta é que a COVID-19 é uma possível doença infecciosa de origem animal (GULARTE et al., 2022; JONES et al., 2008; PEIRIS et al., 2003a; PERBOLIANACHIS et al., 2022).

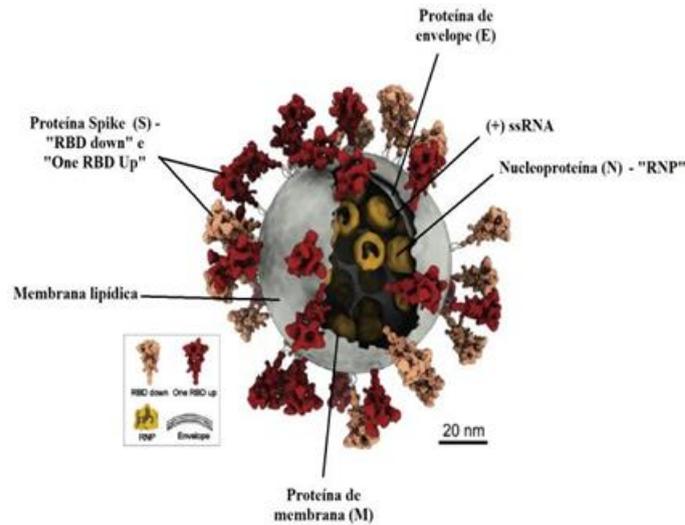
2.1.1 Genoma do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples positiva pertencente ao gênero *Betacoronavirus* (RAINER et al., 2003). O genoma do SARS-CoV-2 é envelopado e possui aproximadamente 30 Kb de comprimento, com um *cap* 5' e uma cauda poli(A) 3'. O RNA genômico se complexa com a proteína básica do nucleocapsídeo (N) para formar um capsídeo helicoidal dentro da membrana.

A membrana de todos os CoVs é composta por no mínimo 3 proteínas estruturais virais; sendo (a) uma proteína spike (S), a qual é um tipo de glicoproteína; (b) uma proteína de membrana (M); e (c) uma proteína de envelope (E), a qual esta é uma proteína altamente hidrofóbica que cobre todo o vírus como mostrado na figura 1 (KUO et al., 2000; REN et al., 2013; WU et al., 2004b; YAO et al., 2020). Para que a replicação viral ocorra é necessário o processamento proteolítico correto da poliproteína por proteases virais, em particular dentre as proteínas não estruturais, a 3CL^{pro} (protease tipo-quimiotripsina) é a principal delas (WU et al., 2004b).

A proteína S possui várias pré- e pós-conformações, nas regiões de domínio de ligação ao receptor (RBD), que são mecanismos de reconhecimento e entrada do vírus SARS-CoV-2 na célula hospedeira (KUO et al., 2000). Os sítios de ligação ao receptor são expostos apenas quando os RBDs adotam uma conformação ascendente. As conformações “RBD-down”, “one-RBD-up” e “two-RBD-up” foram observadas em proteínas S de SARS-CoV-2, expressa de forma recombinante (KUO et al., 2000).

Figura 1. Arcabouço molecular do vírus SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Yao *et al.* 2020. Estrutura tridimensional, das partículas esféricas e elipsoidal do SARS-CoV-2. Ele é reconstruído com projeção da pré-fusão S na conformação “RBD-down” em rosa salmão, e “one-RBD-up” em vermelho, enquanto o envelope lipídico está representado na cor cinza e as ribonucleoproteínas (RNPs) em amarelo. RBD = Domínio de ligação ao receptor. Vírus com RNA de 30 Kb de comprimento e 80 nm de diâmetro.

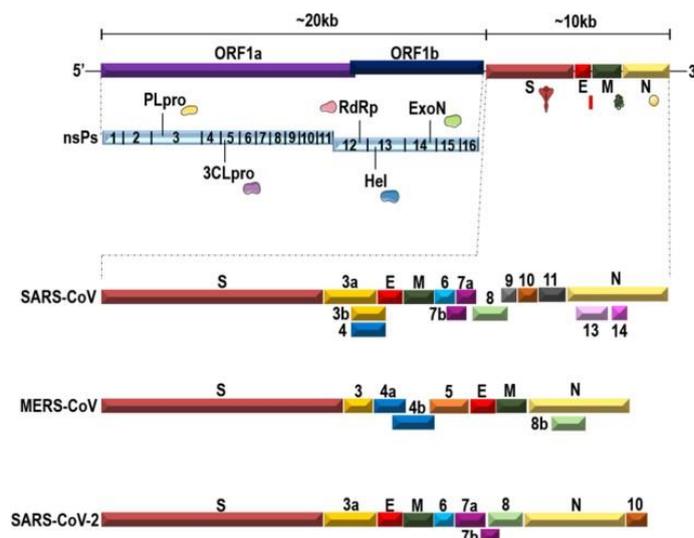
O SARS-CoV-2 é um vírus com genoma RNA com altas taxas de mutações, sugerindo que esse vírus seja mais propenso a evoluir e se tornar resistente aos medicamentos e o sistema imunológico do hospedeiro (DONG; DU; GARDNER, 2020; PAPANIKOLAOU et al., 2022). Com isso, a taxa de mutação ainda permanece incerta, sendo esperadas variantes filogenéticas deste vírus (PAPANIKOLAOU et al., 2022). Assim, torna-se difícil conhecer a origem exata dessas novas variantes do SARS-CoV-2, bem como, acompanhar sua filogenia e taxonomia (BARD; BABADY, 2022). No fim de Junho de 2020, já existiam mais de 35 sequenciamentos do SAR-CoV-2 e suas variantes, com informações importantes (BARD; BABADY, 2022; PAPANIKOLAOU et al., 2022). Mesmo existindo muitos dados disponíveis, não há um sistema definitivo para discutir e nomear as diversas linhagens filogenéticas que formam o vírus (BARD; BABADY, 2022; PEIRIS et al., 2003b). Isso é esperado uma vez que, o SARS-CoV-2 é um vírus recente, porém amplamente investigado (DONG; DU; GARDNER, 2020; PEIRIS et al., 2003b; RAINER et al., 2003).

2.1.2 Estrutura e as suas funções

O sequenciamento completo do genoma do SARS-CoV-2 possui regiões não traduzidas (UTR) em ambas as extremidades e pelo menos 6 genes completos de leitura quadro aberta

(*Open-reading frame - ORF*), como ilustrada na figura 2 abaixo. A primeira ORF (ORF1a/b), considerada aproximadamente dois terços do comprimento do genoma *c'*, pode traduzir diretamente duas poliproteína 1a (pp1a) e poliproteína 1ab (pp1ab) (HUSSAIN et al., 2005; PILLAIYAR; MEENAKSHISUNDARAM; MANICKAM, 2020). Essas poliproteínas são processadas pela protease 3CL^{pro} (também conhecida como protease principal - M^{pro}) e protease tipo papaína (PL^{pro}) para se tornarem 16 proteínas não estruturais (nsps) (KHALIFA et al., 2021). Essas nsps estão envolvidas na produção do RNA subgenômico, que codifica quatro proteínas estruturais principais. Em seguida, as proteínas são coletadas com nova montagem do genoma de RNA no retículo endoplasmático (ER) e aparelho de Golgi (LI et al., 2022).

Figura 2. Comparação entre as estruturas genômicas do SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2.



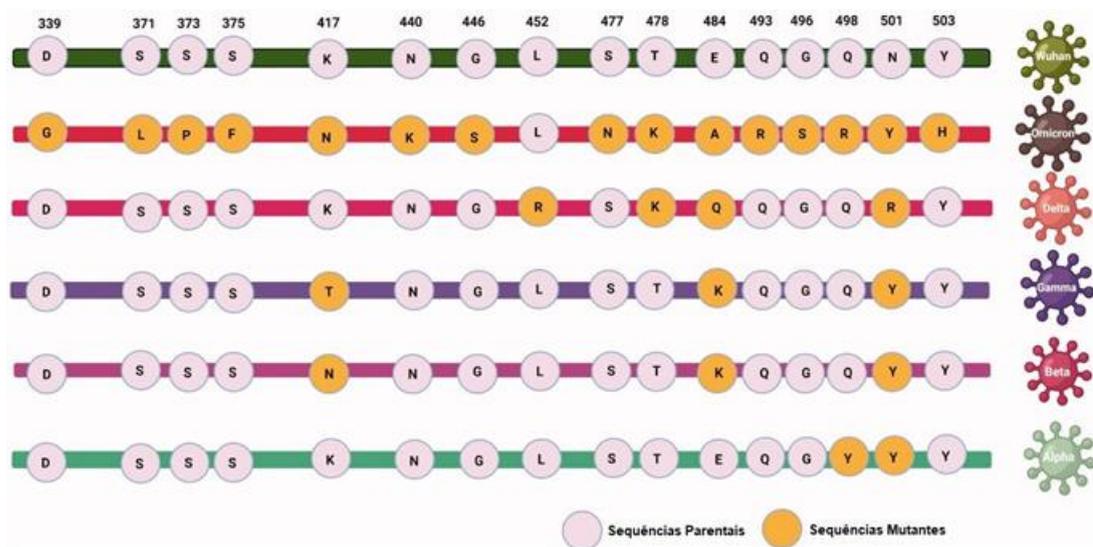
Fonte: Figura com base em sequências completas do genoma do Genbank: AY274119.3, NC_019843.3 e NC_045512.2.

A imagem acima mostra a organização, agora mais específica, dos genomas de SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2. Os genomas dos HCoV são de RNS no sentido positivo com 3 Kb de comprimento programados em proteínas estruturais e não-estruturais. A região terminal 5' codifica a ORFs 1a e 1b dando destaque para o pp1a e pp1b, os quais são clivados dentro de proteínas não-estruturais. A região terminal 3' codifica as proteínas estruturais que irão estar juntas dentro da partícula viral. Essa figura mostra a representação esquemática dos genomas de SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 com ênfase nas proteínas acessórias estruturais, destacando suas as similaridades e as diferenças entre elas.

2.2. Epidemiologia do SARS-CoV-2

O surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2 nos últimos meses representa um dos principais desafios dessa pandemia (FERNANDES et al., 2022). O acúmulo de mutações decorrentes da replicação viral subsequente é um fenômeno natural. Sabe-se que o vírus SARS-CoV-2 se desenvolve a uma taxa de aproximadamente $1,1 \times 10^{-3}$ substituições por local/ano. Isso corresponde a quase uma substituição a cada 11 dias aproximadamente (MARTIN; VANINSBERGHE; KOELLE, 2021). Embora a maioria das mutações não tenha impacto perceptível, poucas mutações foram encontradas para dar origem a novas variantes de alto risco do vírus, como mostrado na figura 3. Além disso, os CoVs da figura 6 são definidos pela OMS como variantes, as quais podem ter fortes evidências de aumento na transmissibilidade, maior gravidade da doença, redução notável na neutralização por anticorpos gerados e, portanto, diminuindo a resposta a tratamentos e vacinas (CDC, 2021; MARTIN; VANINSBERGHE; KOELLE, 2021).

Figura 3. Mutações de amino ácidos reportadas na região de domínio de ligação (RBD) para diferentes cepas de SARS-CoV-2.

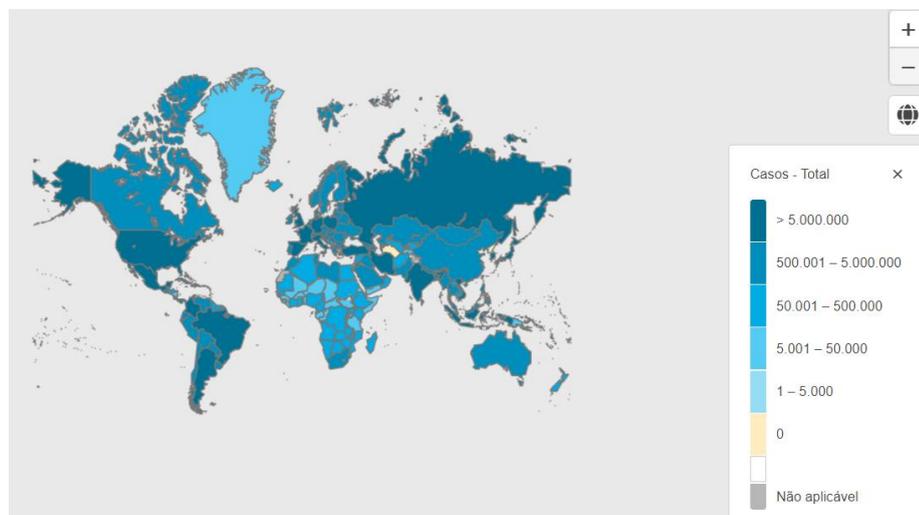


Fonte: Adaptado e traduzido de Fernandes et al, 2022.

Desde o início da pandemia causada pelo SARS-CoV-2, existe um processo de atualização e controle de dados dos casos confirmados acumulados, por data de notificação e óbitos, realizado pela OMS e pelo Ministério da Saúde do Brasil. Para tal, informações oficiais repassadas pelas Secretarias de Saúde dos 195 países e das 27 unidades Federativas Brasileiras são levadas em conta, com o objetivo de ser um condutor oficial de comunicação sobre a

situação epidemiológica de COVID-19 (WHO, 2022c). No mundo, até 18 de março de 2022, tinham sido notificados 464.809.377 casos confirmados acumulados, incluindo 6.062.536 óbitos (Figura 4), segundo a OMS (WHO, 2022c). Já no Brasil, atualmente tem-se 29.478.039 casos confirmados acumulados e 655.940 óbitos. No Nordeste até o dia 19 de março de 2022 foram reportados 6.134.642 casos confirmados acumulados, sendo 127.534 de óbitos (WHO, 2022d). Em Maceió (AL), o número de casos confirmados acumulados é de 295.21 e 6.845 óbitos, até o dia 19 de Março de 2022 (DATA, 2022a; WHO, 2022c).

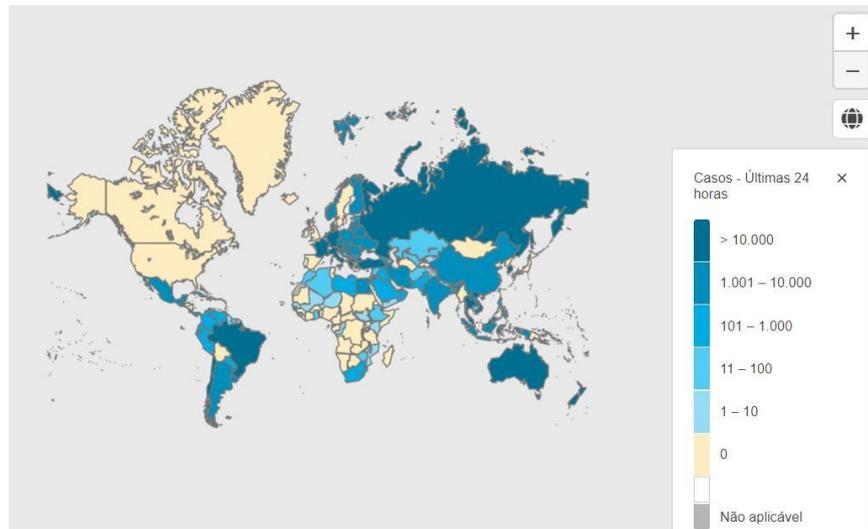
Figura 4. Distribuição geográfica da COVID-19 no ano de 2022.



Fonte: WHO, 2022. No gráfico acima corresponde ao número de casos totais globais confirmados de COVID-19 dividido por países até o dia 18 de março de 2022. Na primeira área (azul escuro) os casos são maiores que 5.000.000. Na segunda área (azul médio) no mapa os números são de 500.001 até 5.000.000. Na terceira área (azul claro) está entre 50.001 até 500.000 de casos confirmados. Na quarta área (azul mais claro), os casos são de 5.001 até 50.000. A quinta área (azul mais claro) os casos estão entre 1 até 5.000. Na sexta área (rosa claro), os casos confirmados são iguais a zero. E na última cor (cinza), são casos não aplicáveis.

Depois de março de 2022, um total de 10.925.055.390 doses de vacina foram administrados globalmente. Isso é igual a 57,7% da população vacinada e, como consequência, os números de casos globais confirmados diminuíram (Figura 5) (DATA, 2022b; WHO, 2022c). No Brasil, o número de pessoas vacinadas é igual a 407.000 e de pessoas totalmente vacinadas é de 159.000. Isso corresponde a 74,4% da população totalmente vacinada. Ainda no Brasil, durante o pior momento da pandemia de COVID-19, a média de novos casos chegou a 77.295 por 24h. Atualmente, após o início da vacinação, esse número caiu para 13.218 (WHO, 2022d).

Figura 5. Distribuição geográfica da OMS sobre o COVID-19 no ano de 2022 após a aplicação das vacinas.



Fonte: Who, 2022. No gráfico acima corresponde ao número de casos confirmados nas últimas 24 horas de COVID-19 dividido por países até o dia 21 de março de 2022. Na primeira área (azul escuro) os casos são maiores que 10.000. Na segunda área (azul médio) no mapa os números são de 1.001 até 10.000. Na terceira área (azul claro) está entre 101 até 1.000 de casos confirmados. Na quarta área (azul mais claro), os casos são de 11 até 100. A quinta área (azul mais claro) os casos estão entre 1 até 10. Na sexta área (rosa claro), os casos confirmados são iguais a zero. E na última cor (cinza), são casos não aplicáveis.

Já para o Brasil, quatro vacinas receberam autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), são elas: CoronaVac (vacina do Butantan feita em colaboração

com a biofarmacêutica chinesa Sinovac), os imunizantes das empresas Pfizer, AstraZeneca e Johnson & Johnson (Janssen). Entretanto, apenas as três primeiras estão enquadradas no Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde (INSTITUTO BUTANTAN, 2022). E, na tabela 2 abaixo, são algumas das principais vacinas para COVID-19 aprovadas para uso emergencial(CARNEIRO; SOUSA; MONTEIRO-CUNHA, 2021) .

Tabela 2. Algumas das principais vacinas para COVID-19 aprovadas para uso emergencial e total no mundo.

País	Desenvolvedor	Vacina	Estratégia	Regime	Eficácia	Armazenamento	Aprovação em...
EUA e Alemanha	Pfizer-Biotech	BNT162b2	mRNA	2 doses	95%	-8 até -60 °C	79 países (EUA, RU, UE, AR, AU, outros)
EUA e Alemanha	Janssen	Ad26.COV2.SAd26		1 dose	74.4 % (US), 64.7 % (Lat. Am), 52.0 % (ZA)	2 até 8 °C	35 países (EUA, UE, CA, ZA, outros)
EUA	Moderna	mRNA-1273	mRNA	2 doses	94%	-25 até -15 °C	41 países (EUA, RU, UE, IL, outros)
Reino Unido e Suécia	Oxford-AstraZeneca	AZD-1222	ChAdOx1	2 doses	70,4%	2 até 8 °C	81 países (RU, EU, BR, IN, MA, outros)
Rússia	Gamaleya	Sputnik-V	Ad26, Ad5	2 doses	91,6%	-18 °C	55 países (RU, AR, AE, GN, outros)
China	CanSino	Ad5-nCoV (Convidecia)	Ad5	1 dose	NA	NA	4 países aprovados (CN, HU, MX, PK)*
China	Sinopharm	BBIBP-CorV	Inactivado	2 doses	NA	2 até 8 °C	27 países (BH, EG, HU, IQ, PE, CS, AE, outros)

China	Sinovac	CoronaVac	Inativado	2 doses	50,4%	2 até 8 °C	19 países (BR, CL, CN, ID, TR, outros)
Índia	Bharat Biotech	BBV152 (Covaxin)	Inativado	2 doses	NA	2 até 8 °C	5 países (IN, IR, MA, NP, ZW, outros)

Fonte: Autora, 2022. AR: Argentina; AE: Emirados Árabes Unidos; AU: Austrália; BH: Bahrain; BR: Brasil; CA: Canadá; CL: Chile; CN: China; EG: Egito; UE: União Europeia; GN: Guiné; HU: Hungria; ID: Indonésia; IL: Israel; IN: Índia; IR: Irã; IQ: Iraque; Lat Am: América Latina; MA: Marrocos; MA: Maurício; MX: México; NP: Nepal; PE: Peru; PK: Paquistão; RU: Rússia; TR: Turquia; RU: Reino Unido; CS: República da Sérvia; ZA: África do Sul; ZW: Zimbábue. *Dados obtidos em Carneiro e colaboradores, 2021.

2.3 Modo de Transmissão e Ciclo Viral do SARS-CoV-2

Atualmente, existem três modos de transmissão do SARS-CoV-2, sendo via *a*) contato direto com indivíduos e superfícies (fômites) infectadas; *b*) gotas respiratórias de larga extensão; e *c*) aerossóis pequenos (transportados pelo ar) (TANG et al., 2020). A transmissão do vírus pelo ar ainda está sendo estudada rigorosamente com novas técnicas de pesquisas para descobrir novos aspectos sobre ele. De acordo com o entendimento tradicional, é envolvido a inalação de aerossóis ou pequenas gotículas infecciosas (5 µm) provenientes de 1 a 2 metros dos indivíduos infectados (WANG et al., 2021).

Alguns estudos detectaram o RNA do SARS-CoV-2 no ar usando o teste de Reação em Cadeia de Polimerase ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (LIU et al., 2020b). As concentrações de RNA têm sido identificadas como sendo 2,9 cópias/L (sala do paciente) (SANTARPIA et al., 2020), 2,6 cópias/L (sala de isolamento) (CHIA et al., 2020), 0,02 cópias/L (banheiro), 0,03 cópias/L (sala de remoção de equipamento de Proteção Individual - EPI) (LIU et al., 2020a). Os outros modos de transmissão como as partículas dos pontos de descarga de águas poluídas, *sprinklers* de águas poluídas, durante a exposição direta durante amostragem/manuseio de águas poluídas, banheiros públicos, etc. Precisam ser investigados de maneira abrangente, como estão sendo feitos para os modos de transmissão aérea, para ter uma visão completa sobre como o vírus está se espalhando em diferentes ambientes. Isso, por sua vez, nos permitir elaborar medidas de prevenção mais efetivas e diretrizes eficazes (KUMAR et al., 2022).

