



# UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS DUAIS FRENTE ÀS  
ENZIMAS NS2B-NS3 DOS VÍRUS DENGUE E ZIKA E NSP2 DO VÍRUS  
CHIKUNGUNYA**

**(Volume I)**

**Universidade Federal de Alagoas**

**Campus A. C. Simões  
Tabuleiro do Martins  
57072-970 - Maceió-AL**

**EDEILDO FERREIRA DA SILVA JÚNIOR**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS DUAIS FRENTE ÀS  
ENZIMAS NS2B-NS3 DOS VÍRUS DENGUE E ZIKA E NSP2 DO VÍRUS  
CHIKUNGUNYA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção da Aprovação em exame de Defesa de Tese.

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior

Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tanja Schirmeister

**(Volume I)**

**Maceió - AL**

**2019**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

S586s Silva Júnior, Edeildo Ferreira da.  
Síntese e avaliação biológica de compostos duais frente às enzimas NS2B-NS3 dos vírus Dengue e Zika e nsP2 do vírus Chikungunya / Edeildo Ferreira da Silva Júnior. – 2019.  
235 f. : il. color.

Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.  
Co-orientadora: Tanja Schirmeister.  
Tese (Doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 203-229.  
Apêndices: f. 230-235.

1. Dengue. 2. Zika vírus. 3. Vírus *Chikungunya*. 4. Compostos bioativos. 5. Inibidores de proteases. 6. Terapia assistida por computador. I. Título.

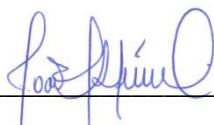
CDU:66.097.8

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### EDEILDO FERREIRA DA SILVA JÚNIOR

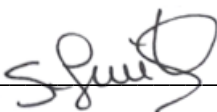
Síntese e avaliação biológica de compostos duais frente às enzimas NS2B-NS3 dos vírus Dengue e Zika e nsP2 do vírus Chikungunya

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 03 / 04 /2019.

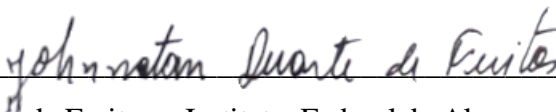


(Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior – UFAL) (Orientador)

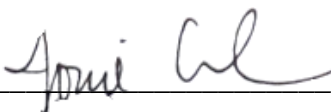
#### Banca Examinadora



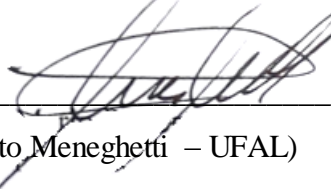
(Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Martine Schmitt – Universidade de Estrasburgo - França) (Examinador Externo)



(Prof. Dr. Johnatan Duarte de Freitas – Instituto Federal de Alagoas - Maceió) (Examinador Externo)



(Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos – UFAL) (Examinador Interno)



(Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti – UFAL) (Examinador Interno)

## AGRADECIMENTOS

À minha família, Edeildo Ferreira da Silva e Roseana Siqueira Pinheiro Ferreira, por todo apoio incondicional dado a mim durante todas as etapas da minha vida. Ao meu irmão, Renan Ferreira Pinheiro, por toda parceria durante os momentos de dificuldades encontrados durante a execução deste trabalho.

À minha amada esposa, Valéria Brandão Pereira, por todo apoio incondicional dado a mim durante meu crescimento acadêmico e pessoal. Agradeço-a por ser tudo o que precisei durante momentos difíceis e felizes que foram vividos por mim (nós). Por fim, tenho certeza que a permanência dela ao meu lado tornou minha caminhada até aqui mais produtiva e afortunada.

Ao meu grande amigo, Prof. Dr. Genildo Cavalcante (Instituto Federal do Acre - IFAC), por toda parceria durante muitos momentos difíceis e outros felizes. Ademais, agradeço-o por ser um indivíduo idôneo, honesto, batalhador e gentil, assim representando um grande exemplo de vida e profissional para mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior (ESEFAR-UFAL), por todas as sugestões e orientações dadas a mim durante a execução deste e outros trabalhos. Além disso, agradeço-o por acreditar em meu potencial e por me permitir fazer parte do Laboratório de Química Medicinal (LQM), desde meu período de iniciação científica até o doutorado, passando-me muitos conhecimentos e lições.

Ao Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino (IQB-UFAL) por todo apoio e orientações quanto à execução de diversos trabalhos durante meu período de mestrado (como coorientador) e doutorado (como colaborador). Ademais, agradeço-o por me passar muitos conhecimentos e por me ensinar a ter uma conduta ética e respeitosa na área acadêmica.

Ao Prof. Dr. Julio Cosme Santos da Silva (IQB-UFAL) por toda atenção e auxílio na elaboração de propostas de projetos de pesquisa na área de química inorgânica e computacional. Ainda, agradeço-o por me mostrar como ser um professor comprometido e exemplar.

Ao grupo do LQM, Paulo Fernando, Igor Nascimento, Érica Erlanny, Kadja Chagas, Marccone Alcantara, Nathan Melo, Rafaelle Fontes (ex-integrante), Giovanni Leoncini, Nathallia Campos

(ex-integrante), Ednaldo Gomes, Edjan Silva (dinâmica), por tornar o ambiente tão harmonioso e favorecer a execução dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Christian Klein (Bayer & Universidade de Heidelberg – Alemanha) por me indicar como potencial pesquisador para a Universidade de Mainz, permitindo-me realizar meu período de doutorado sanduíche na Alemanha.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tanja Schirmeister (Universidade Johannes Gutenberg de Mainz – Alemanha), por me aceitar como estudante de doutorado em seu grupo de pesquisa. Ainda, agradeço-a por toda a disponibilidade e profissionalismo durante as discussões científicas, orientações, apresentações e questionamentos. Por fim, agradeço-a por tornar claro o papel do professor enquanto orientador, bem como, o respeito que é devido a este profissional.

Ao MSc. Fabian Barthels (Universidade Johannes Gutenberg de Mainz – Alemanha) por me auxiliar durante a elaboração de metodologias sintéticas, bem como, na realização dos ensaios biológicos frente à protease NS2B-NS3 dos vírus Dengue e Zika. Ainda, agradeço-o por tornar o ambiente de trabalho harmônico e produtivo.

Ao MSc. Marvin Schwickert (Universidade Johannes Gutenberg de Mainz – Alemanha) por me ensinar várias técnicas de manuseio de aparatos laboratoriais. Ainda, agradeço-o por tornar o ambiente de trabalho harmônico e produtivo.

Ao MSc. Kevin Schwickert (Universidade Johannes Gutenberg de Mainz – Alemanha) por realizar todos experimentos relacionados às técnicas de cromatografia líquida de alta-eficiência (CLAE) e espectrometria de massas (EM).

Ao Dr. Sascha Jung (Universidade Johannes Gutenberg de Mainz – Alemanha) por me auxiliar durante o início das minhas atividades no grupo de pesquisa coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Schirmeister. Além disso, agradeço-o por todos os conhecimentos passados a mim e pela amizade resultante do trabalho em parceria.

À técnica Sabine Mährlein (Universidade Johannes Gutenberg de Mainz – Alemanha) por executar os experimentos de inibição competitiva.

À CAPES, CNPq e FAPESP por fornecer apoio financeiro a mim em todos os estágios acadêmicos pelos quais passei, desde minha iniciação científica até o doutorado (sanduíche).

*"Ich denke niemals an die Zukunft,  
sie kommt früh genug"*  
– Albert Einstein –



## RESUMO

Os vírus Dengue (DENV) e Zika (ZIKV) são flavivírus pertencentes à família *Flaviviridae*, que são transmitidos pela picada do vetor infectado, nesse caso, mosquitos do gênero *Aedes spp.* A replicação viral de ambos é função da proteína não-estrutural 3 (NS3<sup>pro</sup>), que atua em associação à NS2B, aumentando a eficiência da atividade enzimática. Assim, tal complexo proteico representa um alvo atrativo para o planejamento de novos fármacos antivirais. O vírus Chikungunya (CHIKV) é considerado como um patógeno do Velho Mundo, pertencente à família *Togaviridae*. Este é uma arbovirose do gênero *Alphavirus* que também é transmitido igualmente por mosquitos *Aedes spp.* Neste, a proteína não-estrutural 2 (nsP2) está relacionada à clivagem de poliproteínas não-estruturais, fundamentais ao processo de replicação do CHIKV. Diante disto, a presente tese de doutorado buscou desenvolver quatro séries de compostos bioativos, planejados de modo racional por meio da aplicação de técnicas computacionais. No total, 82 benzotiazóis acoplados a diferentes ácidos foram sintetizados e avaliados frente à NS2B-NS3. Dentre estes, sete compostos apresentaram atividade significativa, sendo o (*E*)-3-(4-(*terc*-butil)fenil)-*N*-(6-metoxibenzo[*d*]tiazol-2-il)acrilamida (**75**) detentor da melhor atividade, com valores de IC<sub>50</sub> de 7,6 e 11 μM frente às proteases do ZIKV e DENV, respectivamente. Ainda, foi verificado que os derivados ativos exercem atividade por mecanismo não competitivo. Todos os resultados obtidos foram utilizados para a construção da relação estrutura-atividade de cada série de análogos, bem como, utilizados durante a discussão dos resultados de *docking* molecular. Em paralelo, um novo protocolo virtual para aplicação no estudo de compostos anti-CHIKV foi desenvolvido com resultados significantes, com valores de  $r^2$  de 0,7 (ChemScore) e 0,84 (GoldScore). Por fim, observou-se que os derivados sintetizados não podem atuar por mecanismo tipo-acceptor de Michael e que estes possuem características químicas mais promissoras do que os compostos encontrados na literatura.

**Palavras-chave:** Dengue. Zika. Chikungunya. NS2B-NS3. nsP2. Síntese. Benzotiazol. Protocolo virtual. Não covalente.

## ABSTRACT

Dengue (DENV) and Zika (ZIKV) viruses are flaviviruses that belong to the *Flaviviridae* family, which are transmitted by the bite of the infected vector, in this case, mosquitoes from the *Aedes spp.* genus. Viral replication of both is a function of non-structural protein 3 (NS3<sup>pro</sup>), which acts in association with NS2B, increasing the efficiency of the enzymatic activity. Thus, this protein complex represents an attractive target for the design of novel antiviral drugs. Chikungunya virus (CHIKV) is considered to be an Old World pathogen belonging to the *Togaviridae* family. This is an arbovirus from the *Alphavirus* genus that is also transmitted by *Aedes spp.* In this, non-structural protein 2 (nsP2) is related to the cleavage of non-structural polyproteins, fundamental to the CHIKV replication process. In sense, this thesis aimed to develop four series of bioactive compounds, rationally designed using computational techniques. In total, 82 benzothiazoles coupled to different acids were synthesized and evaluated toward NS2B-NS3 protease. Among these, 7 compounds showed significant activity, and the (*E*)-3-(4-(tert-butyl)phenyl)-*N*-(6-methoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)acrylamide (**75**) exhibited the best activity, with IC<sub>50</sub> values of 7.6 and 11 μM upon ZIKV and DENV proteases, respectively. Also, it was verified that the active derivatives exert activity by a non-competitive mechanism. All results were used to construct the structure-activity relationship of each series of analogs, as well as, used during the discussion of molecular docking results. In parallel, a new virtual protocol for application in the study of anti-CHIKV compounds was developed with satisfactory results, with *r*<sup>2</sup> values of 0.7 (ChemScore) and 0.84 (GoldScore). Finally, it has been observed that the synthesized derivatives cannot act as Michael acceptor-type mechanism and that these have more promising chemical characteristics than the compounds found in the literature.

**Keywords:** Dengue. Zika. Chikungunya. NS2B-NS3. nsP2. Synthesis. Benzothiazole. Virtual protocol. Non-covalent.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gêneros de mosquitos que atuam mais comumente como vetores de flavivírus. ....	28
Figura 2 – Prevalência mundial do vírus Dengue.....	29
Figura 3 – Ciclos de transmissão silvestre e urbano para o vírus Zika. ....	30
Figura 4 – Microcefalia em neonatos com infecção por Zika congenitamente contraída. ....	32
Figura 5 – Visão geral do ciclo de infecção dos flavivírus em nível celular.....	33
Figura 6 – Componentes estruturais e não estruturais da poliproteína flaviviral. ....	35
Figura 7 – Representações tridimensionais das proteínas não-estruturais dos flavivírus.....	37
Figura 8 – Modelo esquemático para o multicomplexo proteico NS2B/NS3 do DENV. ....	38
Figura 9 – Mecanismo enzimático da tríade catalítica na protease NS2B-NS3.....	39
Figura 10 – Conformações fechada (A) e aberta (B) para a protease NS2B-NS3 do DENV2.	41
Figura 11 – Conformações fechada e aberta para a protease NS2B-NS3 do ZIKV.....	42
Figura 12 – Sítio alostérico hipotético no DENV-2. ....	43
Figura 13 – Benzotiazóis biologicamente ativos frente à NS2B-NS3 do DENV2 e 3.....	49
Figura 14 – Novas sulfonamidas ativas contra a NS2B-NS3 do ZIKV. ....	50
Figura 15 – Prolil-sulfonamidas substituídas e ativas frente à protease NS2B-NS3 dos vírus DENV2 e ZIKV.....	51
Figura 16 – Formação do complexo Cys143-maleimida.....	52
Figura 17 – FARMD's utilizados na farmacoterapia do CHIKV resistente aos AINES. ....	55
Figura 18 – Ciclo biológico do vírus Chikungunya. ....	57
Figura 19 – Estrutura tridimensional do vírus Chikungunya. ....	58
Figura 20 – Representação gráfica dos cinco sítios de ligação (pockets) encontrados na superfície da nsP2 do vírus Chikungunya. ....	59
Figura 21 – Melhor análogo derivado da acilidrazona contendo fenil(4-t-butil)ciclopropano e suas interações com a nsP2 do vírus Chikungunya. ....	62
Figura 22 – Melhor análogo acilidrazona sintetizado por Das <i>et al.</i> , 2016.....	63
Figura 23 – Melhor análogo sintetizado por Giancotti <i>et al.</i> , 2018.....	63
Figura 24 – Melhores compostos sintetizados por Tardugno <i>et al.</i> e suas interações.....	64
Figura 25 – Núcleo 2-aminobenzotiazol selecionado como ponto de partida para o planejamento dos potenciais compostos duais. ....	72
Figura 26 – Estrutura básica das acilidrazonas (37) e fenilciclopropanos (38) ativos frente à nsP2 do vírus Chikungunya.....	73
Figura 27 – Interações e pré-requisitos moleculares necessários à atividade anti-CHIKV.....	73

Figura 28 – Estratégia de hibridização molecular utilizada no planejamento racional dos novos compostos duais.....	74
Figura 29 – Fluxograma utilizado para o desenvolvimento do protocolo virtual para explorar inibidores da nsP2 do vírus Chikungunya. ....	126
Figura 30 – Visualização esquemática dos compostos selecionados. ....	127
Figura 31 – Estrutura química do composto de referência utilizado no estudo por DFT. ....	130
Figura 32 – Mecanismo reacional proposto para obtenção dos ácidos cinâmicos. ....	135
Figura 33 – Mecanismo reacional proposto para obtenção de cloretos de acilas a partir de ácidos cinâmicos.....	137
Figura 34 – Mecanismo reacional proposto para a obtenção dos análogos 2-aminobenzo[d]tiazóis.....	139
Figura 35 – Mecanismo reacional para obtenção dos derivados 2-aminobenzo[d]tiazóis não-halogenados acoplados aos correspondentes ácidos carboxílicos.....	141
Figura 36 – Mecanismo reacional para obtenção dos derivados 2-aminobenzo[d]tiazóis halogenados acoplados aos correspondentes ácidos carboxílicos.....	142
Figura 37 – Mecanismo reacional para obtenção dos derivados hidroxilados dos 2-aminobenzo[d]tiazóis acoplados aos análogos dos ácidos carboxílicos.....	143
Figura 38 – Mecanismo proposto para bromoboração dos inibidores.....	144
Figura 39 – Estados de transição analisados em nível atomístico usando DFT B3LYP/6-31G(d). ....	145
Figura 40 – Similaridade estrutural dos derivados selecionados para REA interséries.....	158
Figura 41 – Derivados trimetoxilados dos compostos mais promissores.....	159
Figura 42 – Substituição do núcleo benzo[d]tiazol por fenil-4-tiazol.....	160
Figura 43 – Coeficientes de correlação ( $r^2$ ) para os diferentes algoritmos genéticos (GA's) de busca empregados nos experimentos de docking molecular.....	162
Figura 44 – Compostos 57, 73, 75, 80, 101, 119 e 124 em complexo com a NS2B-NS3 do DENV2.....	163
Figura 45 – Visualização do composto 119 inserido no bolso hidrofóbico da NS2B-NS3 do DENV2.....	164
Figura 46 – Interações para o composto 57 inseridos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2.....	165
Figura 47 – Interações para o composto 73 inseridos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2.....	166

Figura 48 – Interações para o composto 75 inseridos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2. ....	167
Figura 49 – Interações para o composto 80 inseridos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2. ....	168
Figura 50 – Interações para o composto 101 inseridos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2. ....	168
Figura 51 – Interações para o composto 119 inseridos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2. ....	169
Figura 52 – Interações para o composto 124 inseridos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2. ....	170
Figura 53 – Curvas de inibição para os compostos promissores em função tempo e concentração. ....	172
Figura 54 – Sobreposição das conformações para o inibidores S11 (A), S15 (B) e S14 (C) obtidas por aplicação dos métodos AM1 (rosa) e B3LYP/6-31G(d) (azul). ....	174
Figura 55 – Gráficos uni- e tridimensionais de Ramachandran para a distribuição dos ângulos diedros Phi ( $\phi$ ) e Psi ( $\psi$ ) dos aminoácidos glicina e prolina nas temperaturas de 300 K (A) e 310 K (B). ....	175
Figura 56 – Flutuações dos valores de RMSD durante as simulações de dinâmica molecular (100 ns) à temperatura de 300 K (preto) e 310 K (vermelho). ....	177
Figura 57 – Comparação entre os sítios da nsP2 após simulações de dinâmica à 300 K (A) e 310 K (B). ....	177
Figura 58 – Valores médios de $r^2$ para a minimização energética inicial usando diferentes metodologias e a relação delas como as funções de pontuação. ....	180
Figura 59 – Conjunto de inibidores em complexo com o sítio ativo da nsP2 do CHIKV. ....	183
Figura 60 – Frequência de visualização de resíduos do sítio ativo da nsP2. ....	185
Figura 61 – Sítio de ligação para o composto de referência usado para prever os valores de $\Delta G_{\text{não-covalente}}$ e $\Delta G_{\text{covalente}}$ . ....	187
Figura 62 – Perfil energético previsto para o mecanismo não covalente de inibição da nsP2. ....	188
Figura 63 – Coordenada de reação para a formação do par iônico Cys(S <sup>-</sup> )1013/His(H <sup>+</sup> )1083 na nsP2. ....	189
Figura 64 – Mecanismo covalente de inibição da nsP2 (hipotético). ....	191
Figura 65 – Comparação entre as duas coordenadas de reação: não-covalente (A) e covalente (B). ....	192

Figura 66 – Frequência de visualização de resíduos do sítio ativo da nsP2 em complexação com os compostos racionalmente planejados.....	195
Figura 67 – Compostos racionalmente planejados em complexo com a enzima nsP2 do Chikungunya vírus.....	195

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DENV	— Vírus Dengue
ZIKV	— Vírus Zika
CHIKV	— Vírus Chikungunya
OMS	— Organização Mundial de Saúde
YFV	— Vírus da Febre Amarela
JEV	— Vírus da Encefalite Japonesa
WNV	— Vírus da Febre do Nilo Ocidental
TBE	— Vírus da Encefalite do Carrapato
SNC	— Sistema Nervoso Central
DC-SIGN	— <i>Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-Integrin</i>
L-SIGN	— <i>Liver Lymphnode-Specific Intracellular Adhesion Molecules-3 Grabbing Non-Integrin</i>
RE	— Retículo Endoplasmático
prM	— Proteína Pré-Membranar
E	— Proteína de Envelope
C	— Proteína de Capsídeo
M	— Proteína de Membrana
PDB	— <i>Protein Data Bank</i>
RMN	— Ressonância Magnética Nuclear
HCV	— Vírus da Hepatite C
HIV	— Vírus da Imunodeficiência Humana
QSAR	— Relação Estrutura-Atividade Quantitativa
AK-Schirmeister	— <i>Arbeitskreis Schirmeister</i> (Grupo de Trabalho)
IC <sub>50</sub>	— Concentração Inibitória para 50% de uma População
CC <sub>50</sub>	— Concentração Citotóxica para 50% de uma População
EC <sub>50</sub>	— Concentração Efetiva para 50% de uma População
SI	— Índice de Seletividade
PAINS	— <i>Pan-Assay Interference Scaffold</i>
PRAT	— <i>Promiscuous Aminothiophenes</i>
RRV	— Vírus da Febre do Rio Ross

SINV	— Vírus Sinbis
VEEV	— Vírus da Encefalite Venezuelana Equina
NIAID	— <i>United State National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
AINES	— Anti-Inflamatório Não-Esteroidais
FARMD	— Fármacos Antirreumáticos Modificadores de Doença
ORF	— <i>Open Reading Frame</i>
mRNA	— RNA Mensageiro
NTPase	— Nucleosídeo Trifosfatase
ECSA	— Centro-Leste Sul Africano
WA	— Oeste Africano
$\Delta G$	— Variação da Energia Livre de Gibbs
DPOC	— Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
CCD	— Cromatografia em Camada Delgada
CCC	— Cromatografia em Coluna Clássica
CLAE	— Cromatografia Líquida de Alta-Eficiência
EM	— Espectrometria de Massas
$P_F$	— Ponto de Fusão
$R_T$	— Tempo de Retenção
ESI	— <i>Electrospray</i>
Da	— Dalton
LRMS	— Espectrometria de Massas de Baixa Resolução
mAU	— Miliunidades de Absorbância
m/z	— Razão Massa/Carga
FT-IR	— Espectrofotometria na Região do Infravermelho
ATR-IV	— Reflectância Total Atenuada por Infravermelho
$\text{cm}^{-1}$	— Número de Onda
$\nu$	— Estiramento
$\delta$	— Deformação Angular (no infravermelho); e Deslocamento Químico (no RMN)
ppm	— Parte por Milhão
DMSO- $d_6$	— Dimetilsulfóxido Deuterado
$ns$	— Número de Pulsos
$J$	— Constante de Acoplamento



Hz	— Hertz
$\lambda$	— Comprimento de Onda
AM1	— <i>Austin Model 1</i>
DFT	— <i>Density Functional Theory</i>
CHEMPLP	— <i>Chemical Piecewise Linear Potential</i>
ASP	— <i>Astex Statistical Potential</i>
MD	— Dinâmica Molecular
MM	— Mecânica Molecular
OPLS	— <i>Optimized Potential for Liquid Simulations</i>
SPC	— <i>Single Point Charge</i>
RMSD	— Desvio Médio dos Quadrados-Mínimos
QM	— Mecânica Quântica
SE	— Semi-Empíricos
TBTU	— 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1',3,3'-tetrametilamino tetrafluoroborato
DIPEA	— <i>N, N'</i> -Di-isopropiletilamina
P <sub>D</sub>	— Ponto de Degradação
REA	— Relação Estrutura-Atividade
SD	— Desvio Padrão
GA	— Algoritmo Genético
Hb_inter	— Ligação Intermolecular de Hidrogênio
Hb_intra	— Ligação Intramolecular de Hidrogênio
Vdw_inter	— Interação de Van der Waals Intermolecular
K	— Kelvin

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	27
2.1	Flavivírus .....	28
2.1.1	Os Vírus Dengue e Zika .....	28
2.1.1.1	Prevalência e patologia do vírus Dengue .....	28
2.1.1.2	Prevalência e patologia do vírus Zika .....	30
2.1.2	Ciclo de infecção dos vírus Dengue e Zika .....	32
2.1.3	Genética flaviviral .....	34
2.1.3.1	Proteínas estruturais dos flavivírus .....	35
2.1.3.2	Proteínas não-estruturais dos flavivírus .....	36
2.1.3.2.1	A protease NS2B/NS3 dos flavivírus .....	37
2.1.3.2.2	Estados conformacionais da NS2B-NS3 nos vírus Dengue e Zika .....	40
2.1.3.2.3	Sítio alostérico hipotético ( <i>pocket</i> ) .....	42
2.2	Recentes Avanços na Terapia Farmacológica dos Vírus Dengue e Zika .....	44
2.2.1	Avanços no desenvolvimento de novos compostos ativos frente à NS2B-NS3 flaviviral .....	46
2.2.2	Avanços no desenvolvimento de novos compostos ativos frente à NS2B-NS3 flaviviral .....	48
2.2.3	Recentes avanços no desenvolvimento de inibidores da protease NS2B-NS3 dos vírus Dengue e Zika obtidos pelo AK-Schirmeister (Universidade Johannes Gutenberg de Mainz, Alemanha) .....	48
2.3	Alphavírus .....	53
2.3.1	O vírus Chikungunya .....	53
2.3.2	Prevalência e patologia do vírus Chikungunya .....	53
2.3.3	Ciclo de infecção do vírus Chikungunya .....	55
2.3.4	Genética do vírus Chikungunya .....	57
2.3.4.1	A protease nsP2 do vírus Chikungunya .....	59
2.4	Recentes Avanços na Terapia Farmacológica/Imunológica do Vírus Chikungunya .....	60
2.4.1	Avanços no desenvolvimento de novos compostos ativos frente à nsP2 do vírus Chikungunya .....	60
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	68

3.1	Objetivo Geral.....	68
3.2	Objetivos Específicos.....	68
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>
4.1	Cromatografias.....	70
4.1.1	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	70
4.1.2	Cromatografia em coluna clássica (CCC).....	70
4.1.3	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS).....	70
4.2	Pontos de Fusão .....	71
4.3	Espectrofotometria na Região do Infravermelho (FT-IR) .....	71
4.4	Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio ( <sup>1</sup> H) e Carbono Treze ( <sup>13</sup> C) .....	72
4.5	Planejamento racional de inibidores <i>duais</i> das enzimas NS2B-NS3 (DENV e ZIKV) e nsP2 (CHIKV).....	72
4.5.1	Procedimentos Reacionais .....	75
4.5.1.1	Síntese do ácido cinâmico e ácido ( <i>E</i> )-3-(4-( <i>terc</i> -butil)fenil)acrílico.....	75
4.5.1.2	Síntese dos cloretos de acila a partir dos ácidos cinâmicos .....	76
4.5.1.3	Síntese do 2-Amino-5,6-dimetoxibenzo[ <i>d</i> ]tiazol.....	77
4.5.1.4	Síntese do 2-Amino-6-( <i>terc</i> -butil)benzo[ <i>d</i> ]tiazol .....	78
4.5.2	Acoplamento de 2-aminobenzo[ <i>d</i> ]tiazóis aos derivados do ácido cinâmico e ao ácido <i>trans</i> -fenilciclopropanocarboxílico.....	79
4.5.2.1	Derivados não halogenados .....	79
4.5.2.2	Derivados halogenados .....	79
4.5.3	Síntese dos derivados benzo[ <i>d</i> ]tiazol-2-fenilciclopropanocarboxamidas <i>mono</i> - e <i>di</i> - hidroxilados.....	80
4.5.4	Acoplamento do 4-( <i>p</i> -toluil)-2-aminotiazol aos ácidos cinâmicos e ao ácido <i>trans</i> - fenilciclopropanocarboxílico .....	119
4.6	Avaliação Biológica dos Inibidores .....	121
4.6.1	Ensaio enzimáticos fluorimétricos .....	121
4.7	Modelagem <i>In silico</i> .....	122
4.7.1	Detalhes computacionais.....	123
4.7.2	Métodos <i>In silico</i> aplicados ao desenvolvimento dos potenciais inibidores da NS2B- NS3 dos vírus Dengue e Zika .....	123
4.7.2.1	<i>Docking</i> molecular .....	123

4.7.3	Desenvolvimento do Protocolo Virtual para Planejamento de Inibidores da Enzima nsP2 do CHIKV .....	124
4.7.3.1	Desenvolvimento do protocolo virtual - Visão geral .....	125
4.7.3.1.1	Seleção dos inibidores da nsP2 e a minimização energética .....	126
4.7.3.1.2	Simulações de dinâmica molecular da nsP2 .....	127
4.7.3.1.3	<i>Docking</i> molecular dos inibidores da nsP2 .....	129
4.7.3.1.4	Investigação de mecanismo de inibição não-covalente ( $\Delta G_{\text{n\~{a}o-covalente}}$ ) e covalente ( $\Delta G_{\text{covalente}}$ ) usando mecânica quântica (QM) .....	129
4.7.3.1.5	Aplicação do novo protocolo virtual à série de inibidores racionalmente planejados .....	131
4.7.3.1.6	Avaliação da atividade biológica dos análogos frente à enzima nsP2 do vírus Chikungunya .....	131
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	133
5.1	Fundamentação Teórica .....	133
5.2	Síntese dos Novos Inibidores Potencialmente <i>Duais</i> .....	133
5.2.1	Síntese dos derivados do ácido cinâmico (4-H e 4- <i>terc</i> -butila) .....	134
5.2.1.1	Caracterização química dos derivados do ácido cinâmico (4-H e 4- <i>terc</i> -butila) .....	135
5.2.2	Síntese dos cloretos de acilas dos ácidos cinâmicos (4-H e 4- <i>terc</i> -butila) .....	136
5.2.2.1	Caracterização química dos cloretos de acilas dos ácidos cinâmicos (4-H e 4- <i>terc</i> -butila) .....	137
5.2.3	Síntese do derivado 2-amino-5,6-dimetoxibenzo[ <i>d</i> ]tiazol .....	138
5.2.3.1	Caracterização química dos derivados 2-aminobenzo[ <i>d</i> ]tiazóis .....	139
5.2.4	Síntese dos derivados 2-aminobenzo[ <i>d</i> ]tiazóis acoplados aos análogos dos ácidos carboxílicos racionalmente planejados .....	140
5.2.4.1	Síntese dos derivados 2-aminobenzo[ <i>d</i> ]tiazóis (não halogenados) acoplados aos análogos dos ácidos carboxílicos .....	140
5.2.4.2	Síntese dos derivados 2-aminobenzo[ <i>d</i> ]tiazóis (halogenados) acoplados aos análogos dos ácidos carboxílicos .....	141
5.2.4.3	Síntese dos derivados hidroxilados dos 2-aminobenzo[ <i>d</i> ]tiazóis acoplados aos análogos dos ácidos carboxílicos .....	142
5.2.4.3.1	Caracterização química dos derivados 2-aminobenzo[ <i>d</i> ]tiazóis acoplados aos análogos dos ácidos carboxílicos racionalmente planejados .....	145
5.3	Resultados Relacionados aos Vírus do Zika e Dengue .....	147

5.3.1	Avaliação da atividade biológica dos análogos frente à protease NS2B-NS3 dos vírus Zika e Dengue .....	147
5.3.1.1	Série dos derivados do ácido cinâmico não substituído .....	148
5.3.1.2	Série dos derivados do ácido 4- <i>terc</i> -butilcinâmico .....	150
5.3.1.3	Série dos derivados do ácido 4-cloro cinâmico .....	153
5.3.1.4	Série dos derivados do fenilciclopropano .....	155
5.3.2	Relação estrutura-atividade entre as séries de compostos derivados do ácido cinâmico .....	157
5.3.3	Modificações estruturais dos compostos mais promissores .....	159
5.3.3.1	Modificações dos compostos (73) e (75) .....	159
5.3.3.1.1	Introdução do grupo trimetoxilbenzeno (farmacóforo 2) .....	159
5.3.3.1.2	Substituição do núcleo benzo[ <i>d</i> ]tiazol (farmacóforo 1) .....	160
5.3.4	<i>Docking</i> molecular dos compostos mais promissores .....	161
5.3.5	Determinação experimental do sítio de ligação dos análogos ativos frente à NS2B-NS3 .....	172
5.4	Resultados Relacionados ao Vírus Chikungunya .....	173
5.4.1	Desenvolvimento do protocolo virtual para o planejamento de compostos ativos frente ao CHIKV .....	173
5.4.1.1	Minimização energética dos inibidores .....	173
5.4.1.2	Simulações de dinâmica molecular .....	174
5.4.1.2.1	Análise da estabilidade estrutural da nsP2 (300 e 310 K) por RMSD .....	176
5.4.1.3	<i>Docking</i> molecular dos inibidores na nsP2 .....	178
5.4.1.4	Investigação de mecanismo não covalente e covalente de inibição da nsP2 por mecânica quântica (QM) .....	186
5.4.1.5	Aplicação do novo protocolo virtual à série de inibidores racionalmente planejados .....	193
5.4.1.6	Avaliação da atividade biológica dos análogos frente à enzima nsP2 do Chikungunya vírus .....	196
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>198</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>201</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>203</b>
	<b>APÊNDICE A – Mini-projetos: Mecânica quântica (QM) aplicada ao estudo de estruturas heterocíclicas com potenciais atividades biológicas</b> .....	<b>230</b>

<b>APÊNDICE B</b> – Mini-projeto: Aplicação da Relação Estrutura-Atividade Quantitativa (QSAR) ao estudo de piridazinonas com atividade anti-PDE4. ....	231
<b>APÊNDICE C</b> – Mini-projeto: Aplicação de <i>docking</i> molecular no estudo de inibidores da $\beta$ -Secretase na doença de Alzheimer .....	232
<b>APÊNDICE D</b> – Revisão: Aplicação de QM no estudo de metabolismo de fármacos .....	233
<b>APÊNDICE E</b> – Projeto: Síntese, atividade biológica e modelagem molecular de novos inibidores da enzimas cruzaina e rodesaina dos <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>T. rhodesiense</i> , respectivamente. ....	234

## **INTRODUÇÃO**

---

## 1 INTRODUÇÃO

Em paralelo à evolução da espécie humana, algumas doenças também evoluíram, conduzindo ao surgimento de novas doenças infecciosas (MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016). Estas, têm aumentando significativamente, em número de casos e expansão geográfica da área acometida. Neste sentido, as doenças zoonóticas transmitidas por mosquitos, tais como Dengue, Zika e Chikungunya, têm avançado bastante no cenário mundial (BARTHELIS, 2018; GOVINDARAJAN; BENELLI, 2016; MARTINEZ; GARZA; CUELLAR-BARBOZA, 2019; MILLIES et al., 2018).