O contato inicial com o organismo hospedeiro ocorre através das mucosas do nariz, boca e olhos (SILVA et al., 2020b). No processo de entrada do Coronavírus (SARS-CoV-2) segue o padrão normal de um ciclo de vida de vírus comum, começando com a ligação do domínio RBD da proteína spike (S) à enzima conversora de angiotensina (ACE2) do hospedeiro (Figura 7). A protease semelhante à tripsina humana da via aérea humana (HAT), catepsinas e a serino protease transmembranar 2 (TMPRSS2) quebram a proteína S e facilitam a fusão da membrana celular e viral e a liberação do RNA do material genético, que acontece dentro da célula hospedeira (DAS et al., 2021; GLOWACKA et al., 2011; SHEREEN et al., 2020; WALLS et al., 2020). Ademais, a TMPRSS2 e poucos outros genes, incluindo o BSG, foram recentemente estudados quanto à variação genética em 131 pacientes positivos para COVID-19, onde foi verificado que a variação dos genes do hospedeiro talvez esteja associada à gravidade e suscetibilidade da infecção (LATINI et al., 2020). Uma vez dentro da célula, a extremidade 5' do RNA tem as ORFs 1a e 1b traduzidas nas poliproteínas pp1a e pp1ab,

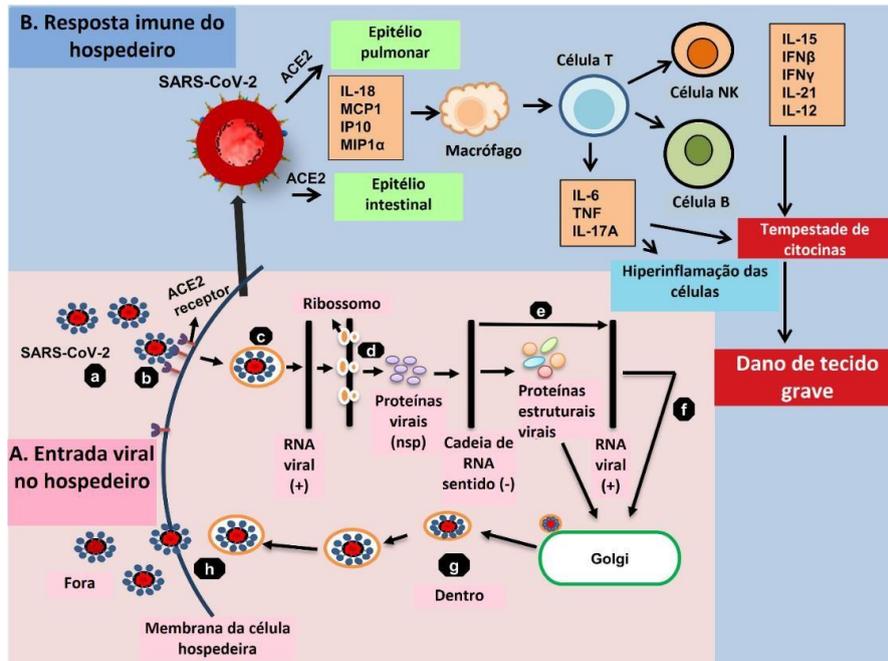
processadas posteriormente em nsP1-11 e nsP1-16, respectivamente (FEHR; PERLMAN, 2015; ZIEBUHR, 2005). Para codificar as duas poliproteínas, o vírus usa uma sequência de códons de parada (5'-UUUAAAC-3') e um pseudonó RNA que causa um deslocamento de quadro ribossomal do quadro de leitura ORF 1a, permitindo a leitura contínua para ORF1b. Assim, a estrutura do pseudonó é desenrolada até encontrar a sequência de parada na ORF1a, impedindo o alongamento contínuo do ribossomo, estendendo a conversão para ORF1b e resultando na tradução de pp1ab (BARANOV et al., 2005; FEHR; PERLMAN, 2015).

A ORF1a do SARS-CoV, SARS-CoV-2 e MERS-CoV tem o domínio PL^{pro} (protease semelhante à papaína) dentro do nsP3, responsável pelo processamento de proteínas replicase maduras. Além disso, ORF1a apresenta outro domínio composto por uma protease do tipo serina, 3CL^{pro} (protease de cisteína do tipo 3C do picornavírus quimotripsina ou protease principal (M^{pro}) dentro de nsP5 (HARCOURT et al., 2004; MARTINA et al., 2005). Enquanto PL^{pro} faz a clivagem nos limites entre nsP1-2, nsP2-3 e nsP3-4. Ainda, 3CL^{pro} é responsável por 11 outros eventos de clivagem restantes (FEHR; PERLMAN, 2015; HARCOURT et al., 2004). As nsP's estão organizadas no complexo replicase-transcriptase (RTC) e possuem outros domínios e funções enzimáticas. Por exemplo, em ORF1b existem nsP's que codificam o domínio de RNA dependente da RNA polimerase (RdRp), RNA helicase, exoribonuclease e uma ribose dependente da atividade de 2'-O-metiltransferase (FEHR; PERLMAN, 2015). Todos essas nsP's com atividades específicas contribuem para a construção de um ambiente que possibilita a síntese de RNA, a replicação e transcrição de RNAs subgenômicos (sgRNAs) e RNAs genômicos (gRNA) (ALANAGREH; ALZOUGHLOOL; ATOUM, 2020; FEHR; PERLMAN, 2015).

A replicação inicia com a síntese de uma polaridade negativa RNA viral que produz gRNA e sgRNAs, que funciona como mRNA para a tradução de proteínas estruturais e acessórias (não estruturais). A partir do complexo RTC, ocorre a transcrição de mRNAs subgenômicos com extremidade 3'-coterminal e gRNA, que possuem em comum uma sequência líder derivada da extremidade 5' do genoma. A partir daí, as proteínas são traduzidas e as proteínas E e M são translocadas para o compartimento intermediário do retículo endoplasmático-Golgi (ERGIC), onde acredita-se ser o local de montagem, brotamento e transporte de vírions (FEHR; PERLMAN, 2015; SCHOEMAN; FIELDING, 2019). As proteínas do nucleocapsídeo embalam o RNA genômico para formar os nucleocapsídeos em estruturas helicoidais. A proteína N então interage com as proteínas E e M, produzindo as partículas semelhantes a vírus (VLPs) que incorporam as proteínas S. Os vírions maduros são transportados para a superfície celular dentro das vesículas e são liberados no espaço

extracelular, permitindo a interação e infecção das células vizinha (FEHR; PERLMAN, 2015).

Figura 6. Montagem do complexo de replicação e transcrição (RTC) do SARS-CoV-2 e mecanismos moleculares relacionados à produção de proteínas não estruturais e estruturais (nsps).



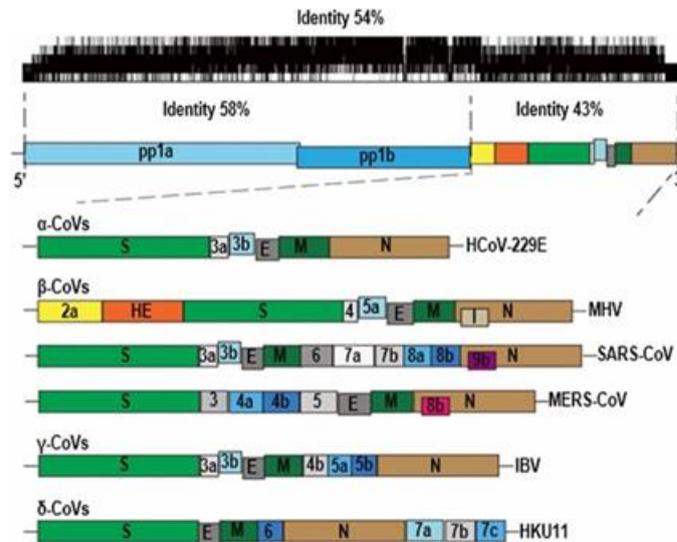
Fonte: Adaptado e traduzido de Das et al, 2021. Visão geral da entrada e resposta imune do hospedeiro levando à tempestade de citocinas e os múltiplos danos de tecidos. A) é a entrada do SARS-CoV-2, replicação, transcrição, tradução e liberação do SARS-CoV-2 para fora. (indicado dentro círculo vermelho). *a.* o Vírus SARS-CoV-2, *b.* ligação da proteína spike com o receptor ACE2, *c.* Endocitose e liberação do genoma viral na célula hospedeira, *d.* Síntese de nsp a partir de poliproteínas por tradução de RNA do genoma usando a maquinaria hospedeira, *e.* Replicação e transcrição do RNA sentido inverso (formação de proteínas estruturais virais), *f.* montagem da fita de RNA (+) e proteínas estruturais na célula de Golgi, *g.* transporte das partículas do vírus maduro para o exterior da célula por meio de vesículas, *h.* exocitose e liberação do vírus SARS-CoV-2. B) A resposta imune do hospedeiro leva à tempestade de citocinas no COVID-19 (indicado no círculo azul).

A inibição da atividade de M^{pro} bloquearia a replicação viral e essencialmente impediria a replicação viral. Já a proteína S, que é dividida em duas unidades funcionais (S1 e S2), é essencial para a interação (adesão) dos vírions com os receptores das células hospedeiras e a subsequente fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira para permitir a infecção (KUO et al., 2000). O genoma de SARS-CoV tem 29.903 nucleotídeos de comprimento contendo 11 ORFs. Todas essas proteínas são cruciais para formar a estrutura do SARS-CoV, especialmente as proteínas N e S, as quais são interessantes candidatas para alvos terapêuticos contra o SARS-CoV (KUO et al., 2000).

O primeiro passo para o ciclo de infecção do vírus envelopado (com o RNA viral) é a interação com receptores celulares e a posterior fusão com a membrana celular, a qual é mediada pela proteína S (KUO et al., 2000). Variações/mutações da proteína S entre as cepas do CoVs são responsáveis pela variedade hospedeira e propensão do vírus em infectar determinadas células de um tecido específico. A proteína N tem funções múltiplas que estão envolvidas em providenciar sinais de importação-nuclear, interferindo em processos celulares, replicação viral e o empacotamento do RNA. Já a proteína E está associada à formação envelope do vírus. A co-expressão das proteínas M e E são resultados da produção do vírus tipo partículas (VLPs), enquanto a expressão da proteína M sozinha não produz (VLPs) (CHEN; LIU; GUO, 2020; TUNG et al., 1992; VENNEMA et al., 1996).

O alinhamento da sequência genômica dos CoVs mostra que 58% deles são idênticos nas regiões codificadas-nsp e 43% são idênticos na codificação-proteína estrutural, compartilhando 54% do genoma total mostrada na figura 3. Isto sugere que as nsps são mais conservadas e as proteínas estruturais são mais diversificadas, uma vez que estas precisam se adaptar a cada novo hospedeiro. Uma vez que a taxa de mutação na replicação do RNA viral é mais alta quando se tratando de um DNA viral, o genoma do RNA viral possui menos do que 10 Kb de comprimento. Entretanto, o genoma do CoV é muito mais longo, com aproximadamente 30 kb de comprimento, sendo um dos RNA virais mais compridos e já conhecidos. Dessa maneira, a manutenção do genoma longo dos CoVs talvez esteja relacionada com a especial função no complexo de transcrição-replicação, o qual contém muitas enzimas de processamento de RNA, como a exorribonuclease 3' e 5' da nsp14 (HUSSAIN et al., 2005).

Figura 7. As estruturas genômicas dos membros dos gêneros de CoVs.

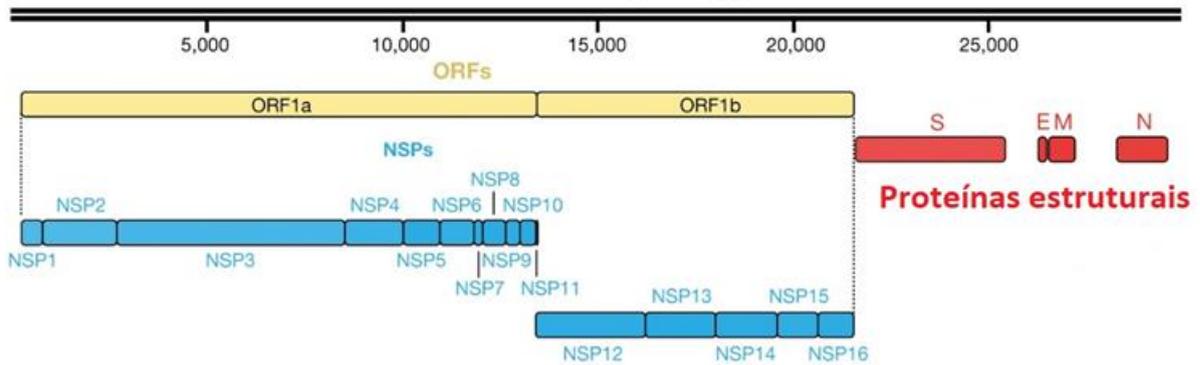


Fonte: Adaptado de Chen *et al.* 2020. A estrutura genômica de quatro genomas de coronavírus. Pp1a e Pp1b representam os dois longos polipeptídios, os quais são processados dentro das 16 proteínas não-estruturais. S, E, M e N indica as quatro proteínas estruturais spike (S), envelope (E), membrana (M) e núcleocapsídeo (N). 2019-nCoV, o novo coronavírus 2019; CoVs, coronavírus; HE hemaglutinina-esterase. Nomes virais: HKU, coronavírus identificado pela Universidade de Hong Kong; HCoV, coronavírus humano; IBV, vírus bronquite infeccioso; MHV, vírus hepatite murina; TGEV, vírus gastroenterite transmissível.

2.4 Proteínas Estruturais e Não Estruturais do SARS-CoV-2

A análise de sequência de isolados de SARS-CoV-2 sugere que o genoma de 30 Kb codifica até 14 quadros de leitura aberta (ORFs) (GORDON *et al.*, 2020). O ORF1a e ORF1ab codificam poliproteínas, as quais são processadas autoproteoliticamente em 16 proteínas não estruturais (nsP1-nsP16) que formam o complexo replicase-transcriptase indicado na figura 8 e na tabela 3. O complexo replicase-transcriptase consiste em várias enzimas, incluindo a protease semelhante à papaína (PL^{pro} ou NSP3), a protease principal (M^{pro} ou $3CL^{pro}$ ou NSP5), o complexo que ocupa o primeiro lugar (NSP7-NSP8), a RNA polimerase primária dependente de RNA (NSP12), uma helicase-trifosfatase (NSP13), uma exoribonuclease (NSP14), uma endonuclease (NSP15) e N7- e 2'0 metiltransferases (NSP10 e NSP16) (BRAGA; SCHMIDT, 1982; CHAN *et al.*, 2020; FEHR; PERLMAN, 2015). No final da 3' do genoma viral, até 13 ORFs são expressos a partir de 9 RNA subgenômicos previstos. Estes incluem quatro proteínas estruturais: spike (S), envelope (E), membrana (M) e núcleocapsídeo (N) e nove fatores acessórios putativos como mostrado na figura 8 (GORDON *et al.*, 2020).

Figura 8. Proteínas do hospedeiro SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado e traduzido de Gordon et al, 2020. n= 4 proteínas estruturais (S, E,M e N) em vermelho. n/NPSs= 16 proteínas não estruturais em azul.

A proteína estrutural spike (S) do SARS-CoV-2 é uma proteína de membrana do tipo I, que forma um trímero, ancorado à membrana do vírus por seu segmento transmembranar, enquanto decora a superfície do vírion com seu grande ectodomínio. Ele se liga à ACE2 em uma célula hospedeira e submete-se a grandes rearranjos estruturais para promover a fusão de membrana (ZHANG et al., 2021). Para a proteína envelope (E), dentre as quatro principais proteínas, é a menor e tem o menor número de cópias das proteínas de membrana encontradas no envelope lipídico de particular de vírus maduras (AL-QAANEH et al., 2021; DUART et al., 2020).

A proteína de membrana (M) é mais prevalente dentro da membrana do vírus e é considerada importante para o processo de crescimento dos Coronavírus. De fato, durante o processo de instalação das partículas virais, esta proteína interage com a própria glicoproteína N, E, S e ela mesma (M) (AL-QAANEH et al., 2021; BIANCHI et al., 2020). A última proteína estrutural é a proteína nucleocapsídeo (N), é um antígeno importante para o coronavírus, que participa do pacote de RNA e liberação de partículas virais (ZENG et al., 2020). A proteína N é altamente imunogênica e abundantemente expressa durante a infecção (LIU et al., 2006). Além disso, a proteína N é usada frequentemente no desenvolvimento de vacinas e ensaios sorológicos (ZENG et al., 2020). No presente, há poucos relatos focados na proteína SARS-CoV-2, e a sua compreensão atualizada da proteína SARS-CoV-2 é uma necessidade urgente (ZENG et al., 2020).

Tabela 3. As 16 proteínas não estruturais dos coronavírus e as suas funções.

Tipo	Funções
------	---------

- nsp1** Promove a degradação do mRNA celular e o bloqueio da tradução da célula hospedeira e da resposta imune inata (HUANG et al., 2011; TANAKA et al., 2012).
- nsp2** Função desconhecida, liga-se a “proibições” (CORNILLEZ-TY et al., 2009).
- nsp3** A protease semelhante à papaína (PLpro), cliva as poliproteínas virais e bloqueia a resposta imune inata, possui múltiplos domínios (LEI; KUSOV; HILGENFELD, 2018).
- nsp4** Proteína *scaffold* transmembrana, formação de DMVs (Vesículas de membrana dupla) (GADLAGE et al., 2010).
- nsp5** 3Lpro, 3C tipo protease, cliva poliproteínas virais, inibe a sinalização de IFN por clivagem de STAT2 (STOBART et al., 2013; ZHU et al., 2017).
- nsp6** Proteína *scaffold* transmembrana, formação de DMVs (*Double Membrane Vesicles*) ou vesícula de membrana dupla, inibe o autofagossomo (ANGELINI et al., 2013; COTTAM; WHEL BAND; WILEMAN, 2014).
- nsp7** Forma um complexo hexadecamérico com nsp8 (TE VELTHUIS; VAN DEN WORM; SNIJDER, 2012).
- nsp8** Forma um complexo com nsp7, pode atuar como primase (TE VELTHUIS; VAN DEN WORM; SNIJDER, 2012).
- nsp9** Dimerização e ligação de RNA (ZENG et al., 2018).
- nsp10** Cofator para nsp14 e nsp16 (DECROLY et al., 2011).
- nsp11** Em pp1a, consiste em um pequeno peptídeo com função desconhecida. Na poliproteína pp1ab, nsp11 é traduzido em nsp12 e devido ao 1-frameshift entre pp1a e pp1b (FEHR; PERLMAN, 2015).
- nsp12** RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (TE VELTHUIS et al., 2010).

- nsp13** RNA helicase, 5'trifosfatase (JIA et al., 2019).
- nsp14** Exo-ribonuclease 3'-5' (*proofreading*), N7-metiltransferase (BOUVET et al., 2012; CHEN et al., 2009).
- nsp15** Endo-ribonuclease, evasão de apoptose e sensores de células dsRNA (BHARDWAJ et al., 2006; DENG et al., 2017).
- nsp16** 2'-O-metiltransferase, inibe RIG-I e MDA5, regulando negativamente a imunidade inata (DECROLY et al., 2011; SHI et al., 2019).

Fonte: Autora, 2023.

2.5 A protease 3CL^{pro} (ou protease principal, M^{pro})

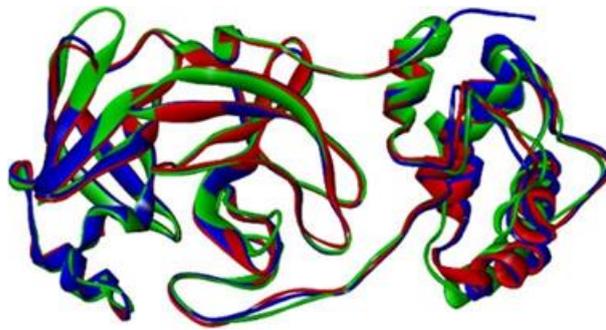
A 3CL^{pro} (também chamada de M^{pro}) é uma protease, correspondente à nsP5, altamente conservada nos HCoV, e assim como a PL^{pro}, é responsável pela clivagem das poliproteínas pp1a e pp1ab, tendo uma função essencial na replicação do vírus (ANAND et al., 2003; TAHIR UL QAMAR et al., 2020). Essa protease cliva a poliproteína viral em 11 sítios conservados, envolvendo a sequência de aminoácidos Leu-Gln/Ser-Ala-Gly, o qual o sítio de clivagem é entre a Gln e a Ser (TAHIR UL QAMAR et al., 2020). Embora, o modelo de clivagem da 3CL^{pro} parece ser conservada no SARS-CoV e no SARS-CoV-2 (ANAND et al., 2003; PERLMAN; NETLAND, 2009), mecanismos adicionais são requeridos no processo das poliproteínas no MERS-CoV, como a dimerização do sítio de ligação no substrato para obter o dímero maduro (TOMAR et al., 2015).

A 3CL^{pro} do coronavírus foi estudada e identificada com três domínios. Os domínios da 3CL^{pro} I e II do N-terminal são folhas β antiparalelas com 6 a 13 fitas β formando uma estrutura semelhante à quimiotripsina (ANAND et al., 2003; TAHIR UL QAMAR et al., 2020). O sítio catalítico de ligação está localizado entre esses dois domínios ligados e uma estrutura de loop conecta o domínio II ao domínio C-terminal III, compondo uma díade de resíduos conservados (cisteína (Cys) e histidina (His)) em ambos SARS-CoV e SARS-CoV-2 (Figura 9) (ANAND et al., 2003; ZHANG et al., 2020a). O domínio III consiste no aglomerado globular de cinco hélices associadas com a dimerização proteica devido às interações entre esses domínios de um de seus monômeros. Também, o domínio III tem sido associado com a atividade proteolítica da

3CL^{pro} (ANAND et al., 2003; TAHIR UL QAMAR et al., 2020; TOMAR et al., 2015).

A 3CL^{pro} faz parte de uma das 16 proteínas não-estruturais do SARS-CoV-2. Depois do vírus entrar, ele deixa o seu RNA genômica dentro do citoplasma da célula hospedeira, a qual é rapidamente convertida em poliproteínas (pp1a e 1ab). Essas poliproteínas são depois clivadas por proteases virais em um total de 16 proteínas não-estruturais, as quais podem servir como alvos essenciais frente à SARS-CoV-2) (ZHANG et al., 2020a).

Figura 9. Simulação da sobreposição das estruturas do SARS-CoV-2 3CL^{pro}, SARS-CoV 3CL^{pro} e MERS-CoV 3CL^{pro}.



Fonte: Liu e colaboradores, 2020. SARS-CoV-2 3CL^{pro} (código PDB: 6LU7, azul), SARS-CoV 3CL^{pro}(código PDB: 1Q2W, vermelho) e MERS-CoV 3CL^{pro} (código PDB: 4RSP, verde).

3. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Compilar estudos científicos que apresentam alternativas para combater os vírus SARS-CoV, SARS-CoV-2 e MERS-CoV por meio da inibição da protease 3CL^{pro}.

2.2. Objetivos Específicos

- Selecionar estudos sobre compostos de origem natural;
- Juntar estudos sobre compostos de origem semissintética;
- Recolher estudos sobre compostos de origem sintética;
- Colecionar estudos sobre compostos descobertos por estudos de triagem virtual.

4. MÉTODOS

4.1. Revisão Bibliográfica

Para elaboração desta revisão bibliográfica foram realizadas pesquisas em bases de dados de textos de jornais e revistas, bem como, artigos e livros científicos, cujo tratassem do tema desse trabalho de conclusão de curso. Para tais buscas, apenas bases internacionais foram utilizadas. Ainda, foram admitidos artigos de acesso aberto (*Open Access*) e fechado (*Under Subscription*). Por fim, a aplicação dos parâmetros descritos abaixo permitiu selecionar um total de 134 trabalhos para análise e elaboração do presente trabalho.

4.2. Palavras-chaves Utilizadas

Para a execução das buscas propriamente ditas, as seguintes palavras-chaves foram usadas: “*Inhibitors*”, “*Synthesis*”, “*Synthetic Compounds*”, “*Natural Compounds*”, “*Natural Products*”, “*Nature-Based*”, “*Nature*”, “*Literature Review*”, “*Epidemiology*”, “*Pathogenic Mechanism*”, “*Treatment*”, em combinação com as palavras “*SARS-CoV*”, “*SARS-CoV-2*”, “*MERS-CoV*” separadas pelo termo AND.

4.3. Ferramentas de Busca Utilizadas

Todas as buscas pelo material científico foram realizadas nas bases “*Science Direct*®”, “*Google Scholar*®”, “*Springer*®”, “*PubMed*®”, “*Nature*®” e “*SciFinder*®”, por meio de acesso via plataforma Periódicos CAPES (<https://www.periodicos.capes.gov.br/>) e utilizando as palavras-chaves citadas anteriormente. Ainda, websites contendo dados epidemiológicos também foram utilizados, tais como “*Ministério da Saúde - MS* (<https://saude.gov.br/>)”, “*World Health Organization - WHO* (<https://www.who.int/>)” e “*Centers for Disease Control and Prevention - CDC* (<https://www.cdc.gov/>)”. Além destes, os bancos de moléculas e proteínas “*DrugBank* (<https://www.drugbank.ca/>)” e “*RCSB Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>)” também foram acessados.

4.4. Critérios de Inclusão/Exclusão

No presente estudo foram apenas incluídos trabalhos revisados por pares, escritos em inglês, provenientes de periódicos indexados, sem restrição temporal. Dessa forma, artigos/textos publicados até 2022 foram analisados e utilizados para confeccionar esse TCC. Por fim, os trabalhos obtidos na literatura, após aplicação dos critérios supracitados, cujo não se enquadravam aos critérios de inclusão, foram excluídos da análise.

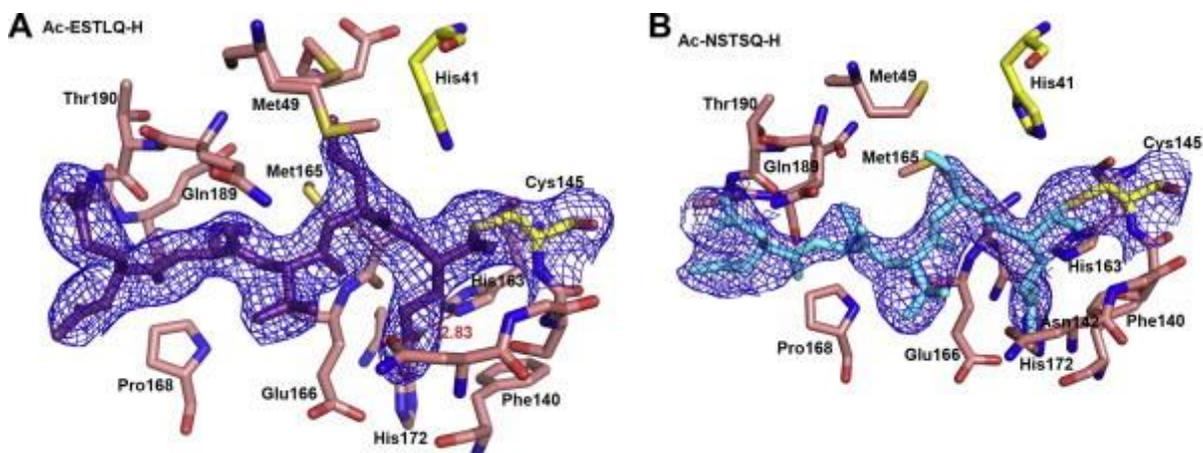
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Inibidores da 3CL^{pro} Encontrados na Literatura

Do ponto de vista da química medicinal, um avanço imperativo e promissor para combater a COVID-19 é desenvolver moléculas que possam inibir o processamento essencial da poliproteína principal, nesse caso, via 3CL^{pro}. Como a 3CL^{pro} é muito crucial para a replicação viral (LEYSEN; DE CLERCQ; NEYTS, 2008), juntamente com a protease semelhante à papaína (PL^{pro}), constituindo um importante alvo na pesquisa de inibidores antivirais seletivos e eficazes contra SARS-CoV (MCKEE et al., 2020; WU et al., 2020). Vários inibidores sintéticos da 3CL^{pro} tem sido reportado, entretanto, eles possuem atividade relativamente fraca (KONWAR; SARMA, 2021). Há várias técnicas de desenvolver inibidores para o SARS-CoV-2, como as técnicas de FBDD (no inglês, *fragment-based drug design*), triagem virtual e experimental, descoberta de fármacos baseada em estrutura (SBDD), têm sido utilizadas pelos pesquisadores na busca de pequenas moléculas inibidoras desta cisteína protease e suas implicações nas células de mamíferos (DE WILDE et al., 2014). Também, nas últimas duas décadas, juntamente com os avanços no campo computacional, a experimentação química em laboratório tem sido auxiliada também por matemática, química, física e algoritmos (JAWARKAR et al., 2022).

Estruturalmente, os inibidores da 3CL^{pro} podem ser classificados como peptídeos e não-peptidomiméticos. Peptidomiméticos copiam inicialmente os substratos dos peptídeos naturais e se ligam à 3CL^{pro} e formam um complexo não covalente. Seus grupos principais, os quais estão espacialmente muito próximo dos resíduos catalíticos da proteína alvo, estão sujeitos a um ataque nucleofílico para catalisar a formação de ligações covalentes com a cisteína (GHOSH et al., 2005; JACOBS et al., 2013; KIM et al., 2013; WEI et al., 2006). Esses grupos principais, possuem principalmente aceptores de Michael, aldeídos e diferentes tipos de cetonas, que se ligam covalentemente ao resíduo Cys¹⁴⁵ no bolso S1' da 3CL^{pro} para exercer um efeito inibitório (GOETZ et al., 2007; SYDNES et al., 2006; ZHANG et al., 2006; ZHU et al., 2011).

Figura 10. Mapas da densidade eletrônica dos inibidores de aldeído da 3CL^{pro} no resíduo Cys¹⁴⁵.



Fonte: Zhu e colaboradores, 2011. Ligação do inibidor no sítio tivo do SARS-CoV da 3CL^{pro}. Os mapas de densidade de elétrons são ilustrados para inibidores (A) que é denominado de Ac-ESTLQ e o (B) que é denominados de Ac-NSTSQ-H. O sítio catalítico Cys¹⁴⁵ do SARS-CoV 3CL^{pro} forma um tio-hemiacetal com o grupo aldeído dos inibidores.

5.2. Inibidores da 3CL^{pro} de Origem Natural

Molécula 1: Como parte de uma investigação em andamento de potenciais inibidores, provenientes de plantas, da 3CL^{pro} do SARS-CoV, Ryu e colaboradores (2010) realizaram uma triagem inicial de extratos etanólicos das folhas de *Torreya nucifera*, usando um ensaio de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET). Dos compostos isolados, molécula 1 sendo o biflavanoide mentoflavona (Figura 11) foi identificado como um potente inibidor da 3CL^{pro}. Também, foi relatado os mecanismos de inibição da enzima, verificados usando gráficos cinéticos e experimentos de docking molecular. O efeito de inibição do composto foi medido usando um método FRET, desenvolvido por Ryu e colaboradores (2010). Neste ensaio, o peptídeo fluorogênico Dabcyl-KNSTLQSGLRKE-Edans (Anygen Co., República da Coreia) é usado como substrato, e a fluorescência é aumentada devido à clivagem do substrato é medida a 360/400 nm (RYU et al., 2010).

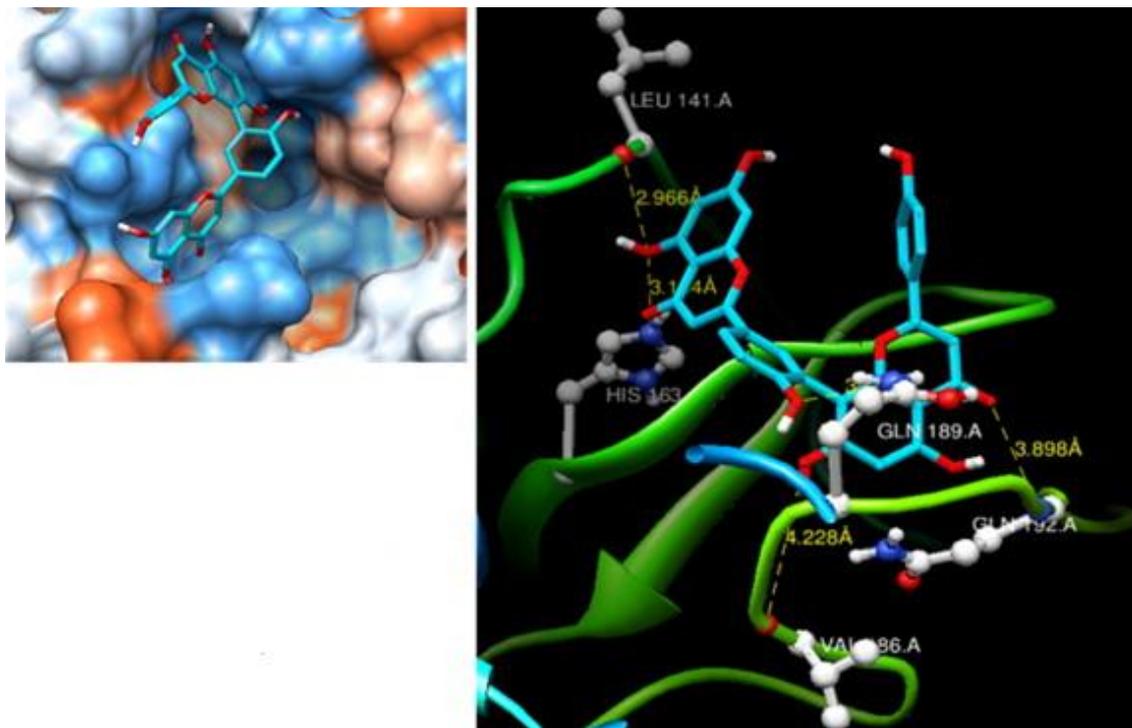
Logo depois, foi realizado uma análise qualitativa das relações de estrutural-atividade (SAR – Structure-Activity Relationship) dessa biflavona é o composto (1) na figura 12. A comparação da biflavona amentoflavona (1) com derivados da biflavona revelou que a metilação dos grupo 7, 4' e 4-hidroxila diminuiu a atividade inibitória, enquanto uma biflavona sozinha, como na mentoflavona (1), aumentou a atividade inibitória. Assim, esse composto

ficou sendo o mais potente (sem o grupo metoxi). E, a localização desse grupo metoxi na molécula foi positivamente correlacionada com a potência dos compostos contra SARS-CoV 3CL^{pro}. O inibidor mais potente foi o composto (1) apresentando cerca de 30 vezes mais potência que os outros compostos do estudo. No caso de flavonas, elas com um grupo hidroxila substituídos por C3', foram inibidores mais potentes. Assim, esses dados sugerem que a substituição da apigenina dentro da flavona como no biflavonóide (1) pode desempenhar papel fundamental na inibição do SARS-CoV 3CL^{pro}. (RYU et al., 2010).

Também, foi analisado o mecanismo inibitório dos biflavanoídes isolados contra atividade do SARS-CoV 3CL^{pro}. Os mecanismos de inibição enzimática do biflavonóide foi modelado usando plotagem de um gráfico Lineweaver-Burk e Dixon (duplo recíproco). O gráfico de Dixon vs 1/V (RFU/min⁻¹) resulta em uma linearização dos dados, onde a equação de uma reta: $y = x + B$ mostra características de inibição não competitiva em relação a 3CL^{pro}, pois V_{max} diminui sem alterar K_m na presença de concentrações crescentes de inibidores. (RYU et al., 2010).

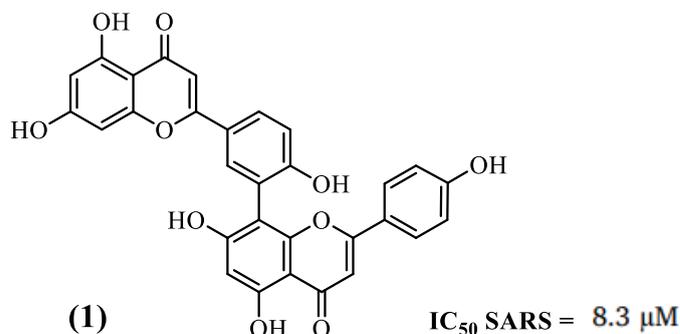
Na análise da biflavona (1) foi usado simulação de docking in silico, e revelou que a biflavona se encaixa bem no bolso de ligação do 3CL^{pro}. Como mostrado na figura 11, o grupo hidroxila C5 do composto (1) formou duas ligações de hidrogênio com o átomo de nitrogênio do grupo imidazol de His¹⁶³ (3,154 Å) e OH de Leu¹⁴¹ (2,966 Å) que pertencem ao sítio S1 de 3CL^{pro}. Além disso, o grupo hidroxila no anel B desse composto forma ligações de hidrogênio com Gln¹⁸⁹ (3,033 Å), que pertence ao sítio S2 de 3CL^{pro}. Nos estudos de relações estruturatividade implicaram interações com Val¹⁸⁶ (4,228 Å) e Gln¹⁹² (3,898 Å) como um dos principais quimiotipos desse inibidor. Assim, este experimento de docking suporta as inferências extraídas do ensaio enzimático, mostrando uma importante ação inibitória das biflavonas no SARS-CoV 3CL^{pro}. Até onde sabe-se, este é o primeiro relato a descrever os efeitos inibitórios da amentoflavona (1) contra a 3CL^{pro}. O CI₅₀ valor deste inibidor, embora superior aos da 3CL derivada de peptídeos^{pro} inibidores, está, no entanto, na faixa micromolar baixa. Assim, os autores acreditam que este composto pode ser um bom candidato para o desenvolvimento como uma droga terapêutica natural contra a infecção por SARS-CoV. (RYU et al., 2010).

Figura 11. Estrutura 2D do inibidor (1) interagindo com a do SARS-CoV 3CL^{pro}.



Fonte: Adaptado de Ryu e colaboradores, 2010. A posição do composto 1 (amentoflavona) no SARS-CoV 3CL^{pro}. Gráfico de fita de **composto 1** complexando a 3CL^{pro} com ligação de hidrogênio.

Figura 12. Estrutura do inibidor encontrado na literatura de origem natural.



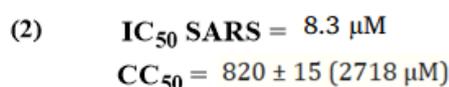
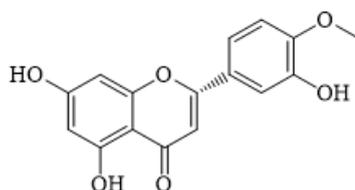
Fonte: Autora, 2023. Composto (1), é a amentoflavona identificado como potente inibidor anti-SARS-CoV 3CL^{pro}.

Molécula 2: Em 2005, Lin e colaboradores realizaram um estudo do extrato de raiz de *Isatis indigotica*, cinco compostos principais da raiz de *I. indigotica* e sete compostos fenólicos derivados de plantas foram testados para efeitos anti-SARS-CoV 3CL^{pro} usando ensaios de clivagem sem células e baseados em células. Foi feita a caracterização do efeito anti-3CL^{pro} do SARS-CoV do extrato aquoso de raiz de *I. indigotica*. A proteína substrato de não-clivagem foi detectada por um ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), utilizando a proteína S

conjugada com peroxidase. O ELISA mostrou que a atividade proteolítica livre de células se correlacionou, de modo dependente da concentração, com a diluição em série da proteína 3CL^{pro} recombinante na faixa de 15 µg/mL a 240 µg/mL. Posteriormente, o efeito anti-3CL^{pro} do extrato de raiz de *I. Indigotica* foi avaliado usando o ensaio de clivagem sem células. O ensaio de clivagem sem células indicou que o extrato de *I. indigotica* teve um efeito anti-3CL^{pro} dependente da dose. E, o composto hesperetina (molécula 2 que está ilustrada na figura 13) inibiu de forma significativa a atividade de clivagem da 3CL^{pro} no ensaio baseado em células e teve um valor pequeno de IC₅₀. (LIN et al., 2005).

O CI₅₀ o valor do ensaio baseado em células pelo extrato da raiz de *I. indigotica* foi duas vezes maior que o CI₅₀ valor do ensaio sem células. A razão pode ser que o extrato de raiz de *I. indigotica* pode conter alguns compostos inibitórios que não podem permear as membranas celulares para atingir o SARS-CoV 3CL^{pro} intracelular. Os resultados dos ensaios de clivagem livre de células e à base de células demonstraram que o extrato de raiz de *I. indigotica* pode conter potente anti-SARS-CoV 3CL^{pro} compostos. Nesse ensaio de clivagem baseado em células de 3CL^{pro} foram em células Vero na avaliação da fluorescência e no perfil de citotoxicidade in vitro da raiz de *I. indigotica*. E, dos compostos testados, a hesperetina foi o inibidor mais potente do SARS-CoV 3CL^{pro}. Além disso, a hesperetina (2) com um CC₅₀ de mais de 2 mM foram consideravelmente me os citotóxicos para as células Vero (figura 13). Semelhante a outras substâncias anti-SARS relatadas, como glicirrizina, nelfinavir, ácido aurintricarboxílico e interferon, o composto relatado pode ser considerado como potencial indício no desenvolvimento de inibidores do SARS-CoV 3CL^{pro}. (LIN et al., 2005).

Figura 13. Estrutura do inibidor de origem natural.



Fonte: Autora, 2023. Composto (2), é a Hesperetina identificado como potente inibidor anti-SARS-CoV 3CL^{pro}. CC₅₀ (concentração citotóxica de 50%) foi a concentração que deu metade da DO₅₇₀₋₆₃₀ de células simuladas no ensaio MTT.

Molécula 3: Park e colaboradores (2013) realizaram um estudo sobre a avaliação biológica de nove florotaninos isolados de alga marrom comestível *Ecklonia cava*. Foi relatado pela primeira vez que os florotaninos (Figura 14) de *E. cava* inibiram competitivamente a 3CL^{pro} do SARS-CoV. As atividades de inibição de florotaninos contra 3CL^{pro} foram avaliadas com uma análise baseada em células/livres confirmada por FRET e luciferase. A partir desses resultados, foi avaliado a afinidade de ligação dos florotaninos isolados de *E. cava* para a 3CL^{pro} por análise de ressonância plasmônica de superfície (SPR) e estudo de ligação molecular. O dieckol que possui dois grupos eckol ligados por um éter difenílico, mostrou a atividade inibitória mais potente (molécula 3 ilustrada na figura 14). (PARK et al., 2013).

Sabe-se, este é o primeiro relato sobre as atividades biológicas das florotaninas isoladas de *E. cava* no foco do SARS-CoV 3CL^{pro}. (PARK et al., 2013).

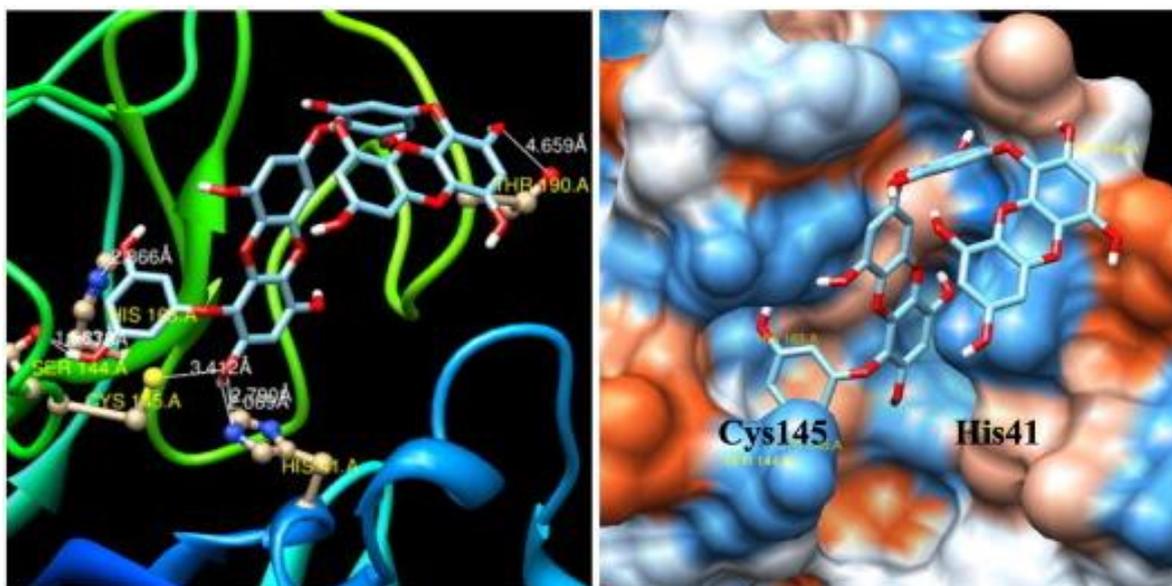
Em seguida, foi estudado o mecanismo cinético da interação desses inibidores com o SARS-CoV 3CL^{pro}. A atividade enzimática foi medida com uma série de concentrações de substrato e várias concentrações de inibidores. Os gráficos cinéticos mostram que o dieckol (3) tem perfis de inibição competitivos porque o gráfico de Lineweaver-Burk ($1/V$ vs $1/[S]$) é uma série de linhas retas com o mesmo intercepto do eixo y para o SARS-CoV 3CL^{pro} inibidores. (PARK et al., 2013).