Os flavivírus são, principalmente, transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes spp.* (BYLER; OGUNGBE; SETZER, 2016; WENG et al., 2017). Estes pertencem à família *Flaviviridae*, que está relacionada a patógenos de interesse médico, incluindo os vírus Dengue (DENV) e Zika (ZIKV) (SILVA-JÚNIOR; SCHIRMEISTER; ARAÚJO-JÚNIOR, 2018).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017) 3,9 bilhões de habitantes estão vivendo em áreas de risco de infecção por DENV, sendo a maioria destes casos oriundos de países das Américas Central e do Sul.

Com relação ao ZIKV, este atingiu níveis globais na última década (MUSSO; GUBLER, 2016). Diferentemente de outros arbovírus, o ZIKV pode ser transmitido de pessoa para pessoa, por meio de fluidos corporais sexuais ou não (CASALE et al., 2018; CHHABRA et al., 2008).

Em 2015, as taxas de incidência de microcefalia e natimortos no Brasil aumentaram 200 vezes, em relação aos anos anteriores (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). No ano seguinte, 1,3 milhões de pessoas apresentaram sintomas de infecção por ZIKV (MLAKAR et al., 2016; SESA, 2016). Entretanto, acredita-se que o número de casos não reportados de indivíduos infectados por ZIKV seja muito superior aos dados divulgados na época (CHAN et al., 2016).

No ZIKV e DENV, a replicação viral depende da proteína não-estrutural 3 (NS3<sup>pro</sup>), que age em associação à NS2B, aumentando a eficiência da atividade enzimática (DE LA CRUZ et al., 2011; LUO; VASUDEVAN; LESCAR, 2015). Dessa forma, este complexo proteico representa um alvo atrativo para o planejamento de fármacos antivirais (SILVA-JÚNIOR; SCHIRMEISTER; ARAÚJO-JÚNIOR, 2018), que irão promover a interrupção da atividade desta protease, conduzindo à morte viral (CHAPPELL et al., 2008).

Em contraste, os Alphavírus pertencem à família *Togaviridae* (PIETILÄ; HELLSTRÖM; AHOLA, 2017), cujo gênero inclui cerca de 30 espécies diferentes de vírus



(CARPENTIER; MORRISON, 2018). A maioria dos Alphavírus são capazes de acometer os seres humanos e animais, causando algumas doenças infecciosas, como no caso do vírus do Velho Mundo, Chikungunya (CHIKV) (PIETILÄ; HELLSTRÖM; AHOLA, 2017).

O CHIKV é uma arbovirose também transmitida por mosquitos do gênero *Aedes spp.* (ABDELNABI et al., 2017; ELEFThERIADOU et al., 2017; WANG; LIU, 2017), o qual tem sido registrado em muitos países das Américas Central e do Sul, levando à estimativa de 11,675 milhões de casos (AALST et al., 2017; AMRAOUI; FAILLOUX, 2016; HWANG; JIANG; FIKRIG, 2019; SILVA-JÚNIOR et al., 2017b). Atualmente, o CHIKV é raramente fatal, no entanto, 87 a 95% dos pacientes sofrem com artralgia debilitante severa por meses ou anos (LEE; HALVERSON; EZINWA, 2018).

A proteína não-estrutural 2 (nsP2) é uma cisteína protease abundantemente encontrada no CHIKV, possuindo atividade relacionada à clivagem de poliproteínas não-estruturais, fundamentais para o processo de replicação do CHIKV (PIETILÄ; HELLSTRÖM; AHOLA, 2017; SILVA-JÚNIOR et al., 2017b; SINGH et al., 2018), semelhante à ação da NS2B-NS3 nos flavivírus.

Apesar dos numerosos esforços direcionados à busca por um antiviral eficaz e seletivo, atualmente não existe um fármaco aprovado para o tratamento focal do DENV, ZIKV e CHIKV. Basicamente, a terapia farmacológica atual inclui apenas medicamentos com finalidade de tratar os sintomas. Diante disto, o desenvolvimento de pesquisas voltadas para o planejamento racional, síntese e desenvolvimento de novas substâncias bioativas faz-se extremamente importante, principalmente considerando que o Brasil é um país endêmico. Assim, a presente tese de doutorado buscou desenvolver novas 4 (quatro) séries de bioativos, planejados de modo racional por meio da aplicação de técnicas computacionais. Em seguida, estas foram avaliadas em ensaios biológicos e os resultados obtidos utilizados para construção de um modelo relacionado à relação estrutura-atividade de cada série de análogos, bem como, utilizados durante a discussão dos resultados de *docking* molecular. Por fim, um novo protocolo virtual para aplicação no desenvolvimento de compostos anti-CHIKV foi desenvolvido e discutido em detalhes.

## **FUDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

---

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

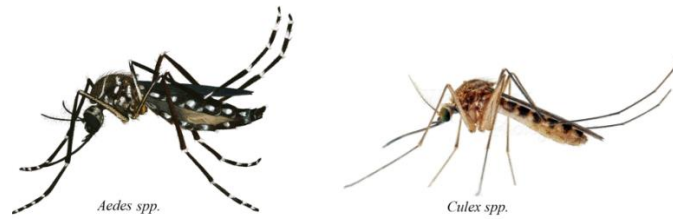
Durante a evolução da espécie humana, as doenças infecciosas também evoluíram em paralelo. O surgimento de novas doenças e o reaparecimento de outras, tidas como erradicadas, representam um grande desafio para a humanidade, para o qual a mesma não está preparada (MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016). As doenças infecciosas emergentes têm aumentando rápida e significativamente, em termos de número de casos e área geográfica acometida. Dentre estas, as doenças zoonóticas são responsáveis por bilhões de casos de adoecimento humano e milhões de mortes todos os anos, constituindo um problema de saúde pública distribuído mundialmente (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017; WHO, 2019).

Mudanças climáticas e viajantes intercontinentais são considerados como os dois principais fatores que contribuem para a disseminação de flavivírus, de seus respectivos habitats naturais nas florestas tropicais aos grandes centros urbanos (HILL et al., 2018).

Mosquitos são vetores de patógenos e parasitos de várias doenças, tais como Dengue, Zika, Chikungunya e filariose linfática (BARTHELIS, 2018; GOVINDARAJAN; BENELLI, 2016; MARTINEZ; GARZA; CUELLAR-BARBOZA, 2019; MILLIES et al., 2018). Assim, o controle desses vetores é de importância global, especialmente em países localizados em áreas tropicais e subtropicais (GOVINDARAJAN; BENELLI, 2016). No entanto, o uso de inseticidas para eliminar os vetores têm conduzido ao desenvolvimento de insetos com maior resistência a estes, dificultando o controle dos mesmos (GOVINDARAJAN; BENELLI, 2016).

Em geral, vírus zoonóticos são transmitidos aos humanos através de insetos hematófagos, tais como mosquitos, moscas, carrapatos e pulgas. Tais vírus são conhecidos como vírus transmitidos por artrópodes ou, simplesmente, arboviroses (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017). Os flavivírus são principalmente transmitidos por mosquitos fêmeas das espécies *Aedes aegypti*, *A. albopictus* e *A. furcifer* (BYLER; OGUNGBE; SETZER, 2016; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; WENG et al., 2017). Embora, as espécies *A. africanus*, *A. apicoargenteus*, *A. hensilli*, *A. luteocephalus*, *A. vitattus* (BYLER; OGUNGBE; SETZER, 2016), bem como o gênero *Culex spp.* também possam atuar como vetores (ABDELNABI et al., 2017; BUSCH; ERICKSON, 2015; YOUNGER, 2016). Na Figura 1 são mostrados os dois principais mosquitos transmissores de flavivírus, bem como seus respectivos gêneros.

**Figura 1 – Gêneros de mosquitos que atuam mais comumente como vetores de flavivírus.**



FONTE: SILVA-JÚNIOR; SCHIRMEISTER; ARAÚJO-JÚNIOR, 2018.

## 2.1 Flavivírus

Os flavivírus pertencem à família *Flaviviridae* (composta por 53 espécies diferentes de vírus) que está relacionada a vários patógenos medicinalmente importantes, incluindo os vírus da febre amarela (YFV), encefalite japonesa (JEV), febre do Nilo Ocidental (WNV), encefalite do carrapato (TBE) (CHOKSUPMANEE et al., 2012; DENG et al., 2012), hepatite C (AGUILERA-PESANTES; MÉNDEZ, 2017; LU et al., 2018) e a peste (LU et al., 2018), bem como os vírus Dengue (DENV) e Zika (ZIKV) (SILVA-JÚNIOR; SCHIRMEISTER; ARAÚJO-JÚNIOR, 2018).

Em geral, os vírus que possuem a habilidade de transitar entre diferentes espécies e causar fatalidades são de extremo interesse para saúde humana. No entanto, a humanidade não está efetivamente preparada para lidar com tamanha ameaça emergente (CHAPPELL et al., 2008).

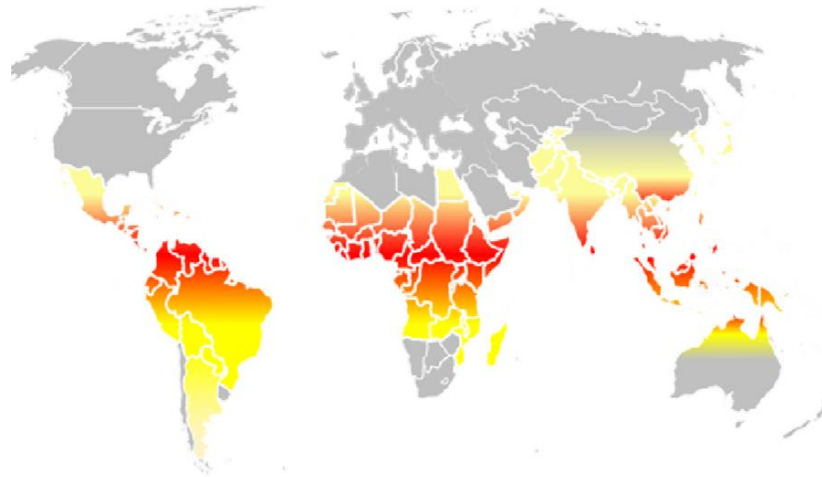
### 2.1.1 Os Vírus Dengue e Zika

#### 2.1.1.1 Prevalência e patologia do vírus Dengue

O vírus Dengue (DENV) é considerado pela a enciclopédia de medicina chinesa (escrita durante a dinastia *Jin*, de 265-420) como sendo a mais velha doença viral transmitida por "água envenenada" por mosquitos. O termo Dengue deriva da palavra *dinga*, que em Suaíle significa *doença causada por um espírito mal* (TIMIRI; SINHA; JAYAPRAKASH, 2016).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2017 (última atualização), um total de 3,9 bilhões de pessoas estão vivendo em áreas de risco de infecção por DENV, em 128 países ao redor do mundo (Figura 2). Destes, mais de 2,5 bilhões (> 70%) estão vivendo em países subtropicais da Ásia-Pacífico. No entanto, a maioria dos casos reportados são oriundos de países situados nas Américas Central e do Sul.

**Figura 2 – Prevalência mundial do vírus Dengue.**



FONTE: BHATT et al., 2013; COLLINS; METZ, 2017 (adaptado). Em vermelho, regiões mais afetadas; em amarelo, regiões menos afetadas.

Muitas doenças causadas por infecções flavivirais tendem a ser epidêmicas em países em desenvolvimento, o que conduz à estimativa de 390 milhões de novos casos de DENV por ano, onde 96 milhões apresentam manifestações clínicas (OLLIARO et al., 2018). No entanto, o cenário real permanece não totalmente esclarecido, uma vez que muitos indivíduos infectados são assintomáticos (COLLINS; METZ, 2017).

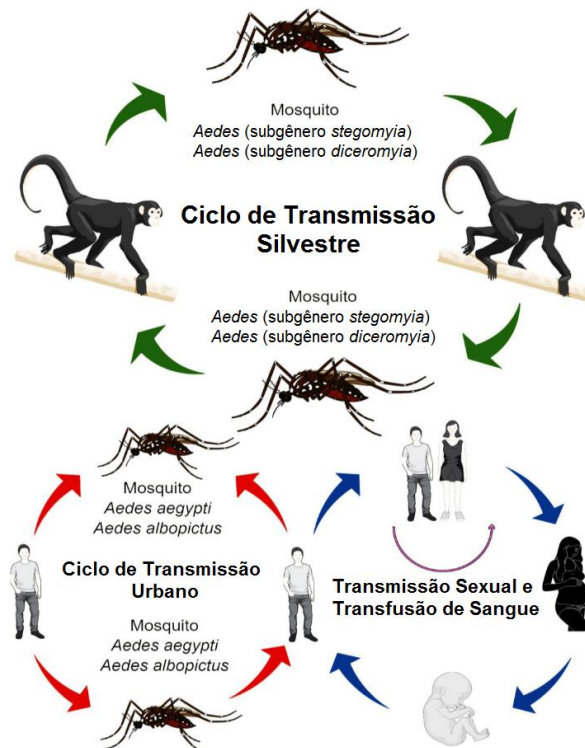
As infecções por DENV são predominantemente em decorrência da injeção subcutânea do vírus na pele do hospedeiro, através da picada do vetor infectado (VASILAKIS et al., 2007). Como consequência, os sintomas aparecem tipicamente após cinco ou oito dias após o contato com o vírus (SOLOMON; MALLEWA, 2001). A febre do Dengue é definida clinicamente como um estado febril agudo com duas ou mais manifestações sintomatológicas, podendo ser cefaleia, dor retro-abdominal, mialgia, artralgia, *rash*, hemorragias ou leucopenia (SOLOMON; MALLEWA, 2001). Neste sentido, a OMS classifica a infecção por DENV em três categorias, sendo estas (i) febre do Dengue, (ii) febre hemorrágica e (iii) síndrome do choque do Dengue (GIBBONS; VAUGHN, 2015). Considerando a estimativa do número global de infecções por DENV, cerca de 250-500 mil pacientes desenvolvem pelo menos duas das categorias da doença, com uma taxa de mortalidade de 1 a 5% (RAWLINSON et al., 2006). Adicionalmente, a síndrome do choque do Dengue pode ser agravada por problemas vasculares e hemorragias. O extensivo recrutamento vascular de células e proteínas antivirais não-neutralizantes facilitam a entrada do vírus nas células hospedeiras, conduzindo a um aumento da infectividade em células susceptíveis (ST JOHN et al., 2013). Apesar dos inúmeros esforços direcionados à busca por um antiviral eficaz e seletivo, atualmente não existem fármacos aprovados para o tratamento da

febre do Dengue. Basicamente, a terapia farmacológica atual inclui apenas medicamentos com finalidade de tratar os sintomas.

### 2.1.1.2 Prevalência e patologia do vírus Zika

Embora o vírus Zika (ZIKV) tenha sido descoberto há mais de 70 anos, a doença atingiu níveis globais na última década. Assim como o DENV, o ZIKV é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes spp.* A prevalência global do ZIKV é muito semelhante à prevalência observada para o DENV (MUSSO; GUBLER, 2016) (rever Figura 2). Em contraste a outros arbovírus, o ZIKV pode ser transmitido de pessoa para pessoa, através de fluidos corporais sexuais e não sexuais. Em adição, a transmissão da mãe para o filho (Figura 3) é possível tanto durante o pré-natal ou perinatal (durante o nascimento), quanto no pós-natal (durante a amamentação) (CASALE et al., 2018; CHHABRA et al., 2008; GÉRARDIN et al., 2008).

**Figura 3 – Ciclos de transmissão silvestre e urbano para o vírus Zika.**



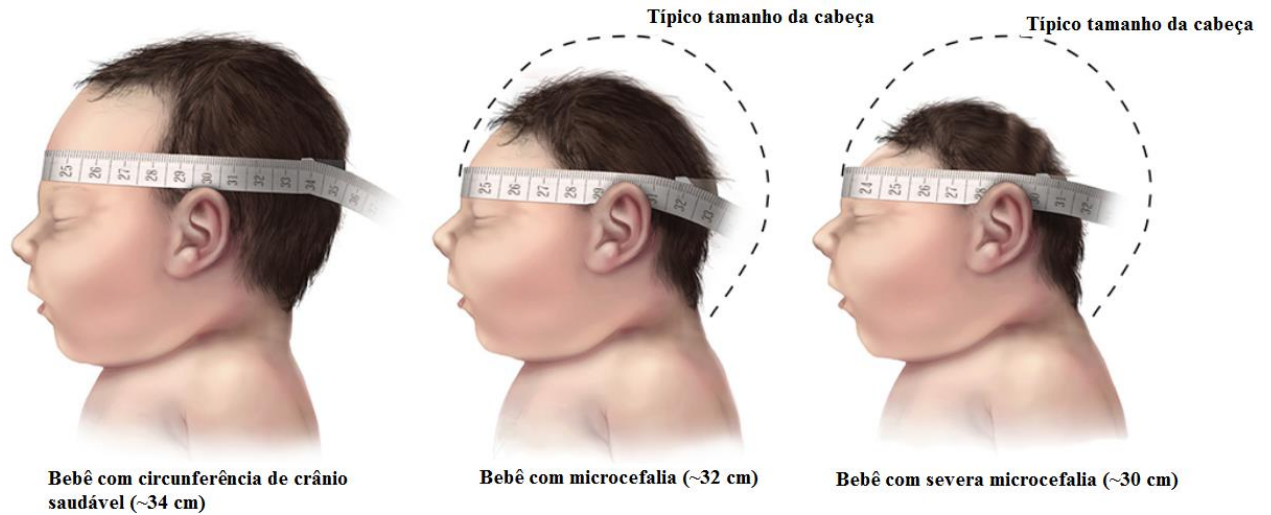
FONTE: RATHER et al., 2017 (tradução). Os ciclos de transmissão urbano (em vermelho) e silvestre (em verde) são representativos para o DENV e ZIKV. No entanto, as transmissões por transfusão de sangue (materno-fetal) e sexual referem-se ao ZIKV (em azul).

A primeira grande epidemia por ZIKV ocorreu em 2007 na Ilha de Yap, Micronésia, onde foi estimado que 75% da população local havia sido infectada. Desde então, várias epidemias foram relatadas em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). Anos mais tarde, o aumento dramático das infecções por ZIKV na América do Sul conduziu a um estado de emergência no Brasil (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). No fim de 2016, um total de 1,3 milhões indivíduos apresentavam sintomas que sugeriam infecção por ZIKV no país (CHAN et al., 2016). No mesmo ano, 40 mil novos casos de Zika foram reportados nos Estados Unidos da América, onde estes estavam relacionados ao retorno de viajantes que estiveram em regiões consideradas endêmicas (MITTAL et al., 2017). Acredita-se que o número de casos não reportados de indivíduos infectados por ZIKV seja muito superior aos dados previamente divulgados, devido aos sintomas mais brandos observados em alguns pacientes que, por muitas vezes, são assintomáticos (CHAN et al., 2016).

Após um período de incubação de 3 a 12 dias, a infecção por ZIKV apresenta sintomas similares aos da febre do Dengue, incluindo mialgia, artralgia, cefaleia e *rash* cutâneo. Adicionalmente, o ZIKV é suspeito de desencadear várias doenças neurológicas, tais como a síndrome de Guillain-Barré, uma doença autoimune que resulta na destruição das bainhas de mielina dos axônios dos nervos periféricos (WHO, 2018). Tais danos neurológicos estão relacionadas ao ZIKV devido os flavivírus terem como objetivo principal a entrada no sistema nervoso central (SNC) (SELVEY; SPEERS; SMITH, 2016). O aumento da incidência de ocorrências neuropatológicas por ZIKV está relacionado a uma única mutação na poliproteína flaviviral prM S139N (YUAN et al., 2017).

Em 2015, as taxas de incidência de microcefalia e natimortos no Brasil aumentaram em cerca de 200 vezes, em relação aos dados anteriores do ZIKV no país. Os neonatos infectados apresentaram uma significativa redução na circunferência dos seus crânios (< 34 cm), em comparação ao diâmetro de crânios saudáveis (Figura 4). A doença está associada com uma variedade de outros sintomas, tais como retardo cognitivo e mental, bem como episódios epiléticos (MLAKAR et al., 2016; SESA, 2016). Por fim, assim como no caso do DENV, o ZIKV também permanece sem alternativas farmacoterapêuticas viáveis em combater seletivamente o vírus (MITTAL et al., 2017).

**Figura 4 – Microcefalia em neonatos com infecção por Zika congenitamente contraída.**



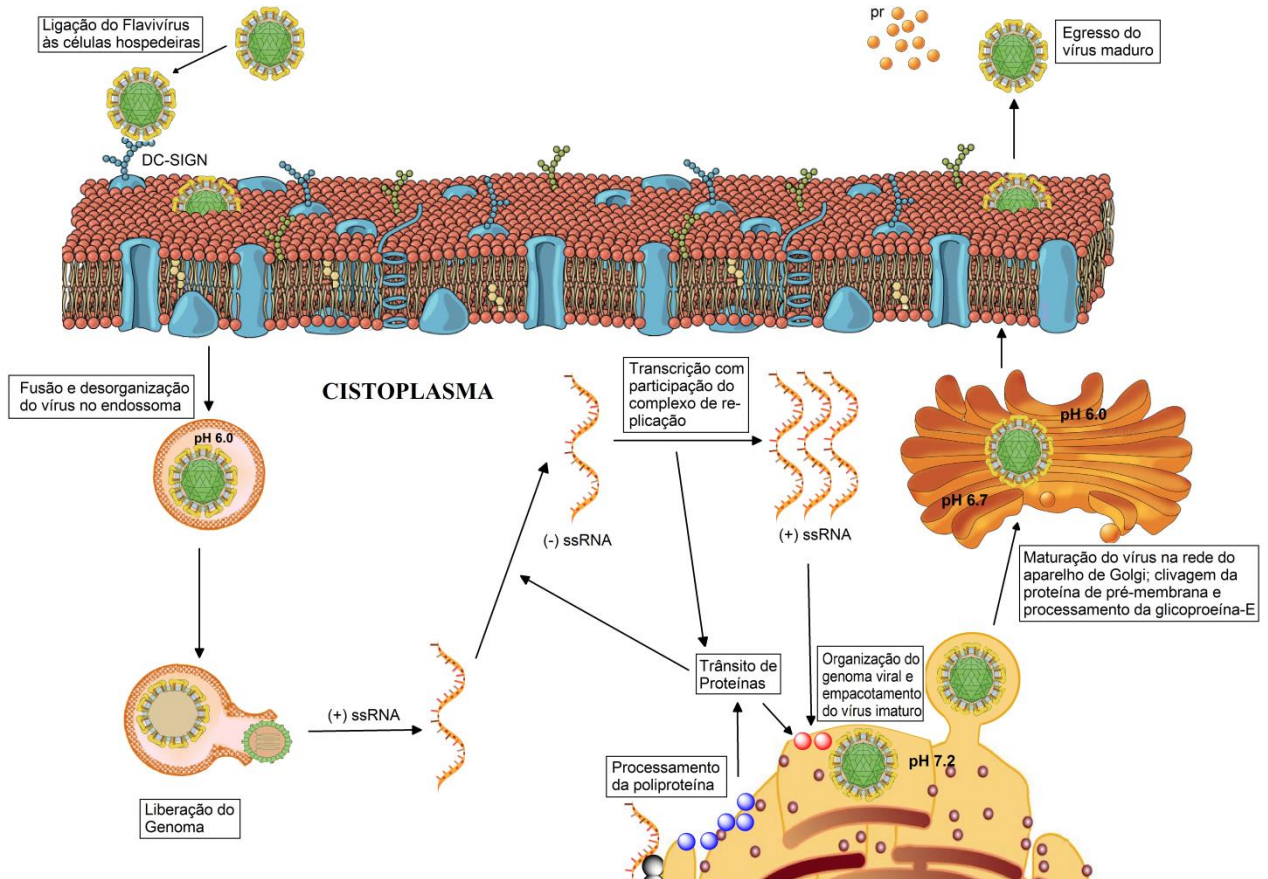
FONTE: <https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/zika-syndrome-birth-defects.html>  
(tradução).

### 2.1.2 Ciclo de infecção dos vírus Dengue e Zika

Os membros do gênero desta família possuem uma alta similaridade entre seus ciclos de vida/infecção. A infecção com flavivírus inicia-se quando o inseto vetor infectado se alimenta do sangue do hospedeiro, injetando o vírus no mesmo. As partículas virais infectam as células susceptíveis (predominantemente, monócitos e células dendríticas) ou ativam células imunes, tais como os mastócitos. O tropismo celular dos flavivírus determinam a patologia em diversos casos, bem como, a transmissão de humano para humano (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). O ciclo de infecção flaviviral típico está ilustrado na Figura 5.



**Figura 5 – Visão geral do ciclo de infecção dos flavivírus em nível celular.**



FONTE: SILVA-JÚNIOR; SCHIRMEISTER; ARAÚJO-JÚNIOR, 2018 (tradução). *pr*: partículas virais.

Normalmente, os flavivírus são reconhecidos por receptores do tipo lectina-C, tais como DC-SIGN (do inglês, *Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-integrin*) e L-SIGN (do inglês, *Liver/lymph node-Specific Intracellular adhesion molecules-3 Grabbing Non-integrin*). Adicionalmente, receptores fosfatidilserina (imunoglobulina de célula-T e mucina) e tirosina quinase (Tyro3, MertK e AXL) também desenvolvem função similar (PERERA-LECOIN et al., 2013). Em geral, os receptores DC-SIGN são expressos nas células dendríticas, enquanto os L-SIGN são encontrados nas células endoteliais (GEIJTENBEEK et al., 2000; JAMESON et al., 2002; PÖHLMANN et al., 2001; SOILLEUX et al., 2002). Por fim, tais receptores interagem com a glicoproteína-E flaviviral, durante a entrada do vírus na célula hospedeira (FEINBERG et al., 2001).

Basicamente, diversos receptores são responsáveis por realizar o reconhecimento da glicoproteína-E flaviviral, como discutido anteriormente. Considerando a Figura 5 acima, a superfície celular permite a entrada do vírus na célula hospedeira, por meio de um mecanismo de endocitose clatrina-dependente. A fusão da membrana do envelope viral no interior do

endossoma, catalisada em meio ligeiramente ácido (~ pH 6,0), revela o nucleocapsídeo e libera o genoma viral no citosol da célula hospedeira (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010). Em seguida, a replicação do genoma viral ocorre intracelularmente nas membranas do aparelho de Golgi, mediada pela ação da RNA-polimerase (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). O RNA genômico é traduzido como uma poliproteína única por ribossomos hospedeiros, a qual é então translocada para a membrana do retículo endoplasmático (RE). Subsequentemente, esta poliproteína é clivada em vários componentes, tais como três proteínas estruturais (pré-membranar (prM), envelope (E) e capsídeo (C)) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4, NS4B e NS5) (DE LA CRUZ et al., 2011; DENG et al., 2012). Os vírions imaturos formados no RE são transportados e liberados via secreção da células hospedeira. Estes saem dos compartimentos do aparelho de Golgi e são maturados pela ação da protease viral NS2B-NS3, bem como por ação sinérgica da furino protease, durante o processo de secreção (LINDENBACH; RICE, 2003; SILVA-JÚNIOR; SCHIRMEISTER; ARAÚJO-JÚNIOR, 2018).