Os resultados promissores descritos acima nos encorajaram a investigar melhor as principais interações entre a florotanina e o SARS-CoV 3CL^{pro}. Para obter mais informações sobre o mecanismo de inibição, um experimento de docking foi realizado. O inibidor mais potente do SARS-CoV 3CL^{pro}, o dieckol (3), foi analisado por análise de docking molecular quanto às suas interações com resíduos proteicos no sítio original de ligação do ligante como ilustrado na figura 14. As florotaninas que foram identificadas como inibidores competitivos dos ensaios de clivagem *trans/cis* do SARS-CoV 3CL^{pro}, foram encaixados na bolsa de ligação ao substrato (bolsa S1) da enzima na simulação de docking. Os resultados da simulação mostraram que o composto mais promissor, o dieckol (3), que possui dois grupos eckol ligados por um éter difenilo, mostrou a menor energia de ligação de -11,51 kcal/mol. Anteriormente, descobrimos que a estrutura do eckol é essencial e crucial para uma boa inibição do SARS-CoV 3CL^{pro}. Como mostrado em figura 14, o grupo hidroxila C2" do dieckol (3) forma uma ligação de hidrogênio com Thr¹⁹⁰ (4,66 Å), e o grupo hidroxila C5' forma uma ligação de hidrogênio com His¹⁶³ (2,87 Å). Além disso, o grupo hidroxila C3' forma uma ligação de hidrogênio com Ser¹⁴⁴ (2,78 Å), e o grupo hidroxila C2 de dieckol (3) formou duas ligações H com His⁴¹ (2,79 Å) e Cys¹⁴⁵ (3,41 Å), os resíduos catalíticos do SARS-CoV 3CL^{pro}. Simulação das interações de docking entre o dieckol (3) e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da 3CL^{pro} revelou

que o dieckol (3) se ligava ao sítio S1 do SARS-CoV 3CL^{pro} através de ligações H. Além disso, confirmamos que o dieckol (3) formou ligações de hidrogênio especialmente fortes com a díade catalítica (Cys¹⁴⁵ e His⁴¹) do SARS-CoV 3CL^{pro}. Esses experimentos de docking suportam as inferências extraídas do ensaio enzimático que revelou a importante ação inibitória do dieckol (3) sobre o SARS-CoV 3CL^{pro}. (PARK et al., 2013).

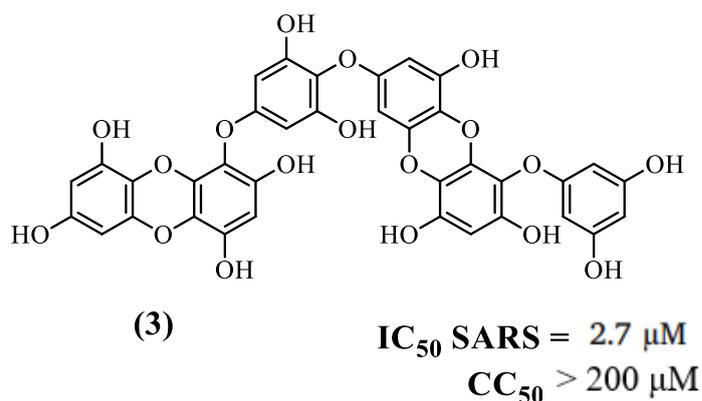
Neste estudo, foi relatado pela primeira vez que asflorataninas de *E. cava* inibiu competitivamente o SARS-CoV 3CL^{pro} nos sistemas sem células/baseados. Além disso, o dieckol (3) teve a atividade inibitória mais potente na 3CL baseada em células^{pro} ensaio de cis-clivagem, e sua potência foi maior do que os outros derivados da florotanina e os inibidores naturais de referência. Além disso, essas análises detalhadas de afinidade de ligação proteína-inibidor por SPR e simulações de docking molecular de dieckol (3) revelou que ele tem uma alta taxa de associação e forma fortes ligações de hidrogênio à díade catalítica (Cys¹⁴⁵ e His⁴¹) do SARS-CoV 3CL^{pro} com a menor energia de ligação. (PARK et al., 2013).

Figura 14. Estrutura 2D do inibidor (3) interagindo com a do SARS-CoV 3CL^{pro}.



Fonte: Adaptado de Park e colaboradores, 2013. A forma de ligação do dieckol (3) no SARS-CoV 3CL^{pro}. Parcelas de fita de dieckol (3) complexadas a 3CL^{pro} com ligação de hidrogênio.

Figura 15. Estrutura do inibidor de origem natural.



Fonte: Autora, 2023. Composto (3), é o Dickel identificado como potente inibidor anti-SARS-CoV 3CL^{pro}.

Molécula 4: Em 2020, Jo e colaboradores empregaram um método proteolítico para sondar os compostos inibidores da 3CL^{pro} do SARS-CoV. Um peptídeo sintético (Figura 16) marcado com um par Edasn-Dacbcyl FRET (Transferência de energia de ressonância de fluorescência) foi usado para pesquisar compostos inibidores da 3CL^{pro} frente à uma biblioteca de flavonoides. Usando a biblioteca de flavanoides, foram detectados vários flavanoides com uma ampla faixa de atividade inibitória. Para prever os esqueletos químicos de flavonoides necessários para interagir com o sítio catalítico da 3CL^{pro}, um estudo de docking molecular foi realizado. (JOet al., 2020).

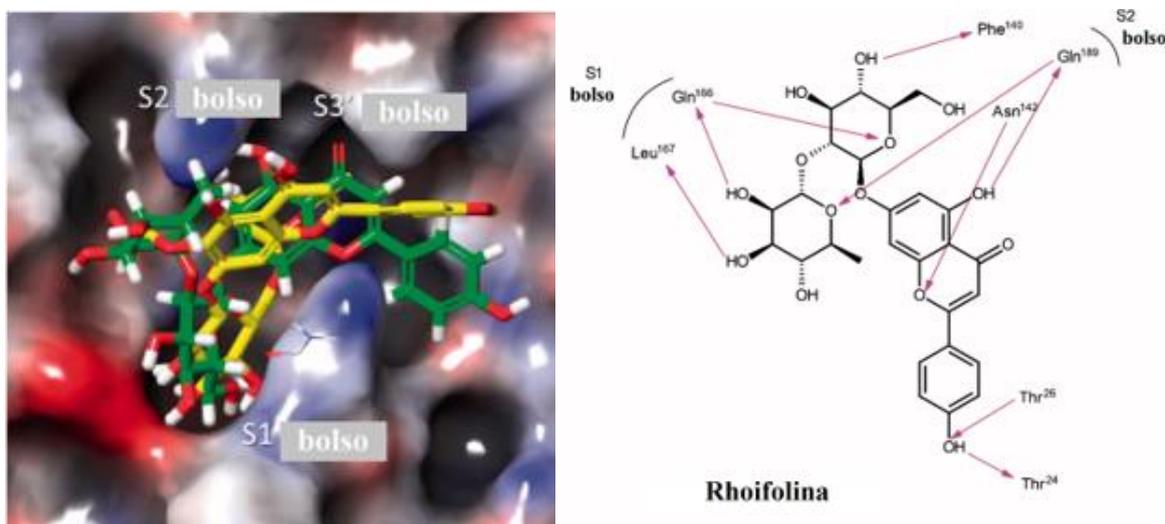
A fim de deduzir os modos de ligação dos flavonoides inibitórios no nível molecular, foi realizada uma investigação teórica aprofundada através de um estudo de docking de ajuste induzido. As interações entre o SARS-CoV 3CL^{pro} e os os flavanóides inibitórios foram analisadas para prever as suas afinidades de ligação. Estruturas de primeira linha (de acordo com as pontuações de deslizamento) dos resultados de docking de ajuste induzido para herbacetina (-9,263) e Rhoifolina ou composto (4) (-9,565) foram selecionadas e hipotetizadas como complexos biológicos como na figura 16. (JOet al., 2020).

Posição de docking de Rhoifolina (4) foi representada no potencial de superfície eletrostática do SARS-CoV 3CL^{pro} (vermelho, negativo; azul, positivo; branco, sem carga). Previu-se que os flavonoides ocupassem o sítio ativo do SARS-CoV 3CL^{pro}. As representações esquemáticas 2D das interações de cinco flavonoides também foram desenhadas conforme na figura 16. S1 representa o sítio polar S1 do SARS-CoV 3CL^{pro}, S2 para o sítio hidrofóbico S2 e o sítio S3' sem forte tendência. As setas cor-de-rosa representam a interação de ligação de hidrogênio. O ensaio e o resultado da acoplagem indicam conclusões importantes. No início, os flavonoides têm uma ampla gama de afinidade de ligação ao SARS-CoV 3CL^{pro} devido aos

seus anéis aromáticos hidrofóbicos e grupos hidroxila hidrofílicos. Em segundo lugar, a presença de grupos de carboidratos influencia severamente a afinidade de ligação e o modo da fração cromo-4-um. (JOet al., 2020).

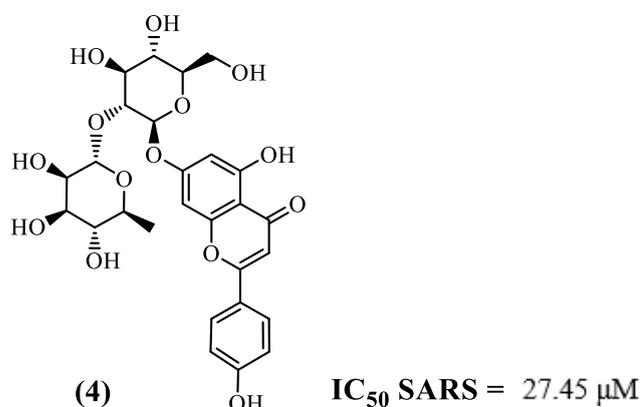
Este estudo sugere que o ensaio bioquímico combinado com a previsão de docking pode ser útil para desenvolver melhores derivados inibitórios de flavonoides de vários arcaouços de flavonoides. Por fim, entre os flavonoides estudados o melhor foi o Rhoifolina (molécula 4) para inibição da 3CL^{pro} e exibiu o menor valor de IC₅₀. (JOet al., 2020).

Figura 16. Estruturas complexas previstas e as representações 2D de SARS-CoV 3CL^{pro}.



Fonte: Adaptado de Jo e colaboradores, 2020. Complexos preditos do flavonoide (4) no sítio catalítico do SARS-CoV 3CL^{pro}.

Figura 17. Estrutura do inibidor encontrado na literatura de origem natural.



Fonte: Autora, 2023. Composto (3), é um flavonoide identificado como potente inibidor anti-SARS-CoV 3CL^{pro}.

Moléculas 5 e 6: Em 2016, Park e colaboradores isolaram 13 constituintes do *Angelica keiskei* que têm como alvo as proteases-CoV. 3CL^{pro} e PL^{pro} foram expressas e purificadas a

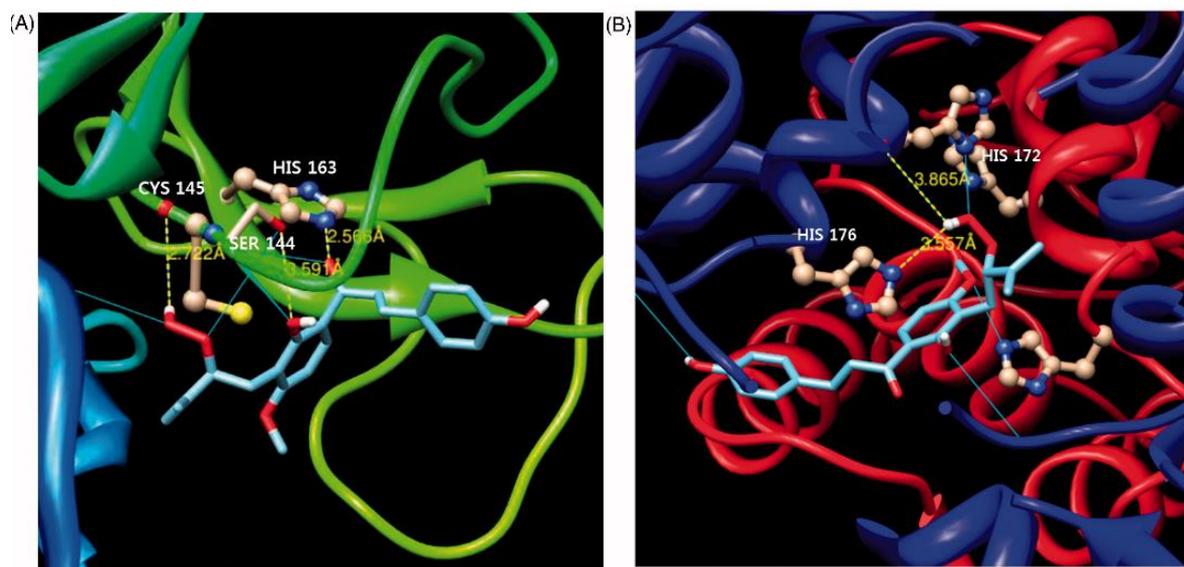
partir de *Escherichia coli*, bem como, as formas truncadas contendo apenas os domínios catalíticos. Os compostos isolados (dentre eles as moléculas 5 e 6 com menores valores de IC₅₀) foram avaliados separadamente quanto às suas atividades inibitórias contra as proteases do vírus. Os mecanismos de inibição dos compostos para as proteases direcionadas foram verificados por gráficos cinéticos e estudos de docking molecular. Até onde sabe-se, este estudo foi o primeiro a examinar a inibição das proteases de cisteína do SARS-CoV por compostos isolados de *A. keiskei*.

Para elucidar ainda mais a interação das proteases de cisteína SARS-CoV com o inibidor mais potente, 6 (comparando com o composto 5 e outros testados), isolado de *A. keiskei*, foi realizada uma simulação de docking *in silico*. A estrutura tridimensional do SARS-CoV 3CL^{pro} complexado a um inibidor análogo ao substrato (codificado 2ZU5) foi utilizado para a análise da modelagem. A análise de docking por computador revelou que a maioria das calconas (5 e 6) se encaixa bem na bolsa de ligação ao substrato de 3CL^{pro}. A estrutura global obtida pelo composto de docking (6) a 3CL^{pro} é mostrado na figura 18 (A) onde o SARS-CoV 3CL^{pro} é desenhado como uma fita, e o composto é representado como um modelo de bola e bastão. Como mostrado na figura 18 (A), o composto 6 formou ligações de hidrogênio (ligação H) com SARS-CoV 3CL^{pro}. O átomo de oxigênio do grupo carbonila do composto (6) forma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de His¹⁶³ (2,57 Å); o grupo hidroxila de C'2 formou ligações H com Ser¹⁴⁴ (3,48 e 3,59 Å). Curiosamente, o grupo peridroxila (PMB) do composto substituído 6 formou fortes ligações H com Cys¹⁴⁵ (3,45 e 2,72 Å) como um dos principais motivos deste inibidor. Elucidar ainda mais a interação do SARS-CoV PL^{pro} com a calcona alquilada (6) isolada, que exibiu atividade inibitória não competitiva. Neste estudo, o docking foi inicialmente realizado usando ligantes energeticamente otimizados em diferentes locais potenciais de ligação em toda a proteína (blind docking), pois esse processo reduz o tempo de simulação. Como mostrado na figura 18 (B), o grupo peridroxila de (6) forma três ligações H com o átomo de nitrogênio de His¹⁷⁶ (3,56 Å), o átomo de oxigênio de His¹⁷² (3,87 Å) e o átomo de nitrogênio de His¹⁷² (3,40 Å). Esses experimentos de docking incentivam os resultados do ensaio enzimático e revelam a importante ação inibitória das calconas alquiladas sobre a atividade das proteases de cisteína SARS-CoV.

Além disso, essa análise mecanicista detalhada de inibidores de proteínas dessas espécies revelou que as calconas (5 e 6) exibiam inibição competitiva do SARS-CoV 3CL^{pro}, considerando que foi observada inibição não competitiva com o SARS-CoV PL^{pro}. Assim, os seus efeitos inibitórios no ensaio sem células/baseado em células, acredita-se que os dados podem ser encorajadores para o desenvolvimento de reagentes terapêuticos para o SARS-CoV.

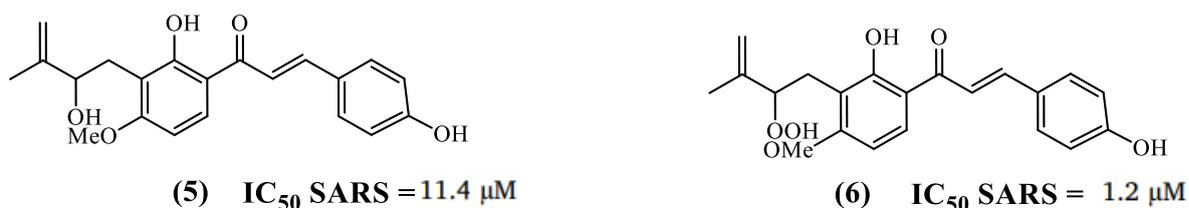
E, dos 13 compostos isolados, a chalcona alquilada (molécula 6) substituída por um grupo peridroxila (Figura 19) apresentou as atividades inibitórias mais potentes contra 3CL^{pro} e PL^{pro}. (PARK et al., 2016).

Figura 18. Análise de docking molecular *in silico* do composto 6 que se liga ao SARS-CoV 3CL^{pro} (A) e PL^{pro} (B).



Fonte: Adaptado de Park e colaboradores, 2016.

Figura 19. Estrutura do inibidor de origem natural.



Fonte: Autora, 2023. Composto (5) e (6) identificados como potentes inibidores anti-SARS-CoV 3CL^{pro} e PL^{pro}.

Molécula 7 e 8: Park Ji-Young e colaboradores (2012) estudaram e realizaram uma avaliação biológica de sete tanshinonas isoladas de *Salvia miltiorrhiza*, que foram identificadas como inibidores específicos e seletivos para as proteases virais 3CL^{pro} e PL^{pro} do SARS-CoV. Uma busca na literatura envolvendo estudos sobre esses sete hits isolados de tanshinona mostrou que, até agora, ninguém tinha identificado como inibidor de protease do coronavírus. E, esses pesquisadores conseguiram identificar nesse estudo que todas as tanshinonas isoladas são bons inibidores para as duas proteases de cisteína. Para o melhor do nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a descrever os efeitos de inibição para as tanshinonas contra as

principais proteases do SARS-CoV. Em particular, sete compostos exerceram atividade inibitória significativa de PL^{pro} (intervalo de 0,8 μ M – 30,0 μ M), em que a inibição deste foi melhorada no ensaio com pré-incubação e apenas duas moléculas (moléculas 7 e 8) tiveram menores valores inibitórios para a 3CL^{pro}. (PARK et al., 2012).

As tanshinonas isoladas (7 e 8), ilustradas na figura 20, foram avaliadas internamente quanto ao seu SARS-CoV 3CL^{pro} e PL^{pro} atividades inibitórias, o que, por sua vez, permitiu desenvolver um novo inibidor de classe com maior seletividade. Como mostra a figura 20, todas as tanshinonas isoladas examinadas (7 e 8), exibiram um efeito inibitório dose-dependente sobre a 3CL^{pro}. Para identificar o farmacóforo inibitório ativo, foi realizado um estudo de relação estrutura-função. Inicialmente, a presença de naftaleno na estrutura quinolona diterpênica pareceu ser importante para a atividade em comparação com a presença de dimetil tetra-naftaleno, e especificamente, para a 7 e 8 que contêm naftaleno e apresentaram menores valores de CI₅₀. Curiosamente, todos os compostos isolados mostraram um efeito inibitório dependente do tempo no PL^{pro} atividade, que é o primeiro relato de inibidores de PL^{pro} derivados naturalmente. A maioria dessas tanshinonas mostra um aumento da inibição da atividade enzimática do PL^{pro} em comparação com 3CL^{pro} na faixa nanomolar ou micromolar. Como evidenciado pela PL^{pro} inibição, a estrutura do dimetil tetra-naftaleno apresentou uma resposta inibitória mais potente do que o quimótipo naftaleno. (PARK et al., 2012). (PARK et al., 2012).

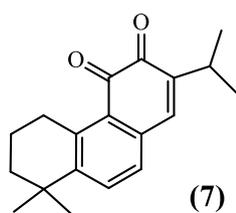
Em seguida, estudaram o mecanismo cinético da interação desses inibidores com as proteases (3CL^{pro} e PL^{pro}). Como resultado dessa análise cinética, descobriram que os inibidores de proteases derivados de *S. miltiorrhiza* poderiam ser divididos em duas classes com base em seu modo de inibição. As tanshinonas isoladas (7 e 8) exibem características de inibição não competitivas em relação à 3CL^{pro}. E, no caso de PL^{pro} gráficos cinéticos, tanshinonas de quatro anéis (8) também mostrou cinética de inibição não competitiva, o composto de três anéis 7 foi a única exceção a esta regra. (PARK et al., 2012).

Até onde sabem, este é o primeiro relatório a descrever os efeitos inibitórios da tanshinona contra as principais proteases do SARS-CoV. Todos os compostos isolados (7 e 8) apresentaram atividades inibitórias acentuadas para a 3CL^{pro} e PL^{pro}. A atividade foi

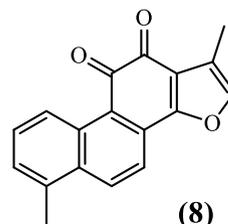
significativamente afetada por mudanças sutis na estrutura. O CI_{50} os valores desses inibidores, embora mais altos do que os dos inibidores da cisteína protease viral derivados de peptídeos e de pequenas moléculas, estão, no entanto, na faixa micromolar baixa. Das tanshinones, a tanshinone 7 apresentou a atividade DUB mais potente com um CI_{50} valor de $0,7 \mu\text{M}$. Os resultados deste estudo justificam uma investigação mais aprofundada para examinar o efeito destes produtos naturais na inibição do SARS-CoV. (PARK et al., 2012).