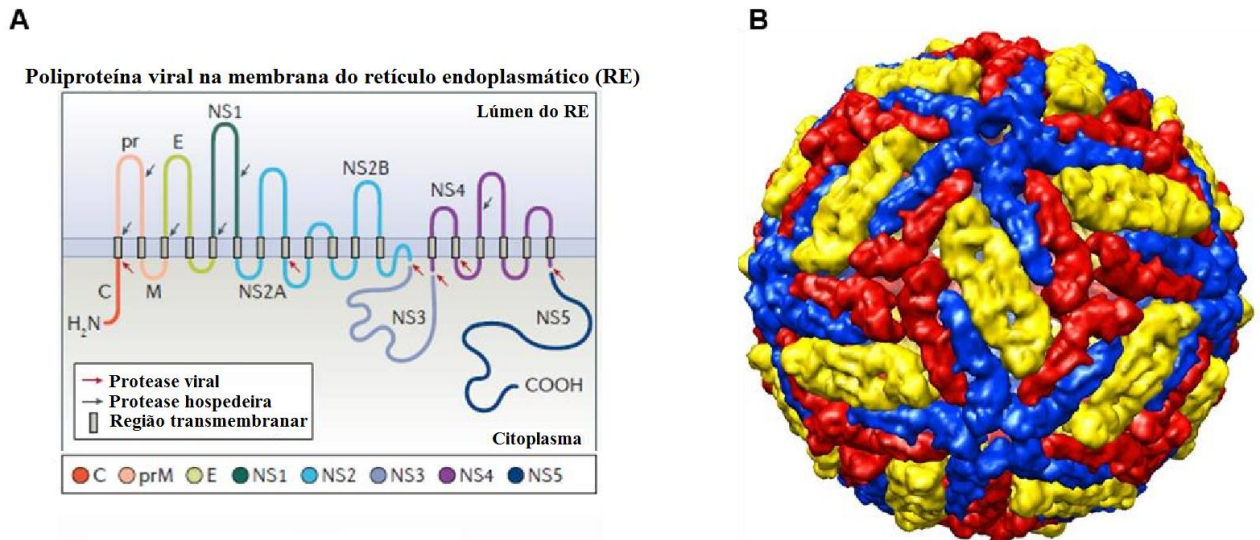
Muitos alvos biológicos virais, tais como proteases, polimerases e helicases estão localizados próximos ao complexo de replicação viral. Similarmente a outros vírus de RNA, os flavivírus rapidamente podem sofrer mutações, devido a sua RNA-polimerase produzir cópias do genoma viral com um baixo índice de fidelidade. Como resultado, esta alta capacidade de mutação conduz à formação de variações intragênicas ou *quasispecies* no interior das células hospedeiras infectadas, as quais representam a causa primária de infecções virais com altas taxas de resistência à farmacoterapia (MAHY, 2010).

### 2.1.3 Genética flaviviral

Os flavivírus possuem uma cadeia positiva de RNA genômico, que é replicada no citoplasma das células hospedeiras. O DENV possui quatro sorotipos intimamente relacionados: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. Todos estes sorotipos têm sido reportados como agentes causadores da infecção por Dengue (FATIMA et al., 2011). Os quatro sorotipos de DENV possuem similaridades em seus genomas virais (similaridade e identidade de 65 e 45%, respectivamente), os quais são traduzidos como uma única poliproteína. Com relação ao ZIKV, existem duas linhagens conhecidas (Africana e Asiática), no entanto, seus genomas virais são praticamente idênticos (índice de identidade de 96%). Além disso, o ZIKV é classificado como um único sorotipo (DOWD et al., 2016). Por fim, todas as poliproteínas

flavivirais compreendem sete proteínas não-estruturais e três proteínas estruturais, como abordado anteriormente (Figura 6).

**Figura 6 – Componentes estruturais e não estruturais da poliproteína flaviviral.**



FONTE: Autor, 2019 (A - tradução e adaptação de Boldescu *et al.* 2017). (A) poliproteína flaviviral não processada inserida na membrana do retículo endoplasmático. Os sítios de processamentos proteolíticos estão indicados por "setas". (B) visualização tridimensional do DENV2 (PDB ID: 3J27) com arranjo de 90 dímeros de poliproteínas E na superfície do vírion, como determinado por microscopia crioeletrônica. Figura preparada utilizando-se o *software* UCSF Chimera® 1.12.

### 2.1.3.1 Proteínas estruturais dos flavivírus

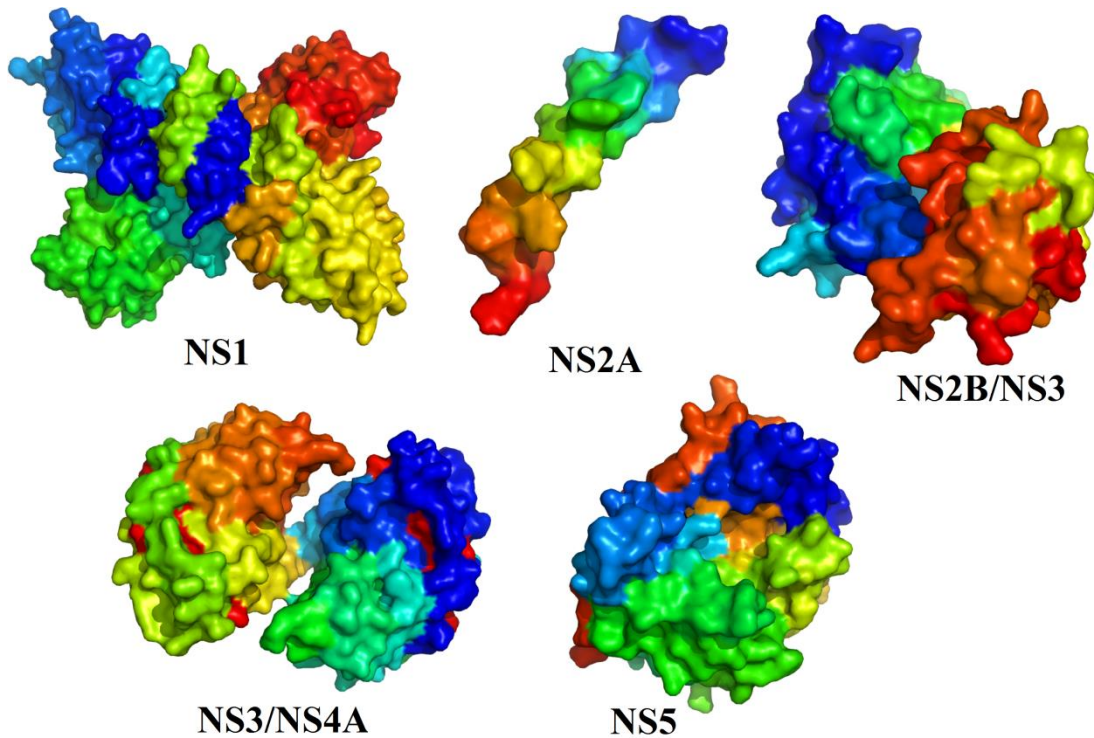
O DENV possui um diâmetro de 50 nm e é rodeado por proteínas estruturais: proteínas do envelope (E), da membrana (M) e do capsídeo (C) (HEINZ; STIASNY, 2012). Basicamente, estas três proteínas estruturais estão envolvidas na formação do vírion. A proteína do capsídeo (C) é uma proteína altamente básica, com aproximadamente 11 kDa, que encapsula o genoma viral. A glicoproteína precursora da proteína M (chamada de prM) incorpora um segmento de 20 amino ácidos na região *N*-terminal, cujo processo envolve três histidinas pH-sensíveis. A proteína M (8 kDa) é um pequeno fragmento proteolítico da proteína precursora M, produzida após ser clivada pela furino protease da célula hospedeira (ZYBERT *et al.*, 2008). Por fim, a função da proteína E (50 kDa) é mediar os processos de ligação e fusão durante a entrada do vírus na célula, e representa o principal antígeno para o sistema imune (SEEMA; JAIN, 2005).

### 2.1.3.2 Proteínas não-estruturais dos flavivírus

As múltiplas funções das sete proteínas não-estruturais dos flavivírus parecem não ter sido completamente elucidadas, as quais ainda permanecem sendo extensivamente estudadas (HASAN et al., 2018).

A NS1 é uma glicoproteína que tem sido utilizada em conjunto com a proteína E para a detecção de sorotipos de DENV em infecções (XU et al., 2006). A proteína NS2A é uma proteína hidrofílica (aproximadamente 22 kDa) que desempenha um importante papel na organização estrutural do vírus (LEUNG et al., 2008). Em contraste, a proteína NS2B (com 14 kDa) está associada à proteína de membrana. Esta, forma um complexo com a NS3 e atua como um cofator na ativação da serino protease NS3 (PHOO et al., 2016). Em adição, a proteína NS3 (70 kDa) é uma proteína multifuncional, cujo desempenha várias funções requeridas para o processamento proteolítico de poliproteínas, bem como da replicação do RNA (serino protease, 5'-RNA trifosfatase, trifosfatase nucleosídica (NTPase) e helicase) (SWARBRICK et al., 2017). A NS4A e NS4B são proteínas hidrofóbicas (16 e 27 kDa, respectivamente) que estão associadas à proteína de membrana e desempenham papel significativo na organização do complexo de replicação do RNA (PREUGSCHAT; STRAUSS, 1991). Por fim, a NS5 é a maior proteína multifuncional (cerca de 103 kDa), cujo exerce atividades de metiltransferase e RNA-polimerase (ZHOU et al., 2007). Na Figura 7 estão mostradas as representações tridimensionais de proteínas não-estruturais dos flavivírus disponíveis no RCSB *Protein Data Bank - PDB*.

**Figura 7 – Representações tridimensionais das proteínas não-estruturais dos flavivírus.**



FONTE: Autor, 2019. As estruturas tridimensionais da NS1 (PDB ID: 4O6B); do domínio transmembranar da NS2A (PDB ID: 2M0S); do complexo NS2B/NS3 (PDB ID: 5GXJ); do complexo NS3/NS4A (PDB ID: 4K8B); e da metiltransferase-NS5 (PDB ID: 2P3O). Ilustração elaborada utilizando-se o *software* PyMol® v.0.99.

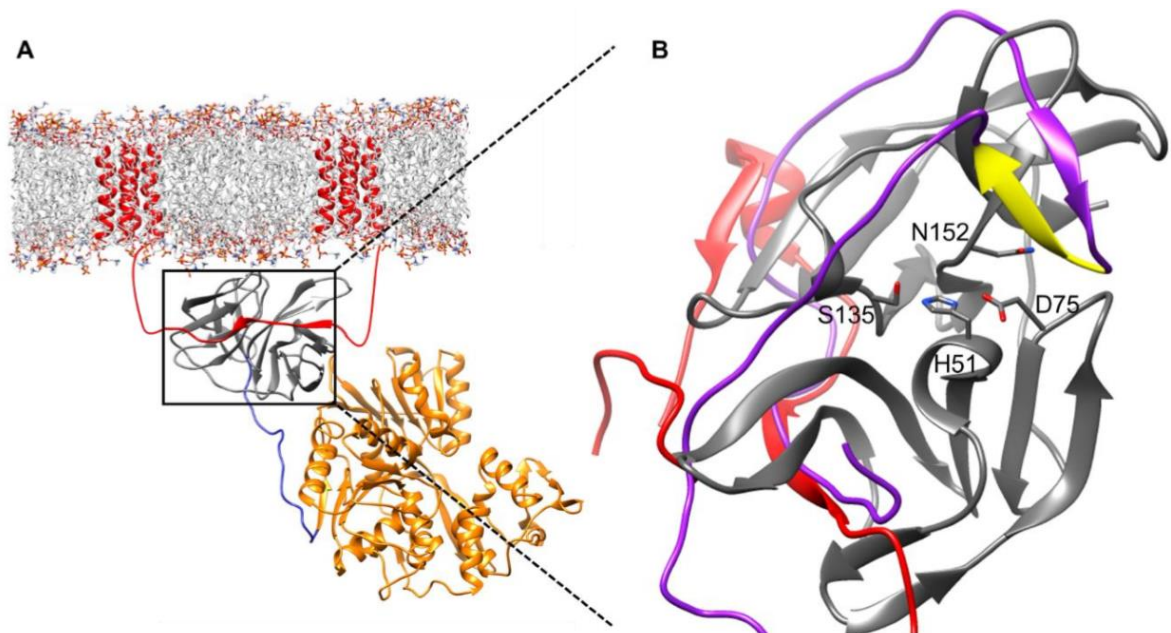
#### 2.1.3.2.1 A protease NS2B/NS3 dos flavivírus

Em geral, a replicação viral depende da proteína não-estrutural 3 (NS3<sup>pro</sup>), que somente é completamente ativa quando associada à NS2B, que funciona como um cofator (mais precisamente, o domínio hidrofóbico central), aumentando de 300 para 7600 vezes a eficiência da atividade enzimática frente aos substratos peptídicos (DE LA CRUZ et al., 2011; FALGOUT et al., 1991; LUO; VASUDEVAN; LESCAR, 2015; TOMLINSON; WATOWICH, 2008). A NS3<sup>pro</sup> é a segunda maior proteína flaviviral (70 kDa), sendo a NS5 (103 kDa) de maior massa molecular (LUO; VASUDEVAN; LESCAR, 2015).

Baseando-se nestas informações, a NS3<sup>pro</sup> representa um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos antivirais que atuem por meio da inibição do complexo NS2B-NS3 (FALGOUT et al., 1991; SILVA-JÚNIOR; SCHIRMEISTER; ARAÚJO-JÚNIOR, 2018). A interrupção da atividade desta protease conduz à morte do vírus, por meio da inibição da replicação do mesmo (CHAPPELL et al., 2008). A protease cliva a poliproteína viral para

liberar outras proteínas estruturais e não-estruturais que são essenciais para o processo de replicação viral, bem como, organização estrutural de novas partículas virais (chamadas de vírions). O domínio de 40 aminoácidos da NS2B está ligado à NS3<sup>PTO</sup> e, ao mesmo tempo, ancora o complexo NS2B/NS3 a um dos folhetos da membrana do RE, via domínios transmembranares *N*- e *C*-terminais (Figura 8). Além disso, a proteína NS3 também é responsável por outras atividades enzimáticas na porção *C*-terminal (helicase e RNA-endonuclease), as quais são diretamente reguladas por interações estéricas com a membrana do RE (NITSCHKE et al., 2014).

**Figura 8 – Modelo esquemático para o multicomplexo proteico NS2B/NS3 do DENV.**



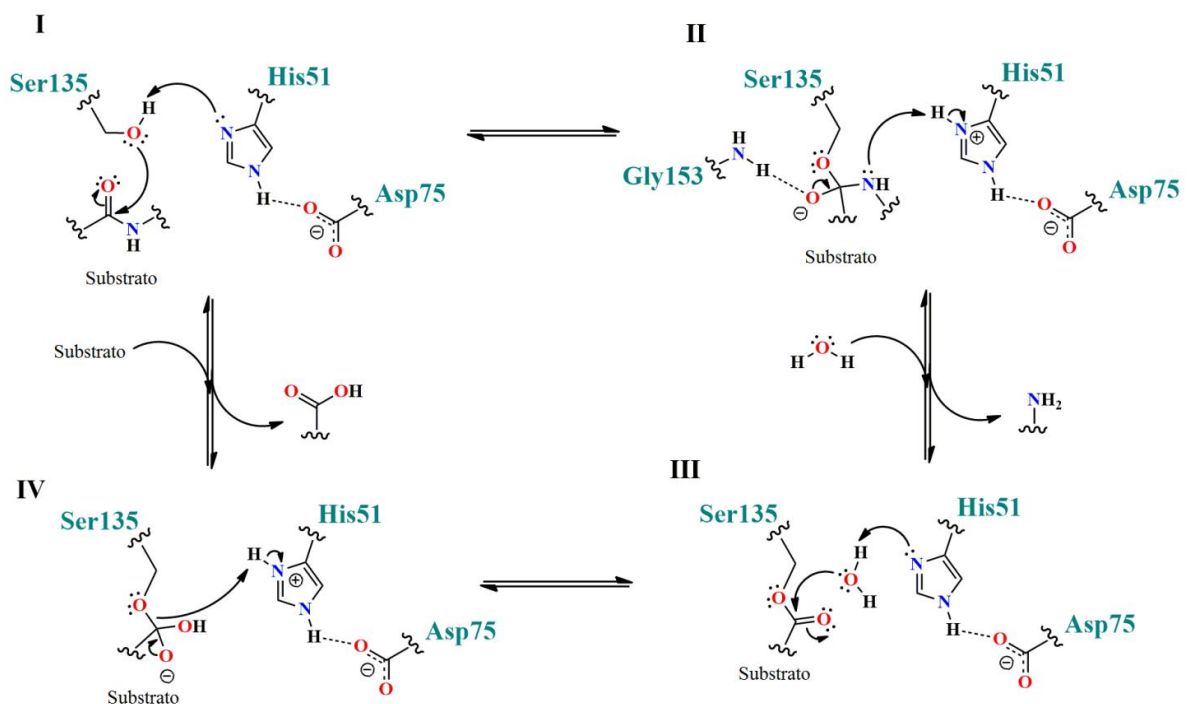
FONTE: Autor, 2019. Em (A), multicomplexo proteico da NS2B/NS3 conjugado ao folheto citoplasmático do RE (PDB ID: 2VBC), evidenciando a helicase (em vermelho), conexão da NS3 (em azul), e a NS3 propriamente dita (em cinza). Em (B), maximização do sítio ativo da NS2B/NS3 do DENV2 (PDB ID: 2M9P). Cores: NS2 "aberta" (vermelho); NS2 "fechada" (roxo); sítio S1 (em amarelo). A tríade catalítica (His51(H), Asp75(D) e Ser135(S)) e o resíduo conservado Asn152 estão representados código de uma letra e em modelo e bastão. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* UCSF Chimera®, v. 1.12.

A NS3<sup>PTO</sup> é constituída de um domínio serino protease tipo-tripsina (dois barris betas com seis folhas betas), com 180 aminoácidos de comprimento. Entre ambos os lóbulos dos barris, uma fenda catalítica é formada, apresentando quatro regiões especificamente bem definidos (rever Figura 8). Em todos os quatro sorotipos do DENV, a NS3<sup>PTO</sup> completamente

ativada possui uma forte preferência para substratos com uma sequência dibásica em P1 e P2, seguida por uma pequena cadeia de aminoácidos na posição P1' e uma preferência por valina/isoleucina na posição P2' (LI et al., 1999). Os domínios hidrofóbicos do cofator NS2B, responsáveis por ligar-se à membrana do RE, não são essenciais para a função proteolítica da NS3<sup>pro</sup> (LI et al., 1999).

A NS3<sup>pro</sup> contém uma tríade catalítica funcional, composta por His51, Asp75 e Ser135. Em geral, a clivagem do substrato peptídico se inicia com um ataque nucleofílico da Ser135 na carbonila P1 do substrato. Devido o grupo hidroxila da Ser135 ser inerentemente um nucleófilo fraco, este deve ser ativado por ação da His51 adjacente (Figura 9, I). A estabilização do complexo no buraco oxoaniônico, via interações de hidrogênio, promove a formação de um intermediário tetraédrico (Figura 9, II). Posteriormente, a decomposição deste estado intermediário resulta na clivagem da porção C-terminal, liberando uma amina. A porção N-terminal permanece covalentemente ligada à enzima, via ligação éster, que é subsequentemente hidrolisada por ação de uma molécula de água. Nesta etapa, a His51 atua novamente como uma base para elevar o caráter nucleofílico da molécula de água (Figura 9, III). Por fim, a porção N-terminal do produto clivado é liberado através da reprotonação do ácido carboxílico, iniciando-se um novo ciclo catalítico (HEDSTROM, 2002) (Figura 9, IV).

**Figura 9 – Mecanismo enzimático da tríade catalítica na protease NS2B-NS3.**



FONTE: Autor, 2019. Em (I), o ataque nucleofílico realizado pela Ser135; Em (II), o buraco oxoaniônico gerado pela Gly153, estabilizando o intermediário tetraédrico. Em adição, um derivado

amínico é liberado como produto; Em (III), o substrato (covalentemente ligado) sofre um novo ataque nucleofílico por uma única molécula de água; Em (IV), um rearranjo ocorre e estabiliza o segundo intermediário tetraédrico, liberando um ácido carboxílico, como produto final. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12.

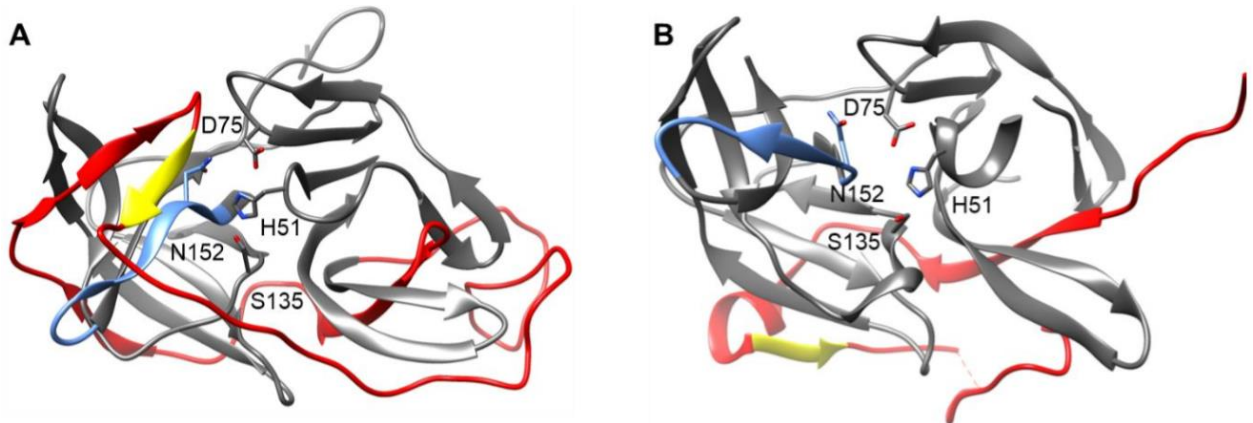
#### 2.1.3.2.2 Estados conformacionais da NS2B-NS3 nos vírus Dengue e Zika

Devido a protease do DENV ser um alvo altamente atrativo no campo da química medicinal, há também um considerável interesse na elucidação das estruturas cristalográficas, as quais podem auxiliar no planejamento e desenvolvimento racional de novos inibidores. No entanto, a cristalização de inibidores específicos complexados à proteína é um grande desafio, principalmente devido à flexibilidade conformacional desta. Neste sentido, diferentes estruturas para o cofator NS2B são denominadas "abertas" ou "fechadas" (POULSEN; KANG; KELLER, 2014).

A constatação da conformação "fechada" é interpretada como uma consequência da ligação do substrato. Esta tem uma importância especial para o sítio ativo de inibidores devido permitir o estudo deste alvo macromolecular em seu estado "ativo", com o cofator NS2B situado em uma posição onde ele participa do reconhecimento do substrato, conduzindo à estrutura transiente chamada de  *$\beta$ -hairpin*. Na conformação fechada da protease do DENV-2 (PDB ID: 2M9P, Figura 10, A), o cofator quase circunda todo o domínio da protease, permitindo a dedução de bolsos específicos S1-S3, a partir da localização de um substrato trifluoracetônico covalentemente ligado ao sítio ativo da serina (GIBBS et al., 2018). Já na conformação aberta da protease do DENV-2 (PDB ID: 2FOM, Figura 10B), o domínio *N*-terminal do cofator NS2B está parcialmente envolvido em torno do domínio da protease. A organização adotada pelo o domínio *C*-terminal da NS2B revela significantes diferenças entre as formas fechada e o complexo não-ligante. Neste arranjo conformacional da NS2B, esta somente estabiliza ambos domínios *N*- e *C*-terminais da NS3<sup>pro</sup> através do fornecimento de folhas betas adicionais. Uma parte do domínio do cofator parece estar termicamente distorcida por conta da densidade eletrônica não ser definida para estes resíduos, sugerindo que a parte *C*-terminal do cofator pode adotar múltiplas conformações em solução (ERBEL et al., 2006).



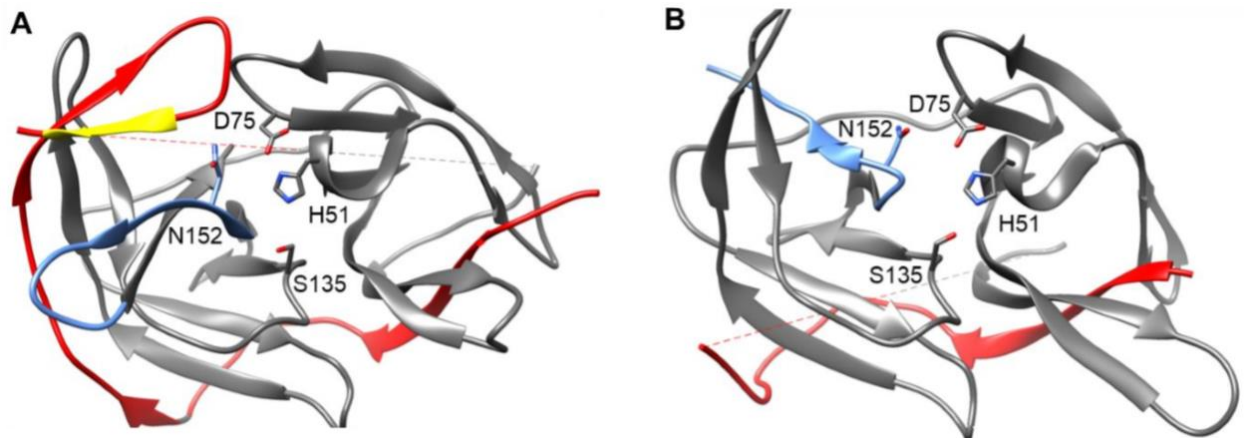
**Figura 10 – Conformações fechada (A) e aberta (B) para a protease NS2B-NS3 do DENV2.**



FONTE: Autor, 2019. Conformações fechada (A) e aberta (B) para a protease do DENV-2 (PDB ID: 2M9P e 2FOM, respectivamente). Cores: protease NS3<sup>pro</sup> (cinza); NS2B (vermelho); S1- $\beta$ -hairpin (amarelo); S1-loop (azul). A tríade catalítica (His51(H), Asp75(D) e Ser135(S)) e o resíduo conservado Asn152 estão representados código de uma letra e em modelo e bastão. Os ligantes complexados foram removidos para melhores visualização do sítio ativo em ambas estruturas. Figura elaborada utilizando-se o *software* UCSF Chimera®, v. 1.12.

A estrutura cristalográfica para a protease do ZIKV em complexo com um inibidor boronato foi resolvida por Lei *et al.* (2016), apresentando uma conformação fechada similar a observada para a protease do DENV-2 (Figura 11A). Nesse sentido, o valor de RMSD para a comparação entre as duas estruturas foi obtido como sendo 2.9 Å. A parte C-terminal do cofator NS2B é amplamente imperceptível, lembrando sua altíssima flexibilidade intrínseca. Já a conformação aberta da protease do ZIKV (Figura 11B) difere em aspectos estruturais da conformação aberta da protease do DENV2. Do resíduo Asn152 ao Gln167, o *loop*-S1 liga-se na conformação aberta e se estende na direção oposta, como na conformação fechada. Esta orientação é estabilizada por interações hidrofóbicas com *N*-barris de folhas betas (CHEN *et al.*, 2016b).

**Figura 11 – Conformações fechada e aberta para a protease NS2B-NS3 do ZIKV.**



FONTE: Autor, 2019. Conformações fechada (A) e aberta (B) para a protease do ZIKV (PDB ID: 5LC0 e 5GXJ, respectivamente). Cores: protease NS3 (cinza); NS2B (vermelho); S1- $\beta$ -hairpin (amarelo); S1-loop (azul). A tríade catalítica (His51(H), Asp75(D) e Ser135(S)) e o resíduo conservado Asn152 estão representados código de uma letra e em modelo e bastão. Os ligantes complexados foram removidos para melhores visualização do sítio ativo em ambas estruturas. Figura elaborada utilizando-se o *software* UCSF Chimera®, v. 1.12.

Análises adicionais sugerem que tal *loop* é uma transição estrutural entre as conformações inativa e ativa da NS3<sup>pro</sup>, uma vez que o subsítio S1 é crítico para o reconhecimento enzimático. Em contraste, o posicionamento dos *loops* em ambas as conformações da protease do DENV2 difere muito menos na protease do ZIKV, assim aumentando a afinidade desta protease por inibidores alostéricos (CHEN et al., 2016b).

Em geral, as estruturas cristalográficas não representam o equilíbrio transicional entre ambas as conformações aberta e fechada; assim, estudos envolvendo ressonância magnética nuclear (RMN) têm sido desenvolvidos com o intuito de elucidar tais aspectos. Para a protease do DENV, a conformação fechada é, sem exceções, o estado mais predominante em solução, considerando tanto a presença quanto a ausência de inibidores (CHEN et al., 2014). No entanto, para a protease do ZIKV, a conformação aberta é encontrada mais abundantemente (MAHAWATHTHA et al., 2017).

#### 2.1.3.2.3 Sítio alostérico hipotético (*pocket*)

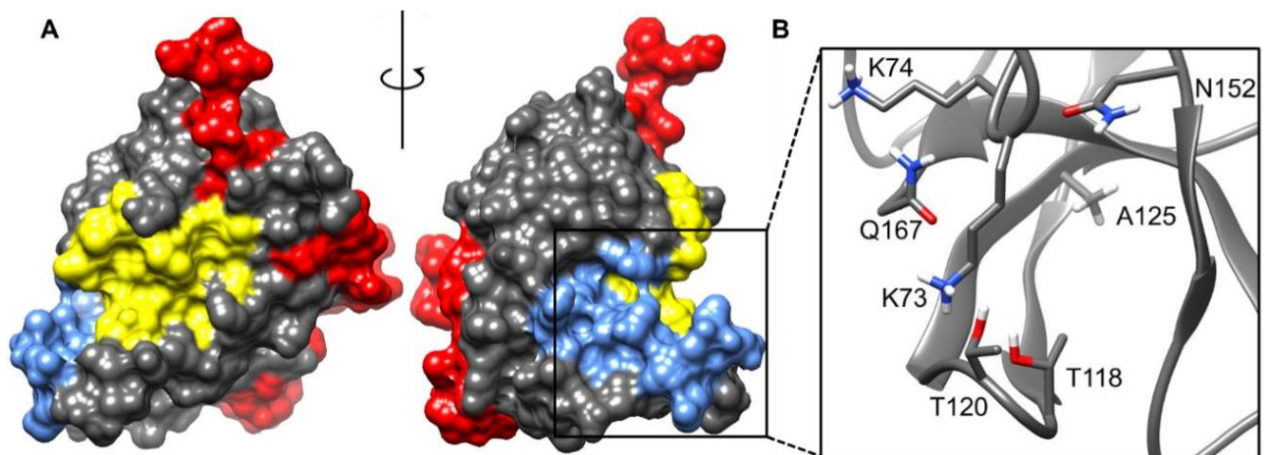
Nos últimos anos vários grupos de pesquisa têm desenvolvido pequenas moléculas capazes de inibir a NS2B-NS3, as quais foram primariamente identificadas como inibidores alostéricos devido aos seus modos de inibição não-competitivos (PAMBUDI et al., 2013;

YANG et al., 2011, 2014). No entanto, o concreto modo de ligação permanece indescritível até os dias atuais.

Noble e colaboradores (2012) sugeriram um sítio alostérico na face relativamente oposta ao sítio ativo, cujo é delimitado por resíduos de ambas NS2B e NS3<sup>pro</sup>, podendo ser potencialmente utilizado como alvo biológico para pequenos inibidores. Paralelamente, Yildiz e coautores (2013) identificaram a mesma região na NS2B-NS3 do DENV, a qual é sensível à inibição alostérica. Além disso, verificou-se que o sítio alostérico mais comumente encontrado é caracterizado por uma fenda predominantemente hidrofóbica na parte anterior ao sítio catalítico clássico, o qual apresenta o resíduo Ala125.

Em 2017, Brecher e coautores desenvolveram um ensaio de mudança conformacional baseado em luciferase para monitorar as transições estruturais da NS2B e caracterizar inibidores quanto à atividade alostérica. Baseando-se nos resultados obtidos, pôde-se sugerir que os inibidores não-competitivos não se ligam à conformação aberta ou induzem a transição fechada para aberta. Uma hipotética localização para tal sítio alostérico na conformação aberta da protease no DENV2 é mostrada na Figura 12.