Por fim, esses compostos isolados atuam como inibidores de PL^{pro} dependentes do tempo, mas a dihidrotansinona I (molécula 8) exibiu atividade inibitória na faixa de nanomolar. Essas descobertas fornecem potenciais inibidores para a infecção e replicação viral do SARS-CoV (PARK et al., 2012).

Figura 20. Estrutura do inibidor de origem natural.



(7)

 $IC_{50} \text{ SARS} = 0.8 \mu\text{M}$


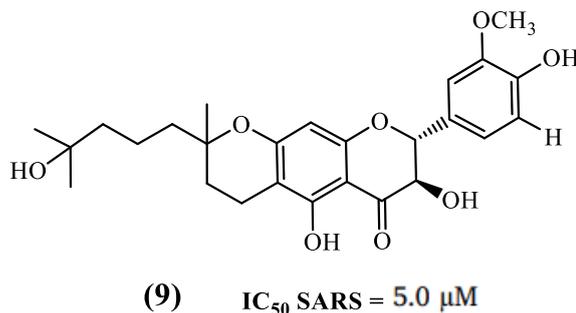
(8)

 $IC_{50} \text{ SARS} = 0,7 \mu\text{M}$

Fonte: Autora, 2023. Composto (7) e (8) identificados como potentes inibidores anti-SARS-CoV 3CL^{pro} e PL^{pro}.

Molécula 9: Cho e colaboradores (2013) investigaram as atividades inibitórias de PL^{pro} de extratos de frutos de *Paulownia tomentosa*. Isolou-se um total de doze flavanoides inibitórios da PL^{pro} , dos quais cinco emergiram como novos flavanoides contendo uma rara molécula de 3,4-dihidro-2H-pirano. Essa análise de todos os compostos isolados em ensaios de inibição de PL^{pro} mostrou que todas as espécies foram capazes de inibir a enzima. A constante de Michaelis aparente ($K_m = 52,0 \pm 0,9 \mu\text{M}$) foi determinada plotando as taxas iniciais normalizadas para concentração de enzima (52 nM) versus concentração de substrato (1-104 μM). Nos ensaios de inibição da PL^{pro} do SARS-CoV, todos os compostos testados apresentaram inibição dependente da dose, em especial a tomentina E (figura 20) apresentando um dos menores valores de inibição (CHO et al., 2013).

Figura 21. Estrutura do inibidor encontrado na literatura de origem natural.



Fonte: Autora, 2023. Composto (9) identificados como potentes inibidores anti-SARS-CoV PL^{pro}.

Molécula 10: Em 2005, Li e colaboradores selecionaram mais de 200 extratos caseiros de ervas medicinais que têm sido historicamente usados para o tratamento de doenças infecciosas induzidas por vírus na China, os quais foram testados contra SARS-CoV usando uma triagem de alto rendimento. Dentre esses extratos selecionados, o *Lycoris radiata* foi o mais potente, de onde a substância licorina (molécula 10) foi isolada e que foi avaliada frente SARS-CoV, obtendo-se um excelente valor de IC_{50} (Figura11), com índice seletividade (SI) superior a 900. (LI et al., 2005).

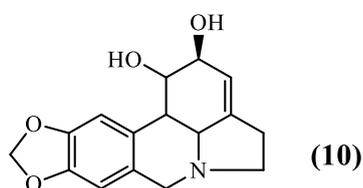
O teste de citotoxicidade para compostos ativos foi baseado na viabilidade celular após o tratamento das células com várias concentrações de compostos, e foi determinado pelo método MTS. Células Vero E6 e HepG2 em microplacas de 96 poços incubadas com diluições seriadas de 10 vezes de compostos de teste em DMEM contendo 5% de FBS. Uma das amostras ativas que apresentaram melhor efeito de inibição na triagem anti-SARS-CoV, o extrato de *L. radiata*, foi escolhida para posterior identificação do componente ativo nela. (LI et al., 2005).

Os resultados mostraram que a licorina comercial e a licorina isolada (10) ilustrada na figura 22 possuíam atividades antivirais semelhantes contra o SARS-CoV. Os ensaios de citotoxicidade também geraram resultados indicando a semelhança. Os valores de SI para os dois compostos são de cerca de 900. Todos estes demonstraram que a licorina foi o componente eficaz em *L. radiata* para inibir a ECP induzida pelo SARS-CoV. (LI et al., 2005).

Em conclusão, os compostos extraídos de *A. annua*, *L. radiata*, *P. lingua* e *L. aggregata* foram identificados para mostrar atividade antiviral contra SARS-CoV na triagem CPE/MTS baseada em células Vero. Mais estudos de estrutura e atividade determinaram que a licorina é um componente ativo na porção alcaloide da planta, destacando a, herbácea *L. radiata* onde teve melhores resultados e valores de IC_{50} , EC_{50} e CC_{50} . A licorina inibe o SARS-CoV em ensaios de inibição de ECP numa concentração bem inferior à da glicirrizina. O CC_{50} de licorina nas linhagens celulares Vero E6 e HepG2 testadas são $14980,0 \pm 912,0$ e $18810,0 \pm$

1322,0 nM, respectivamente. O valor do SI é maior que 900. Todos esses resultados sugerem que a licorina (10) tem propriedades que atendem às necessidades de ser um medicamento antiviral. No entanto, o mecanismo de atividade antiviral desses compostos ativos não é claro. No futuro, pode valer a pena investigar como esses compostos, especialmente a licorina (10), interagem com proteínas e antígenos virais expressos. Os resultados desse estudo fornecem um forte apoio para o uso dessas ervas para tratar doenças infecciosas do SARS-CoV. Nos resultados também demonstraram que o composto (10) é um bom candidato para o desenvolvimento de novos medicamentos antivirais. (LI et al., 2005).

Figura 22. Estrutura do inibidor encontrado na literatura de origem natural.



$$\text{IC}_{50} \text{ SARS} = 15.7 \pm 1.2 \text{ nM}$$

$$\text{CC}_{50} = 14980,0 \pm 912,0 \text{ nM}$$

Fonte: Autora, 2023. Composto (10) identificados como potentes inibidores anti-SARS-CoV.

Molécula 11: Kim e colaboradores (2019) estudaram a *Stephania tetrandra* e outras espécies de *Menispermaceae*, que principais fontes dos alcaloides *bis-benzilisoquinolina* tetrandrina (TET), fangchinolina (FAN) e cefarantina (CEP) (moléculas 11.a, 11.b e 11.c, respectivamente - figura 23). Esses compostos inibiram significativamente a morte celular induzida por vírus sem citotoxicidade aparente nas doses eficazes. O tratamento com TET, FAN e CEP suprimiu drasticamente a replicação de HCoV-OC43, bem como inibiu a expressão de proteínas virais S e N.

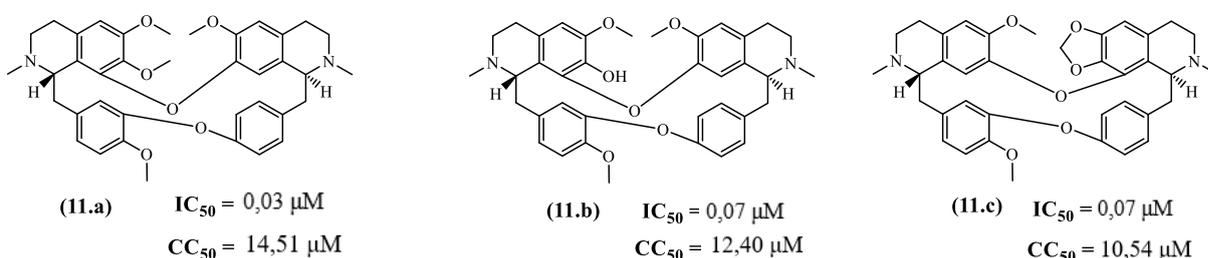
Esse estudo foi investigar as atividades antivirais do TET, como um composto de moléculas pequenas derivado de ervas, em fibroblastos MRC-43 infectados pelo HCoV-OC5 derivados de tecido pulmonar humano. No geral, esses resultados mostraram que o TET inibiu a infecção por HCoV-OC43 de células MRC-5 de forma dose-dependente. Além disso, os efeitos antivirais do FAN e do CEP, que também são compostos naturais com estruturas químicas semelhantes às do TET, foram verificados. No geral, nossos achados sugerem que TET, FAN e CEP são potenciais candidatos antivirais para o tratamento da infecção por β -CoV humano.

Além disso, nenhuma citotoxicidade foi causada pelos compostos dentro das faixas

efetivas, mesmo em uma concentração tão alta quanto 10 μM ($\text{CC}_{50} > 10 \mu\text{M}$). O CI_{50} os valores das moléculas (11.a), (11.b) e (11.c) foram de 295,6, 919,2 e 729,7 nM, respectivamente, o que resultou em índices de seletividade ($\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$) de > 40 , 11 e 13, respectivamente na figura 23 sugerindo que a atividade antiviral do TET foi mais efetiva que a do FAN e do CEP. Juntos, esses dados mostram que o tratamento com uma dose eficaz das três moléculas possuem potenciais atividades anti-HCoV-OC43.

Dos resultados do presente neste estudo demonstraram que TET, FAN e CEP, que têm sido amplamente aplicados em estudos antitumorais, são agentes antivirais naturais potencialmente fortes para o tratamento da infecção por HCoV. Estes compostos não tiveram efeitos citotóxicos nas células MRC-5, e o cotratamento inibiu consideravelmente a morte celular induzida pelo HCoV-OC43 de forma dose-dependente. Os valores de (11.a), (11.b) e (11.c) foram, respectivamente, com índices seletivos de > 40 , 19, 11,46 e 13,63. Esses achados estabelecem das 3 moléculas como compostos naturais que podem ser úteis para a prevenção e tratamento de infecções por HCoV, e em teste futuros no SARS-CoV e MERS-Cov.

Figura 23. Estrutura do inibidor encontrado na literatura de origem natural.



Fonte: Autora, 2023. As moléculas (11.a), (11.b) e (11.c) foram identificados como potentes inibidores anti-HCoV-OC43.

Molécula 12: Segundo Young e colaboradores (2010), estudaram e conseguiram identificar derivados de triterpeno de quinona-metídeo como inibidores da 3CL^{pro} do SARS-CoV, na faixa de μM incluindo a iguesterina (molécula 12 – figura 25). Esse composto foi isolado de *Triterygium regelii* e foram avaliados para suas atividades inibitórias contra a 3CL^{pro} do SARS-CoV. A estrutura de raios-X da 3CL^{pro} do SARS-CoV em complexo com um inibidor análogo de substrato (codificado por 1uk4 ou 2z3e0), obtido do Protein Data Bank (PDB), foi usado para análise de modelagem. (RYU et al., 2010).

Os experimentos de docking molecular apoiam a observação no ensaio enzimático, que revela os papéis importantes da inibição das frações quinona-metídeos da 3CL^{pro} SARS-CoV. Embora todos os triterpenos quinona-metídeos isolados eram compostos anteriormente

conhecidos, esta é a primeira vez que demonstrou ter atividade inibitória frente à 3CL^{pro} do SARS-CoV. (RYU et al., 2010).

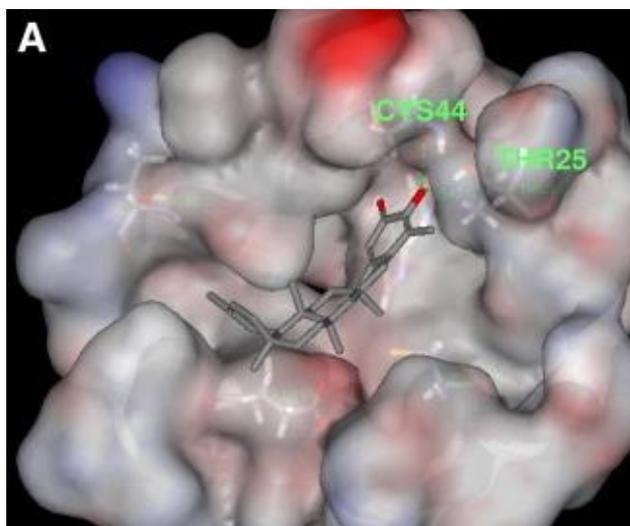
Triterpenos quinona-metida, celastrol, pristimerina, tingenona e iguesterina (molécula 12 na figura 24) foram isolados de *Triterygium regelii* e diidrocelastrol (**5**) foi sintetizado por hidrogenação sob catalisador de paládio. Triterpenos isolados de quinona-metido foram avaliados para SARS-CoV 3CL^{pro} atividades inibitórias e mostrou potentes atividades inibitórias, a porção quinona-metida no anel A e o anel E mais hidrofóbico ajudam a exibir atividade potente inibitória com CI₅₀ valor de 2,6 µM. Além disso, o triterpeno (12) provou ser competitivos pela análise cinética. (RYU et al., 2010).

Para melhor investigar a interação desses inibidores com a enzima, tentou-se uma simulação de acoplamento molecular da ligação de (12) ao sítio ativo de SARS-CoV 3CL^{pro}. A análise de acoplamento por computador revelou que a iguesterina (12) pode se encaixar bem na bolsa de ligação ao substrato do SARS-CoV 3CL^{pro}. Como mostrado em figura 24 A, o grupo hidroxila de C3 de (12) formou uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio do grupo carbonila de Cys⁴⁴ e OH de Thr²⁵ localizado no domínio I (resíduos 8–101). (RYU et al., 2010).

O modo de ligação da iguesterina (12) tem diferente do ácido betulínico (His¹⁶⁴ e Thr²⁴) e da savinina (Cys¹⁴⁵, Gln¹⁶⁶, Gln¹⁸⁹, Gly¹⁴³ e Ser¹⁴⁴) com 1uk4. Essas diferenças de interação intermolecular aparentemente são refletidas pelo CI 10 vezes menor₅₀ valor da molécula (12) em comparação com o dos compostos de referência na inibição da 3CL^{pro}. Esses experimentos de docking apoiam a observação no ensaio enzimático, que revela os papéis importantes da inibição das quinona-metida do SARS-CoV 3CL^{pro}. Embora este estudo preliminar de modelagem molecular não possa ser a prova final para esse argumento crítico, ele constitui um sinal positivo para a possibilidade do mecanismo. (RYU et al., 2010).

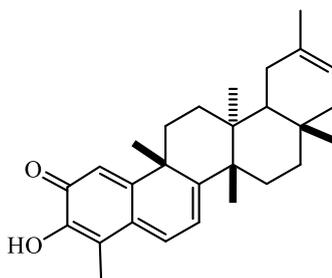
Resumindo, foi identificado derivados triterpênicos quinona-metida como novos inibidores de SARS-CoV 3CL^{pro}. Os compostos bioativos recentemente identificados com SARS-CoV 3CL^{pro} a atividade inibitória na faixa de µM inclui a iguesterina (**12**). Embora todos os triterpenos isolados de quinona-metido tenham sido compostos previamente conhecidos, esta é a primeira vez que foi demonstrado que possui SARS-CoV 3CL^{pro} atividade inibitória. (RYU et al., 2010).

Figura 24. Modelagem computacional dos compostos (12) (A) que se ligam ao SARS-CoV 3CL^{pro}.



Fonte: Adaptado de Young e colaboradores, 2010.

Figura 25. Estrutura do inibidor encontrado na literatura de origem natural.



(12) IC₅₀ SARS = 2.6 μM

Fonte: Autora, 2023. A molécula 12 foi identificado como potente inibidor anti-SARS-CoV 3CL^{pro}.

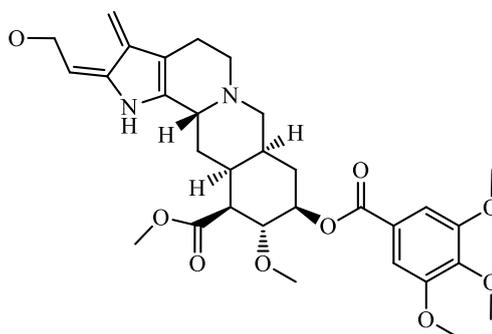
Molécula 13: Wu e colaboradores (2004) realizaram um em células Vero E6 infectadas com SARS-CoV e uma coleção de quase 10.000 compostos e produtos naturais para identificar agentes antivirais. Eles também, descreveram estudos de alguns compostos líderes promissores revelados na triagem. Esse ensaio com base em células foi desenvolvimento para rastrear fármacos existentes, produtos naturais e compostos sintéticos com atividade contra SARS-CoV. Dentre todos os agentes testados, 50 compostos foram encontrados a ter EC₅₀ de 10 μM, entre esses compostos existentes, a Reserpina (molécula 13) teve um dos menores valores inibitórios (IC₅₀). O EC₅₀ foi determinado com base em ELISA. Entretanto, Western-Blot, imunofluorescência, citometria de fluxo, inibição contra a 3CL^{pro} e entrada viral também foram realizados.

Os compostos Reserpina (13), um medicamento aprovado pela Food and Drug Administration) foram testados com IFA, ELISA, análise de Western blot e citometria de fluxo para confirmar suas atividades anti-SARS. A CE_{50} os valores de Reserpina composto (13) foi de 3,4 μM e 6,0 μM 3 e o CC_{50} os valores foram de 25 μM (SI = 7,3). (WU et al., 2004).

Como a reserpina tem sido usada clinicamente, seu produto natural relacionado também pode ser ativo contra o SARS-CoV. A reserpina (13), um alcaloide natural produzido por vários membros do gênero *Rauwolfia*, tem sido usada principalmente como anti-hipertensivo periférico e como depressor central e sedativo. Também encontrou uso como agente radioprotetor e experimentalmente como contraceptivo. Através de um ensaio baseado em células, descobriram que vários compostos, em destaque o composto (13) mostrou atividades promissoras contra o SARS-CoV. (WU et al., 2004).

Em resumo, a molécula 13 é um produto natural que também pode (figura 26) atuar como inibidor de protease 3CL^{pro}. (WU et al., 2004).

Figura 26. Estrutura do inibidor encontrado na literatura de origem natural.



Fonte: Autora, 2023. A molécula (13) foi identificado como potentes inibidores anti-SARS-CoV 3CL^{pro}.

Moléculas 14 e 15: Ryu e colaboradores (2010) investigaram potenciais inibidores da 3CL^{pro} do SARS-CoV a partir de plantas medicinais. Inicialmente, foi realizado uma triagem inicial de extratos etanólicos das folhas de *Torreya nucifera*, usando um ensaio de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET). Foram isolados 12 compostos fitoquímicos, sendo oito diterpenoides e quatro biflavanoides com atividade inibitória da 3CL^{pro} do SARS-CoV. Nesses biflavanoides, quando ocorreu a substituição de um grupo metoxila em C-7, pareceu aumentar a potência dos compostos (14 e 15). A molécula 14 pode ser responsável pelo aumento de duas vezes na atividade inibitória frente à 3CL^{pro} do SARS-CoV, quando

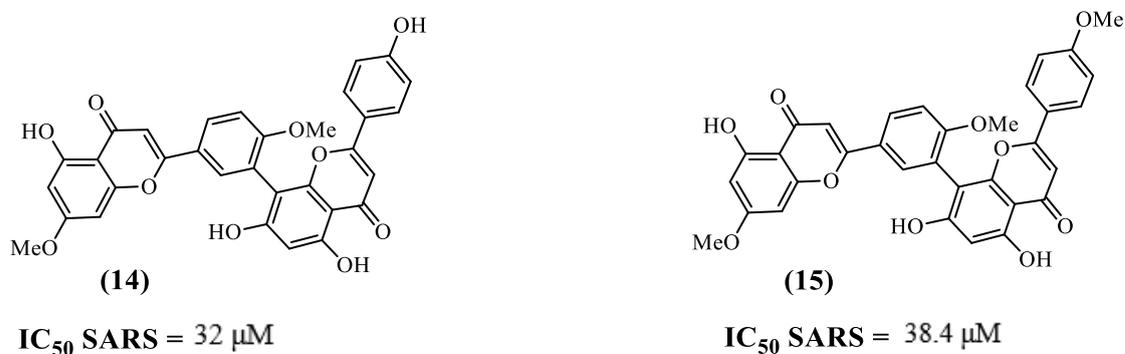
comparada à molécula 15. (RYU et al., 2010).

Em seguida, realizamos uma análise qualitativa das relações estrutural-atividade dos compostos (14) e (15) exibido na figura 27. Assim, outros compostos testados na pesquisa, que possuem grupos metoxi, foram menos potentes ($IC_{50} = 32,0\text{--}72,3 \mu\text{M}$) dos que não possuem um grupo metoxi. Também foi descoberto que a localização do grupo metoxi dentro desses compostos foi positivamente correlacionada com a potência dos compostos contra o SARS-CoV 3CL^{pro}. O grupo C-7 metoxi de compostos (14) ($IC_{50} = 32,0 \mu\text{M}$) e (15) ($IC_{50} = 38,4 \mu\text{M}$) pode ser responsável por um aumento de duas vezes no SARS-CoV 3CL^{pro} atividade inibitória. (RYU et al., 2010).

Também caracterizaram o mecanismo inibitório dos biflavonoides isolados contra a atividade de SARS-CoV 3CL^{pro}. Os mecanismos de inibição enzimática do biflavonóide foi modelado usando plotagem de um gráfico Lineweaver-Burk e Dixon (duplo recíproco). O gráfico de Dixon vs $1/V$ (RFU/min⁻¹) resulta em uma linearização dos dados, onde a equação de uma reta: $y = x + B$ mostra características de inibição não competitiva em relação a 3CL^{pro} pois V_{max} diminui sem alterar K_m na presença de concentrações crescentes de inibidores. (RYU et al., 2010).

Por fim, os resultados confirmam que os compostos (14 e (15) isolada de *T. nucifera*, são inibidores efetivos do SARS-CoV 3CL^{pro} e mais eficazes do que as correspondentes flavonas (apigenina e luteolina) e derivados biflavonóides contendo vários números de grupos metoxi. Assim, acreditam-se que estes compostos podem ser um bons candidatos para o desenvolvimento como um medicamento terapêutico natural contra a infecção por SARS-CoV. (RYU et al., 2010).

Figura 27. Estrutura do inibidor encontrado na literatura de origem natural.



Fonte: Autora, 2023. As moléculas (14) e (15) foram identificados como potentes inibidores anti-SARS-CoV 3CL^{pro}.