**Figura 12 – Sítio alostérico hipotético no DENV-2.**



FONTE: Autor, 2019. Em (A), modelo de superfície molecular para a conformação aberta da protease do DENV-2 (PDB ID: 2FOM). Em (B), resíduos comumente envolvidos em interações com inibidores. Cores: protease NS3 (cinza); NS2B (vermelho); sítio ativo (amarelo); sítio alostérico hipotético (azul). Figura elaborada utilizando-se o *software* UCSF Chimera®, v. 1.12.

Inicialmente, dois mecanismos de inibição alostérica foram estabelecidos. No primeiro, um ligante é capaz de induzir a mudança conformacional na NS3<sup>pro</sup> aberta para fechada (OTHMAN et al., 2008). No outro, considera-se a mobilidade do cofator NS2B ou perturbação

da interação entre NS2B e NS3<sup>pro</sup>, impedindo a mudança conformacional da protease para a forma ativa (MUKHAMETOV et al., 2014).

A inibição alostérica está relacionada com um resíduo asparagina bifuncional (Asn152), que está envolvido tanto no reconhecimento do substrato, via interação de hidrogênio, com o resíduo Gly82 da  $\beta$ -hairpin do NS2B na conformação fechada, quanto na formação do sítio alostérico na conformação aberta. O resíduo Asn152 é conservado em todas as proteases flavivirais. Além disso, sabe-se que mutações neste têm conduzido à completa inativação da protease (BRECHER et al., 2017). Consequentemente, utilizar a Asn152 como alvo racional poderia estabilizar a conformação aberta e inibir a formação de uma estrutura proteolítica  $\beta$ -hairpin (AGUILERA-PESANTES et al., 2017a). No entanto, interações com a Lys74, que está imediatamente adjacente à Asp75 da tríade catalítica, poderiam causar uma diminuição da atividade por uma mudança conformacional induzida por um ligante (OTHMAN et al., 2008).

## 2.2 Recentes Avanços na Terapia Farmacológica dos Vírus Dengue e Zika

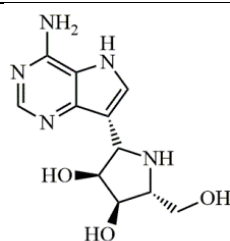
Em 2016, a divisão de vacinas da Sanofi-Pasteur aprovou a primeira vacina tetravalente contra os quatro sorotipos do DENV, chamada Dengvaxia<sup>®</sup> (ou também conhecida como CYD-TDV). No entanto, sua eficácia frente aos sorotipos DENV1 e 2 não está completamente esclarecida (RECKER et al., 2016; SRIVARANGKUL et al., 2018).

Basicamente, a Dengvaxia<sup>®</sup> é uma vacina profilática, tetravalente, vírus-atenuado, que contém genes processadores das proteínas E e pré-membranar (prM) dos DENV1-4 inseridos no arranjo quimérico do vírus da febre amarela (YFV) atenuado (LOW; OOI; VASUDEVAN, 2017). O seu calendário de vacinação consiste em três doses de 0,5 mL em intervalos de seis meses. Entretanto, esta só é recomendada para o grupo de indivíduos na faixa etária entre 9 e 45 anos de idade (SRIVARANGKUL et al., 2018). Em adição, cada dose (0,5 mL) contém 4,5-6,0 log<sub>10</sub> IDCC<sub>50</sub>, onde tal unidade representa a dose infectante para 50% de uma cultura celular (WHO, 2016). Por fim, a Dengvaxia<sup>®</sup> tem sido administrada em mais de dez países, incluindo Índia, Estados Unidos, México, Austrália e Brasil (LU et al., 2018).

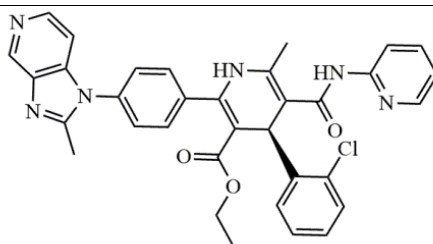
Esse recente avanço pode ser considerado como produto dos inúmeros esforços direcionados ao desenvolvimento de estratégias imunológicas contra os vírus DENV e ZIKV de várias companhias farmacêuticas em todo o mundo, em seus respectivos grupos de pesquisas, como observado na Tabela 1.

**Tabela 1 – Status atual (e últimas atualizações) de vacinas e fármacos/protótipos ativos contra os vírus Dengue e Zika no pipeline das indústrias farmacêuticas.**

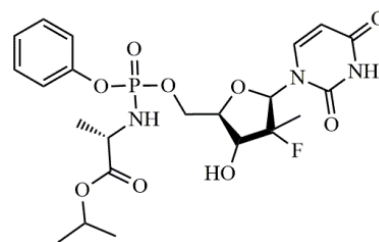
Indicação (Proposta) <sup>a</sup>	Nome do Inibidor (Sinonímia)/Tipo	Companhia ou Instituto	Status (Ano) <sup>b</sup>
ZIKV (ZIKV)	BBV 121/vacina	<i>Bharat Biotech</i> <sup>®</sup>	Ensaio de Fase II para ZIKV na Índia (2019)
ZIKV (ZIKV)	Galidesivir/ composto ativo (1)	<i>BioCryst</i> <sup>®</sup>	Ensaio Pré-clínico para ZIKV nos EUA e Reino Unido (2019)
DENV (YFV e ZIKV)	EMX 001/vacina	<i>Emergex Vaccines</i> <sup>®</sup>	Ensaio Pré-clínico para DENV, YFV e ZIKV no Reino Unido (2019)
Carcinoma (ZIKV e WNV)	Rintatolimod/vacina adjuvante	<i>Hemisphere Biopharma</i> <sup>®</sup>	Ensaio Pré-clínico para ZIKV e WNV nos EUA (2019)
DENV (YFV)	vacina	<i>Fundação Oswaldo Cruz</i>	Ensaio Pré-clínico para YFV no Brasil (2019)
DENV (DENV)	KD-382/vacina	<i>Kaketsuken</i> <sup>®</sup>	Ensaio de Fase I para DENV na Austrália e Japão (2019)
Asma (DENV)	Modipafant/composto ativo (2)	<i>Pfizer</i> <sup>®</sup>	Descontinuado nos ensaios Clínicos de Fase II para asma no Reino Unido



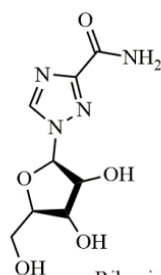
Galidesivir (1)



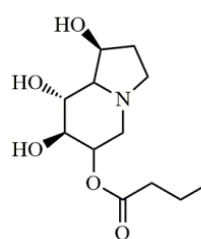
Modipafant (2)



Sofosbuvir (3)



Ribavirin (4)



Celgosivir (5)

			(2015). Embora, esteja em Fase II para DENV (2019)
HCV (YFV)	Sofosbuvir (GS-7977)/composto ativo <b>(3)</b>	<i>Pharmasset/Gilead</i> <sup>®</sup>	Aprovado para HCV (2013). Embora, esteja em Fase II para YFV (2019).
HCV (DENV, YFV e ZIKV)	Ribavirin/composto ativo <b>(4)</b>	<i>Roche</i> <sup>®</sup>	Aprovado (2013)
DENV (HCV e HIV)	Celgosivir <b>(5)</b>	<i>Sanofi-Aventis</i> <sup>®</sup>	Ensaio de Fase I/II para DENV em Singapura (2019)
DENV	Dengvaxia (CYD-TDV)/vacina	<i>Sanofi Pasteur</i> <sup>®</sup>	Aprovado (2016). Embora, tenha sido retirado do mercado nas Filipinas (2017).
DENV (DENV)	TAK 003/vacina	<i>Takeda</i> <sup>®</sup>	Ensaio de Fase III para DENV no Reino Unido e EUA (2019)
ZIKV (ZIKV)	CSB 013/vacina	<i>Tianjin CanSino Biotechnology</i> <sup>®</sup>	Ensaio Pré-clínicos para ZIKV na China (2019)
Ebola e Marburg (ZIKV e YFV)	Tyzivumab/vacina	<i>Tychan/WuXi Biologics</i> <sup>®</sup>	Ensaio de Fase I para ZIKV e YFV em Singapura (2019)

<sup>a</sup>: Composto ou vacina inicialmente planejada para o alvo (indicação), no entanto, durante os ensaios biológicos um possível diferente alvo se mostrou mais promissor (proposta); <sup>b</sup>: As informações sobre os correspondentes status e/ou últimas atualizações foram obtidas nos bancos de dados: [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca); <https://adisinsight.springer.com>; e [www.accessdata.fda.gov](http://www.accessdata.fda.gov). Abreviações - ZIKV: Zika vírus; DENV: Dengue vírus; WNV: vírus do Nilo Ocidental; YFV: vírus da Febre Amarela; HCV: vírus da Hepatite C.

### 2.2.1 Avanços no desenvolvimento de novos compostos ativos frente à NS2B-NS3 flaviviral

O desenvolvimento de compostos farmacologicamente seguros e efetivos pode ser considerado como o ponto mais importante do planejamento de fármacos ant Flavivirais (LU et al., 2018). No entanto, sabe-se que o processamento correto da poliproteína flaviviral é um

passo vital na replicação do vírus, onde este é executado pela ação combinada de proteases celulares (co- e pós-tradução), e um complexo serino protease (NS2B-NS3) (CHOKSUPMANEE et al., 2012). Ademais, esse alvo molecular possui diferentes sítios alostéricos rodeando a fenda catalítica (AGUILERA-PESANTES et al., 2017b). Considerando tais informações, a NS2B-NS3 pode ser utilizada como um alvo primordial no planejamento e desenvolvimento de novos agentes antinflavivirais (AGUILERA-PESANTES et al., 2017b). Além disso, as proteases NS2B-NS3 dos vírus Dengue e Zika compartilham aproximadamente 80% de homologia entre seus sequenciamentos genômicos (QADIR et al., 2018).

Diversos inibidores da NS2B-NS3 têm sido reportados em vários trabalhos de diferentes grupos de pesquisa em todo o mundo, no entanto, uma pequena parcela destes compostos são realmente promissores e possuem propriedades que permitem a estes, avançarem nas etapas de desenvolvimento de fármacos. Estes podem ser classificados dentro de três categorias, sendo inibidores de (i) origem natural; (ii) sintética; e (iii) triagem/planejamento virtual.

Normalmente, as plantas podem produzir compostos químicos específicos que são normalmente usados contra patógenos e predadores. Dentre estes, os inibidores de proteases naturalmente ocorrem em plantas como proteínas de defesa. Adicionalmente, estes inibidores possuem importantes funções endógenas, tais como a formação de estoque de sementes, sinalização celular, ativação do fator de crescimento, bem como, regulação da produção de proteases (QI; SONG; CHI, 2005). Neste sentido, alguns estudos foram desenvolvidos com o intuito de verificar a capacidade de certo inibidores de proteases vegetais frente à NS2B-NS3. Substâncias oriundas das espécies vegetais *Alocasia macrorrhizos* (popularmente conhecida como "orelha de elefante gigante") (PALAYAM et al., 2018) e *Boesenbergia rotunda* (KIAT et al., 2006), bem como uma série de flavanonas (SRIVARANGKUL et al., 2018) têm demonstrado significativa atividade antinflaviviral, através da inibição da protease NS2B-NS3 do DENV2.

O planejamento racional de novos inibidores sintéticos da NS2B-NS3 é considerado um imenso desafio, pois esta enzima possui um sítio catalítico hidrofóbico e raso (MAHAWATHTHA et al., 2017; YIN et al., 2006). No entanto, inibidores da replicação viral devem ser capazes de reduzir a carga viral, bem como prevenir a progressão da doença (SRIVARANGKUL et al., 2018). Neste sentido, os compostos de origem sintética representam o grupo de inibidores mais promissores encontrados na literatura, com valores de  $IC_{50}$  e/ou  $EC_{50}$  na faixa nanomolar. Várias classes de compostos químicos têm exibido excelentes perfis biológicos e podem ser consideradas como sendo bastante promissoras, são elas: peptídeos cíclicos (TAKAGI et al., 2017), dipeptídeos (ZHOU et al., 2013), peptídomiméticos contendo

ácidos borônicos (NITSCHKE et al., 2017), metalopeptídeos complexados com cobre (PINKHAM; YU; COWAN, 2018), pirrolidinas, imidazolidinonas (WENG et al., 2017), piridazinonas (LU et al., 2018), 2-aminobenzotiazóis (WU et al., 2015), indan-1,3-dionas (OLIVEIRA et al., 2018) e indóis (MARTINEZ et al., 2018).

Entretanto, o planejamento de fármacos é um processo complexo e muito caro, que frequentemente resulta em falhas. Na tentativa de reduzir as falhas e os altos custos em colocar um fármaco no mercado, várias técnicas computacionais tem sido empregadas, que podem prever as propriedades moleculares via relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR), modelagem farmacofórica, planejamento baseado em estruturas e/ou fragmentos moleculares (SILVA-JÚNIOR; ARAÚJO-JÚNIOR; AQUINO, 2017). Basicamente, tais métodos contidos no âmbito da química computacional são capazes de prover uma resposta rápida e segura com a finalidade de identificar os compostos mais promissores para o planejamento racional de novos candidatos a fármacos (AGUILERA-PESANTES; MÉNDEZ, 2017).

Considerando estas preciosas informações, vários estudos computacionais vêm sendo desenvolvidos com o intuito de se reduzir o tempo de planejamento e otimizar os resultados. A partir destes estudos, compostos tais como benzimidazóis (DENG et al., 2012), piperidinas, flavanonas (CABARCAS-MONTALVO et al., 2016), diversos heterociclos nitrogenados catiônicos (MIRZA et al., 2016, 2018), bem como diferentes metabólitos naturais (BYLER; OGUNGBE; SETZER, 2016) e análogos de benzoxazóis (SCHÖNE et al., 2017), têm sido frequentemente encontrados como sendo promissores, os quais têm sido testados e confirmados como agentes antinflavivirais, assim, legitimando o uso de tais técnicas virtuais na descoberta de *hits* e/ou otimização de *leads*.

2.2.2 Avanços no desenvolvimento de novos compostos ativos frente à NS2B-NS3 flaviviral

2.2.3 Recentes avanços no desenvolvimento de inibidores da protease NS2B-NS3 dos vírus Dengue e Zika obtidos pelo AK-Schirmeister (Universidade Johannes Gutenberg de Mainz, Alemanha)

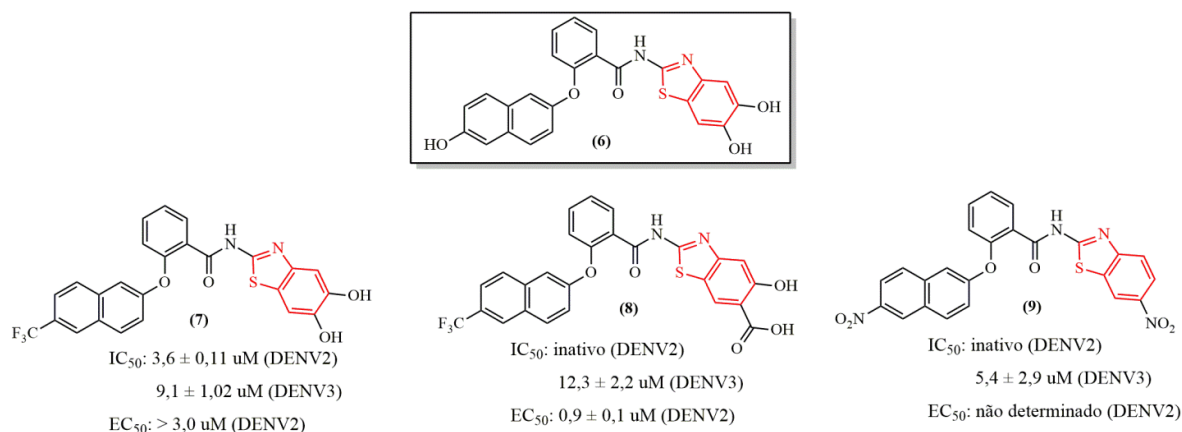
Recentemente, o grupo de pesquisa liderado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tanja Schirmeister (Universidade Johannes Gutenberg de Mainz – Alemanha, local de execução do período de doutorado sanduíche do respectivo autor desta tese), em parceria com o grupo de pesquisa dirigido pelo Prof. Dr. Jochen Bodem (Universidade de Würzburgo – Alemanha) têm direcionado seus esforços na descoberta e desenvolvimento de novos derivados benzotiazólicos



com atividade antinflaviviral, focando nos flavivírus DENV e ZIKV. Para tal, tem-se aplicado a triagem de um grande número de compostos, síntese combinatória e diversos métodos *in silico*. Como resultado, promissores benzotiazóis foram identificados após avaliação biológica frente à protease NS2B-NS3 do DENV e ZIKV (Figura 13), dados iniciais publicados no jornal internacional *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (WU et al., 2015).

Partindo-se de uma quimioteca *in-house* (aproximadamente 250 compostos), verificou-se que o composto (6) demonstrou possuir a melhor atividade frente à NS2B-NS3 do DENV2, com  $IC_{50}$  de  $4,2 \pm 0,16 \mu\text{M}$ . Adicionalmente, este foi avaliado frente à protease do DENV3, onde observou-se  $IC_{50}$  de  $0,99 \mu\text{M}$ . Durante o ensaio de inibição do DENV2 em células, verificou-se que tal composto foi capaz de inibir a replicação viral com  $IC_{50}$  de  $3,2 \mu\text{M}$ . Ainda, foi observado que este possui excelente atividade antiviral em células *Vero* infectadas ( $EC_{50}$  de  $0,8 \mu\text{M}$ ), sem exibir efeitos tóxicos até uma concentração de  $10 \mu\text{M}$ . Com relação à NS2B-NS3 do ZIKV, observou-se que o composto (6) apresentou um valor de  $IC_{50}$  de  $1,41 \mu\text{M}$ .

**Figura 13 – Benzotiazóis biologicamente ativos frente à NS2B-NS3 do DENV2 e 3.**



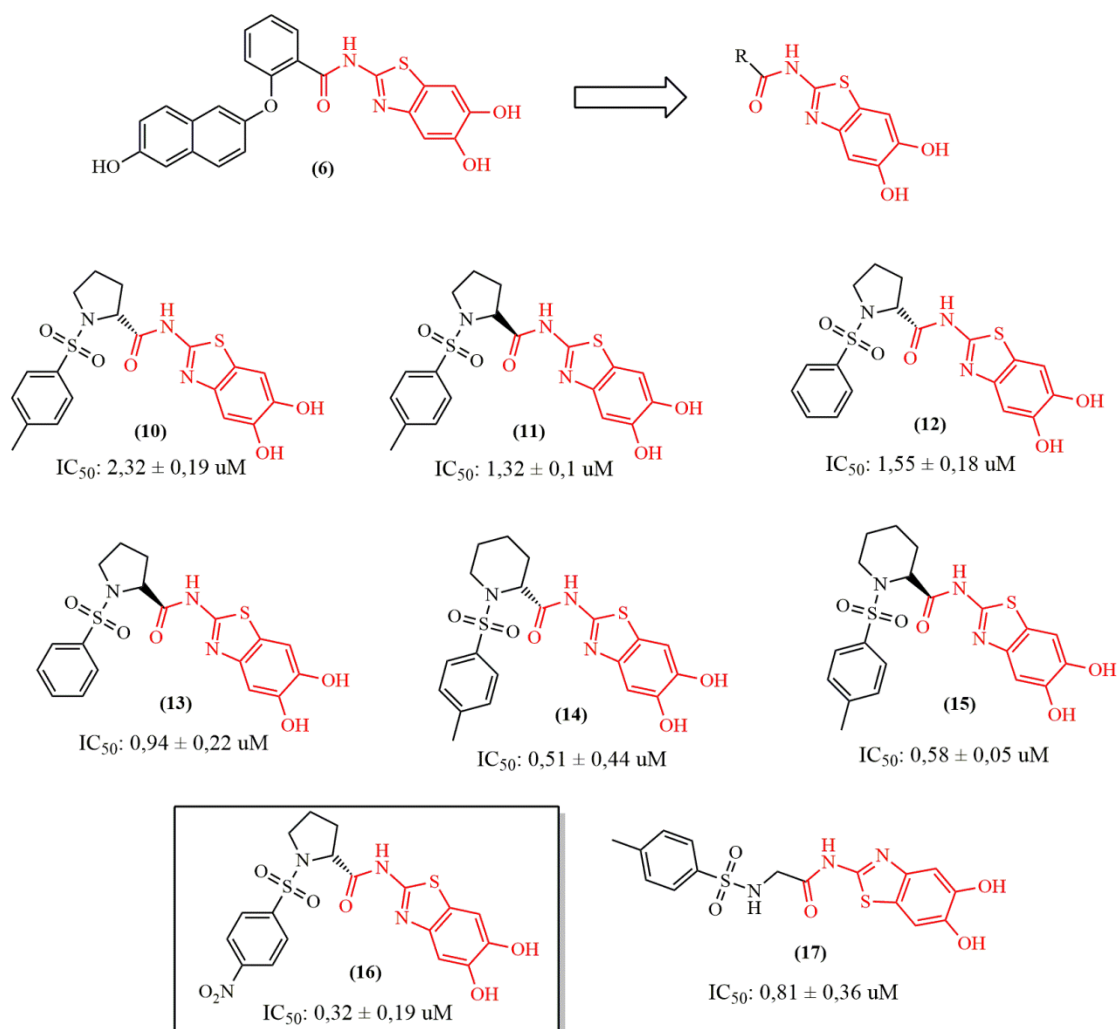
FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12.

Tipicamente, os análogos 2-aminobenzotiazólicos são bem conhecidos por serem considerados como compostos do tipo *Pan-Assay Interference Scaffold*, abreviados por *PAINS* (DEVINE et al., 2015), os quais apresentam seletividade promíscua para diferente alvos, o que leva à obtenção de falsos positivos. Entretanto, diversos métodos de avaliação foram utilizados para comprovar que tal *hit* não é um *PAINS* e que este tem validade e seletividade, tais como ensaio fluorimétrico com a protease, antiviral em cultura de células, citotoxicidade, termoforese em microescala e dinâmica molecular (BARTHELIS, 2018).

Adicionalmente, considerando o composto *hit* (6) e aplicando-se síntese combinatória, uma nova classe de prolil-sulfonamidas (Figura 14) foi obtida, com melhor solubilidade e de

fácil obtenção, uma vez que não era necessário realizar a reação de acoplamento de Ullmann. Dentre os compostos, o melhor composto (**16**) apresentou valores de  $IC_{50}$  iguais a 8,58 e 0,32  $\mu$ M para DENV-2 e ZIKV, respectivamente. No entanto, o índice de seletividade (SI) foi 27 (vinte e sete) vezes maior para a protease do ZIKV do que para o DENV2, razão ainda não completamente elucidada (MILLIES et al., 2018).

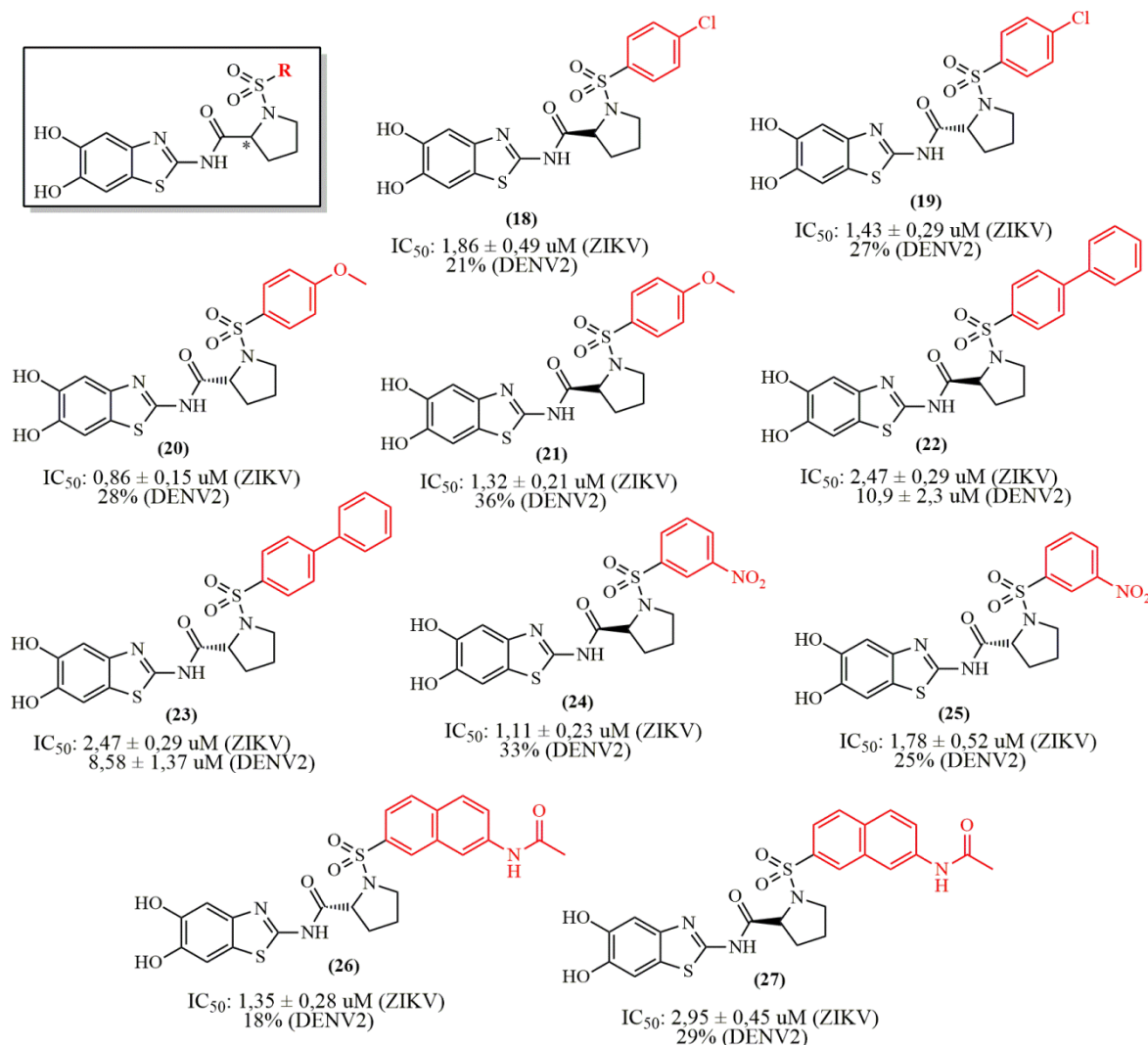
**Figura 14 – Novas sulfonamidas ativas contra a NS2B-NS3 do ZIKV.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o software ChemDraw® v. 12.

Considerando os excelentes resultados obtidos com o composto (**16**), modificações estruturais foram realizadas na fenila da proilil-sulfonamida. Dessa forma, foram obtidos novos derivados proilil-sulfonamidas substituídos com diferentes grupos eletrodadores e retiradores (Figura 15). Em seguida, estes foram avaliados quanto à inibição da protease NS2B-NS3 do DENV2 e ZIKV. Entretanto, nenhum novo análogo foi identificado como mais promissor do que o seu correspondente precursor.

**Figura 15 – Prolil-sulfonamidas substituídas e ativas frente à protease NS2B-NS3 dos vírus DENV2 e ZIKV.**



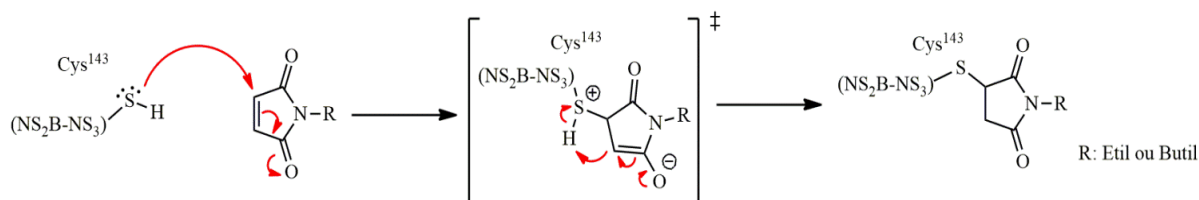
FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o software ChemDraw® v. 12.

Baseando-se nos resultados obtidos, o composto (16) permaneceu como o *lead*, uma vez que as modificações estruturais mostradas na Figura 15 não resultaram em um composto mais potente do que seu correspondente precursor. Consequentemente, este foi avaliado quanto ao seu modo de inibição, podendo este ser competitivo ou não. Neste sentido, uma protease NS2B-NS3 mutante do ZIKV (cedida pelo Prof. Dr. Cristhian Klein - Universidade de Heidelberg, Alemanha) foi utilizada para determinação do modo de inibição desse *lead*.

Sabe-se que a protease NS2B-NS3 não possui nenhum resíduo cisteína (que pode atuar como um nucleófilo), então, uma forma mutante foi criada para avaliar o modo de inibição de compostos ativos (LEI et al., 2016). Esta forma mutante possui um resíduo de cisteína livre na

posição da Ser143 (Cys/Ser<sup>143</sup>), o qual tem grande afinidade por grupos eletrofílicos. Então, um derivado da maleimida foi adicionado durante os ensaios biológicos, gerando um impedimento estérico devido à formação de um complexo covalentemente ligado (Figura 16) ao sítio catalítico. No entanto, observou-se que o composto **(16)** continuou produzindo efeitos inibitórios sobre este alvo, sugerindo que tratava-se de um inibidor não competitivo (MILLIES et al., 2018).

**Figura 16 – Formação do complexo Cys143-maleimida.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12.

## 2.3 Alphavírus

Os Alphavírus pertencem à família *Togaviridae* juntamente com o gênero *Rubivirus*, que contém apenas um membro, o vírus Rubéola (PIETILÄ; HELLSTRÖM; AHOLA, 2017). O gênero Alphavírus inclui cerca de 30 espécies diferentes de vírus identificados e catalogadas (CARPENTIER; MORRISON, 2018).

A maioria dos Alphavírus são conhecidos por causar doenças infecciosas em humanos e/ou animais, incluindo os vírus do Velho Mundo, Chikungunya (CHIKV), febre do Rio Ross (RRV) e Sindbis (SINV), bem como os vírus do Novo Mundo, Encefalite Venezuelana Equina (VEEV) (PIETILÄ; HELLSTRÖM; AHOLA, 2017; VANEY; DUQUERROY; REY, 2013).

### 2.3.1 O vírus Chikungunya

O CHIKV é uma arbovirose do gênero *Alphavirus* que também possui um ciclo silvestre e outro urbano. Assim como observado na transmissão do DENV e ZIKV, seus principais vetores também são as espécies de mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* (ABDELNABI et al., 2017; ELEFThERIADOU et al., 2017; PETERSEN; POWERS, 2016; VILLAMIL-GÓMEZ; RODRIGUEZ-MORALES, 2016; WANG; LIU, 2017). Embora, as espécies *A. furcifer* (SCHWARTZ; ALBERT, 2010), bem como, *Culex spp.* possam atuar como vetores dessa doença considerada emergente (ABDELNABI et al., 2017; MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017; RIOU; POLETTO; BOËLLE, 2016; YOUNGER, 2016).

### 2.3.2 Prevalência e patologia do vírus Chikungunya

Em 1952, o CHIKV foi primeiramente identificado durante um surto epidêmico na Tanzânia. Em 2004, o reaparecimento global do CHIKV se iniciou no Quênia, após o vírus se espalhar por diferentes ilhas do Oceano Índico. Desde o fim da década de 90, a infecção por CHIKV tem sido registrada em muitos países das Américas Central e do Sul, levando à estimativa de 11,675 milhões de casos (AALST et al., 2017; AMRAOUI; FAILLOUX, 2016; HWANG; JIANG; FIKRIG, 2019; SILVA-JÚNIOR et al., 2017b). Basicamente, o CHIKV é considerado um problema de saúde pública real onde mosquitos do gênero *Aedes spp.* estão disseminados (ABDELNABI et al., 2017).