5.3. Inibidores da 3CL^{pro} de Origem Semissintética

Molécula 1 e 2: Sun e colaboradores (2021) fizeram uma triagem envolvendo 315 compostos contendo regiões eletrofílicas, as quais poderiam se ligar covalentemente à 3CL^{pro} do SARS-CoV-2. Os pesquisadores identificaram 15 inibidores da 3CL^{pro} com valores de IC₅₀ < 30 µM. Entretanto, os autores focaram em dois compostos, metilbardoxolona e bardoxolona (molécula 1 e 2, respectivamente), os quais foram levados para ensaios clínicos e sua atividade anti-SARS-CoV-2 não havia sido relatada anteriormente. Metilbardoxolona e bardoxolona são triterpenoides semissintéticos derivados do ácido oleanólico, que ativam a via Nrf2 e inibem a via NF-κB. Foi visto que ambos inibem a replicação do vírus SARS-CoV-2. As eficácias destes também foram confirmadas por meio da visualização da diminuída expressão da nucleoproteína (NP) do vírus, usando a microscopia de imunofluorescência 48h pós-infecção. (SUN et al., 2021).

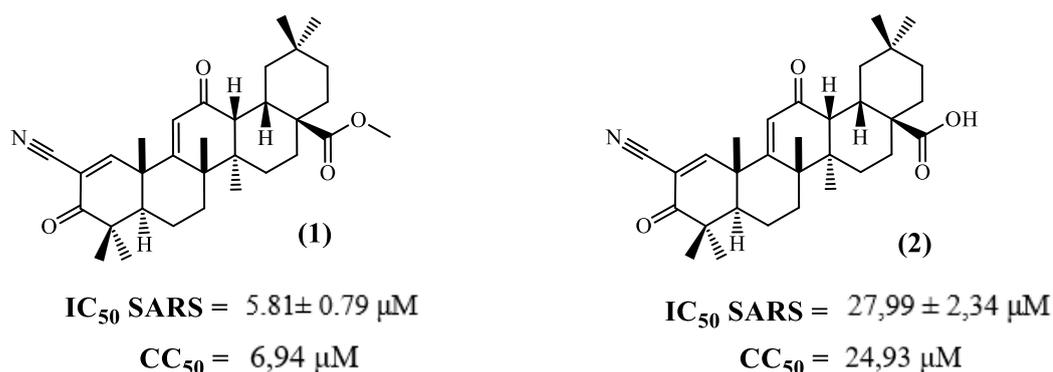
De vários outros compostos encontrados, os pesquisadores concentraram-se apenas nos dois compostos, Metilbardoxolona (1) e bardoxolona (2), que foram processados para ensaios clínicos e sua atividade anti-SARS-CoV-2 não foi relatada antes. A segurança e a farmacocinética destes dois compostos estão bem caracterizadas. Testaram ainda a atividade anti-SARS-CoV-2 da molécula (1) e da (2) postos na figura 27. Com incubação em tempo integral, a bardoxolona metila e a bardoxolona inibem a replicação do SARS-CoV-2 em células Vero com CE₅₀ valores de 0,29 µM (SI = 23,9) e 0,43 µM (SI = 56,6), respectivamente. Ambos os compostos também inibem a replicação viral do SARS-CoV-2 em células Calu-3 humanas com CE₅₀ valores de 0,20 µM (SI = 5,8) e 0,42 µM (SI = 28,2), respectivamente. (SUN et al., 2021).

O docking molecular indicou que tanto a Metilbardoxolona (1) e a bardoxolona (2) se ligam a uma bolsa entre o domínio I e o domínio II e formam ligações de hidrogênio com Arg⁴⁰, bem como interação hidrofóbica com Phe¹⁸¹ e Val¹⁸⁶. O átomo de enxofre de Cys85 está próximo dos átomos de carbono reativos da bardoxolona metila e bardoxolona com 5 Å de distância, sugerindo o potencial para a formação de ligações covalentes. O grupo metilo da bardoxolona metila neutraliza a carga negativa da bardoxolona, reduzindo assim a sua repulsão eletrostática com Glu55 e aumenta a sua afinidade de ligação. (SUN et al., 2021).

Os inibidores covalentes seletivos devem se ligar especificamente aos alvos, além da formação de ligações covalentes. A metilbardoxolona (1) e a bardoxolona (2) são triterpenoides semissintéticos derivados do ácido oleanólico que ativam a via Nrf2 e inibem a via NF-κB. (SUN et al., 2021). Ensaios clínicos estão em andamento para explorar o potencial da (2) para

tratar doenças renais crônicas. Assim, os ativadores Nrf2 das moléculas (1) e 2) podem ser desenvolvidos como uma estratégia de tratamento antiviral variado, inibindo a replicação viral, promovendo a resolução da inflamação, proporcionando citoproteção robusta e facilitando o reparo tecidual. Recomendamos testar suas atividades como agentes anti-COVID-19. (SUN et al., 2021).

Figura 28. Estrutura dos Inibidores de origem semissintética.



Fonte: Autora, 2023. As moléculas (1) e (2) foram identificados como potentes inibidores anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro} em células Vero.

Molécula 3 e 4: Yuan e pesquisadores (2022) utilizaram uma abordagem de semissíntese baseada no farmacóforo (*Pharmacophore-oriented semisynthesis - POSS*), partindo-se dos produtos naturais (-)-maoelactona A e oridonina para a descoberta de agentes anti-SARS-CoV-2. O rearranjo/lactonização de Wolff (WRLC) foi utilizado para criar um esqueleto químico do tipo maoelactona sem precedentes na literatura durante a semissíntese da molécula 3. Depois, estudos do mecanismo sugeriram o mecanismo concertado para o rearranjo de Wolff e um processo passo a passo de adicionar água para lactonização. A reação de WRLC permitiu a criação de uma nova família para do esqueleto químico do tipo maoelactona (molécula 3) e o farmacóforo oridinona (molécula 4), no qual os derivados inibiram a replicação do SARS-CoV-2 em células HPA EpiC com um baixo valor de EC_{50} . Essa abordagem usando produtos naturais modificados que possuem esqueletos químicos únicos pode resultar em compostos com atividade antiviral, mas suas estruturas complexas dificultam a síntese dos mesmos. As modificações realizadas deram origem a um novo produto potencialmente inibitório para o SARS-CoV-2, com um excelente valor de IC_{50} (figura 12) (ZHOU et al., 2022).

A aplicação de POSS a dois membros *do* diterpeno em uma síntese química para criar compostos líderes para agentes anti-SARS-CoV-2. Um membro é (-)-maoelactona A (3), que possui um andaime do tipo maoelactona sem precedentes da *Isodon eriocalyx*, e o outro

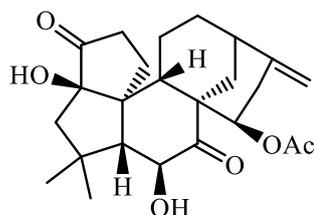
membro é oridonina (4), que carrega um farmacóforo e é um produto comercial e presente em um alto teor em *I. rubescens*. Uma reação de rearranjo/lactonização de Wolff (WRLC) foi desenvolvida para a construção do andaime do tipo maoelactona durante a semissíntese de (3), permitindo a criação de uma nova família anti-SARS-CoV-2 a partir de 2 pela montagem do farmacóforo com o andaime do tipo maoelactona e levando à descoberta de potenciais agentes anti-SARS-CoV-2.

Um grupo cetona α,β -insaturado e um grupo 14-hidroxila foram selecionados como farmacóforo para (4) com base em várias linhas de evidência. Uma coleção de bibliotecas NP foi previamente rastreada para identificar inibidores do SARS-CoV-2, e vários produtos naturais contendo cetonas α,β -insaturadas apresentaram um bom desempenho: a oridonina (4) (figura 28) possuía uma CE_{50} de 1,46 μ M para o SARS-CoV-2. Imaginamos que a estrutura sem precedentes de (3) pode melhorar a bioatividade de (4) com base em vários exemplos de modificação no anel A, aumentando os efeitos biológicos. Nomeou-se esta estrutura do tipo maoelactona, embora a configuração absoluta da estrutura, incluindo C-2 e C-10, ainda não tenha sido determinada. Portanto, uma semissíntese do composto (3) a partir da eriocalyx B poderia ser conduzida para fornecer a estereoquímica da estrutura do tipo maoelactona, e um método sintético simples poderia ser desenvolvido para construir a do tipo maoelactona como uma abordagem de transformação de estrutura para o composto (4). A abordagem sintética direta poderia ainda ser aplicada para estabelecer uma nova família anti-SARS-CoV-2, combinando o farmacóforo de (4) com um andaime do tipo maoelactona, selecionando assim todo o potencial da estrutura de maoelactona (3) (figura 29).

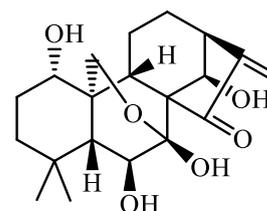
Essa abordagem de semissíntese voltada para farmacóforos foi aplicada para criar uma nova família anti-SARS-CoV-2, reagindo o farmacóforo da oridonina (4) com uma nova estrutura (maoelactona A, 3). Foi estabelecido (3) como um diterpenóide ent-kaurano rearranjado com uma estrutura de lactona sem precedentes de *I. eriocalyx* e nomearam a arranjo como tipo maoelactona (3). Realizaram uma semissíntese em dez passos com a molécula (3) a partir da eriocalyxin, proporcionando a configuração absoluta de um andaime do tipo maoelactona. Mais importante ainda, a síntese consistiu no uso de um rearranjo/lactonização de Wolff (WRLC) para construir uma estrutura do tipo maoelactona em uma etapa, o que desempenhou um papel fundamental na implementação da abordagem POSS. Um estudo mecanicista adicional da reação do WRLC sugere um mecanismo concertado para o rearranjo de Wolff e um processo gradual assistido por água para lactonização. A reação WRLC desenvolvida foi então aplicada para transferir (4) para um arranjo do tipo maoelactona carregando o farmacóforo, o que produziu uma nova família de andaimes que foi avaliada

contra SARS-CoV-2 3CL^{pro} e SARS-CoV-2. Grupos dos membros da nova família mostraram atividade anti-SARS-CoV-2 significativa, dos quais 70 inibiram a replicação do vírus SARS-CoV-2 em células HPA EpiC com uma baixa CE₅₀ valor (19±1 nM) e um alto valor de TI (>1000), ambos valores melhores que os do remdesivir.

Figura 29. Estrutura dos Inibidores de origem semissintética.



(3) IC₅₀ SARS = 19 ± 1 nM



(4) IC₅₀ SARS = 1,46 μM

Fonte: Autora, 2023. As moléculas (3) e (4) foram identificados como potentes inibidores anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro}.

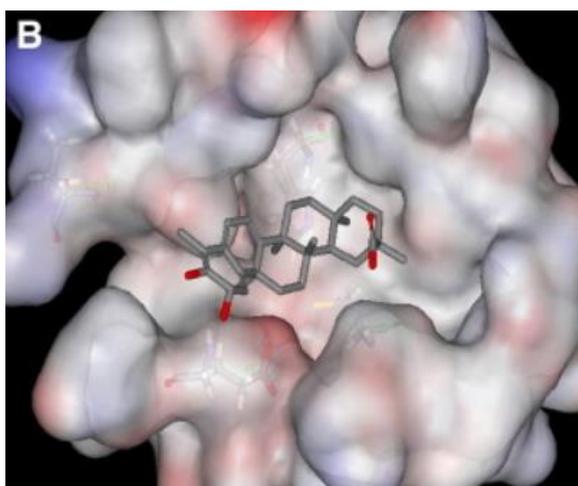
Molécula 5: Em 2010, Ryu e colaboradores isolaram alguns compostos a partir da *Triterygium regelii*, e modificaram estes por hidrogenação catalisada por paládio. Alguns compostos, sendo um deles o dihidrocelastrol (molécula 5 - Figura 31), que mostrou atividades inibitórias competitivas favoráveis contra a 3CL^{pro} do SARS-CoV. Também, durante essa busca por novos inibidores da 3CL^{pro} do SARS-CoV de plantas medicinais, descobriram que os extratos de MeOH (95%) da casca de *T. regelii* podem inibir consideravelmente a atividade da 3CL^{pro} do SARS-CoV. Nesse sentido, para confirmação da fração quinona-metídeo atua para inibir A 3CL^{pro} do SARS-CoV, o celasterol reagiu por desidrogenação sob catalisador Pd para fornecer o dihidrocelastrol em um rendimento quantitativo. De acordo com o resultado de Schwalbe, possui sítios eletrofílicos dentro dos anéis A e B, onde grupos nucleofílico do grupo cisteína tiol da proteína do ciclo de divisão celular 37 (Cdc37), reagem com o quinona-metídeo de um por meio de uma adição de Michael, tendo como resultado na formação de um aduto em C6. Assim, os pesquisadores acreditam que esta parte seria valiosa para aumentar a atividade inibitória da 3CL^{pro}.

A fim de confirmar se a metade quinona-metido desempenha um papel para inibir o SARS-CoV 3CL^{pro}, celastrol foi reagido por desidrogenação sob catalisador Pd para dar o diidrocclastrol (5) (figura 30) em um rendimento quantitativo. De fato, nosso resultado mostrou que a porção quinona-metido de celastrol aumentou a potência do SARS-CoV 3CL^{pro} de inibição em duas vezes quando comparado com o análogo reduzido (5) (CI₅₀ = 21,7 μM). Em

vista desse resultado, a presença de uma porção de quinona-metido parece desempenhar um papel relativamente significativo na inibição.

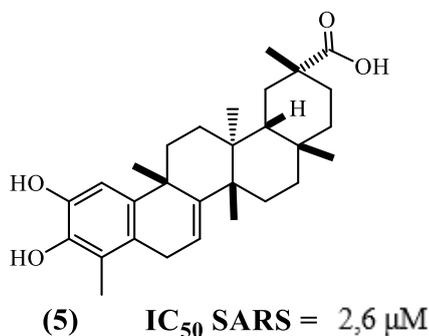
A análise do modo de inibição foi usando os gráficos de Lineweaver-Burk e Dixon. E ela computador revelou que a molécula (5) não formou nenhuma ligação intermolecular com a enzima além da interação hidrofóbica exibido na figura 29. Embora este estudo preliminar de modelagem molecular não possa ser a prova final para esse argumento crítico, ele constitui um sinal para a possibilidade dos mecanismos. Esses experimentos de docking apoiam a observação no ensaio enzimático, que revela os papéis importantes da inibição das metades quinona-metidas do SARS-CoV 3CL^{pro}. Em resumo, como resultado foi identificado derivados de triterpenos de quinona-metídeo como novos inibidores da 3CL^{pro} do SARS-CoV.

Figura 30. Modelagem computacional dos compostos (5) (B) com o sítio catalítico da SARS-CoV 3CL^{pro}.



Fonte: Adaptado de Ryu e colaboradores, 2010.

Figura 31. Estrutura do Inibidor de origem semissintética.

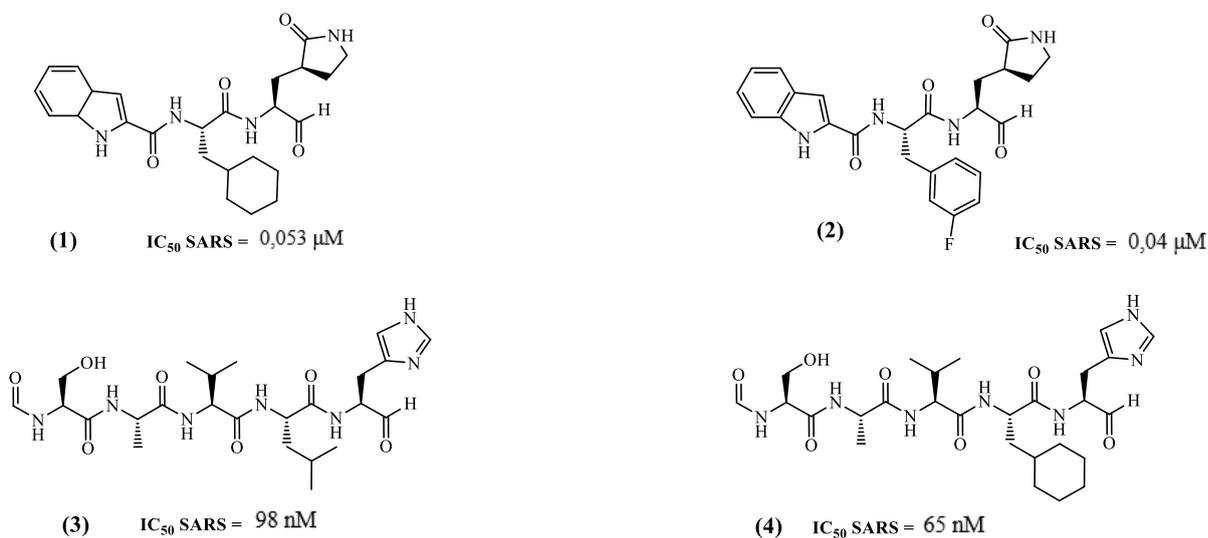


Fonte: Autora, 2023. A molécula (5) foi identificado como potente inibidor anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro}.

5.4. Inibidores da 3CL^{pro} de Origem Sintética

Moléculas 1-4: Dai e colaboradores, em 2020, sintetizaram e projetaram as moléculas 1, 2, 3 e 4 (figura 13) como novos inibidores para a 3CL^{pro} do SARS-CoV-2 e essas moléculas demonstraram excelente atividade inibitória contra a 3CL^{pro} do SARS-CoV-2. Ambos compostos foram estudados com atenção para descobrir os principais compostos direcionados à 3CL^{pro} e mostraram uma potente atividade de infecção anti-SARS-CoV-2 em um ensaio com base em células. As estruturas cristalinas mostraram que as moléculas 1 e 2 são inibidores covalentes, que grupos aldeído estão ligados covalentemente a Cys¹⁴⁵ da 3CL^{pro}. Os dois compostos mostraram boas propriedades de PK *in vivo*, e a molécula 1 também exibiu baixa toxicidade, o que é um fármaco promissora com potencial clínico que merece mais estudos. A 3CL^{pro} do SARS-CoV recombinante foi expressa e purificado a partir de *Escherichia coli*. Um substrato marcado fluorescentemente, MCA-AVLQ↓SGFR-Lys (Dnp)-Lys-NH₂, derivado da sequência de autoclivagem *N*-terminal da protease viral foi projetado e sintetizado para o ensaio enzimático. Ambos os dois compostos (molécula 1 e 2) exibiram alta atividade de inibição 3CL^{pro} do SARS-CoV. (DAI et al., 2020).

Figura 32. Estrutura dos Inibidores de origem Sintética.

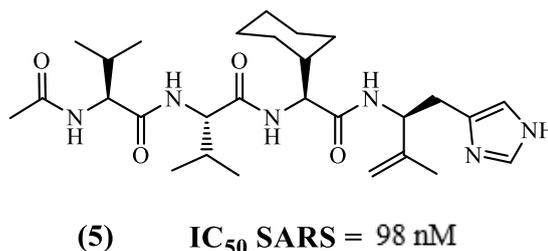


Fonte: Autora, 2023. As moléculas (1), (2), (3) e (4) foram identificados como potentes inibidores anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro}.

Molécula 5: Em 2017, Kenichi Akaji e colaboradores desenvolvera inibidores não peptídicos que interagem com o P1, P2 e sítos da 3CL^{pro} e uma nova série de derivados de serina (molécula 5) (figura 33) foi projetado e desenhado com base no tetrapeptídeo aldeído Ac-Thr-

Val-Cha- His-H. A modificação estrutural baseada na estrutura cristalina de raios-X de uma série de peptídeos em complexo com 3CL^{pro} resultou em uma inibição com um valor de IC₅₀ satisfatória inibição da 3CL^{pro} do SARS-CoV. E como resultado, os dados de inibição cinética obtidos por Lineweaver-Burk sugeriram que um aldeído em C-terminal do composto pode funcionar como inibidores competitivos. (KONNO et al., 2017).

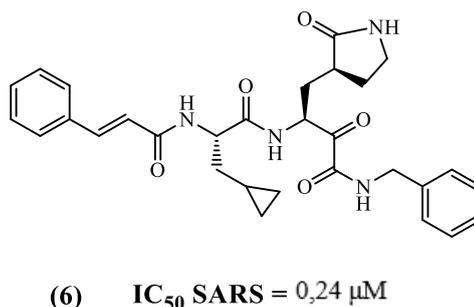
Figura 33. Estrutura dos Inibidores de origem Sintética.



Fonte: Autora, 2023. A molécula (5) foi identificado como potente inibidor anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro}.

Molécula 6: Em 2020, Zhang e colaboradores escolheram a classe química de α -cetoamidas peptidomiméticas para avaliar a viabilidade de obter medicamentos antivirais direcionados ao coronavírus com equipotência contra alfacoronavírus, betacoronavírus e enterovírus. Assim, foi descrito o projeto baseado em estrutura, síntese e avaliação da atividade inibitória de uma série de compostos de amplo espectro proporcionadas pelo estudo da relação estrutura-atividade, principalmente em relação à posição P2 dos peptidomiméticos. Os compostos sintetizados foram testados contra as proteases recombinantes, assim como em *replicon* virais e culturas de células infectadas com vírus. Dessa forma, verificou-se que a maioria das moléculas não foi tóxica para as células. O análogo ciclopropilmetil (molécula 6) (Figura 34) apresentou boa atividade contra a 3CL^{pro} dos vírus SARS-CoV, HCoV-NL63, HCoV-229E e MERS-CoV (ZHANG et al., 2020b).

Figura 34. Estrutura dos Inibidores de origem Sintética.

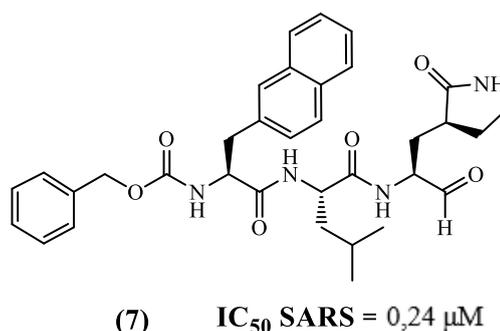


Fonte: Autora, 2023. A molécula (6) foi identificado como potente inibidor anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro}, HCoV-

NL63, HCoV-229E e MERS-CoV.

Molécula 7: Em 2013, Prior e colaboradores relataram a síntese e bioavaliação de uma classe de inibidores tripeptídicos antivirais de amplo espectro. Esse estudo teve como foco inibidores do estado de transição da 3CL^{pro}, incorporando um elemento de reconhecimento como um fragmento de peptídeo que é compatível com a especificidade de substrato conhecida das enzimas-alvo. Os resultados mostraram que a seletividade de um inibidor representativo (molécula 7) foi avaliado usando um painel de proteases, incluindo elastase de neutrófilos humanos, α -quimotripsina, tripsina e trombina. O inibidor 7 (Figura 35) mostrou atividade mínima contra essas todas essas enzimas. Por fim, esse inibidor pode ser desenvolvido como antiviral de amplo espectro contra esses vírus importantes (PRIOR et al., 2013).