Em 2008, o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos (do inglês: *United State National Institute of Allergy and Infectious Diseases - NIAID*) incluiu o

CHIKV na categoria C de prioridades. Esta categoria está relacionada aos patógenos que poderiam ser utilizados para disseminação em massa no futuro, devido sua alta taxa de morbimortalidade e significativo impacto sobre a saúde pública (POWERS; LOGUE, 2007; SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

Atualmente, o CHIKV é responsável por acometer indivíduos em mais de 60 países (LEE; HALVERSON; EZINWA, 2018; WHO, 2019). Apesar da expressiva abrangência, o CHIKV é raramente fatal, no entanto, 87 a 95% dos indivíduos infectados sofrem com artralgia debilitante, que pode persistir por meses ou anos (LEE; HALVERSON; EZINWA, 2018).

É estimado que mais de 40 milhões de pessoas tenham sido infectadas nas Américas, resultando em 23,8 milhões de indivíduos com graves sequelas, custando mais de US\$ 185 bilhões aos cofres públicos (BLOCH, 2016; LEE; HALVERSON; EZINWA, 2018).

Com relação à patologia, durante a fase aguda, a carga viral pode atingir até  $10^8$  partículas virais por mililitro de sangue e a concentração plasmática de interferons tipo I (IFN's) pode variar entre 0,5 e 2,0 ng/mL, associada à robusta indução de outras citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias (BURT et al., 2017; CHIRATHAWORN et al., 2010; NG et al., 2009).

Normalmente, os sintomas da infecção por CHIKV se iniciam entre 4 e 7 dias após a picada do mosquito infectado, sendo responsável pela chamada febre Chikungunya, que possui outros sintomas, tais como artralgia e *rash* maculopapular (BELTRÁN-SILVA et al., 2016; EVANS; MEIRES, 2016; SEYEDI et al., 2016; TECHER et al., 2015; THANAPATI et al., 2017). Como afirmado anteriormente, é raramente letal, mas pode progredir para o estágio crônico em 60% dos casos (ABDELNABI et al., 2017).

O estágio crônico é caracterizado por severa poliartrite persistente, predominante em espécies de vírus do Velho Mundo (ABDELNABI et al., 2017; DELOGU et al., 2011). No entanto, casos atípicos de complicações envolvendo a visão e os sistemas cardíaco, gastrointestinal e neurológico têm sido relatados (COUDERC et al., 2012; SINGH; UNNI, 2011; THIBERVILLE et al., 2013).

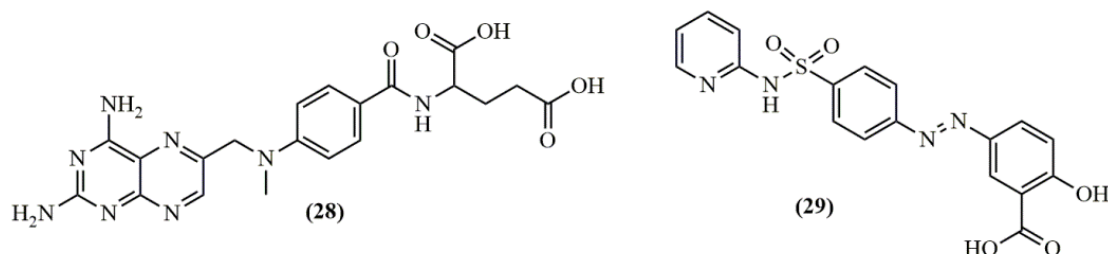
O CHIKV é responsável por ocasionar severas dores nas articulações dos tornozelos, dedos, cotovelos, joelhos e pulsos (GIGANTE et al., 2014; JAVELLE et al., 2017; SANGEETHA; PURUSHOTHAMAN; RAJARAJAN, 2017). Alguns estudos têm demonstrado que é possível encontrar imunoglobulina M (IgM) anti-CHIKV até 18 (dezoito) meses após o início dos sintomas (JAIN et al., 2017; ROBIN et al., 2008). Nesses casos, exercícios físicos são recomendados para diminuir a rigidez nas articulações acometidas (DE LAMBALLERIE; NINOVE; CHARREL, 2009). Casos de CHIKV associado à coinfeção por vírus Dengue (DENV) e Zika (ZIKV) têm sido relatados em estudos recentes (BEHNAM et al.,

2016; SHRINET; SRIVASTAVA; SUNIL, 2017). Embora, a coinfeção por ZIKV não parece aumentar a severidade da doença ou a duração da artralgia (KUTSUNA et al., 2016). Adicionalmente, casos de reumatismo crônico inflamatório associado à infecção por CHIKV em pacientes são raros, no entanto, são potencialmente danosos ao tecido esquelético. A maioria dos casos requer apenas tratamento sintomáticos, principalmente com anti-inflamatórios e fisioterapia (JAVELLE et al., 2017).

Basicamente, o CHIKV ataca os fibroblastos, sugerindo seu envolvimento com os tecidos musculares, articulares e epiteliais (tecido conjuntivo). Adicionalmente, o grande número de terminações nervosas encontradas nas articulações e nos tecidos musculares explicam a dor observada em paciente acometidos por esta infecção viral (CHANDAK et al., 2009). Em alguns casos, o CHIKV está associado com encefalite, o que conduz à alta suspeita de infecção por CHIKV neurotrópico, predominantemente observada em vírus do Novo Mundo (BURT et al., 2017; ELEFTHERIADOU et al., 2017; EVANS; MEIRES, 2016; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; WANG; LIU, 2017).

Basicamente, o tratamento farmacológico tem sido limitado aos fármacos antipiréticos, analgésicos, corticoides e anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) para aliviar os sintomas (ABDELNABI et al., 2017; GIGANTE et al., 2014). Em adição, fármacos antirreumáticos modificadores de doença (FARMD's), tais como metotrexato (28) e sulfasalazina (29) (Figura 17) podem ser administrados em casos mais severos, onde há resistência aos AINES (ALI OU ALLA; COMBE, 2011; EVANS; MEIRES, 2016; KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012).

**Figura 17 – FARMD's utilizados na farmacoterapia do CHIKV resistente aos AINES.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12.

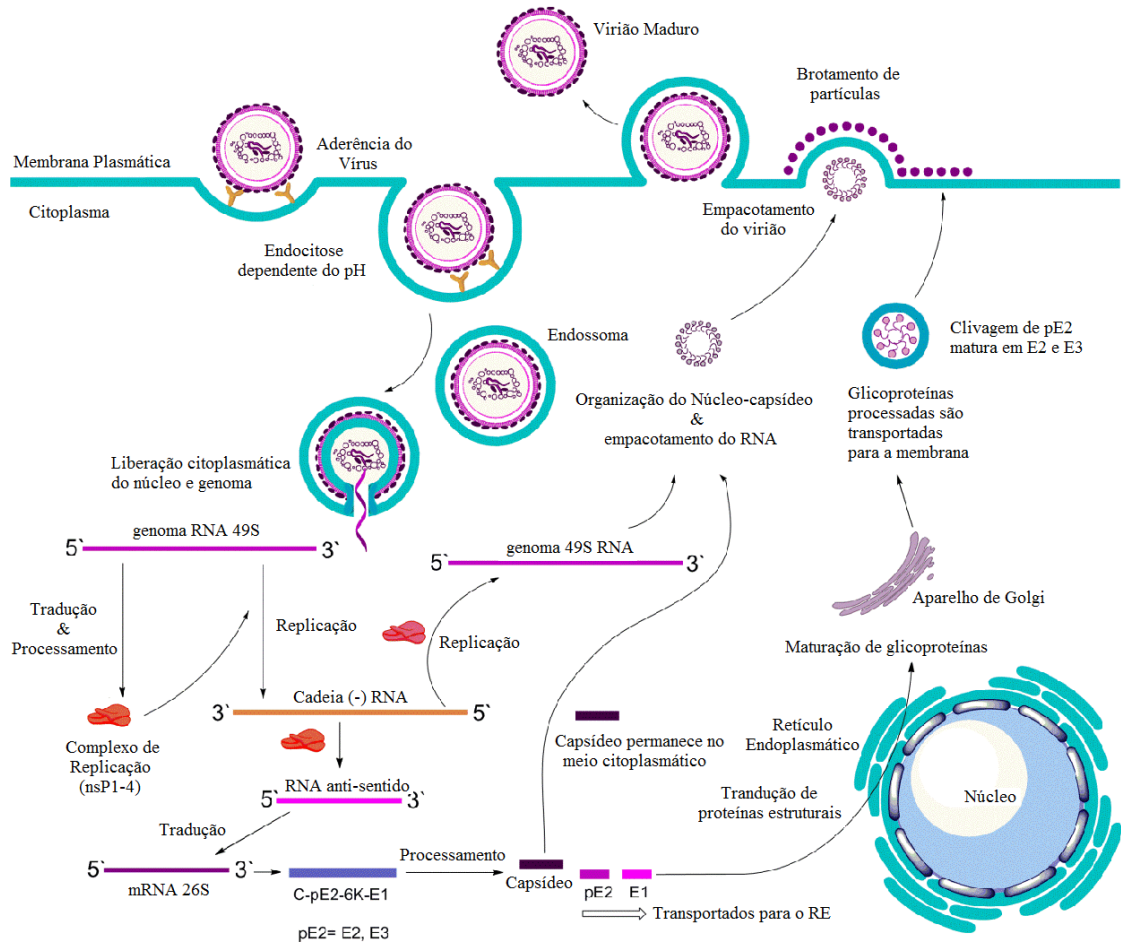
### 2.3.3 Ciclo de infecção do vírus Chikungunya

O ciclo de vida do CHIKV está representado na Figura 18. Inicialmente, o CHIKV se adere à superfície da membrana plasmática da célula hospedeira. Em seguida, este invade a célula alvo por endocitose dependente do pH. No interior ácido do endossoma, a estrutura viral

sofre mudanças conformacionais no envelope viral peptídico que expõem a proteína E<sub>1</sub>, e favorece a fusão da membrana viral à membrana da célula hospedeira. Tal fato permite que ocorra a liberação citoplasmática do núcleo e do genoma viral. Em seguida, os precursores das proteínas não-estruturais (nsP's) são obtidos a partir da conversão destas em nsP1-4 pela ação do mRNA viral (genoma RNA 49S ou RNA genômico). Por sua vez, estas nsP's organizam-se e formam o complexo de replicação viral, que sintetiza um RNA de cadeia negativa intermediário. Este funciona como molde para a síntese de ambos RNA's, subgenômico (26S) e genômico (49S). O RNA subgenômico é responsável pela expressão do precursor da poliproteína C-pE<sub>2</sub>-6K-E<sub>1</sub>, que é processado por uma serino protease autoproteolítica. Subsequentemente, a proteína capsídeo (C) é liberada e as glicoproteínas pE<sub>2</sub> e E<sub>1</sub> são geradas. Estas, quando associadas ao aparelho de Golgi, são exportadas à membrana plasmática, onde a pE<sub>2</sub> é clivada em E<sub>2</sub> e E<sub>3</sub>. Por fim, a montagem (ou organização) viral é favorecida pela ligação do nucleocapsídeo viral ao empacotamento do RNA viral, bem como, pelo recrutamento das glicoproteínas e pelo transporte destas à membrana plasmática hospedeira (ANFASA et al., 2017; KAUR; CHU, 2013; KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012; MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016; SCHWARTZ; ALBERT, 2010).



**Figura 18 – Ciclo biológico do vírus Chikungunya.**



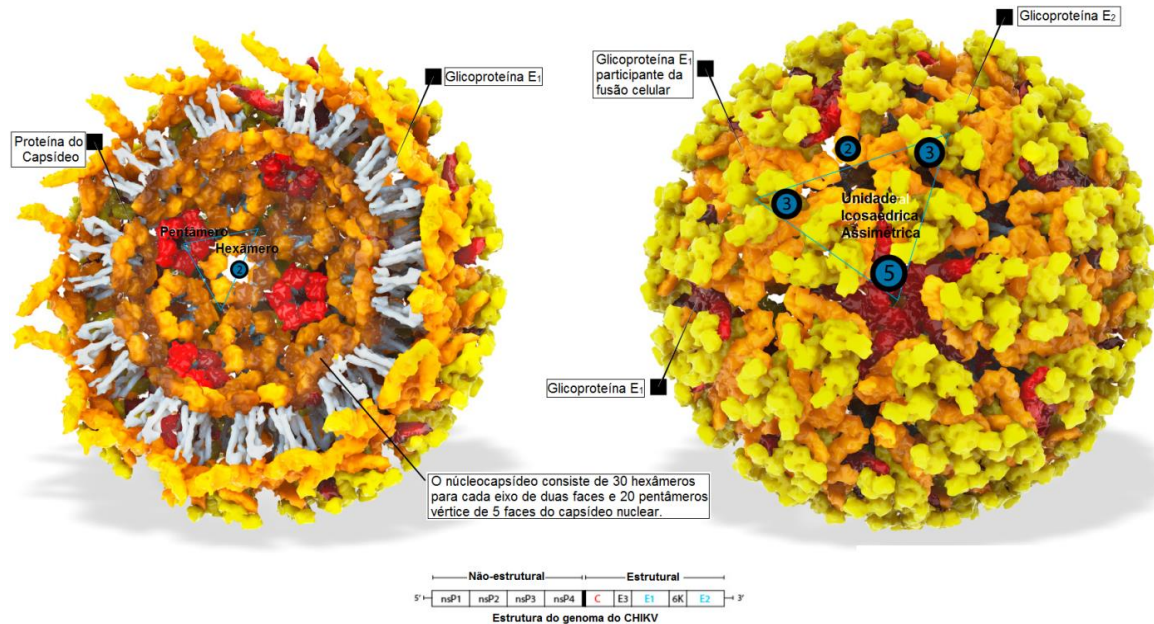
FONTE: Rashad *et al.*, 2014 (tradução).

### 2.3.4 Genética do vírus Chikungunya

O genoma dos alphavírus consiste em uma fita-positiva de RNA com aproximadamente 11 a 12 kb, contendo uma estrutura 5'-*cap* e 3'-*poli(A)* (PIETILÄ; HELLSTRÖM; AHOLA, 2017).

Os *Alphavirus* são vírus de membrana envelopada, constituídos por uma fita-simples de RNA como material genético e um nucleocapsídeo tipo-icosaédrico, com tamanho variando entre 60 e 70 nm (KAUR *et al.*, 2013; MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016; SHRINET; SRIVASTAVA; SUNIL, 2017). O genoma do CHIKV compreende duas fase de leitura aberta (do inglês, *open reading frames - ORF's*), sendo o domínio 5' capaz de codificar as quatro proteínas virais não-estruturais (nsP1–nsP4) e o domínio 3', codificador das proteínas virais estruturais (incluindo o capsídeo - C), as duas maiores glicoproteínas envelopadas (E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub>), e dois peptídeos acessórios, E<sub>3</sub> e 6K (Figura 19) (JAIN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2019).

**Figura 19 – Estrutura tridimensional do vírus Chikungunya.**



FONTE: 3Dciencia.com, 2017 (tradução e adaptação).

A nsP1 está envolvida na decodificação do RNA mensageiro (*mRNA*) e, *via* ação enzimáticas da guanina-7-metiltransferase e guaniltransferase, sintetiza a cadeia negativa do RNA viral (BURT et al., 2017; RASHAD; MAHALINGAM; KELLER, 2014; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; SINGH; UNNI, 2011). Em adição, a nsP2 possui outras funções enzimáticas importantes, que incluem a RNA-helicase, nucleosídeo trifosfatase (NTPase) e RNA-dependente 5'-trifosfatase, onde estas estão localizadas na porção *N*-terminal da proteína. Em contraste, o domínio *C*-terminal da nsP3 atua em parte da replicase e como uma proteína acessória envolvida na síntese de RNA (RUSSO et al., 2010; SAISAWANG et al., 2017; SEYEDI et al., 2016). Por fim, a nsP4 atua como uma polimerase RNA-dependente (BHAKAT et al., 2014; SEYEDI et al., 2016; SINGH; UNNI, 2011).

Diferentemente, as proteínas E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub> são responsáveis pela formação de espículas glicoproteicas na superfície da partícula viral, o que facilita a aderência desta às células hospedeiras susceptíveis. Mutação na Alanina por Valina (Ala/Val<sup>226</sup>) na E<sub>1</sub> resulta em uma nova cepa do CHIKV, que se torna mais resistente ao tratamento (KAUR; CHU, 2013; TSETSARKIN et al., 2007). Da mesma forma, a substituição da Glicina<sup>407</sup> por Arginina (Gly/Arg<sup>407</sup>) na E<sub>2</sub> é responsável por cepas de CHIKV resistentes ao arbidol (BLAISING; POLYAK; PÉCHEUR, 2014; SCUOTTO et al., 2017; TSETSARKIN et al., 2009). Normalmente, a superfície do CHIKV consiste de 80 espículas trimétricas compostas de heterodímeros das proteínas E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub> em uma bicamada lipídica (SOURISSEAU et al., 2007).

O 6K do CHIKV é pequeno, hidrofóbico e essencial para a organização estrutural da partícula viral, onde atua na sinalização da sequência de processamento da proteína E<sub>1</sub> (SOURISSEAU et al., 2007). No entanto, o papel do 6K na replicação viral do CHIKV ainda não é completamente entendido (MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016).

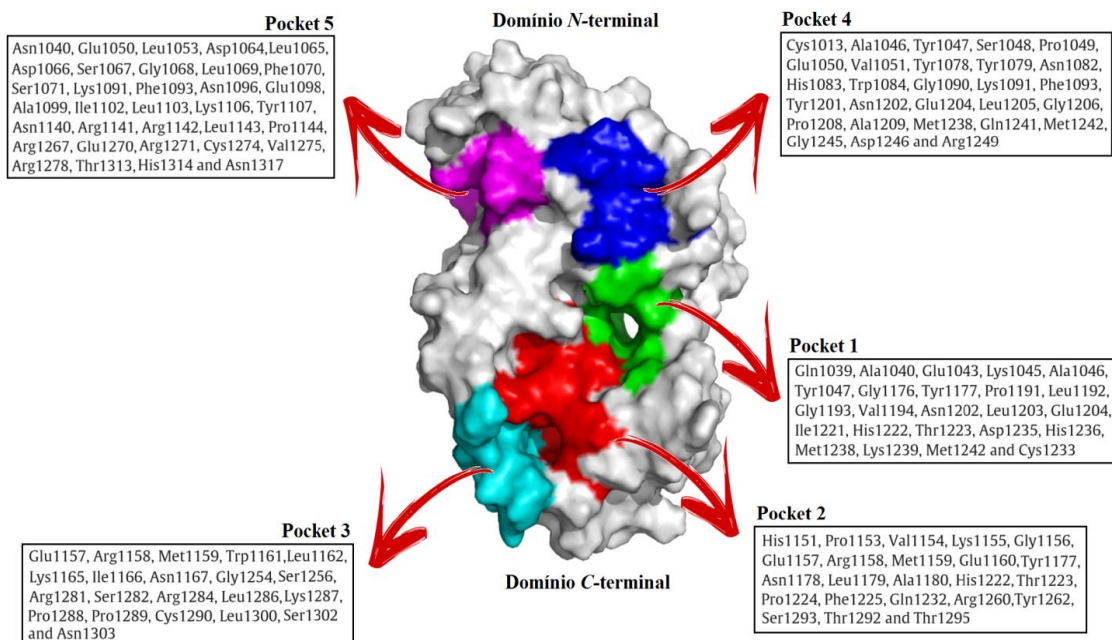
Em geral, existem três genótipos do CHIKV, sendo estas as linhagens Asiática (*Asian*), Centro-Leste Sul Africana (*ECSA*) e Oeste Africana (*WA*) (ANFASA et al., 2017; KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012).

Recentemente foi verificado que a sequência de aminoácidos identificada no CHIKV apresenta similaridades entre as proteínas não-estruturais e estruturais, tendo estas valores entre 58-85% e 42-85%, respectivamente (MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016).

#### 2.3.4.1 A protease nsP2 do vírus Chikungunya

Com relação à morfologia da nsP2, esta possui cinco "bolsos" (do inglês, *pockets* - Figura 20) contendo resíduos críticos que estão envolvidos em interações de hidrogênio e/ou contatos hidrofóbicos entre a protease e diferentes inibidores. No entanto, o sítio de ligação mais importante para atividade de compostos biologicamente ativos é o número 4 (quatro), uma vez que possui a díade catalítica em seu interior (NGUYEN; YU; KELLER, 2015).

**Figura 20 – Representação gráfica dos cinco sítios de ligação (pockets) encontrados na superfície da nsP2 do vírus Chikungunya.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o software PyMol® v. 0.99.

A nsP2 é uma cisteína protease, sendo a mais abundantemente encontrada no CHIKV, compondo aproximadamente 20-30% da partícula viral (PIETILÄ; HELLSTRÖM; AHOLA, 2017; SINGH et al., 2018). A atividade proteolítica desta está relacionada à clivagem de poliproteínas não-estruturais fundamentais para o processo de replicação viral (BOURAI et al., 2012; NGUYEN; YU; KELLER, 2015; PIETILÄ; HELLSTRÖM; AHOLA, 2017; SILVA-JÚNIOR et al., 2017b; SINGH et al., 2018).

A enzima nsP2 desempenha sua função por meio de uma díade catalítica conservada composta por uma cisteína e uma histidina. Basicamente, seu mecanismo envolve a desprotonação do grupo tiol da cisteína no sítio ativo, através da ação de um resíduo histidina adjacente. Embora, esse mecanismo não tenha sido conclusivamente elucidado (NGUYEN; YU; KELLER, 2015; STRAUSS et al., 1992). Nesse sentido, Singh e colaboradores (2012) propuseram que os resíduos ativos mais importantes (com exceção dos resíduos catalíticos) são Lys1045, Gly1176, His1222 e Lys1239. Em contraste, Bassetto e coautores (2013b) reportaram que os resíduos Cys1013 e His1083 são extremamente importantes para o mecanismo de replicação viral no CHIKV. Em adição, Russo e colaboradores (2006) sugeriram que tais resíduos estão localizados no domínio *N*-terminal, com uma distância de 4,8 Å entre eles. Ainda, os autores concluíram que tal distância é essencialmente suficiente para favorecer a transferência do próton entre as espécies. Além disso, o Trp1084 próximo à His1083 parece desempenhar papel auxiliar na atividade da protease nsP2 (STRAUSS et al., 1992).

## 2.4 Recentes Avanços na Terapia Farmacológica/Imunológica do Vírus Chikungunya

Apesar das altas taxas de propagação e morbimortalidade do CHIKV, não há atualmente nenhuma vacina ou agente antiviral seletivo disponível para o tratamento desta infecção viral (ABDELNABI et al., 2017; BOURJOT et al., 2012; JAVELLE et al., 2017). Embora, pesquisadores têm recentemente reportado o desenvolvimento de uma nova vacina candidata a método de imunização contra o CHIKV (PLANTE et al., 2011).

### 2.4.1 Avanços no desenvolvimento de novos compostos ativos frente à nsP2 do vírus Chikungunya

Vários estudos têm demonstrado que diversas classes de compostos químicos possuem atividade anti-CHIKV *in vitro*. Estes estão classificados de acordo com sua atividade biológica comprovada, existindo assim os (*i*) inibidores de entrada do CHIKV (DI MOLA et al., 2014;

SANGEETHA; PURUSHOTHAMAN; RAJARAJAN, 2017); (ii) inibidores da nsP1 (FEIBELMAN et al., 2018); (iii) inibidores da nsP2 (BASSETTO et al., 2013; DAS et al., 2016; GIANCOTTI et al., 2018; JADAV et al., 2015; TARDUGNO et al., 2018); (iv) inibidores da nsP3 (SEYEDI et al., 2016); (v) inibidores da nsP4 (WADA et al., 2017); (vi) inibidores do complexo proteico E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub> (SHRINET; SRIVASTAVA; SUNIL, 2017); e os (vii) inibidores da replicação do genoma viral (CHING et al., 2015; KHAN et al., 2011; RATHORE et al., 2014).

Basicamente, a replicação do CHIKV pode ser considerada como um grande ponto de partida para identificação de potenciais alvos para o desenvolvimento de novos compostos antivirais (KAUR; CHU, 2013). O mecanismo antiviral desses agentes é avaliado baseando-se em suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, capacidade sequestradora de radicais livre, imunoestimulatórias, inibição da síntese de RNA viral, bem como, inibição da entrada do vírus em células susceptíveis (MURALI et al., 2015).

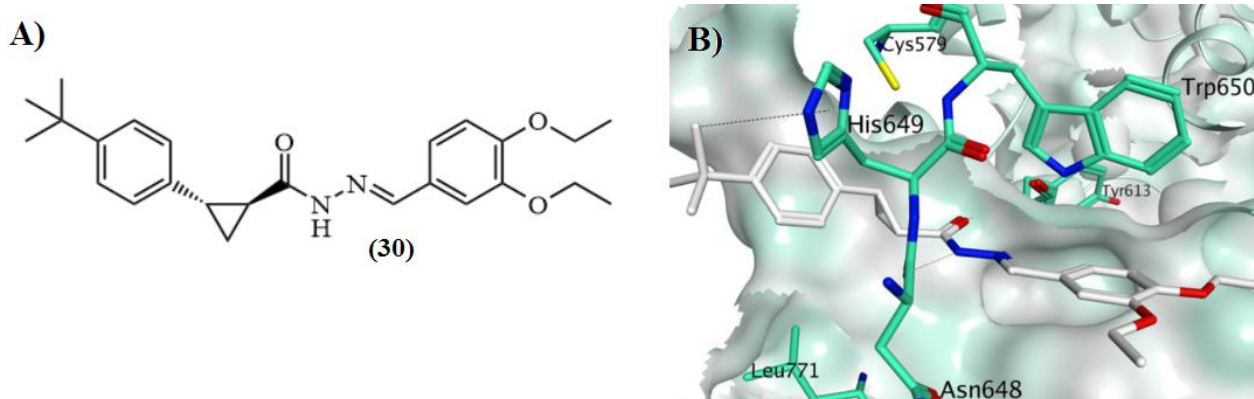
As proteínas que mediam processos-chave no ciclo de vida do CHIKV podem ser utilizadas como alvos macromoleculares para o planejamento de novos compostos com atividade anti-CHIKV (KAUR; CHU, 2013; SILVA-JÚNIOR et al., 2017b). Neste sentido, a nsP2 é um alvo extremamente atrativo para o planejamento racional de novos inibidores, uma vez que desempenha papel crucial na replicação e transcrição do CHIKV (NGUYEN; YU; KELLER, 2015; SILVA-JÚNIOR et al., 2017b).

Considerando estas valiosas informações, vários estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de se obter novos derivados ativos frente à enzima nsP2 do CHIKV. Nesse sentido, diversas técnicas virtuais têm sido exploradas durante a identificação de novos compostos *hits*, os quais possam ser utilizados no desenvolvimento de potenciais *leads*. Aplicando-se tais técnicas, algumas classes de compostos químicos foram identificados como promissores para o planejamento racional de *leads*, tais como os indóis (JADAV et al., 2012), piperazinas, benzimidazóis, pirimidinas (NGUYEN; YU; KELLER, 2015), bem como, diversos fitocompostos (LUCAS-HOURANI et al., 2013). Em contraste, estudos envolvendo síntese orgânica têm conduzido à obtenção de compostos mais promissores como *hit*, apresentando valores baixos de IC<sub>50</sub> e boa tolerância citotóxica. Dentre estes, as tiazolidinas/rodaninas (JADAV et al., 2015) e os peptidomiméticos (SINGH et al., 2018) têm demonstrado excelentes resultados. No entanto, os compostos mais promissores encontrados na literatura são derivados acilidrazônicos e, portanto, serão mais profundamente abordados.

Bassetto e coautores (2013b) desenvolveram um estudo envolvendo vários derivados acilidrazônicos acoplados ao fenil(4-*t*-butil)ciclopropano. A partir deste, foi verificado que o composto (**30**, Figura 21, A) exibiu a melhor atividade, com valor de IC<sub>50</sub> de 5,0 ± 0,2 µM.

Adicionalmente, este apresentou valor de concentração citotóxica para 50% da população de células ( $CC_{50}$ ) de  $72 \pm 20 \mu\text{M}$ , o que conduziu a um índice de seletividade (SI) de 14. Dessa forma, este foi considerado como o candidato mais promissor da série de compostos sintetizados pelos autores. Com relação ao estudo por *docking* molecular, observou-se que este é capaz de interagir na região central do sítio catalítico (*pocket 4*), onde a acilidrazona interage hidrofobicamente com a díade catalítica (Cys579(1013) e His649(1083)), bem como com o resíduo Trp650. Por fim, percebeu-se que uma das metilas do grupo fenil(4-*t*-butil)ciclopropano interage com anel da His649, de maneira similar às interações  $\pi$ -stacking e/ou  $\pi$ -cátion (Figura 21, B).

**Figura 21 – Melhor análogo derivado da acilidrazona contendo fenil(4-*t*-butil)ciclopropano e suas interações com a nsP2 do vírus Chikungunya.**

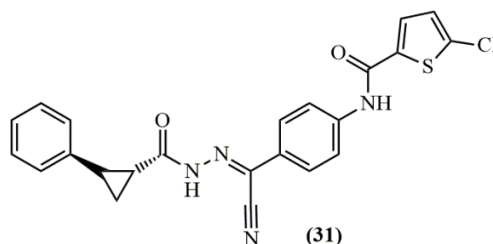


FONTE: (A) Autor, 2019; estrutura elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw Ultra v. 12.0. (B) Bassetto *et al.* 2013b. Em (A), estrutura química do melhor análogo sintetizado por Bassetto *et al.* 2013b; Em (B), interações do compostos visualizadas por *docking* molecular.

Baseando-se nos resultados obtidos por Bassetto e colaboradores (2013b), um outro estudo foi realizado por Das e coautores (2016). Neste, os autores sintetizaram e avaliaram biologicamente diversas acilidrazonas contendo diferentes substituintes no grupo fenilciclopropano frente a células infectadas com o CHIKV. Como resultado, o composto (**31**, Figura 22) apresentou  $EC_{50}$  de  $1,5 \mu\text{M}$ , com  $CC_{50} > 200$  e um valor de  $SI > 133$ . Em adição, alguns parâmetros significativos para a interação ligante-macromolécula foram determinados, tais como a energia de ligação (teórica) e a eficiência de ligação (experimental). Estes valores foram obtidos como sendo  $-8,61$  e  $-0,297$  kcal/mol, respectivamente. Por fim, os autores concluíram que o grupamento fenilciclopropano é responsável por auxiliar em potenciais

interações hidrofóbicas entre o ligante e a nsP2. Além disso, a região da acilidrazona pode atuar como um domínio aceptor/doador de ligação de hidrogênio no sítio ativo.

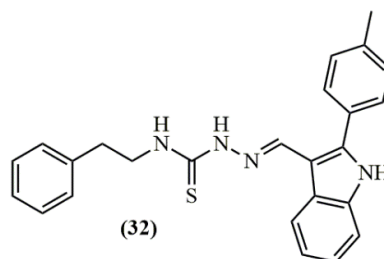
**Figura 22 – Melhor análogo acilidrazona sintetizado por Das *et al.*, 2016.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se *software* ChemDraw® v.12.