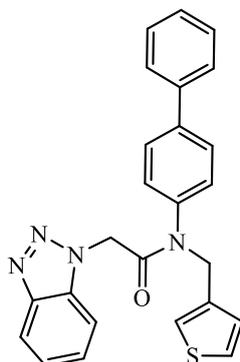
Figura 35. Estrutura dos Inibidores de origem Sintética.



Fonte: Autora, 2023. A molécula (7) foi identificado como potente inibidor anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro}.

Molécula 8: Em 2013, Turlington e colaboradores estudaram e descreveram a continuação dos esforços para o desenvolvimento de inibidores potentes e não covalentes da 3CL^{pro} do SARS-CoV, baseado em uma segunda classe química de triazóis da campanha deles de triagem (MLPCN) e o avanço desta série de compostos líderes para uma sonda de segunda geração sub-100 nM. Foi proposto por meio dos dados da pesquisa de cristalografia que ML300 e triazóis (molécula 8) (Figura 36) nesta série inibem a 3CL^{pro} através de um novo mecanismo de ação. Tal trabalho fornece uma nova direção para o planejamento e refinamento de inibidores não covalentes adicionais (TURLINGTON et al., 2013).

Figura 36: Estrutura dos Inibidores de origem Sintética.

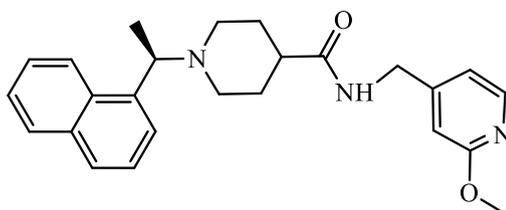


(8) IC_{50} SARS = 0,051 μ M

Fonte: Autora, 2023. A molécula (8) foi identificado como potente inibidor anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro}.

Moléculas 9: Em 2014, Báez-Santos e colaboradores tiveram como objetivo de seus estudos o design baseado em estrutura e foi usado para gerar uma série de inibidores não covalentes com potência nanomolar contra a protease semelhante à papaína (PL^{pro}) do coronavírus SARS-CoV. Vários inibidores (está na figura 37 – molécula 9) exibiram atividade contra células Vero E6 infectadas com SARS-CoV e com especificidade ampliada em relação à enzima PLP2 homóloga vindo do coronavírus humano. Concluindo, uma série de segunda geração de inibidores altamente potentes da PL^{pro} do SARS-CoV foram desenhadas e avaliadas biologicamente para o avanço no desenvolvimento de fármacos anticoronavírus. Os quatro compostos, entre eles a molécula 9 (figura 37) foram os inibidores mais potentes da PL^{pro} e na atividade antiviral SARS-CoV. Assim, a molécula 9 é um dos melhores candidatos para avançar em modelos de eficácia animal. (BÁEZ-SANTOS et al., 2014).

Figura 37. Estrutura dos Inibidores de origem Sintética.



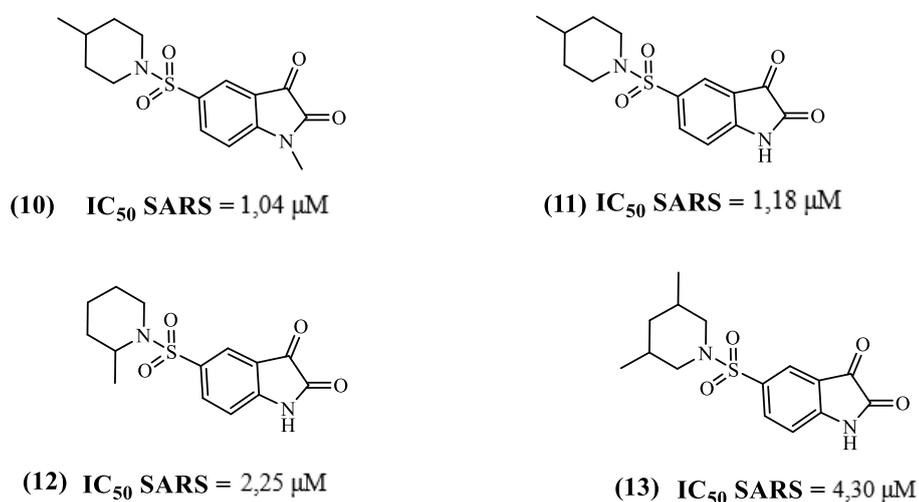
(9) IC_{50} SARS = 0.35 μ M

Fonte: Autora, 2023. A molécula (9) foi identificado como potente inibidor anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro}.

Moléculas 10-13: Em 2014, Liu e colaboradores estudaram uma série de derivados

da isatina como possíveis inibidores da 3CL^{pro} do SARS-CoV. Tal série de compostos foi planejada, sintetizada e avaliada por ensaios *in vitro* usando um substrato peptídico fluorogênico. Assim, foi observada uma potente inibição da 3CL^{pro} do SARS-CoV. A relação estrutura-atividade foi descrita e possíveis modos de interação de ligação propostos por estudos de docking molecular. Para prever esse modo de ligação das moléculas 10 e 11, a isatina 5-sulfonamida no sítio ativo da 3CL^{pro} do SARS-CoV (Código PDB 1UK4) usando Glide 5.5 (que é um modelo de glide no software Schrodinger), os compostos 10 e 11 foram fixados no sítio ativo. O composto 11 foi ligado por hidrogênio dentro da Gly143 e Cys145 na protease, o composto 11 gerou ligação de hidrogênio com a Gly143, Ser144 e Asn142. É notável que, ambos os grupos carbonil na posição 2 e o átomo de nitrogênio na posição 1 da isatina são importantes na formação de ligações de hidrogênio. Entretanto, a modelagem revelou que o esqueleto químico da isatina estava fixado no local S1' e a sequência lateral R2 e R3 estavam localizados nos sítios S2 e S1 da 3CL^{pro} do SARS, respectivamente. Em ambos os resultados de docking, as substituições na posição 5 ativaram os compostos 10 e 11 para fixar o sítio hidrofóbico S2. Esses experimentos de docking molecular apoiaram a observação no ensaio enzimático de que as potências dos IC₅₀ seguiram uma ordem nos quatro compostos (figura 38). Com base nesses encontrados acima, os pesquisadores acreditam que a atividade dos pequenos compostos pode ser melhorada por modificação com o anel simples de seis membros na posição 5 e substituição na posição N-1 por um grupo metil, o qual pode conduzir uma melhor combinação de compostos com um bolso de proteína. Dos compostos testados, a molécula 10 (figura 38) demonstrou uma maior atividade inibitória mais potente contra 3CL^{pro} comparada com as demais (Figura 38 com os valores de IC₅₀) (LIU et al., 2014).

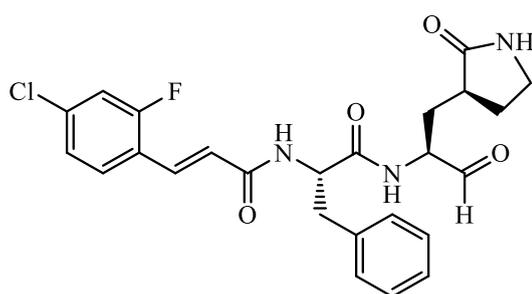
Figura 38. Estrutura dos Inibidores de origem Sintética.



Fonte: Autora, 2023. As moléculas (10), (11), (12) e (13) foram identificadas como potentes inibidores anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro}.

Molécula 14: Vathan e colaboradores, em 2017 selecionaram os inibidores de EV71 da 3CL^{pro} contra MERS-CoV e avaliaram ainda os êxitos por ensaios com sabe em células usando MERS-CoV vivo. Esses derivados representam alguns dos poucos agentes anti-MERS-CoV confirmados por ensaios baseados em células e também mostraram atividade de amplo espectro contra os tipos α e β dos CoVs, conforme descrito neste estudo. Um ensaio fluorométrico usando o peptídeo fluorogênico, Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans como descrito anteriormente foi utilizado para determinar as constantes de inibição dos compostos. A fluorescência foi aumentada devido a clivagem deste substrato catalisado pela 3CL^{pro} e foi monitorada em 538 nm com excitação em 355 nm. Os compostos peptidomiméticos foram sintetizados de acordo com o método relatado em Kuo e colaboradores. A avaliação preliminar desses compostos peptidomiméticos contra a 3CL^{pro} de MERS foram feitas em 50 μ M. Os compostos inibiram mais da metade da atividade da protease sob tal condição foram selecionados para outras medidas de IC₅₀. Utilizando ensaio enzimático, dentre os compostos a molécula 14 apresentou IC₅₀ pequeno contra a 3CL^{pro} purificado com o MERS-CoV. Esse composto também inibiu a 3CL^{pro} do SARS-CoV em valores pequenos de IC₅₀ (figura 39). (KUMAR et al., 2017).

Figura 39. Estrutura dos Inibidores de origem Sintética.



(14) IC₅₀ SARS = 0.2 μ M

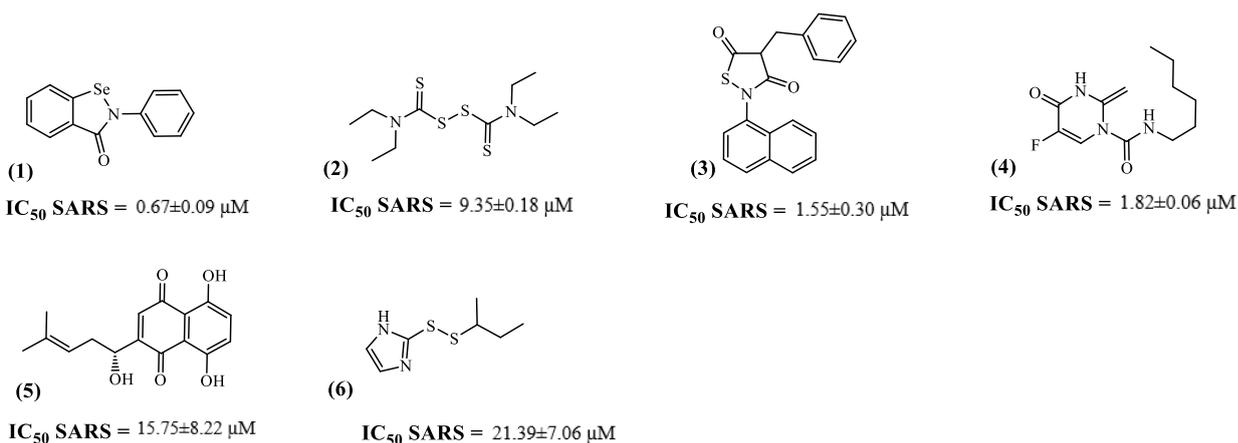
Fonte: Autora, 2023. A molécula (14) foi identificada como potente inibidor anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro}.

5.5. Inibidores da 3CL^{pro} Descobertos por Triagem Virtual

Moléculas 1-6: Em 2020, Jin e colaboradores descreveram os resultados de um programa que tinha o objetivo de descobrir rapidamente compostos líderes para uso clínico,

combinando design de fármacos assistidos, triagem virtual de fármacos e triagem de alto rendimento. Esse estudo teve o foco na identificação de medicamentos líderes que visam a protease principal 3CL^{pro} do SARS-CoV-2. Por meio de uma combinação de triagem virtual de alto rendimento (do inglês, *High-Throughput Screening - HTS*) com base em estrutura. Foram testados mais de 10.000 compostos (incluindo fármacos aprovados) candidatos a fármacos em ensaios clínicos e outros farmacologicamente ativo. No total, 6 desses compostos (moléculas 1-6) inibiram a 3CL^{pro} (Figura 39). Dentre esses 6 compostos, o ebselen (molécula 1), também teve a maior atividade antiviral promissora e mais forte dessa atividade em ensaios baseados em células. Os resultados mostraram a eficácia da estratégia da triagem virtual que pode levar à descoberta de fármacos com potencial clínico em resposta a novas doenças infecciosas para as quais não há medicamentos ou vacinas específicas disponíveis (JIN et al., 2020).

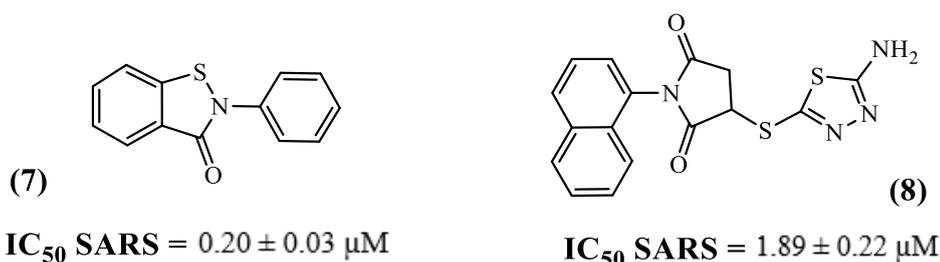
Figura 39. Estrutura dos Inibidores descobertos por Triagem Virtual.



Fonte: Autora, 2023. As moléculas (1), (2), (3), (4), (5) e (6) foram identificadas como potentes inibidores anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro}.

Molécula 7 e 8: Guo e colaboradores (2021) estudaram e identificaram dois principais inibidores da 3CL^{pro} por meio de triagem virtual com base em docking molecular e bioensaio. Primeiro, foi desenvolvido um protocolo de triagem virtual que inclui moléculas semelhante a fármacos, filtragem de moléculas PAINS e ADMET, design de fármacos com base em docking e análise de agrupamentos. Eles obtiveram 37 moléculas finais e elas foram testadas. Dentre esse total, apenas duas moléculas (molécula 7 e 8) apresentaram atividade biológica relativamente alta (valores de IC_{50} na Figura 40) (GUO et al., 2021).

Figura 40. Estrutura dos Inibidores descobertos por Triagem Virtual.

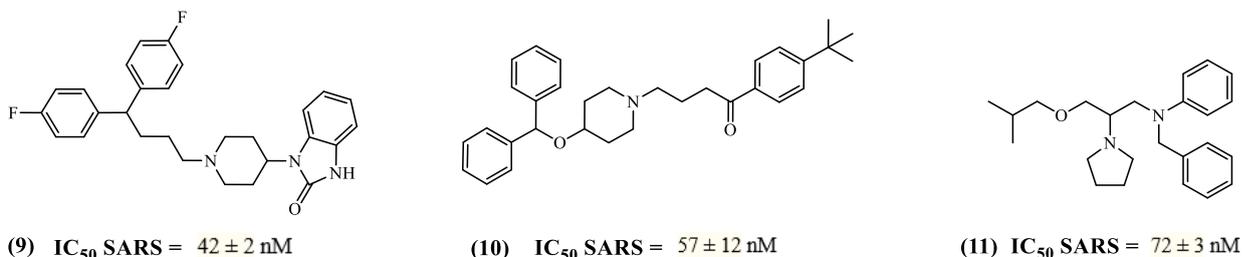


Fonte: Autora, 2023. As moléculas (7) e (8) foram identificadas como potentes inibidores anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro}.

Moléculas 9-11: Em 2020, Vatansever e colaboradores fizeram uma análise por docking molecular de 30 fármacos aprovados pela (FDA)-EMA e, posteriormente, foram caracterizados quanto as suas inibições da 3CL^{pro} da SARS-CoV-2. Destes fármacos, seis tiveram um valor de $IC_{50} < 100 \mu\text{M}$. Dentre eles, teve a Pimozida, Ebastina e Bepridil (moléculas 9, 10 e 11, respectivamente) são pequenas moléculas que são esperadas exercer um efeito semelhante à hidroxicloroquina no aumento do pH endossomal para diminuir a entrada da SARS-CoV-2 em células susceptíveis do hospedeiro. Para investigar se alguns fármacos existentes podem inibir potentemente a M^{pro}, foi feito o docking em grupo de fármacos de moléculas pequenas aprovadas pela FDA/EMA ao sítio ativo da M^{pro} e selecionaram 30 melhores fármacos para fazer a caracterização experimentalmente. Foram expressadas em células TOP10 de *Escherichia coli*. Para expressão desses fármacos, foi juntado o gene M^{pro} a um gene de proteína fluorescente verde superfolder (sfGFP). Em adição, para purificação direta foi feita com resinas Ni-NTA. Para purificação da M^{pro} clivado e na maturação, foi usado o sulfato de amônio para precipitá-lo da célula, depois foi usado a cromatografia de troca de íons e exclusão de tamanho para isolá-lo e obteve mais de 95% de pureza. Entre esses três fármacos, o bepridil pode ser muito interessante, pois anteriormente ele mostrou eficácia 100% de proteção contra a infecção do vírus Ebola em camundongos na dose de 12 mg/kg. Para pacientes com angina crônica estável, a dose recomendada diária é de 20 mg-400 mg/kg O Bepridil foi anteriormente explorado em uma dose alta de 100 mg/kg para tratamento de doenças. Seu uso em doses altas pode exercer funções duplas no tratamento da COVID-19, (a) aumentando o pH endossomal para retardar a entrada viral e (b) inibindo 3CL^{pro} em células infectadas. Na simulação de docking, o AutoDock 4 foi utilizado para todas as análises de docking. Para cada molécula, o cálculo foi com base em algoritmo genético foi realizado para 100 corridas com cada corrida tendo um número máximo de avaliações de 2.500.000. No entanto, os pesquisadores nesse estudo ressaltam a relevância de fazer os testes clínicos do uso de Bepridil

(molécula 11) para COVID-19. Por fim, os resultados revelaram que vários fármacos aprovados pela (FDA)-EMA têm alta potência na inibição do 3CL^{pro} e, portanto, incentivam o possível uso desses medicamentos no combate ao COVID-19 (VATANSEVER et al., 2020).

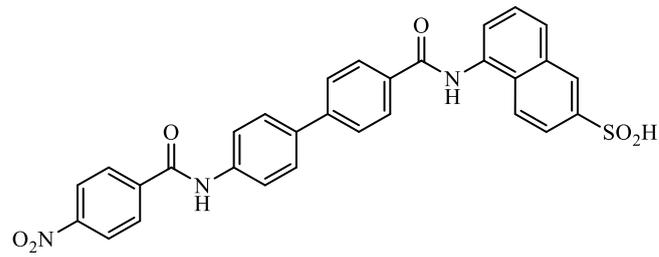
Figura 41. Estrutura dos Inibidores descobertos por Triagem Virtual.



Fonte: Autora, 2023. As moléculas (9), (10) e (11) foram identificadas como potentes inibidores anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro}.

Molécula 12: No ano de 2021, Bojadzic e colaboradores identificaram por meio de corantes orgânicos foi possível identificar SMIs (pequenas moléculas inibidoras) que podem equiparar aos PPIs (interação proteína-proteína), essenciais para a ativação e controle de células imunes. Os autores descobriram que pigmentos orgânicos, que é particularmente rico em fortes ligantes de proteínas, oferece um ponto de partida útil. Estes inibidores foram identificados por avaliação de uma biblioteca de pigmentos químicos. Dentre os candidatos promissores, a molécula 12 (DRI-C23041) inibiu a interação da hECA2 com a proteína spike do SARS-CoV-2 e SARS-CoV, com valores de atividade na escala micromolar em ensaios utilizando ELISA. O DRI-C23041 (figura 42) expressou uma seletividade e inibiu as duas diferentes entradas de SARS-CoV-2-S expressando um pseudovírus dentro da hECA2, o qual expressou células de um modo à depender da concentração, com um baixo valor de IC_{50} em micromolar. Isso fornece evidências para a viabilidade da inibição de PPIs como ponto crítico para a ligação do SARS-CoV-2 no hECA2, servindo como um primeiro guia na busca para alternativas de terapias antivirais contra a COVID-19 (BOJADZIC et al., 2021).

Figura 42. Estrutura dos Inibidores descobertos por Triagem Virtual.



(12) IC_{50} SARS = 0.52 μ M

Fonte: Autora, 2023. A molécula (12) foi identificada como potente inibidor anti-SARS-CoV-2 3CL^{pro}.

6. CONCLUSÃO

Os estudos sobre compostos de origem natural visando o alvo da 3CL^{pro} do SARS-CoV-2 foram encontrados e compilados em maiores proporções, assim os melhores estão: as moléculas (2), (3), (10), (11.a), (11.b), (11.c) e (13) com eficazes com valores excelentes de IC₅₀, CC₅₀, CE₅₀, SI e análises específicas de docking molecular e mecanismos de estrutura atividade para a inibição dessa protease. Os compostos de origem semissintética, seus estudos foram encontrados em quantidades menores, mas apresentam as moléculas (1) e (2) ótimos valores de inibição de IC₅₀, CE₅₀, CC₅₀, SI e docking molecular para a protease 3CL^{pro} do vírus SARS-CoV-2. Já os inibidores da 3CL^{pro} de origem sintética encontrados na literatura foram diversos, e os que foram agrupados são descritos como sendo muito potentes, de exemplo, os compostos (1), (2), (3), (4), (9), (10), (11), (12) e (13) na faixa de nanomolar (nM) e micromolar (μM), com resultados positivos de inibição. Para os inibidores da 3CL^{pro} identificados por meio de triagem virtual com base em docking molecular exibiram uma atividade antiviral promissora, com substâncias de valores baixos de IC₅₀, elevando a eficácia da triagem virtual como um potencial à descoberta de fármacos com potencial clínico. Além disso, demonstrando que técnicas *in silico* podem ser uma interessante alternativa para obtenção/identificação de compostos promissores.