Giancotti e colaboradores (2018) realizaram diversas modificações estruturais racionalmente planejadas em um derivado benzilidenoacriloidrazida, gerando 9 (nove) diferentes séries de análogos. No total, 69 derivados foram sintetizados e analisados frente à nsP2. Dentre estes, o composto (**32**, Figura 23) se mostrou como sendo um novo composto *hit*, exibindo IC<sub>50</sub> de 1,8 ± 0,9 μM, com CC<sub>50</sub> de 7,8 ± 0,3 μM e SI de 4,4. Este apresentou uma inibição máxima de 100% em uma concentração de 2,5 μM. Por fim, observou-se que a utilização de uma hidrazona-tiocarboamida (ou tiossemicarbazona) invés do clássico aceptor de Michael (como observado nos compostos de Bassetto *et al.* (2013) e Das *et al.* (2016)), resultou em composto mais ativo em relação ao seu precursor.

**Figura 23 – Melhor análogo sintetizado por Giancotti *et al.*, 2018.**

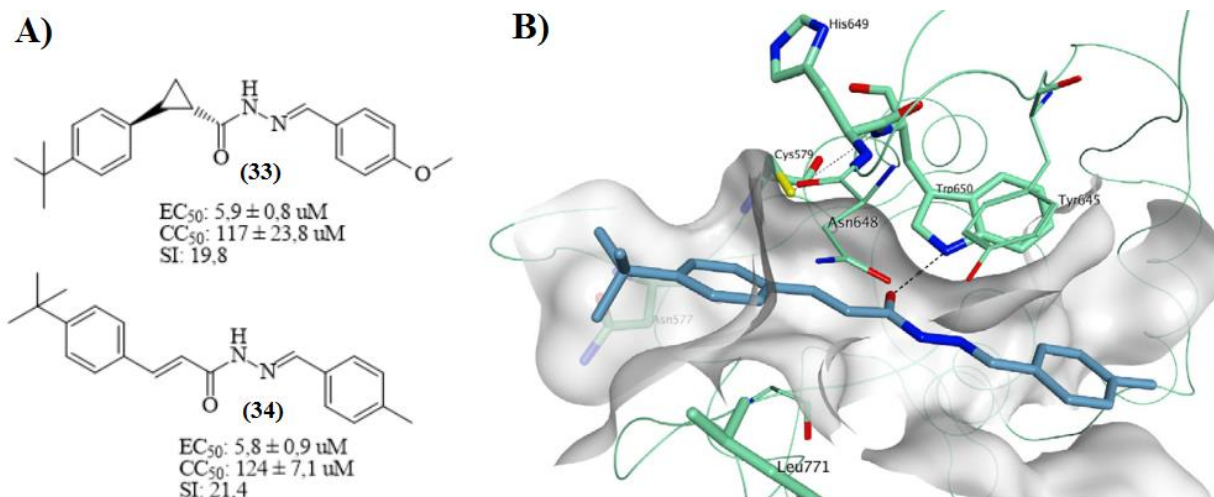


FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se *software* ChemDraw® v.12.

Com intenção de melhor explorar estas informações obtidas com estes trabalhos previamente realizados, Tardugno e colaboradores (2018) sintetizaram quatro séries de compostos, baseando-se na estrutura do *hit* encontrado por Bassetto e coautores (2013b). Todos os novos compostos foram testados sobre a enzima nsP2, quanto à atividade anti-CHIKV. Além disso, os efeitos citotóxicos foram determinados em células *Vero* infectadas com o vírus. Em

geral, uma das séries se mostrou mais efetiva, contendo os dois melhores compostos do estudo, (33) e (34) (Figura 24, A). Considerando o (34) como sendo o *hit*, este foi analisado quanto às interações ligante-nsP2, por *docking* molecular. Por fim, verificou-se que a ligação de hidrogênio entre o N–H (Trp650 - atuando como doador) e o C=O (atuando como aceitador) é extremamente importante para a atividade anti-CHIKV (Figura 24, B).

**Figura 24 – Melhores compostos sintetizados por Tardugno *et al.* e suas interações.**

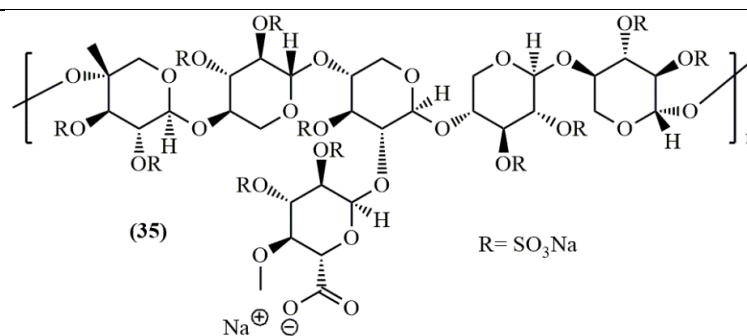


FONTE: (A) Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw Ultra v. 12.0; (B) Tardugno *et al.* 2018.

Por fim, algumas pesquisas recentes têm conduzido à descoberta de novos agentes imunoterapêuticos na forma de vacinas, bem como na utilização do polissulfato sódico de pentosana (35) via oral, cujo são considerados como promissores avanços no combate ao CHIKV. Entretanto, comparando-se as Tabelas 1 (anteriormente apresentada) e 2 é possível verificar que o CHIKV é uma enfermidade mais negligenciada do que o DENV e ZIKV, uma vez que o seu respectivo *pipeline* atual é mais escasso.



**Tabela 2 – Status atual (e últimas atualizações) das vacinas e candidatos a fármacos contra o Chikungunya vírus no pipeline das indústrias farmacêuticas.**



Indicação (Proposta) <sup>a</sup>	Nome do Inibidor (Sinonímia)/Tipo	Companhia ou Instituto	Status (Ano) <sup>b</sup>
CHIKV (Câncer de próstata, HIV, Influenza, Pneumonia)	dMAB (dMAB ipilimumab e tremelimumad)/anticorpo monoclonal biespecífico	<i>Inovio Pharmaceuticals</i> <sup>®</sup>	Ensaio de Pré-clínicos para CHIKV e Câncer nos EUA (2019)
CHIKV	VRC-CHKVLP059-00-VP/Vacina	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases - USA</i>	Ensaio de Fase II para CHIKV nos EUA (2019)
CHIKV	Anticorpo	<i>FIT Biotech</i> <sup>®</sup>	Em fase de licenciamento na Finlândia (2019)
CHIKV	VLA-1553/Vacina	<i>Valneva</i> <sup>®</sup>	Ensaio clínico de Fase I nos EUA (2019)
CHIKV	MV-CHIK/Vacina	<i>Themis Bioscience</i> <sup>®</sup>	Ensaio de Fase II nos EUA (2019)
CHIKV	VAL-181388/Vacina	<i>Moderna Therapeutics</i> <sup>®</sup>	Ensaio de Fase I nos EUA (2019)
Dor (CHIKV, RRV, asma alérgica, DPOC)	Polissulfato Sódico de Pentosana (PPS)/inibidor (35)	<i>Paradigm Biopharma</i> <sup>®</sup>	Ensaio Pré-clínicos para CHIKV nos EUA (2019)

<sup>a</sup>: Composto ou vacina inicial planejado para o alvo (indicação), no entanto, durante os ensaios biológicos um possível diferente alvo se mostrou interessante (proposta); <sup>b</sup>: As informações sobre os correspondentes status e/ou últimas atualizações foram obtidas nos bancos de dados: [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca); <https://adisinsight.springer.com>; e [www.accessdata.fda.gov](http://www.accessdata.fda.gov). Abreviações - CHIKV: Chikungunya; HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana; RRV: Vírus do Rio Ross; DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.

## **OBJETIVOS**

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Planejar, sintetizar e avaliar a atividade inibitória de novos benzotiazóis *duais* frente às enzimas NS2B/NS3 dos vírus Dengue e Zika e nsP2 do Chikungunya vírus.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Planejar racionalmente os novos inibidores *duais* das enzimas NS2B-NS3 e nsP2;
- ❖ Sintetizar os novos inibidores planejados racionalmente;
- ❖ Avaliar a atividade *in vitro* dos compostos *duais* frente às enzimas NS2B-NS3 dos ZIKV e DENV, bem como, nsP2 do CHIKV;
- ❖ Discutir a Relação Estrutura-Atividade (REA) dos compostos sintetizados e testados;
- ❖ Realizar o *docking* molecular dos compostos mais ativos em seus respectivos alvos e discutir as principais interações, bem como, a natureza e as contribuições destas;
- ❖ Desenvolver um novo protocolo virtual para aplicação no planejamento de novos inibidores da nsP2;
- ❖ Aplicar o novo protocolo virtual no estudo dos compostos racionalmente planejados e discutir os resultados obtidos;

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Cromatografias

#### 4.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de Sílica Gel 60 F<sub>254</sub> da MERCK® de 0,25 mm de espessura. Estas foram utilizadas para monitorar o andamento das reações, bem como, determinar os fatores de retenção ( $R_F$ ) dos compostos finais. Os valores de  $R_F$  foram calculados através da razão: *distância percorrida pela amostra / distância percorrida pela fase móvel*, após eluição das respectivas placas (SIMÕES et al., 2010). Por fim, a interpretação das placas de CCD foi realizada com o auxílio de luz emissora de radiação ultravioleta (UV-vis), no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 254 nm.

#### 4.1.2 Cromatografia em coluna clássica (CCC)

Para a purificação de alguns compostos sintetizadas nesta tese foi utilizada a técnica de cromatografia em coluna clássica (CCC), também conhecida como cromatografia em coluna de vidro, com dimensões de 30 x 400 mm. As mesmas foram empacotadas utilizando-se sílica gel 60 (0,063-0,2 mm, 70-230 mesh, da marca MERCK®) e o sistema eluente apropriado para cada separação. As amostras foram incorporadas em sílica gel (3 vezes a massa (em mg) da amostra) e, em seguida, adicionadas à coluna cromatográfica (SIMÕES et al., 2010). As frações obtidas foram coletadas em tubos de ensaio com dimensões de 16 x 150 mm (20 mL). Por fim, as frações contendo a substância pura foram colocadas juntas e rota-evaporadas, rendendo o produto isolado.

#### 4.1.3 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

A determinação do grau de pureza dos compostos finais foi realizada em cromatógrafo líquido HEWLETT PACKARD® 1100 series, empregando-se uma coluna C18 com dimensões de 75 mm x 2,0 mm, 1,6  $\mu$ M da marca AGILENT® InfinityLab Poroshell 120 SB. Durante os experimentos, metanol  $\geq$  99% (grau HPLC) foi utilizado como fase móvel do sistema. Em adição, os parâmetros de análise foram estabelecidos como sendo: (a) concentração da amostra igual a 1 mg/mL; (b) fluxo de corrida de 0,7 mL/min; (c) tempo de corrida de 8 min; e (d)

volume de injeção de 2  $\mu\text{L}$ . Por fim, os tempos de retenção ( $R_T$ ) foram computados em minutos (min) e a absorvância, em mili unidades de absorvância (mAU) (BRITO et al., 2017). Acoplado a este sistema, um espectrômetro de massas de baixa resolução (LRMS) da marca AGILENT®, modelo 1100 (*positive ions trap mode*) foi empregado para determinação das massas moleculares (em Dalton - Da) dos respectivos compostos finais, através da razão massa/carga ( $m/z$ ), após ionização dos mesmos. Por fim, foi admitido a determinação da massa monoisotópica usando-se a técnica de ionização por *electrospray* (ESI), o que permitiu detecção de íons pseudomoleculares. Estes, por sua vez, correspondem às massas dos compostos finais adicionadas em 1 (um) Dalton ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), bem como, acrescidas em 23 (vinte e três) Daltons ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) (AITKEN, 2010).

#### 4.2 Pontos de Fusão

Os pontos de fusão (em  $^{\circ}\text{C}$ ) dos compostos finais foram determinados utilizando-se um equipamento digital da marca A. KRÜSS OPTRONIC®, com capacidade de atingir a temperatura de  $360^{\circ}\text{C}$ , em capilares de vidro contendo as amostras sólidas. Inicialmente, uma temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  foi admitida e, então, o aumento desta era permitido até se observar a fusão completa da substância analisada. No entanto, os pontos de fusão estão inexatos, sendo admitida uma faixa de fusão de até 2 (dois) graus Celsius (YAKOUB et al., 2018).

#### 4.3 Espectrofotometria na Região do Infravermelho (FT-IR)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro da marca THERMO SCIENTIFIC NICOLET®, modelo *Avatar 330 FT-IR*, utilizando-se o método de reflectância total atenuada (ATR), na faixa de  $4000$  a  $600\text{ cm}^{-1}$  (CARDOSO et al., 2014; MAGALHÃES-MOREIRA et al., 2014). Todos os dados obtidos foram analisados e tratados no *software* OMNIC®, versão 6.2 (1992-2003), da *Thermo Electron Corporation*. Os estiramentos ( $\nu$ ) e/ou deformações angulares ( $\delta$ ) referentes aos principais grupos funcionais presentes nos compostos intermediários e finais foram computados em transmitância por número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). Além disso, em alguns casos, tais estiramentos foram classificados quanto à simetria, podendo estes serem simétricos (*s*) ou assimétricos (*as*) (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009).

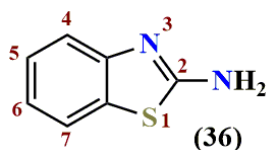
#### 4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e Carbono Treze ( $^{13}\text{C}$ )

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e carbono treze ( $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos utilizando-se um equipamento da marca BRUKER®, modelo *UltraShield* 300 MHz, e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ) como solvente analítico. Para obtenção dos espectros dos compostos intermediários e finais, admitiu-se um número de pulsos (*ns*) total de 32 e 4096 para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. Os deslocamentos químicos observados nos espectros foram computados em partes por milhão (ppm). Em adição, as constantes de acoplamento (*J*) inerentes aos sinais de hidrogênios inseridos em determinados ambientes químicos foram computadas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram instituídas da seguinte forma: simpleto (*s*), simpleto largo (*br s*), duplete (*d*), duplo duplete (*dd*), tripleto de duplete (*td*), quarteto (*q*) e multiplete (*m*) (JACOBSEN, 2017; SILVA-JÚNIOR et al., 2016). Por fim, o *software* TopSpin® 3.5 *pl* 7 (2018-2019) (BRUKER® BioSpin GmbH) foi utilizado para análise de todos os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , bem como, na elaboração das ilustrações.

#### 4.5 Planejamento racional de inibidores *duais* das enzimas NS2B-NS3 (DENV e ZIKV) e nsP2 (CHIKV)

Tendo-se em vista os avanços recentes do AK-Schirmeister com derivados contendo o núcleo 2-aminobenzotiazol (Figura 25) frente à NS2B-NS3 do DENV2 e ZIK, tal heterociclo aromático foi selecionado para melhor ser explorado, representando um núcleo farmacofórico (*farmacóforo 1*). Para tal, diferentes substituintes foram utilizados nas posições 4, 5 e 6 deste. Em contraste, substituições na posição 7 demonstraram inativar a reatividade do benzotiazol frente aos ácidos.

**Figura 25 – Núcleo 2-aminobenzotiazol selecionado como ponto de partida para o planejamento dos potenciais compostos *duais*.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12.



Paralelamente, considerando os avanços quanto aos inibidores da nsP2 do CHIKV encontrados na literatura, observa-se que os derivados acilidrazonas (**37**) e fenilciclopropano (**38**) (Figura 26) emergem como duas classes de compostos promissores como inibidores desta enzima. Dessa forma, estes foram utilizados durante o planejamento dos novos inibidores, propostos aqui como um segundo farmacóforo (*farmacóforo 2*).

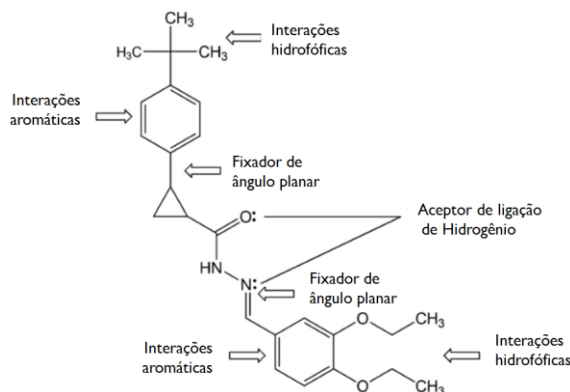
**Figura 26 – Estrutura básica das acilidrazonas (37) e fenilciclopropanos (38) ativos frente à nsP2 do vírus Chikungunya.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o software ChemDraw® v. 12.

A química medicinal de inibidores da nsP2 é relativamente atual, resultando em uma escassez de informações mais completas relacionadas aos principais substituintes considerados essenciais para o desenvolvimento de compostos potentes frente a este alvo biomacromolecular. Entretanto, algumas informações importantes foram descritas por Das e colaboradores (2016), no que se refere à estrutura mais promissora (**30**) envolvida no estudo desenvolvido pelos mesmos. De modo geral, um potencial inibidor da nsP2 deve conter dois sistemas aromáticos separados entre si por um *linker* aceptor/doador de ligação de hidrogênio e uma estrutura fixa, que restringe a rotação livre dos sistemas aromáticos ligados a esta. Na figura 27 são mostradas as importantes interações e pré-requisitos moleculares que contribuem para a inibição desta enzima do CHIKV.

**Figura 27 – Interações e pré-requisitos moleculares necessários à atividade anti-CHIKV.**



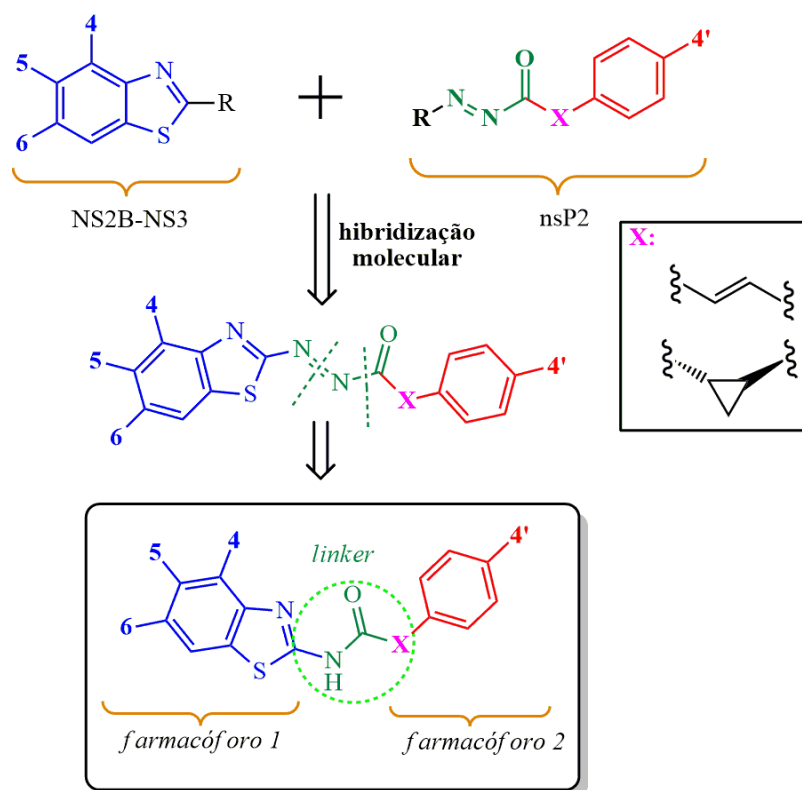
FONTE: Das *et al.*, 2016 (tradução).

De modo geral, a técnica de hibridização molecular foi utilizada como estratégia de modificação estrutural para obtenção dos novos compostos almejados. Basicamente, esta estratégia permite a conexão entre dois ou mais núcleos ativos (farmacóforos), por meio de um conector, ou *linker* (ABRAHAM, 1998; LEMKE et al., 2008; THOMAS, 2003).

Sabe-se que as hidrazonas e acilidrazonas são tipicamente compostos *PAINS* (ALAM et al., 2014; DEVINE et al., 2015; HUSSAIN; ALI, 2017; POULIOT; JEANMART, 2016), assim sendo, decidiu-se modificar tal grupamento químico, adicionando-se uma função amida como *linker* entre os dois farmacóforos. Ademais, manteve-se o domínio acceptor/doador de ligação de hidrogênio intacto, considerando as observações realizados por Tardugno e coautores (2018).

Além disso, o desenvolvimento de compostos *pan-antivirais* é considerado como uma importante e excelente estratégia de geração de agentes ativos frente aos diferentes tipos de arboviroses (QADIR et al., 2018). Neste sentido, considerando todas as informações supracitadas, os novos compostos *duais* foram planejados como representado no esquema mostrado na Figura 28.

**Figura 28 – Estratégia de hibridização molecular utilizada no planejamento racional dos novos compostos duais.**

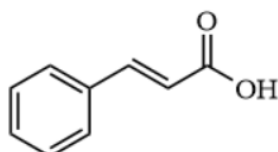


Considerando o esquema mostrado na Figura 28, diferentes análogos contendo diferentes substituintes nas posições 4, 5 e 6 do anel benzotiazol (*farmacóforo 1*) foram sintetizados e analisados frente às enzimas virais. Adicionalmente, o *linker* foi mantido como um sistema aceptor/doador de ligação de hidrogênio, representado pela amida. No que se refere à restrição da conformação (fator importante para a atividade anti-CHIKV), esta foi garantida através da introdução de uma ligação C=C ou um anel ciclopropano inseridos na região “X” das moléculas finais. Por fim, para os derivados do ácido cinâmico, três diferentes substituintes foram planejados na posição *para* da fenila, sendo 4'-H, 4'-*t*-But e 4'-Cl (*farmacóforo 2*). Basicamente, o objetivo principal de tais modificações nesse anel foi observar se fatores estéricos (4'-*t*-But) ou eletrônicos (4'-Cl) possuem significativo impacto sobre a atividade das moléculas finais, quando comparados com seus precursores não substituídos (4'-H).

#### 4.5.1 Procedimentos Reacionais

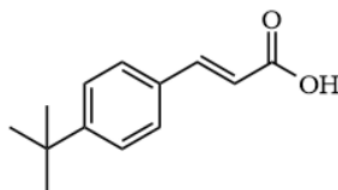
##### 4.5.1.1 Síntese do ácido cinâmico e ácido (*E*)-3-(4-(*terc*-butil)fenil)acrílico

Em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 20 mL de piridina, 6 g do correspondente aldeído (1 eq.) foram adicionados. Em seguida, o anidrido acético (1,1 eq.) foi então adicionado. A mistura reacional foi colocada sob agitação e refluxo durante 15 minutos. Posteriormente, *N*-metilpiperazina (10 mol%) foi adicionada como base catalítica. Então, a reação permaneceu sob refluxo durante 24 horas. Após o término da reação (verificado por CCD), 20 mL de H<sub>2</sub>O destilada foram adicionados à mistura bruta, rendendo um precipitado de coloração branca. A mistura heterogênea descansou sob refrigeração (2 °C) por um período de 30 minutos. Após este tempo, esta foi colocada novamente sob agitação e, então, ácido clorídrico concentrado (37%) foi adicionado até o pH igual a 1,0 ser atingido. Por fim, o pó resultante foi filtrado e lavado com H<sub>2</sub>O destilada (2 x 50 mL), rendendo o produto desejado. Metodologia adaptada de Luo e coautores (2015).



**Ácido cinâmico (39)** – Rendimento: 97%; Aspecto: pó branco amorfo. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 2830  $\delta$ (C–O); 1671  $\nu$ (C=O); 1627  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1074  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>). RMN <sup>1</sup>H

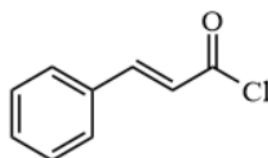
(300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,52 (*d*, 1H,  $J= 16,01$ , CH<sub>eno</sub>); 7,39-7,41 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,59 (*d*, 1H,  $J= 16,11$ , CH<sub>eno</sub>); 7,65-7,68 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 12,38 (*br s*, 1H, OH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  119,68 (C<sub>eno</sub>); 128,62 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 129,34 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 130,65 (C<sub>Ar</sub>); 134,69 (C<sub>q</sub>); 144,37 (C<sub>eno</sub>); 168,01 (C=O).



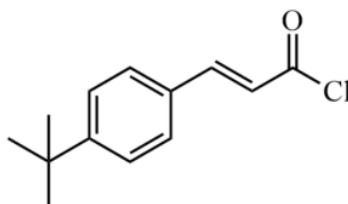
**Ácido (E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)acrílico (40)** – Rendimento: 97%; Aspecto: pó amarelo intenso cristalino. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 2949  $\delta$ (C–O); 1668  $\nu$ (C=O); 1621  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1110  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1,26 (*s*, 9H, CH<sub>3</sub>); 6,46 (*d*, 1H,  $J= 16,01$ , CH<sub>eno</sub>); 7,41 (*d*, 2H,  $J= 8,47$ , CH<sub>Ar</sub>); 7,55 (*d*, 1H,  $J= 16,11$ , CH<sub>eno</sub>); 7,59 (*d*, 2H,  $J= 4,65$ , CH<sub>Ar</sub>); 12,32 (*br s*, 1H, OH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  31,35 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,00 (C<sub>terc</sub>); 118,76 (C<sub>eno</sub>); 126,15 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 128,46 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 131,97 (C<sub>q</sub>); 144,24 (C<sub>eno</sub>); 153,55 (C<sub>q</sub>); 168,11 (C=O).

#### 4.5.1.2 Síntese dos cloretos de acila a partir dos ácidos cinâmicos

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, contendo 6 mL de dimetilformamida (DMF) em atmosfera inerte de argônio, 500 mg do correspondente ácido cinâmico foram adicionados. Em seguida, 2 eq. de cloreto de tionila (SOCl<sub>2</sub>) foram adicionados à solução inicial. A mistura reacional foi mantida sob agitação durante 24 horas, à temperatura ambiente. Após o término da reação, 10 mL de uma solução resfriada e saturada de NaHCO<sub>3</sub> foi colocada em um becker, sob agitação. Em seguida, a mistura bruta reacional foi removida do balão com o auxílio de uma seringa. Então, a agulha foi inserida diretamente na solução de NaHCO<sub>3</sub> e, lentamente, a mistura bruta foi adicionada à mesma. Por fim, a mistura permaneceu sob agitação durante 10 min, formando um precipitado. Este foi filtrado e lavado com a solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 10 mL), seguida por H<sub>2</sub>O destilada (2 x 20 mL), rendendo o produto impuro. Assim, uma recristalização a partir de uma mistura de acetona e H<sub>2</sub>O destilada (1:2) foi necessária para se obter o produto desejado puro.



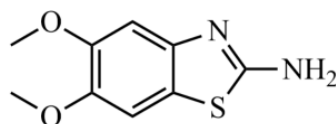
**Cloreto de Cinamoíla (41)** – Rendimento: 90%; Aspecto: pó amarelo intenso amorfo. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 1676  $\nu$ (C=O); 1627  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1066  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7,34 (*d*, 1H, *J*= 15,83, CH<sub>eno</sub>); 7,44-7,49 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,81 (*d*, 1H, *J*= 15,87, CH<sub>eno</sub>); 7,83-7,86 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  117,35 (C<sub>eno</sub>); 122,75 (C<sub>Ar</sub>); 129,55 (C<sub>Ar</sub>); 131,88 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 133,94 (C<sub>Ar</sub>); 134,05 (C<sub>q</sub>); 144,53 (C<sub>eno</sub>); 163,17 (C=O).



**Cloreto de (E)-3-(4-(*terc*-butil)fenil)acrilóila (42)** – Rendimento: 55%; Aspecto: pó branco amorfo. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 1758 ( $\nu$ C=O); 1707  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1071  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,29 (*s*, 9H, CH<sub>3</sub>); 6,76 (*d*, 1H, *J*= 15,92, CH<sub>eno</sub>); 7,48 (*d*, 2H, *J*= 8,4, CH<sub>Ar</sub>); 7,73 (*d*, 2H, *J*= 8,4, CH<sub>Ar</sub>); 7,87 (*d*, 1H, *J*= 15,92, CH<sub>eno</sub>). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  31,31 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,20 (C<sub>terc</sub>); 116,44 (C<sub>eno</sub>); 126,35 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 129,35 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 131,39 (C<sub>q</sub>); 148,94 (C<sub>eno</sub>); 154,95 (C<sub>q</sub>); 163,31 (C=O).

#### 4.5.1.3 Síntese do 2-Amino-5,6-dimetoxibenzo[*d*]tiazol

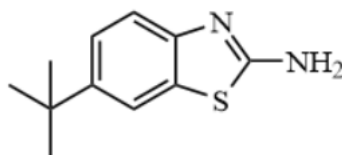
Em um balão de fundo redondo de 250 mL, contendo 100 mL de ácido acético, 5 g de 3,4-dietoxianilina ou 3,4-dimetoxianilina (1 eq.) foram adicionados. Em seguida, isotiocianato de potássio (2,2 eq.) foi adicionado à solução. Esta mistura reacional foi colocada em banho de gelo e, então, bromo (Br<sub>2</sub>, 1 eq.) foi adicionado gota-a-gota. Foi permitido que a mistura reacional atingisse a temperatura ambiente. Após 24 horas, observou-se o término da reação, juntamente com a formação de um precipitado marrom escuro. O sólido foi coletado através da filtração e, posteriormente, este foi colocado em refluxo de ácido clorídrico concentrado (37%), durante 2 horas. Após este tempo, a mistura foi filtrada para retirar impurezas insolúveis no meio reacional e, em seguida, a fração líquida foi neutralizada por adição de pastilhas de hidróxido de potássio (KOH), tal etapa foi realizada em banho de gelo (reação extremamente violenta e exotérmica). Por fim, o precipitado formado foi filtrado e lavado com H<sub>2</sub>O destilada (2 x 50 mL), rendendo o produto desejado puro (BARTHEL, 2018).



**2-Amino-5,6-dimetoxibenzo[d]tiazol (43)** – Rendimento: 99%; Aspecto: pó marrom pálido amorfo. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3370  $\nu$ (N–H)<sub>as</sub>; 3350  $\nu$ (N–H)<sub>s</sub>; 1053  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 981  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  3,72 (*d*, 6H, *J*= 7,26, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 6,96 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,19 (*br s*, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,27 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  56,14 (CH<sub>3</sub>); 56,66 (CH<sub>3</sub>); 102,8 (C<sub>Ar</sub>); 105,28 (C<sub>Ar</sub>); 121,80 (C<sub>q</sub>); 145,06 (C<sub>q</sub>); 147,13 (C–O); 148,62 (C–O); 166,29 (C–NH<sub>2</sub>).

#### 4.5.1.4 Síntese do 2-Amino-6-(*terc*-butil)benzo[d]tiazol

Os procedimentos para início da preparação do 2-Amino-6-(*terc*-butil)benzo[d]tiazol (**44**) foram os mesmo para este análogo. No entanto, este difere quanto ao método de purificação. Após o término da reação (após 24 horas), observou-se a formação de um precipitado de coloração branca. Em seguida, a mistura bruta foi neutralizada através da adição de uma solução concentrada de amônia (25%). Subsequentemente, realizou-se uma extração líquido-líquido usando-se acetato de etila e H<sub>2</sub>O destilada, na proporção de 1:3. A fração orgânica foi coletada e rota-evaporada, rendendo um pó alaranjado como produto, cujo não encontrava-se purificado (JIMONET et al., 1999). Dessa forma, uma coluna cromatográfica clássica foi realizada, utilizando-se éter de petróleo e acetato de etila (7:3) como fase móvel, rendendo o produto desejado puro.