REFERÊNCIAS

- AL-QAANEH, A. M. et al. Genome composition and genetic characterization of SARS-CoV-2. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 1978–1989, 1 mar. 2021.
- ALANAGREH, L.; ALZOUGHLOO, F.; ATOUM, M. The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. **Pathogens 2020, Vol. 9, Page 331**, v. 9, n. 5, p. 331, 29 abr. 2020.
- ANAND, K. et al. Coronavirus main proteinase (3CLpro) Structure: Basis for design of anti-SARS drugs. **Science**, v. 300, n. 5626, p. 1763–1767, 13 jun. 2003.
- ANGELINI, M. M. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. **mBio**, v. 4, n. 4, 13 ago. 2013. AZHAR, E. I. et al. Evidence for Camel-to-Human Transmission of MERS Coronavirus. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 26, p. 2499–2505, 26 jun. 2014.
- BÁEZ-SANTOS, Y. M. et al. X-ray structural and biological evaluation of a series of potent and highly selective inhibitors of human coronavirus papain-like proteases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2393–2412, 27 mar. 2014.
- BARANOV, P. V. et al. Programmed ribosomal frameshifting in decoding the SARS-CoV genome. **Virology**, v. 332, n. 2, p. 498–510, 20 fev. 2005.
- BARD, J. D.; BABADY, N. E. The Successes and Challenges of SARS-CoV-2 Molecular Testing in the United States. **Clinics in Laboratory Medicine**, 8 mar. 2022.
- BHARDWAJ, K. et al. RNA Recognition and Cleavage by the SARS Coronavirus Endoribonuclease. **Journal of Molecular Biology**, v. 361, n. 2, p. 243, 11 ago. 2006.
- BIANCHI, M. et al. Sars-CoV-2 Envelope and Membrane Proteins: Structural Differences Linked to Virus Characteristics? **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.
- BOJADZIC, D. et al. Small-Molecule Inhibitors of the Coronavirus Spike: ACE2 Protein-

Protein Interaction as Blockers of Viral Attachment and Entry for SARS-CoV-2. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1519–1534, 11 jun. 2021.

BOUVET, M. et al. RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 24, p. 9372–9377, 12 jun. 2012.

BRAGA, S.; SCHMIDT, A. Clinical and cytogenetic spectrum of duplication 3p. **European journal of pediatrics**, v. 138, n. 2, p. 195–197, mar. 1982.

CALLAWAY, E. The race for coronavirus vaccines: a graphical guide. **Nature**, v. 580, n.7805, p. 576–577, 30 abr. 2020.

CARNEIRO, D. C.; SOUSA, J. D.; MONTEIRO-CUNHA, J. P. The COVID-19 vaccine development: A pandemic paradigm. **Virus Research**, v. 301, p. 198454, 1 ago. 2021.

CDC, C. FO D. C. AND P.-. **SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>>. Acesso em: 26 mar. 2022.

CHAN, J. F. W. et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 221–236, 1 jan. 2020.

CHEN, S. C. et al. Expression and membrane integration of SARS-CoV E protein and its interaction with M protein. **Virus genes**, v. 38, n. 3, p. 365–371, jun. 2009.

CHEN, Y.; LIU, Q.; GUO, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 4, p. 418–423, 1 abr. 2020.

CHENG, V. C. C. et al. Viral replication in the nasopharynx is associated with diarrhea inpatients with severe acute respiratory syndrome. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 38, n. 4, p. 467–475, 15 fev.

2004.

CHIA, P. Y. et al. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospitalrooms of infected patients. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.

CHO, J. K. et al. Geranylated flavonoids displaying SARS-CoV papain-like protease inhibition from the fruits of *Paulownia tomentosa*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.21, n. 11, p. 3051–3057, 1 jun. 2013.

CORNILLEZ-TY, C. T. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling. **Journal of virology**, v. 83, n. 19, p. 10314–10318, out. 2009.

COTTAM, E. M.; WHEL BAND, M. C.; WILEMAN, T. Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion. **Autophagy**, v. 10, n. 8, p. 1426–1441, 2014.

DAI, W. et al. Structure-Based Design, Synthesis and Biological Evaluation of Peptidomimetic Aldehydes as a Novel Series of Antiviral Drug Candidates Targeting the SARS-CoV-2 Main Protease. **bioRxiv**, p. 2020.03.25.996348, 28 mar. 2020.

DAS, A. et al. An overview of basic molecular biology of SARS-CoV-2 and current COVID-19 prevention strategies. **Gene Reports**, v. 23, p. 101122, 1 jun. 2021.

WHO. IN. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Disponível em:

<<https://covid19.who.int/table>>. Acesso em: 21 mar. 2022a.

DE GROOT, R. J. et al. Commentary: Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. **Journal of Virology**, v. 87,n. 14, p. 7790–7792, 15 jul. 2013.

DE WILDE, A. H. et al. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cellculture. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4875–4884, 2014.

DECROLY, E. et al. Crystal structure and functional analysis of the SARS-coronavirus RNA cap 2'-O-methyltransferase nsp10/nsp16 complex. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 5, maio 2011.

DENG, X. et al. Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 21, p. E4251–E4260, 23 maio 2017.

DOERFLER, W. Adenoviral Vector DNA- and SARS-CoV-2 mRNA-Based Covid-19 Vaccines: Possible Integration into the Human Genome - Are Adenoviral Genes Expressed in Vector-based Vaccines? **Virus Research**, v. 302, p. 198466, 1 set. 2021.

DONG, E.; DU, H.; GARDNER, L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 20, n. 5, p. 533–534, 1 maio 2020.

DUART, G. et al. SARS-CoV-2 envelope protein topology in eukaryotic membranes. **Open Biology**, v. 10, n. 9, 1 set. 2020.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1282, p. 1–23, 26 fev. 2015.

FERNANDES, Q. et al. Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2031274>, v. 54, n. 1, p. 524–540, 2022.

GADLAGE, M. J. et al. Murine hepatitis virus nonstructural protein 4 regulates virus-induced membrane modifications and replication complex function. **Journal of virology**, v. 84, n. 1, p. 280–290, jan. 2010.

GHOSH, A. K. et al. Design and synthesis of peptidomimetic severe acute respiratory syndrome chymotrypsin-like protease inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n.22, p. 6767–6771, 3 nov. 2005.

GHOSH, N.; NANDI, S.; SAHA, I. A review on evolution of emerging SARS-CoV-2 variants based on spike glycoprotein. **International immunopharmacology**, v. 105, 1 abr.2022.

GLOWACKA, I. et al. Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. **Journal of Virology**, v. 85, n. 9, p. 4122–4134, maio 2011.

GOETZ, D. H. et al. Substrate specificity profiling and identification of a new class of inhibitor for the major protease of the SARS Coronavirus. **Biochemistry**, v. 46, n. 30, p.8744–8752, 31 jul. 2007.

GORDON, D. E. et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. **Nature** 2020 **583:7816**, v. 583, n. 7816, p. 459–468, 30 abr. 2020.

GROOT, R. J. DE et al. Commentary: Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. **Journal of Virology**, v. 87,n. 14, p. 7790–7792, 15 jul. 2013.

GULARTE, J. S. et al. Early introduction, dispersal and evolution of Delta SARS-CoV-2 in Southern Brazil, late predominance of AY.99.2 and AY.101 related lineages. **Virus Research**, v. 311, p. 198702, 2 abr. 2022.

GUO, S. et al. Discovery of novel inhibitors against main protease (Mpro) of SARS-CoV-2 via virtual screening and biochemical evaluation. **Bioorganic Chemistry**, v. 110, p. 104767,1 maio 2021.

HAIDER, N. et al. COVID-19-Zoonosis or Emerging Infectious Disease? **Frontiers in public health**, v. 8, 26 nov. 2020.

HARCOURT, B. H. et al. Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replicase Products and Characterization of Papain-Like Protease Activity. **Journal of Virology**, v. 78, n. 24, p. 13600–13612, 15 dez. 2004.

HIGHLIGHTS, C. **Guangdong Province Weather Information**. Disponível em: <<https://www.chinahighlights.com/guangdong/weather.htm>>. Acesso em: 16 mar. 2022.

HOFFMAN, R. L. et al. Discovery of Ketone-Based Covalent Inhibitors of Coronavirus 3CL

Proteases for the Potential Therapeutic Treatment of COVID-19. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 21, p. 12725–12747, 12 nov. 2020.

HUANG, C. et al. SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 12, dez. 2011.

HUSSAIN, S. et al. Identification of novel subgenomic RNAs and noncanonical transcription initiation signals of severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Journal of virology**, v. 79, n. 9, p. 5288–5295, maio 2005.

INSTITUTO BUTANTAN. **Quais são as diferenças entre as vacinas contra Covid-19 que estão sendo aplicadas no Brasil? - Instituto Butantan**. Disponível em:

<<https://butantan.gov.br/covid/butantan-tira-duvida/tira-duvida-noticias/quais-sao-as-diferencas-entre-as-vacinas-contra-covid-19-que-estao-sendo-aplicadas-no-brasil>>. Acesso em: 25 mar. 2022. **International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/>>. Acesso em: 16 mar. 2022.

JACOBS, J. et al. Discovery, synthesis, and structure-based optimization of a series of N- (tert-butyl)-2-(N-arylamido)-2-(pyridin-3-yl) acetamides (ML188) as potent noncovalent small molecule inhibitors of the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) 3CL protease. **Journal of medicinal chemistry**, v. 56, n. 2, p. 534–546, 24 jan. 2013.

JAWARKAR, R. D. et al. QSAR based virtual screening derived identification of a novel hit as a SARS CoV-229E 3CLpro Inhibitor: GA-MLR QSAR modeling supported by molecular Docking, molecular dynamics simulation and MMGBSA calculation approaches. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 103499, 1 jan. 2022.

JIA, Z. et al. Delicate structural coordination of the Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus Nsp13 upon ATP hydrolysis. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 12, p. 6538–6550, 9 jul. 2019.

JIN, Z. et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. **Nature** 2020 **582:7811**, v. 582, n. 7811, p. 289–293, 9 abr. 2020.

JO, S. et al. Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 145–151, 1 jan. 2020.

JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–993, 21 fev. 2008.

KALITA, P.; TRIPATHI, T. Methodological advances in the design of peptide-based vaccines. **Drug Discovery Today**, 10 mar. 2022.

KHALIFA, S. A. M. et al. Screening for natural and derived bio-active compounds in preclinical and clinical studies: One of the frontlines of fighting the coronaviruses pandemic. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 85, 1 maio 2021.

KIM, D. E. et al. Natural Bis-Benzylisoquinoline Alkaloids-Tetrandrine, Fangchinoline, and Cepharanthine, Inhibit Human Coronavirus OC43 Infection of MRC-5 Human Lung Cells. **Biomolecules 2019, Vol. 9, Page 696**, v. 9, n. 11, p. 696, 4 nov. 2019.

KIM, Y. et al. Potent inhibition of feline coronaviruses with peptidyl compounds targeting coronavirus 3C-like protease. **Antiviral Research**, v. 97, n. 2, p. 161–168, 1 fev. 2013.

KONNO, H. et al. Synthesis and evaluation of phenylisoserine derivatives for the SARS-CoV 3CL protease inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 12, p. 2746–2751, 15 jun. 2017.

KONWAR, M.; SARMA, D. Advances in developing small molecule SARS 3CLpro inhibitors as potential remedy for corona virus infection. **Tetrahedron**, v. 77, p. 131761, 1jan. 2021.

KUMAR, M. et al. Game of Transmissions (GoT) of SARS-CoV-2: Second Wave of COVID-19 is here in India. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, p.100355, 19 mar. 2022.

KUMAR, V. et al. Identification and evaluation of potent Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) 3CLPro inhibitors. **Antiviral Research**, v. 141, p. 101–106, 1 maio

2017.

KUO, L. et al. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. **Journal of virology**, v. 74, n. 3, p. 1393–1406, fev. 2000.

LATINI, A. et al. COVID-19 and Genetic Variants of Protein Involved in the SARS-CoV-2 Entry into the Host Cells. **Genes 2020, Vol. 11, Page 1010**, v. 11, n. 9, p. 1010, 27 ago. 2020.

LEI, J.; KUSOV, Y.; HILGENFELD, R. Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. **Antiviral research**, v. 149, p. 58–74, 1 jan. 2018.

LEYSEN, P.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. **Antiviral Research**, v. 78, n. 1, p. 9–25, 1 abr. 2008.

LI, B. et al. Viral infection and transmission in a large, well-traced outbreak caused by the SARS-CoV-2 Delta variant. **Nature communications**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

LI, S. Y. et al. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. **Antiviral Research**, v. 67, n. 1, p. 18–23, 1 jul. 2005.

LIN, C. W. et al. Anti-SARS coronavirus 3C-like protease effects of *Isatis indigotica* root and plant-derived phenolic compounds. **Antiviral Research**, v. 68, n. 1, p. 36–42, 1 out. 2005.

LIU, D. et al. Potential secondary transmission of SARS-CoV-2 via wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 749, p. 142358, 20 dez. 2020a.

LIU, S. J. et al. Immunological characterizations of the nucleocapsid protein based SARS vaccine candidates. **Vaccine**, v. 24, n. 16, p. 3100–3108, 12 abr. 2006.

LIU, W. et al. Synthesis, modification and docking studies of 5-sulfonyl isatin derivatives as SARS-CoV 3C-like protease inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 292–302, 1 jan. 2014.

MARTIN, M. A.; VANINSBERGHE, D.; KOELLE, K. Insights from SARS-CoV-2

sequences. **Science (New York, N.Y.)**, v. 371, n. 6528, p. 466–467, 29 jan. 2021. MARTINA, E. et al. Screening of electrophilic compounds yields an aziridinyl peptide as new active-site directed SARS-CoV main protease inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 24, p. 5365–5369, 15 dez. 2005.

MCKEE, D. L. et al. Candidate drugs against SARS-CoV-2 and COVID-19. **Pharmacological research**, v. 157, 1 jul. 2020.

PAPANIKOLAOU, V. et al. From delta to Omicron: S1-RBD/S2 mutation/deletion equilibrium in SARS-CoV-2 defined variants. **Gene**, v. 814, 10 mar. 2022.

PARK, J. Y. et al. Tanshinones as selective and slow-binding inhibitors for SARS-CoV cysteine proteases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5928–5935, 1 out. 2012.

PARK, J. Y. et al. Dieckol, a SARS-CoV 3CLpro inhibitor, isolated from the edible brown algae *Ecklonia cava*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 13, p. 3730–3737, 1 jul. 2013.

PARK, J. Y. et al. Chalcones isolated from *Angelica keiskei* inhibit cysteine proteases of SARS-CoV. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 23–30, 2 jan. 2016.

PAULES, C. I.; MARSTON, H. D.; FAUCI, A. S. Coronavirus Infections—More Than Just the Common Cold. **JAMA**, v. 323, n. 8, p. 707–708, 25 fev. 2020.

PEIRIS, J. S. M. et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. **Lancet (London, England)**, v. 361, n. 9366, p. 1319–1325, 19 abr. 2003a.

PEIRIS, J. S. M. et al. The severe acute respiratory syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 349, n. 25, p. 2431–2441, 18 dez. 2003b.

PERBOLIANACHIS, P. et al. Phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 viruses circulating in the South American region: Genetic relations and vaccine strain match. **Virus research**, v. 311,

abr. 2022.

PERLMAN, S.; NETLAND, J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology** **2009 7:6**, v. 7, n. 6, p. 439–450, 11 maio 2009.

PILLAIYAR, T.; MEENAKSHISUNDARAM, S.; MANICKAM, M. Recent discovery and development of inhibitors targeting coronaviruses. **Drug discovery today**, v. 25, n. 4, p. 668–688, 1 abr. 2020.

PRIOR, A. M. et al. Design, synthesis, and bioevaluation of viral 3C and 3C-like protease inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 23, p. 6317–6320, 1 dez. 2013.

RAINER, T. H. et al. Evaluation of WHO criteria for identifying patients with severe acute respiratory syndrome out of hospital: prospective observational study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 326, n. 7403, p. 1354–1358, 21 jun. 2003.

RAJEEV, R. et al. Zoonotic evolution and implications of microbiome in viral transmission and infection. **Virus research**, v. 290, 1 dez. 2020.

RAMBAUT, A. et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. **15 July**, 2020.

RAMBAUT, A. et al. Addendum: A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. **Nature microbiology**, v. 6, n. 3, p. 415, 1 mar. 2021.

REN, Z. et al. The newly emerged SARS-like coronavirus HCoV-EMC also has an “Achilles” heel”: current effective inhibitor targeting a 3C-like protease”. **Protein & cell**, v. 4, n. 4, p. 248–250, 1 abr. 2013.

RYU, Y. B. et al. SARS-CoV 3CLpro inhibitory effects of quinone-methide triterpenes from *Tripterygium regelii*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 6, p. 1873–1876, 15 mar. 2010a.

SANTARPIA, J. L. et al. Aerosol and surface contamination of SARS-CoV-2 observed in quarantine and isolation care. **Scientific Reports** 2020 **10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 29 jul. 2020.

SCALERA, N. M.; MOSSAD, S. B. The first pandemic of the 21st century: a review of the 2009 pandemic variant influenza A (H1N1) virus. **Postgraduate medicine**, v. 121, n. 5, p. 43–47, 2009.

SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology Journal** 2019 **16:1**, v. 16, n. 1, p. 1–22, 27 maio 2019.

SHEN, Z. et al. Genomic Diversity of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2 in Patients With Coronavirus Disease 2019. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 71, n. 15, p. 713–720, 1 ago.2020.

SHEREEN, M. A. et al. COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **Journal of Advanced Research**, v. 24, p. 91–98, 1 jul. 2020.

SHI, P. et al. PEDV nsp16 negatively regulates innate immunity to promote viral proliferation. **Virus Research**, v. 265, p. 57, 1 maio 2019.

SILVA, L. R. et al. Druggable targets from coronaviruses for designing new antiviral drugs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 22, p. 115745, 2020a.

STALIN RAJ, V. et al. Isolation of MERS Coronavirus from a Dromedary Camel, Qatar, 2014 - Volume 20, Number 8—August 2014 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 8, p. 1339–1342, 2014a.

STOBART, C. C. et al. Chimeric Exchange of Coronavirus nsp5 Proteases (3CLpro) Identifies Common and Divergent Regulatory Determinants of Protease Activity. **Journal of Virology**, v. 87, n. 23, p. 12611, dez. 2013.

SUN, Q. et al. Bardoxolone and bardoxolone methyl, two Nrf2 activators in clinical trials, inhibit SARS-CoV-2 replication and its 3C-like protease. **Signal Transduction and Targeted Therapy** 2021 **6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–3, 29 maio 2021.

SYDNES, M. O. et al. Synthesis of glutamic acid and glutamine peptides possessing a trifluoromethyl ketone group as SARS-CoV 3CL protease inhibitors. **Tetrahedron**, v. 62, n. 36, p. 8601–8609, 4 set. 2006.

TAHIR UL QAMAR, M. et al. Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 4, p. 313, 1 ago. 2020.

TAN, C. W. et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. **Nature biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1073–1078, 1 set. 2020.

TANAKA, T. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 facilitates efficient propagation in cells through a specific translational shutoff of host mRNA. **Journal of virology**, v. 86, n. 20, p. 11128–11137, 15 out. 2012.

TANG, S. et al. Aerosol transmission of SARS-CoV-2? Evidence, prevention and control. **Environment International**, v. 144, p. 106039, 1 nov. 2020.

TE VELTHUIS, A. J. W. et al. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 1, p. 203–214, 29 out. 2010.

TE VELTHUIS, A. J. W.; VAN DEN WORM, S. H. E.; SNIJDER, E. J. The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 4, p. 1737, fev. 2012.

TOMAR, S. et al. Ligand-induced Dimerization of Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus nsp5 Protease (3CLpro): IMPLICATIONS FOR nsp5 REGULATION AND THE DEVELOPMENT OF ANTIVIRALS *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 32, p. 19403–19422, 7 ago. 2015.

TUNG, F. Y. T. et al. The 9-kDa hydrophobic protein encoded at the 3' end of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus genome is membrane-associated. **Virology**, v. 186, n. 2, p. 676–683, 1992.

TURLINGTON, M. et al. Discovery of N-(benzo[1,2,3]triazol-1-yl)-N-(benzyl)acetamido)phenyl) carboxamides as severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) 3CLpro inhibitors: Identification of ML300 and noncovalent nanomolar inhibitors with an induced-fit binding. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 22, p. 6172–6177, 15 nov. 2013.

VATANSEVER, E. C. et al. Targeting the SARS-CoV-2 Main Protease to Repurpose Drugs for COVID-19. **bioRxiv**, 23 maio 2020.

VENNEMA, H. et al. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles byco-expression of viral envelope protein genes. **The EMBO journal**, v. 15, n. 8, p. 2020– 2028, 15 abr. 1996.

WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281- 292.e6, 16 abr. 2020.

WANG, C. C. et al. Airborne transmission of respiratory viruses. **Science**, v. 373, n. 6558, 27 ago. 2021.

WANG, J. et al. The COVID-19 Vaccine Race: Challenges and Opportunities in Vaccine Formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 6, 1 ago. 2020.

WEI, P. et al. The N-terminal octapeptide acts as a dimerization inhibitor of SARS coronavirus 3C-like proteinase. **Biochemical and biophysical research communications**, v.339, n. 3, p. 865–872, 20 jan. 2006.

WHO. **Coronavirus disease (COVID-19)**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1>. Acesso em: 3 mar. 2022a.

WU, C. et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 5, p. 766–788, 1 maio 2020.

WU, C. Y. et al. Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human coronavirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

America, v. 101, n. 27, p. 10012–10017, 6 jul. 2004a.

YAO, H. et al. Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. **Cell**, v. 183, n. 3, p. 730-738.e13, 29 out. 2020.

ZAKI, A. M. et al. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1814–1820, 8 nov. 2012.

ZENG, W. et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 527, n. 3, p. 618–623, 30 jun. 2020.

ZENG, Z. et al. Dimerization of Coronavirus nsp9 with Diverse Modes Enhances Its Nucleic Acid Binding Affinity. **Journal of virology**, v. 92, n. 17, set. 2018.

ZHANG, H. Z. et al. Design and synthesis of dipeptidyl glutaminyl fluoromethyl ketones as potent severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1198–1201, 9 fev. 2006.

ZHANG, J. et al. Structure of SARS-CoV-2 spike protein. **Current Opinion in Virology**, v. 50, p. 173–182, 1 out. 2021.

ZHANG, L. et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. **Science**, v. 368, n. 6489, p. 409–412, 24 abr. 2020a.

ZHOU, Y. F. et al. Harnessing Natural Products by a Pharmacophore-Oriented Semisynthesis Approach for the Discovery of Potential Anti-SARS-CoV-2 Agents. **Angewandte Chemie International Edition**, p. e202201684, 2022.

ZHU, L. et al. Peptide aldehyde inhibitors challenge the substrate specificity of the SARS-coronavirus main protease. **Antiviral research**, v. 92, n. 2, p. 204–212, nov. 2011.

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **The New England journal of medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020

ZHU, X. et al. Porcine Deltacoronavirus nsp5 Antagonizes Type I Interferon Signaling by Cleaving STAT2. **Journal of virology**, v. 91, n. 10, 15 maio 2017.

ZIEBUHR, J. The Coronavirus Replicase. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 287, p. 57–94, 2005.