**2-Amino-6-(*terc*-butil)benzo[d]tiazol (44)** – Rendimento: 65%; Aspecto: pó laranja pálido amorfo. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3431  $\nu$ (N–H)<sub>as</sub>; 3280  $\nu$ (N–H)<sub>s</sub>; 1044  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 905  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,27 (*s*, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 7,23 (*s*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,32 (*br s*, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,64 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  31,93 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 34,75 (C<sub>terc</sub>); 117,59 (C<sub>Ar</sub>); 123,19 (C<sub>Ar</sub>); 131,33 (C<sub>q</sub>); 144,02 (C<sub>Ar</sub>); 150,98 (C<sub>q</sub>); 166,96 (C–C<sub>terc</sub>); 172,48 (C–NH<sub>2</sub>).

#### 4.5.2 Acoplamento de 2-aminobenzo[*d*]tiazóis aos derivados do ácido cinâmico e ao ácido *trans*-fenilciclopropanocarboxílico

##### 4.5.2.1 Derivados não halogenados

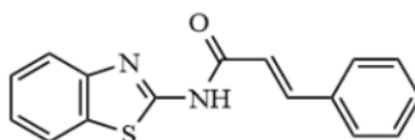
Inicialmente, o correspondente 2-aminobenzo[*d*]tiazol (1 eq.) foi adicionado a um balão de 25 mL, contendo 5 mL de dimetilformamida (DMF) como solvente. À solução, o respectivo ácido cinâmico (1,1 eq.) foi adicionado. Em seguida, 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamino tetrafluoroborato - TBTU (1 eq.) foi adicionado à mistura reacional, sob agitação. Esta permaneceu sob agitação à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após este tempo, *N,N*-diisopropiletilamina - DIPEA (3 eq.) foi adicionada como base catalítica. A mistura reacional permaneceu sob agitação à temperatura ambiente durante 48 horas. Após o término da reação, 20 mL de uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> foram adicionados à solução inicial, resultando na formação de um precipitado. Então, esta permaneceu sob agitação durante 15 minutos e, subsequentemente, o resíduo sólido foi filtrado e lavado com a solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 10 mL) e H<sub>2</sub>O destilada (3 x 25 mL), rendendo o produto impuro. Assim, este foi recristalizado a partir de uma mistura de acetona e H<sub>2</sub>O destilada (1:2), obtendo-se o produto desejado puro.

##### 4.5.2.2 Derivados halogenados

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, 100 mg de correspondente 2-aminobenzotiazol halogenado foram adicionados, juntamente com DMF anidro (3 mL) em atmosfera inerte de argônio. Em seguida, 4 eq. de trietilamina (Et<sub>3</sub>N) foram adicionados à solução. Esta permaneceu sob agitação durante 30 minutos, à temperatura de 70 °C. Posteriormente, uma solução contendo 1,1 eq. do cloreto de acila correspondente, em DMF anidro e sob atmosfera de argônio, foi adicionado à mistura inicial. Por fim, a mistura reacional resultante permaneceu sob estas condições por um período de 24 horas. Após o término da reação, o produto foi isolado exatamente como descrito no tópico anterior.

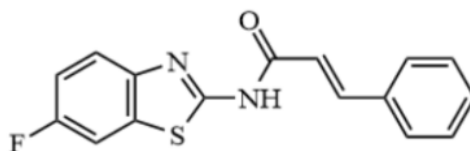
#### 4.5.3 Síntese dos derivados benzo[*d*]tiazol-2-fenilciclopropanocarboxamidas *mono*- e *di*-hidroxilados

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, contendo diclorometano anidro (5 mL), 100 mg do correspondente produto contendo alcóxidos nas posições 4, ou 6, ou 5 e 6 foram adicionados. A solução, sob agitação, foi resfriada até a temperatura de  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, 2 eq. (para cada heteroátomo na molécula inicial) de tribrometo de boro ( $\text{BBr}_3$ ) foram adicionados gota-a-gota à solução previamente preparada e resfriada. Posteriormente, a reação foi deixada durante 24 horas à temperatura ambiente e à atmosfera inerte de argônio. Após o término da mesma, 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada foram adicionados à mistura bruta, resultando na formação de um precipitado. Este, então foi filtrado e lavado com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada gelada (3 x 30 mL), rendendo o produto purificado.



**(*E*)-*N*-(benzo[*d*]tiazol-2-il)cinamamida (45)** – Rendimento: 70%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,77;  $R_T$ : 1,09 min; Grau de pureza: 99%;  $P_F$ : 211-212  $^{\circ}\text{C}$ . ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3164  $\nu(\text{N-H})_s$ ; 1688  $\nu(\text{C=O})$ ; 1624  $\nu(\text{C=C}_{eno})$ ; 1074  $\nu(\text{C}_{Ar}=\text{C}_{Ar})$ ; 988  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  6,83 (*d*, 1H,  $J= 15.37$ ,  $\text{CH}_{eno}$ ); 7,17 (*m*, 1H,  $\text{CH}_{Ar}$ ); 7,28-7,4 (*m*, 4H,  $\text{CH}_{Ar}$ ); 7,51-7,54 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{Ar}$ ); 7,61 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{Ar}$ ); 7,66 (*d*, 1H,  $\text{CH}_{eno}$ ); 7,86 (*d*, 1H,  $\text{CH}_{Ar}$ ); 12,45 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  119,88 ( $\text{C}_{Ar}$ ); 121,0 ( $\text{C}_{eno}$ ); 122,18 ( $\text{C}_{Ar}$ ); 124,04 ( $\text{C}_{Ar}$ ); 126,61 ( $\text{C}_{Ar}$ ); 128,59 ( $\text{C}_{Ar}$ ); 129,36 ( $\text{C}_q$ ); 129,59 ( $\text{C}_{Ar}$ ); 131,0 ( $\text{C}_{Ar}$ ); 132,15 ( $\text{C}_q$ ); 134,65 ( $\text{C}_{Ar}$ ); 143,6 ( $\text{C}_{eno}$ ); 149,13 ( $\text{C}_q$ ); 158,54 ( $\text{C}_{Ar}$ ); 164,51 ( $\text{C=O}$ ); 168,01 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OS}$ : 280,07 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 281,1 (100%); 151,2 (3,4%); 131,2 (5,6%).

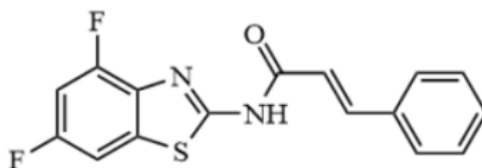
REFERÊNCIA: (WANG; FU; HUANG, 2017).





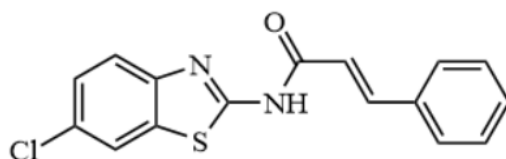
**(E)-N-(6-fluorobenzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (46)** – Rendimento: 69%; Aspecto: pó branco amorfo;  $R_F$ : 0,37;  $R_T$ : 1,32 min; Grau de pureza: 96%;  $P_F$ : 298-299 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3153  $\nu(\text{N-H})$ ; 1682  $\nu(\text{C=O})$ ; 1624  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1093  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 920  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  6,95 (*d*, 1H,  $J= 15,64$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,29 (*td*, 1H,  $J= 9,0$ ; 2,7,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,46-7,51 (*m*, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,65-7,68 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,74-7,79 (*m*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,8 (*d*, 1H,  $J= 15,64$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,91 (*d*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,61 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  108,46 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 108,81 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 119,74 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 122,06 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 128,61 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,59 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 131,03 ( $\text{C}_q$ ); 133,34 ( $\text{C}_q$ ); 134,63 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 143,7 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 145,89 ( $\text{C}_q$ ); 158,56 ( $\text{C-F}$ ); 164,57 ( $\text{C=O}$ ); 168,63 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{OS}$ : 298,06 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 299,1 (100%); 169,1 (1,2%); 131,2 (5,6%).

REFERÊNCIA: (KOROŠEC et al., 2013).



**(E)-N-(4,6-difluorobenzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (47)** – Rendimento: 71%; Aspecto: pó branco amorfo;  $R_F$ : 0,47;  $R_T$ : 1,62 min; Grau de pureza: 96%;  $P_F$ : 268-269 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3060  $\nu(\text{N-H})$ ; 1664  $\nu(\text{C=O})$ ; 1614  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}}$ ); 1020  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 987  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  6,92 (*d*, 1H,  $J= 15,92$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,32-7,4 (*m*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,46-7,51 (*m*, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,65-7,68 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,79-7,84 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$  e  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 12,79 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  104,76 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 105,12 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 119,51 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 128,64 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,58 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 131,10 ( $\text{C}_q$ ); 134,55 ( $\text{C}_q$ ); 135,31 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 135,38 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 143,99 ( $\text{C}_q$ ); 155,48 ( $\text{C-F}$ ); 158,32 ( $\text{C-F}$ ); 159,10 ( $\text{C=O}$ ); 164,72 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{N}_2\text{OS}$ : 316,05 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 317,1 (100%); 131,2 (5,1%).

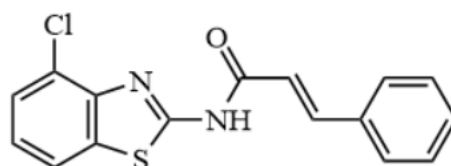
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(6-clorobenzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (48)** – Rendimento: 61%; Aspecto: pó branco amorfo;  $R_F$ : 0,5;  $R_T$ : 1,86 min; Grau de pureza: 99%;  $P_F$ : 269-270 °C. ATR-IV

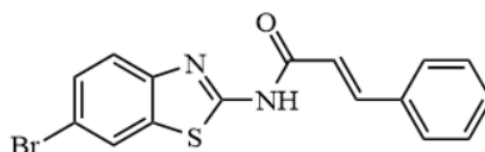
(transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3064  $\nu$ (N–H); 1684  $\nu$ (C=O); 1623  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1099  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 988  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  6,98 (*d*, 1H, *J*= 15,92, CH<sub>eno</sub>); 7,46-7,51 (*m*, 4H, CH<sub>Ar</sub>); 7,66-7,68 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,75 (*d*, 1H, *J*= 8,94, CH<sub>Ar</sub>); 7,8 (*d*, 1H, *J*= 15,97, CH<sub>eno</sub>); 8,14 (*d*, 1H, *J*= 1,76, CH<sub>Ar</sub>); 12,71 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  119,7 (C<sub>Ar</sub>); 121,91 (C<sub>Ar</sub>); 122,22 (C<sub>eno</sub>); 126,96 (C<sub>Ar</sub>); 128,08 (C<sub>Ar</sub>); 128,63 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 129,59 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 131,07 (C–Cl); 133,86 (C<sub>q</sub>); 134,61 (C<sub>q</sub>); 143,82 (C<sub>eno</sub>); 148,05 (C<sub>q</sub>); 159,38 (C=O); 164,68 (C=N). C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>OS: 314,03 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 315,1 (100%); 185,0 (1,4%); 131,3 (4,6%).

REFERÊNCIA: (AMNERKAR; BHUSARI, 2010; JAIN et al., 2012).



**(E)-N-(4-clorobenzod[tiazol-2-il]cinamamida (49)** – Rendimento: 79%; Aspecto: pó rosa pálido amorfo; R<sub>F</sub>: 0,42; R<sub>T</sub>: 1,75 min; Grau de pureza: 95%; P<sub>F</sub>: 127-128 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3111  $\nu$ (N–H); 1686  $\nu$ (C=O); 1619  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1071  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 981  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  6,93 (*d*, 1H, *J*= 15,93, CH<sub>eno</sub>); 7,27 (*t*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,44-7,52 (*m*, 4H, CH<sub>Ar</sub>); 7,63-7,66 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,78 (*d*, 1H, *J*= 15,92, CH<sub>eno</sub>); 7,98 (*dd*, 1H, *J*= 7,98; 1,2, CH<sub>Ar</sub>); 12,44 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  120,68 (C<sub>eno</sub>); 121,17 (C<sub>Ar</sub>); 124,47 (C–Cl); 124,6 (C<sub>Ar</sub>); 126,47 (C<sub>Ar</sub>); 128,53 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 129,55 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 130,87 (C<sub>q</sub>); 133,92 (C<sub>Ar</sub>); 134,79 (C<sub>q</sub>); 143,24 (C<sub>eno</sub>); 146,26 (C<sub>q</sub>); 160,7 (C=O); 165,47 (C=N). C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>OS: 314,03 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 315,1 (100%); 185,1 (1,4%); 131,2 (7,1%).

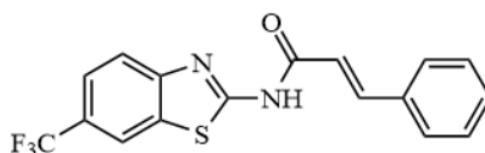
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(6-bromobenzod[tiazol-2-il]cinamamida (50)** – Rendimento: 66%; Aspecto: pó branco amorfo; R<sub>F</sub>: 0,62; R<sub>T</sub>: 2,06 min; Grau de pureza: 99%; P<sub>D</sub>: 315-316 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3162  $\nu$ (N–H); 1684  $\nu$ (C=O); 1626  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1085  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 989  $\nu$ (S–

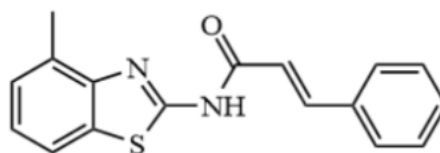
C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,12 (*d*, 1H,  $J$ = 15,93,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,45-7,51 (*m*, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,57 (*dd*, 1H,  $J$ = 8,6; 1,9,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,65-7,68 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,73 (*d*, 1H,  $J$ = 14,43,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,8 (*d*, 1H,  $J$ = 15,90,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 8,26 (*d*, 1H,  $J$ = 2,04,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,85 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  115,94 ( $\underline{\text{C}}\text{-Br}$ ); 119,89 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 122,63 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 124,71 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,63 ( $(\text{C}_{\text{Ar}})_3$ ); 129,58 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-C}_{\text{Ar}}$ ); 131,04 ( $\text{C}_{\text{q}}$ ); 134,38 ( $\text{C}_{\text{q}}$ ); 134,66 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 143,65 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 148,45 ( $\text{C}_{\text{q}}$ ); 159,29 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 164,79 ( $\text{C}=\text{N}$ ).  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{OS}$ : 357,98 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 361,0 (100%); 228,9 (1,3%); 131,2 (5,4%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



(*E*)-*N*-(6-(trifluorometil)benzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (**51**) – Rendimento: 65%; Aspecto: pó branco amorfo;  $R_F$ : 0,8;  $R_T$ : 2,08 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 193-194 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3066  $\nu(\text{N-H})$ ; 1686  $\nu(\text{C}=\text{O})$ ; 1628  $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{eno}})$ ; 1055  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 982  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,97 (*d*, 1H,  $J$ = 15,83,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,46-7,53 (*m*, 4H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,64-7,69 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,83 (*d*, 1H,  $J$ = 15,83,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,92 (*d*, 1H,  $J$ = 8,47,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 8,51 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,83 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  119,56 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 121,40 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 124,41 ( $\underline{\text{C}}\text{F}_3$ ); 128,68 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-C}_{\text{Ar}}$ ); 129,61 ( $(\text{C}_{\text{Ar}})_3$ ); 131,14 ( $\text{C}_{\text{q}}$ ); 132,71 ( $\text{C}_{\text{q}}$ ); 134,55 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 144,15 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 146,14 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 148,72 ( $\text{C}_{\text{q}}$ ); 151,89 ( $\text{C}_{\text{q}}$ ); 161,78 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 164,88 ( $\text{C}=\text{N}$ ).  $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{OS}$ : 348,05 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 349,1 (100%); 131,3 (3,3%).

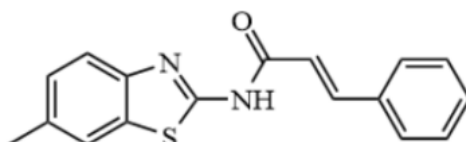
REFERÊNCIA: INÉDITA.



(*E*)-*N*-(4-metilbenzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (**52**) – Rendimento: 68%; Aspecto: pó amarelo intenso amorfo;  $R_F$ : 0,4;  $R_T$ : 1,71 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 120-121 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3175  $\nu(\text{N-H})$ ; 1650  $\nu(\text{C}=\text{O})$ ; 1616  $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{eno}})$ ; 1078  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 979  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2,59 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 6,97 (*d*, 1H,  $J$ = 15,83,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,18 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,46-7,51 (*m*, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,64-7,67 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,76-7,81 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$  e

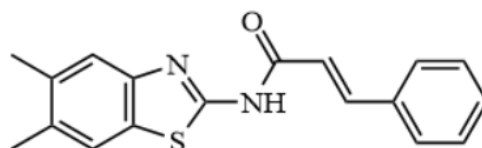
CH<sub>eno</sub>); 12,69 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 18,43 (CH<sub>3</sub>); 119,56 (C<sub>Ar</sub>); 119,90 (C<sub>Ar</sub>); 124,01 (C<sub>eno</sub>); 127,09 (C<sub>Ar</sub>); 128,55 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 129,59 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 130,29 (C<sub>q</sub>); 130,97 (C<sub>q</sub>); 131,81 (C-CH<sub>3</sub>); 134,67 (C<sub>Ar</sub>); 143,29 (C<sub>eno</sub>); 148,23 (C<sub>q</sub>); 157,67 (C=O); 164,43 (C=N). C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>OS: 294,08 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 295,1 (100%); 165,1 (2,4%); 131,2 (1,5%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(6-metilbenzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (53)** – Rendimento: 80%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo; R<sub>F</sub>: 0,37; R<sub>T</sub>: 1,52 min; Grau de pureza: 95%; P<sub>F</sub>: 265-266 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3060 ν(N-H); 1684 ν(C=O); 1625 ν(C=C<sub>eno</sub>); 1069 ν(C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 983 ν(S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2,41 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,95 (*d*, 1H, *J* = 15,83, CH<sub>eno</sub>); 7,25 (*dd*, 1H, *J* = 8,19; 1,3, CH<sub>Ar</sub>); 7,45-7,52 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,62-7,67 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,75-7,8 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub> e CH<sub>eno</sub>); 12,49 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 21,46 (CH<sub>3</sub>); 119,97 (C<sub>Ar</sub>); 120,64 (C<sub>Ar</sub>); 121,75 (C<sub>eno</sub>); 127,92 (C<sub>Ar</sub>); 128,56 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 129,57 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 130,94 (C<sub>q</sub>); 132,31 (C<sub>q</sub>); 133,52 (C-CH<sub>3</sub>); 134,68 (C<sub>Ar</sub>); 143,4 (C<sub>eno</sub>); 147,13 (C<sub>q</sub>); 157,66 (C=O); 164,38 (C=N). C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>OS: 294,08 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 295,1 (100%); 165,1 (2,8%); 131,2 (1,3%).

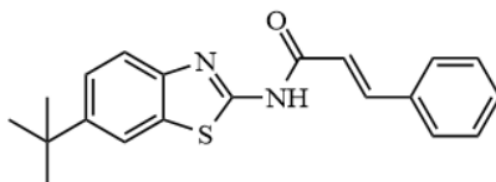
REFERÊNCIA: (AMNERKAR; BHUSARI, 2010).



**(E)-N-(5,6-dimetilbenzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (54)** – Rendimento: 86%; Aspecto: pó marrom pálido amorfo; R<sub>F</sub>: 0,42; R<sub>T</sub>: 1,87 min; Grau de pureza: 95%; P<sub>F</sub>: 219-220 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3138 ν(N-H); 1663 ν(C=O); 1620 ν(C=C<sub>eno</sub>); 1046 ν(C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 987 ν(S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2,31 (*s*, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 6,94 (*d*, 1H, *J* = 15,92, CH<sub>eno</sub>); 7,45-7,49 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,55 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,63-7,66 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,71 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,76 (*d*, 1H, *J* = 15,92, CH<sub>eno</sub>); 12,46 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 20,01 (CH<sub>3</sub>); 20,16 (CH<sub>3</sub>); 120,0 (C<sub>Ar</sub>); 121,36 (C<sub>eno</sub>); 121,89 (C<sub>Ar</sub>); 128,54 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 129,53 (C<sub>q</sub>); 129,56

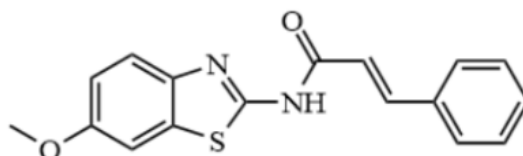
(C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 130,92 (C<sub>q</sub>); 132,91 (C<sub>Ar</sub>); 134,69 (C-CH<sub>3</sub>); 135,26 (C-CH<sub>3</sub>); 143,3 (C<sub>eno</sub>); 147,71 (C<sub>q</sub>); 157,58 (C=O); 164,28 (C=N). C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>OS: 308,1 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 309,1 (100%); 179,1 (3,3%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(6-(*tert*-butil)benzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (55)** – Rendimento: 57%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo; R<sub>F</sub>: 0,46; R<sub>T</sub>: 1,29 min; Grau de pureza: 98%; P<sub>F</sub>: 173-174 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 2959 ν(N-H); 1693 ν(C=O); 1616 ν(C=C<sub>eno</sub>); 1084 ν(C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 921 ν(S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1,33 (*s*, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 6,96 (*d*, 1H, *J*= 15,8, CH<sub>eno</sub>); 7,64-7,73 (*m*, 6H, CH<sub>Ar</sub>); 7,78 (*d*, 1H, *J*= 15,73, CH<sub>eno</sub>); 7,96 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,99 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 12,52 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 31,88 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,15 (C<sub>terc</sub>); 110,03 (C<sub>Ar</sub>); 118,25 (C<sub>eno</sub>); 124,4 (C<sub>Ar</sub>); 124,97 (C<sub>Ar</sub>); 127,85 (C<sub>Ar</sub>); 128,57 (C<sub>Ar</sub>); 128,66 (C<sub>Ar</sub>); 129,36 (C<sub>Ar</sub>); 129,59 (C<sub>Ar</sub>); 130,68 (C<sub>q</sub>); 134,67 (C<sub>q</sub>); 141,87 (C<sub>eno</sub>); 143,24 (C-C<sub>terc</sub>); 158,06 (C<sub>q</sub>); 164,37 (C=O); 168,03 (C=N). C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>OS: 336,13 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 337,1 (100%); 207,2 (2,5%); 131,2 (5,6%).

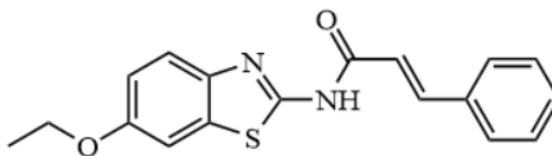
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(6-metoxibenzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (56)** – Rendimento: 80%; Aspecto: pó amarelo intenso; R<sub>F</sub>:0,82; R<sub>T</sub>: 1,14 min; Grau de pureza: 96%; P<sub>F</sub>: 259-261 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3165 ν(N-H); 1681 ν(C=O); 1621 ν(C=C<sub>eno</sub>); 1058 ν(C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 998 ν(S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3,81 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,94 (*d*, 1H, *J*= 15,83, CH<sub>eno</sub>); 7,04 (*dd*, 1H, *J*= 8,84; 2,42, CH<sub>Ar</sub>); 7,46-7,5 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,58 (*d*, 1H, *J*= 2,4, CH<sub>Ar</sub>); 7,64-7,67 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,77 (*d*, 1H, *J*= 15,83, CH<sub>eno</sub>); 12,46 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 56,11 (CH<sub>3</sub>); 105,20 (C<sub>Ar</sub>); 115,41 (C<sub>Ar</sub>); 119,95 (C<sub>Ar</sub>); 121,62 (C<sub>eno</sub>); 128,55 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 128,65 (C<sub>q</sub>); 129,57 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 130,93 (C<sub>q</sub>); 133,49 (C<sub>q</sub>); 134,70 (C<sub>Ar</sub>); 143,29 (C<sub>eno</sub>); 156,47

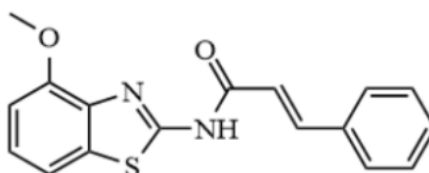
(C–OCH<sub>3</sub>); 156,65 (C=O); 164,25 (C=N). C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: 310,08 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 311,1 (100%); 181,1 (4,2%); 131,2 (1,2%).

REFERÊNCIA: (RAWAT; QURAIISHI, 2003).



**(E)-N-(6-etoxybenzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (57)** – Rendimento: 72%; Aspecto: pó laranja intenso amorfo; R<sub>F</sub>: 0,35; R<sub>T</sub>: 1,46 min; Grau de pureza: 95%; P<sub>F</sub>: 222-223 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3176 ν(N–H); 1683 ν(C=O); 1623 ν(C=C<sub>eno</sub>); 1061 ν(C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 977 ν(S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1,35 (*t*, 3H, *J*= 6,9, CH<sub>3</sub>); 4,07 (*q*, 2H, *J*= 6,95, OCH<sub>2</sub>); 6,94 (*d*, 1H, *J*= 15,83, CH<sub>eno</sub>); 7,02 (*dd*, 1H, *J*= 8,66; 2,4, CH<sub>Ar</sub>); 7,45-7,47 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,56 (*d*, 1H, *J*= 2,42, CH<sub>Ar</sub>); 7,62-7,67 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,77 (*d*, 1H, *J*= 15,83, CH<sub>Ar</sub>); 12,44 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 15,15 (CH<sub>3</sub>); 64,09 (CH<sub>2</sub>); 105,87 (C<sub>Ar</sub>); 115,76 (C<sub>Ar</sub>); 120,0 (C<sub>eno</sub>); 121,60 (C<sub>Ar</sub>); 128,54 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 129,57 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 129,63 (C<sub>q</sub>); 130,91 (C<sub>Ar</sub>); 133,48 (C<sub>q</sub>); 133,48 (C<sub>q</sub>); 143,26 (C<sub>eno</sub>); 155,87 (C–OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 156,45 (C=O); 164,24 (C=N). C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: 324,09 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>); 325,1 (100%); 195,1 (2,3%); 131,3 (1,3%).

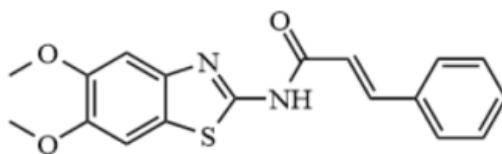
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(4-metoxybenzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (58)** – Rendimento: 70%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo; R<sub>F</sub>: 0,65; R<sub>T</sub>: 1,17 min; Grau de pureza: 95%; P<sub>F</sub>: 132-134 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3245 ν(N–H); 1670 ν(C=O); 1628 ν(C=C<sub>eno</sub>); 1045 ν(C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 972 ν(S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3,92 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,9 (*d*, 1H, *J*= 15,73, CH<sub>eno</sub>); 7,0 (*d*, 1H, *J*= 7,99, CH<sub>Ar</sub>); 7,26 (*t*, 1H, *J*= 8,0, CH<sub>Ar</sub>); 7,45-7,49 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,54 (*d*, 1H, *J*= 8,0, CH<sub>Ar</sub>); 7,64-7,67 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,79 (*d*, 1H, *J*= 15,73, CH<sub>eno</sub>); 12,72 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 56,31 (CH<sub>3</sub>); 108,17 (C<sub>Ar</sub>); 113,99 (C<sub>Ar</sub>); 125,03 (C<sub>eno</sub>); 128,57 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 129,57 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 130,97 (C<sub>q</sub>); 133,52 (C<sub>q</sub>); 134,64 (C<sub>Ar</sub>); 139,04 (C<sub>q</sub>); 143,46 (C<sub>eno</sub>);

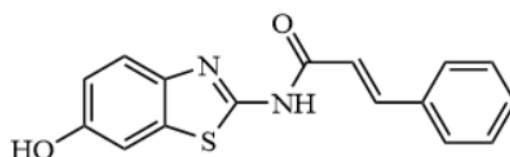
152,33 (C<sub>q</sub>); 156,95 (C=O); 164,3 (C=N). C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: 310,08 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 311,1 (100%); 181,1 (4,2%); 131,2 (1,2%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(5,6-dimetoxibenzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (59)** – Rendimento: 68%; Aspecto: pó amarelo intenso amorfo; R<sub>F</sub>: 0,42; R<sub>T</sub>: 0,94 min; Grau de pureza: 98%; P<sub>F</sub>: 140-141 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3153<sub>v</sub>(N–H); 1679<sub>v</sub>(C=O); 1626<sub>v</sub>(C=C<sub>eno</sub>); 1030<sub>v</sub>(C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 977<sub>v</sub>(S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3,82 (*d*, 6H, *J*= 5,49, CH<sub>3</sub>); 6,96 (*d*, 1H, *J*= 15,8, CH<sub>eno</sub>); 7,31 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,45-7,51 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,56 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,64-7,69 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,75 (*d*, 1H, *J*= 15,8, CH<sub>eno</sub>); 12,42 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 56,19 (OCH<sub>3</sub>); 56,42 (OCH<sub>3</sub>); 103,98 (C<sub>Ar</sub>); 120,02 (C<sub>Ar</sub>); 123,64 (C<sub>eno</sub>); 128,52 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 129,36 (C<sub>q</sub>); 129,57 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 130,88 (C<sub>q</sub>); 134,68 (C<sub>Ar</sub>); 143,12 (C<sub>eno</sub>); 143,19 (C<sub>q</sub>); 147,48 (C–OCH<sub>3</sub>); 149,43 (C–OCH<sub>3</sub>); 156,94 (C=O); 163,99 (C=N). C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S: 340,09 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 341,1 (100%); 211,1 (1,7%).

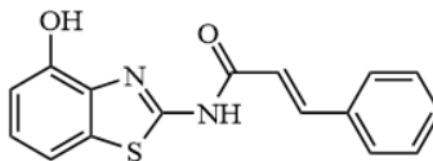
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(6-hidroxibenzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (60)** – Rendimento: 98%; Aspecto: pó amarelo amorfo; R<sub>F</sub>: 0,35; R<sub>T</sub>: 0,73 min; Grau de pureza: 97%; P<sub>F</sub>: 272-273 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3320<sub>δ</sub>(O–H); 3149<sub>v</sub>(N–H); 1664<sub>v</sub>(C=O); 1604<sub>v</sub>(C=C<sub>eno</sub>); 1020<sub>v</sub>(C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 918<sub>v</sub>(S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 6,87-6,89 (*m*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 6,93 (*d*, 1H, *J*= 15,8, CH<sub>eno</sub>); 7,3 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,45-7,49 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,55 (*d*, 1H, *J*= 8,66, CH<sub>Ar</sub>); 7,62-7,68 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,75 (*d*, 1H, CH<sub>eno</sub>); 9,56 (*br s*, 1H, OH); 12,39 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 107,24 (C<sub>Ar</sub>); 116,03 (C<sub>Ar</sub>); 120,3 (C<sub>Ar</sub>); 121,9 (C<sub>eno</sub>); 128,81 (C<sub>Ar</sub>); 129,86 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 131,18 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 133,76 (C<sub>q</sub>); 134,4 (C<sub>q</sub>); 142,51 (C<sub>eno</sub>); 143,4 (C<sub>q</sub>); 154,97

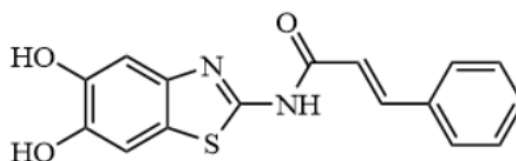
( $\underline{\text{C}}-\text{OH}$ ); 155,83 ( $\underline{\text{C}}=\text{O}$ ); 164,39 ( $\underline{\text{C}}=\text{N}$ ).  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ : 296,06 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 297,1 (100%); 167,0 (3,8%); 131,1 (4,9%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(4-hidroxibenzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (61)** – Rendimento: 98%; Aspecto: pó amarelo amorfo;  $R_F$ : 0,32;  $R_T$ : 0,84 min; Grau de pureza: 96%;  $P_F$ : 272-273 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3324  $\delta$ (O–H); 3182  $\nu$ (N–H); 1687  $\nu$ (C=O); 1629  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1053  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 931  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  6,84 (*d*, 1H,  $J$ = 7,91, CH<sub>Ar</sub>); 6,94 (*d*, 1H,  $J$ = 15,83, CH<sub>eno</sub>); 7,11 (*t*, 1H,  $J$ = 7,91, CH<sub>Ar</sub>); 7,38 (*d*, 1H,  $J$ = 7,91, CH<sub>Ar</sub>); 7,45-7,5 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,64-7,67 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,78 (*d*, 1H,  $J$ = 15,73, CH<sub>eno</sub>); 9,79 (*br s*, 1H, OH); 12,61 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  112,18 (C<sub>Ar</sub>); 112,68 (C<sub>Ar</sub>); 120,37 (C<sub>eno</sub>); 125,44 (C<sub>Ar</sub>); 128,94 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 129,96 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 131,33 (C<sub>q</sub>); 134,21 (C<sub>Ar</sub>); 135,07 (C<sub>q</sub>); 138,88 (C<sub>eno</sub>); 143,67 (C<sub>q</sub>); 150,84 ( $\underline{\text{C}}-\text{OH}$ ); 156,44 (C=O); 164,65 (C=N).  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ : 296,06 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 297,1 (100%); 167,0 (3,6%); 131,1 (4,5%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.

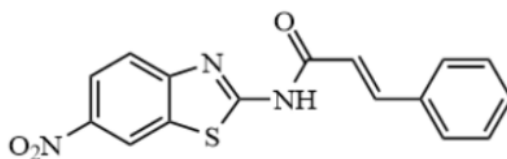


**(E)-N-(5,6-di-hidroxibenzo[d]tiazol-2-il)cinamamida (62)** – Rendimento: 99%; Aspecto: pó amarelo amorfo;  $R_F$ : 0,33;  $R_T$ : 0,64 min; Grau de pureza: 97%;  $P_F$ : 272-273 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3177  $\delta$ (O–H); 1676  $\nu$ (C=O); 1604  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1059  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 943  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7,45 (*d*, 1H,  $J$ = 15,64, CH<sub>eno</sub>); 7,59 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,72 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,89-7,92 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,95 (*br s*, 1H, OH); 7,96-8,04 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 8,09 (*d*, 1H, CH<sub>eno</sub>); 9,23 (*br s*, 1H, OH); 12,68 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  106,36 (C<sub>Ar</sub>); 120,44 (C<sub>eno</sub>); 122,18 (C<sub>Ar</sub>); 129,18 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 129,72 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 133,27 (C<sub>q</sub>); 134,81 (C<sub>Ar</sub>); 141,03 (C<sub>eno</sub>); 142,02 (C<sub>q</sub>); 142,54 ( $\underline{\text{C}}-\text{OH}$ ); 143,97 ( $\underline{\text{C}}-\text{OH}$ ); 145,62 (C<sub>q</sub>); 155,48 ( $\underline{\text{C}}=\text{O}$ );



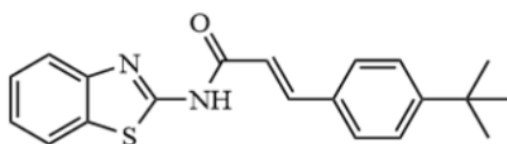
163,15 ( $\underline{C=N}$ ).  $C_{16}H_{12}N_2O_3S$ : 312,06 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ( $[M+H]^+$ ) 313,1 (100%); 274,3 (1,2%); 208,9 (10,6%); 182,9 (3,6%); 131,1 (8,6%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)cinamamida (63)** – Rendimento: 70%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,57;  $R_T$ : 1,34 min; Grau de pureza: 96%;  $P_F$ : 269-270 °C. ATR-IV (transmitância/ $cm^{-1}$ ): 3160  $\nu$ (N-H); 1683  $\nu$ (C=O); 1598  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1051  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 996  $\nu$ (S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  6,97 (*d*, 1H,  $J$ = 15,83, CH<sub>eno</sub>); 7,47-7,48 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,66-7,69 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,84 (*d*, 1H,  $J$ = 15,8, CH<sub>eno</sub>); 7,91 (*d*, 1H,  $J$ = 8,94, CH<sub>Ar</sub>); 8,28 (*dd*, 1H,  $J$ = 8,28; 2,37, CH<sub>Ar</sub>); 9,06 (*d*, 1H,  $J$ = 2,32, CH<sub>Ar</sub>); 12,98 (*s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  119,37 (C<sub>Ar</sub>); 119,52 (C<sub>eno</sub>); 121,06 (C<sub>Ar</sub>); 122,26 (C<sub>Ar</sub>); 128,73 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 129,62 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 131,24 (C<sub>Ar</sub>); 132,86 (C<sub>q</sub>); 134,49 (C<sub>q</sub>); 143,45 (C<sub>eno</sub>); 144,47 ( $\underline{C-NO_2}$ ); 154,05 (C<sub>q</sub>); 164,11 (C=O); 165,05 (C=N).  $C_{16}H_{11}N_3O_3S$ : 325,05 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ( $[M+H]^+$ ) 326,0 (100%); 301,2 (2,4%); 279,1 (3,3%); 251,0 (2,8%); 217,1 (2,9%); 195,0 (2,0%); 149,2 (2,8%); 131,3 (15,5%).

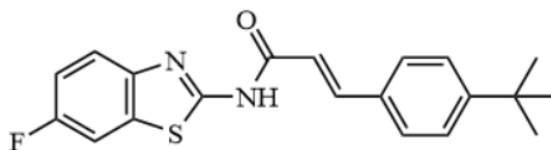
REFERÊNCIA: (AMNERKAR; BHUSARI, 2010; JAIN et al., 2012).



**(E)-N-(benzo[d]thiazol-2-yl)-3-(4-(tert-butyl)fenil)acrilamida (64)** – Rendimento: 72%; Aspecto: pó rosa pálido amorfo;  $R_F$ : 0,37;  $R_T$ : 3,12 min; Grau de pureza: 96%;  $P_F$ : 214-215 °C. ATR-IV (transmitância/ $cm^{-1}$ ): 2954  $\nu$ (N-H); 1677  $\nu$ (C=O); 1622  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1071  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 985  $\nu$ (S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,29 (*s*, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 6,92 (*d*, 1H,  $J$ = 15,73, CH<sub>eno</sub>); 7,31 (*t*, 1H,  $J$ = 7,35, CH<sub>Ar</sub>); 7,42-7,5 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,58-7,6 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,74-7,79 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub> e CH<sub>eno</sub>); 7,99 (*d*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 12,53 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  31,36 (( $\underline{CH_3}$ )<sub>3</sub>); 35,11(C<sub>terc</sub>); 119,01 (C<sub>Ar</sub>); 120,98 (C<sub>eno</sub>); 122,15 (C<sub>Ar</sub>); 124,00 (C<sub>Ar</sub>); 126,4 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 126,48 (C<sub>Ar</sub>); 128,46 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 131,97 (C<sub>q</sub>); 132,16 (C<sub>q</sub>); 143,46 (C<sub>q</sub>); 149,16

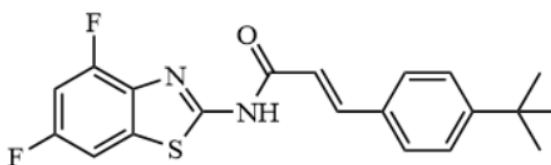
( $C_{eno}$ ); 153,97 ( $C_q$ ); 158,58 (C=O); 164,65 (C=N).  $C_{20}H_{20}N_2OS$ : 336,13 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 337,1 (100%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-N-(6-fluorobenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (65)** – Rendimento: 67%; Aspecto: pó laranja intenso amorfo;  $R_F$ : 0,52;  $R_T$ : 3,59 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 240-241 °C. ATR-IV (transmitância/ $cm^{-1}$ ): 2959  $\nu$ (N-H); 1693  $\nu$ (C=O); 1674  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1084  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 978  $\nu$ (S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,29 (*s*, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 6,91 (*d*, 1H,  $J=15,64$ , CH<sub>eno</sub>); 7,29 (*td*, 1H,  $J=9,0; 2,61$ , CH<sub>Ar</sub>); 7,48 (*d*, 2H,  $J=8,38$ , CH<sub>Ar</sub>); 7,59 (*d*, 2H,  $J=8,38$ , CH<sub>Ar</sub>); 7,74-7,79 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub> e CH<sub>eno</sub>); 7,9 (*dd*, 1H,  $J=8,7; 2,56$ , CH<sub>Ar</sub>); 12,65 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  31,35 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,12 (*C*<sub>terc</sub>); 108,43 (C<sub>Ar</sub>); 108,79 (C<sub>Ar</sub>); 118,83 (C<sub>Ar</sub>); 122,13 (*C*<sub>eno</sub>); 126,40 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 128,48 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 131,93 (C<sub>q</sub>); 133,33 (C<sub>q</sub>); 133,48 (C<sub>q</sub>); 145,57 (*C*<sub>eno</sub>); 154,0 (C<sub>q</sub>); 157,52 (C-F); 160,7 (C=O); 164,7 (C=N).  $C_{20}H_{19}FN_2OS$ : 354,12 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 355,1 (100%); 131,2 (1,0%).

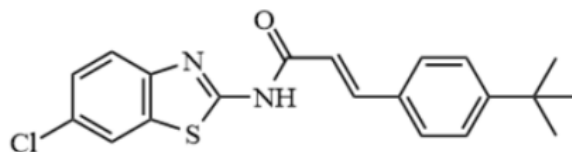
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-N-(4,6-difluorobenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (66)** – Rendimento: 66%; Aspecto: pó branco amorfo;  $R_F$ : 0,57;  $R_T$ : 1,58 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 203-204 °C. ATR-IV (transmitância/ $cm^{-1}$ ): 3198  $\nu$ (N-H); 1679  $\nu$ (C=O); 1623  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1021  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 947  $\nu$ (S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,165 (*s*, 9H, CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; 6,92 (*d*, 1H,  $J=15,92$ , CH<sub>eno</sub>); 7,32-7,40 (*m*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,46-7,51 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,65-7,68 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,79-7,84 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub> e CH<sub>eno</sub>); 12,82 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  31,36 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,11 (*C*<sub>terc</sub>); 101,95 (C<sub>Ar</sub>); 104,27 (C<sub>Ar</sub>); 104,63 (C<sub>q</sub>); 119,02 (*C*<sub>eno</sub>); 128,15 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 129,09 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 130,61 (C<sub>q</sub>); 134,6 (C<sub>q</sub>); 134,89 (C-C<sub>terc</sub>); 143,5 (*C*<sub>eno</sub>); 155,48 (C-F); 158,32

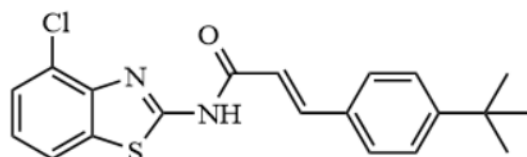
(C–F); 158,61 (C=O); 164,23 (C=N).  $C_{20}H_{18}F_2N_2OS$ : 372,11 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 373,1 (100%); 131,2 (5,1%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-N-(6-clorobenzof[d]tiazol-2-il)acrilamida (67)** – Rendimento: 68%; Aspecto: pó branco amorfo;  $R_F$ : 0,55;  $R_T$ : 1,88 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 265-266 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3063  $\nu$ (N–H); 1677  $\nu$ (C=O); 1627  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1096  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 979  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,29 (*s*, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 6,91 (*d*, 1H,  $J$ = 15,92, CH<sub>eno</sub>); 7,43-7,50 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,57-7,6 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,73-7,79 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub> e CH<sub>eno</sub>); 8,13 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 12,60 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  31,35 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,12 (C<sub>terc</sub>); 118,83 (C<sub>Ar</sub>); 121,88 (C<sub>Ar</sub>); 122,16 (C<sub>eno</sub>); 126,41 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 126,91 (C<sub>q</sub>); 128,02 (C<sub>Ar</sub>); 128,49 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 131,92 (C<sub>q</sub>); 133,88 (C<sub>q</sub>); 143,68 (C<sub>eno</sub>); 148,06 (C<sub>q</sub>); 154,03 (C–Cl); 159,5 (C=O); 164,82 (C=N).  $C_{20}H_{19}ClN_2OS$ : 370,09 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 371,1 (100%).

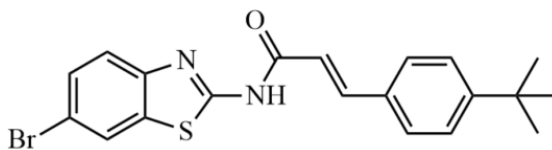
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-N-(4-clorobenzof[d]tiazol-2-il)acrilamida (68)** – Rendimento: 86%; Aspecto: pó rosa pálido amorfo;  $R_F$ : 0,52;  $R_T$ : 1,8 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 94-95 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3479  $\nu$ (N–H); 1676  $\nu$ (C=O); 1616  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1071  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 972  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,29 (*s*, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 6,89 (*d*, 1H,  $J$ = 15,73, CH<sub>eno</sub>); 7,3 (*t*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,39-7,45 (*m*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,48-7,55 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,57-7,62 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,78 (*d*, 1H,  $J$ = 15,72, CH<sub>eno</sub>); 7,98 (*dd*, 1H,  $J$ = 7,83; 0,9, CH<sub>Ar</sub>); 12,98 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  31,35 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,14 (C<sub>terc</sub>); 118,94 (C<sub>eno</sub>); 121,34 (C<sub>Ar</sub>); 124,75 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 126,43 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 126,64 (C–Cl); 128,49 (C<sub>Ar</sub>); 131,91 (C<sub>Ar</sub>); 133,78 (C<sub>q</sub>);

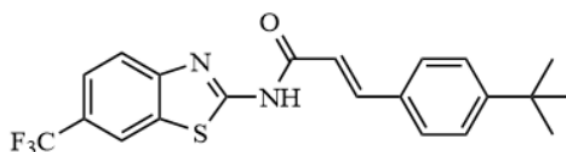
143,76 ( $C_{eno}$ ); 146,08 ( $C_q$ ); 154,06 ( $C_q$ ); 159,90 ( $\underline{C}-C_{terc}$ ); 164,96 ( $C=O$ ); 171,14 ( $C=N$ ).  
 $C_{20}H_{19}ClN_2OS$ : 370,09 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ( $[M+H]^+$ ) 371,2 (100%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



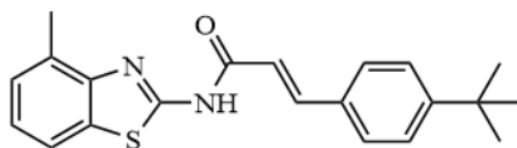
**(E)-N-(6-bromobenzo[d]thiazol-2-yl)-3-(4-(tert-butyl)fenil)acrilamida (69)** – Rendimento: 72%; Aspecto: pó laranja intenso amorfo;  $R_F$ : 0,31;  $R_T$ : 2,05 min; Grau de pureza: 96%;  $P_F$ : 220-221 °C. ATR-IV (transmitância/ $cm^{-1}$ ): 3060  $\nu(N-H)$ ; 1678  $\nu(C=O)$ ; 1625  $\nu(C=C_{eno})$ ; 1082  $\nu(C_{Ar}=C_{Ar})$ ; 979  $\nu(S-C)$ . RMN  $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1,29 (*s*, 9H,  $(CH_3)_3$ ); 6,91 (*d*, 1H,  $J=15,83$ ,  $CH_{eno}$ ); 7,48-7,50 (*m*, 2H,  $CH_{Ar}$ ); 7,56-7,61 (*m*, 3H,  $CH_{Ar}$ ); 7,69 (*d*, 1H,  $J=8,66$ ,  $CH_{Ar}$ ); 7,77 (*d*, 1H,  $J=15,83$ ,  $CH_{eno}$ ); 8,27 (*d*, 1H,  $J=1,86$ ,  $CH_{Ar}$ ); 12,62 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}C$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  31,35 ( $(\underline{CH}_3)_3$ ); 35,13 ( $C_{terc}$ ); 115,93 ( $C_{Ar}$ ); 118,78 ( $C_{Ar}$ ); 122,58 ( $C_{eno}$ ); 124,72 ( $C_{Ar}-C_{Ar}$ ); 126,41 ( $C_{Ar}-C_{Ar}$ ); 128,50 ( $C_q$ ); 129,62 ( $C_{Ar}$ ); 131,91 ( $C_q$ ); 134,38 ( $C_q$ ); 143,73 ( $C_{eno}$ ); 148,50 ( $C_q$ ); 154,06 ( $\underline{C}-Br$ ); 154,06 ( $C=O$ ); 164,80 ( $C=N$ ).  $C_{20}H_{19}BrN_2OS$ : 414,04 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ( $[M+H]^+$ ) 417,1 (100%); 187,2 (1,7%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



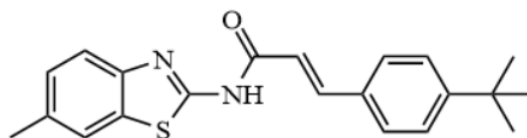
**(E)-3-(4-(tert-butyl)fenil)-N-(6-(trifluorometil)benzo[d]thiazol-2-yl)acrilamida (70)** – Rendimento: 78%; Aspecto: pó laranja pálido amorfo;  $R_F$ : 0,45;  $R_T$ : 2,48 min; Grau de pureza: 99%;  $P_F$ : 235-236 °C. ATR-IV (transmitância/ $cm^{-1}$ ): 3067  $\nu(N-H)$ ; 1685  $\nu(C=O)$ ; 1626  $\nu(C=C_{eno})$ ; 1057  $\nu(C_{Ar}=C_{Ar})$ ; 972  $\nu(S-C)$ . RMN  $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1,31 (*s*, 9H,  $(CH_3)_3$ ); 6,93 (*d*, 1H,  $J=15,92$ ,  $CH_{eno}$ ); 7,49-7,52 (*m*, 3H,  $CH_{Ar}$ ); 7,61 (*d*, 2H,  $J=8,19$ ,  $CH_{Ar}$ ); 7,76-7,81 (*m*, 1H,  $CH_{Ar}$  e  $CH_{eno}$ ); 8,15 (*s*, 1H,  $CH_{Ar}$ ); 12,63 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}C$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  31,56 ( $(\underline{CH}_3)_3$ ); 35,33 ( $C_{terc}$ ); 119,04 ( $C_{Ar}$ ); 119,14 ( $C_{eno}$ ); 122,09 ( $C_{Ar}$ ); 122,37 ( $C_{Ar}$ ); 126,62 ( $C_{Ar}-C_{Ar}$ ); 127,12 ( $\underline{C}F_3$ ); 128,23 ( $\underline{C}-CF_3$ ); 128,70 ( $C_{Ar}-C_{Ar}$ ); 132,13 ( $C_q$ ); 134,09 ( $C_q$ ); 143,89 ( $C_{eno}$ ); 148,27 ( $\underline{C}-C_{terc}$ ); 154,24 ( $C_q$ ); 159,71 ( $C=O$ ); 165,03 ( $C=N$ ).  $C_{21}H_{19}F_3N_2OS$ : 404,12 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ( $[M+H]^+$ ) 405,1 (100%); 218,2 (2,3%); 188,3 (3,1%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



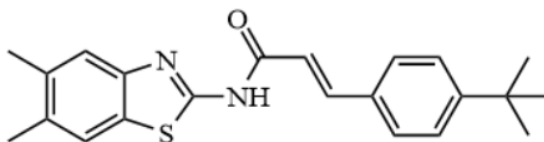
**(E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-N-(4-metilbenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (71)** – Rendimento: 78%; Aspecto: pó branco amorfo;  $R_F$ : 0,35;  $R_T$ : 1,74 min; Grau de pureza: 97%;  $P_F$ : 129-130 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2960  $\nu$ (N–H); 1651  $\nu$ (C=O); 1614  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1076  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 982  $\nu$ (S–C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1,29 (*s*, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2,58 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,93 (*d*, 1H,  $J$ = 15,83, CH<sub>eno</sub>); 7,17-7,27 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,46-7,49 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,56-7,59 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,75 (*d*, 1H,  $J$ = 15,83, CH<sub>eno</sub>); 7,8 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 12,62 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  18,41 (CH<sub>3</sub>); 31,35 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,1 (C<sub>terc</sub>); 119,05 (C<sub>Ar</sub>); 119,53 (C<sub>Ar</sub>); 123,96 (C<sub>eno</sub>); 126,39 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 127,07 (C<sub>q</sub>); 128,41 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 130,25 (C<sub>q</sub>); 131,81 (C<sub>q</sub>); 131,98 (C–CH<sub>3</sub>); 143,35 (C<sub>eno</sub>); 148,24 (C<sub>q</sub>); 153,94 (C<sub>Ar</sub>); 157,7 (C=O); 164,57 (C=N). C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>OS: 350,15 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 351,2 (100%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



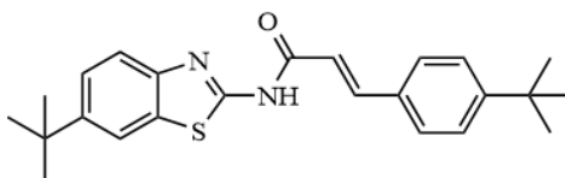
**(E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-N-(6-metilbenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (72)** – Rendimento: 64%; Aspecto: pó branco amorfo;  $R_F$ : 0,46;  $R_T$ : 4,28 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 228-229 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2955  $\nu$ (N–H); 1676  $\nu$ (C=O); 1621  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1062  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 983  $\nu$ (S–C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1,29 (*s*, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2,41 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,91 (*d*, 1H,  $J$ = 15,83, CH<sub>eno</sub>); 7,25 (*dd*, 1H,  $J$ = 8,05; 1,3, CH<sub>Ar</sub>); 7,44-7,5 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,57-7,65 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,74 (*d*, 2H, CH<sub>Ar</sub> e CH<sub>eno</sub>); 12,41 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  21,44 (CH<sub>3</sub>); 31,36 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,11 (C<sub>terc</sub>); 119,08 (C<sub>Ar</sub>); 120,63 (C<sub>Ar</sub>); 121,74 (C<sub>eno</sub>); 126,39 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 127,91 (C<sub>q</sub>); 128,44 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 131,98 (C<sub>q</sub>); 132,31 (C<sub>q</sub>); 133,47 (C–CH<sub>3</sub>); 143,29 (C<sub>eno</sub>); 147,14 (C<sub>q</sub>); 153,94 (C<sub>Ar</sub>); 157,7 (C=O); 164,53 (C=N). C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>OS: 350,15 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 351,2 (100%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



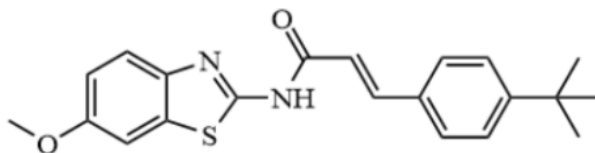
**(E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-N-(5,6-dimetilbenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (73)** – Rendimento: 68%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,36;  $R_T$ : 1,86 min; Grau de pureza: 97%;  $P_F$ : 139-140 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2963  $\nu(\text{N-H})$ ; 1662  $\nu(\text{C=O})$ ; 1613  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1048  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 979  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1,29 (*s*, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ); 2,32 (*d*, 6H,  $J=2,6$ ,  $(\text{CH}_3)_2$ ); 6,9 (*d*, 1H,  $J=15,83$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,48 (*d*, 2H,  $J=8,36$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,57 (*t*, 3H,  $J=7,26$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,7-7,76 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$  e  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 12,4 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  20,01 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ); 20,16 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ); 31,36 ( $\underline{\underline{\text{C}}}\text{H}_3$ ); 35,11 ( $\text{C}_{\text{terc}}$ ); 119,14 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 121,34 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 121,91 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,43 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,52 ( $\text{C}_q$ ); 131,99 ( $\underline{\text{C}}-\text{CH}_3$ ); 132,88 ( $\underline{\text{C}}-\text{CH}_3$ ); 135,26 ( $\text{C}_q$ ); 143,19 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 147,72 ( $\text{C}_q$ ); 153,91 ( $\text{C}_q$ ); 157,75 ( $\text{C=O}$ ); 164,42 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{OS}$ : 364,16 g/mol; LRMS ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 365,2 (100%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



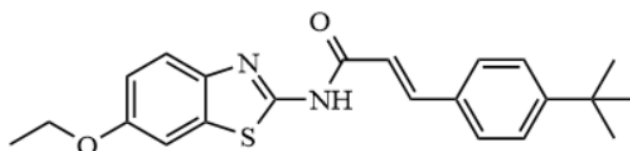
**(E)-N-(6-(*tert*-butil)benzo[d]tiazol-2-il)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)acrilamida (74)** – Rendimento: 69%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,56;  $R_T$ : 1,19 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 202-203 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2960  $\nu(\text{N-H})$ ; 1687  $\nu(\text{C=O})$ ; 1627  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1108  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 905  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1,29 (*s*, 12H,  $(\text{CH}_3)_6$ ); 1,30 (*s*, 6H,  $(\text{CH}_3)_2$ ); 6,89 (*d*, 1H,  $J=15,83$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,45-7,49 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,55-7,58 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,61 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,69 (*d*, 1H,  $J=15,55$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,94 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 8,45 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 10,12 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  31,36 ( $\underline{\underline{\text{C}}}\text{H}_3$ ); 31,90 ( $\underline{\underline{\text{C}}}\text{H}_3$ ); 34,12 ( $\text{C}_{\text{tert}}$ ); 35,12 ( $\text{C}_{\text{terc}}$ ); 119,71 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 120,24 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 123,68 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 124,24 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,37 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,38 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,36 ( $\text{C}_q$ ); 132,12 ( $\text{C}_q$ ); 145,74 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 146,67 ( $\underline{\text{C}}_q-\text{C}_{\text{terc}}$ ); 153,75 ( $\text{C}_q$ ); 157,43 ( $\underline{\text{C}}_q-\text{C}_{\text{terc}}$ ); 164,92 ( $\text{C=O}$ ); 173,25 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{OS}$ : 392,19 g/mol; LRMS ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 393,1 (100%); 206,2 (2,6%); 188,1 (6,7%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



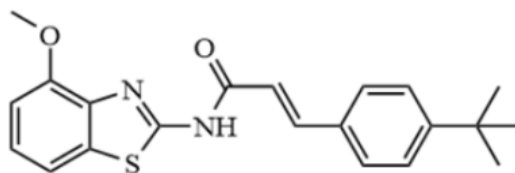
**(E)-3-(4-(*terc-butil*)fenil)-N-(6-metoxibenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (75)** – Rendimento: 73%; Aspecto: pó laranja pálido amorfo;  $R_F$ : 0,36;  $R_T$ : 2,92 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 221-222 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2950  $\nu(\text{N-H})$ ; 1683  $\nu(\text{C=O})$ ; 1626  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1060  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 993  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1,29 (*s*, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ); 3,81 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 6,9 (*d*, 1H,  $J= 15,73$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,03 (*dd*, 1H,  $J= 8,84$ ; 2,4,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,47-7,5 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,57-7,59 (*m*, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,65 (*d*, 1H,  $J= 8,84$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,74 (*d*, 1H,  $J= 15,73$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 12,42 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  31,36 ( $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ); 35,1 ( $\text{C}_{\text{terc}}$ ); 56,12 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ); 105,21 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 115,38 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 119,09 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 121,59 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 126,39 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,42 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 132,00 ( $\text{C}_q$ ); 133,49 ( $\text{C}_q$ ); 143,16 ( $\text{C}_q$ ); 143,29 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 153,9 ( $\text{C}_q$ ); 156,53 ( $\underline{\text{C}}-\text{OCH}_3$ ); 156,63 ( $\text{C=O}$ ); 164,39 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ : 366,14 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 367,2 (100%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



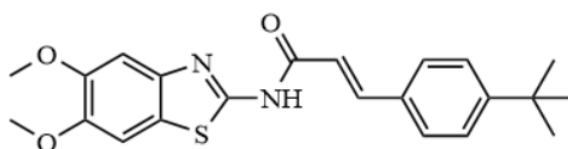
**(E)-3-(4-(*terc-butil*)fenil)-N-(6-etoxibenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (76)** – Rendimento: 86%; Aspecto: pó marrom intenso amorfo;  $R_F$ : 0,4;  $R_T$ : 4,05 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 216-217 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2949  $\nu(\text{N-H})$ ; 1673  $\nu(\text{C=O})$ ; 1602  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}}$ ); 1039  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 977  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1,29 (*s*, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ); 1,35 (*t*, 3H,  $J= 6,98$ ,  $\text{CH}_3$ ); 4,07 (*q*, 2H,  $J= 6,98$ ,  $\text{OCH}_2$ ); 6,9 (*d*, 1H,  $J= 15,73$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,02 (*dd*, 1H,  $J= 8,8$ ; 2,4,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,44-7,49 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,55-7,57 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,59 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,63 (*d*, 1H,  $J= 8,8$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,73 (*d*, 1H,  $J= 15,73$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,43 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  15,15 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ); 31,35 ( $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ); 35,1 ( $\text{C}_{\text{terc}}$ ); 64,07 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 105,84 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 115,74 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 119,7 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 121,58 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,39 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,42 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 132,0 ( $\text{C}_q$ ); 133,47 ( $\text{C}_q$ ); 143,15 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 143,2 ( $\text{C}_q$ ); 153,89 ( $\text{C}_q$ ); 155,84 ( $\underline{\text{C}}-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ); 156,5 ( $\text{C=O}$ ); 164,38 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ : 380,16 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 381,2 (100%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-N-(4-metoxibenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (77)** – Rendimento: 73%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,83;  $R_T$ : 2,99 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 199-200 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 2958  $\nu$ (N–H); 1678  $\nu$ (C=O); 1625  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1050  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 982  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,28 (*s*, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 3,92 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,86 (*d*, 1H, *J*= 15,83, CH<sub>eno</sub>); 6,99 (*d*, 1H, *J*= 8,0, CH<sub>Ar</sub>); 7,25 (*t*, 1H, *J*= 7,96, CH<sub>Ar</sub>); 7,49 (*t*, 3H, *J*= 8,02, CH<sub>Ar</sub>); 7,56 (*t*, 2H, *J*= 7,96, CH<sub>Ar</sub>); 7,75 (*d*, 1H, *J*= 15,83, CH<sub>eno</sub>); 12,66 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  31,34 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,09 (C<sub>terc</sub>); 56,29 (CH<sub>3</sub>); 108,14 (C<sub>Ar</sub>); 113,97 (C<sub>Ar</sub>); 118,97 (C<sub>eno</sub>); 124,99 (C<sub>Ar</sub>); 126,38 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 128,44 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 131,94 (C<sub>q</sub>); 133,52 (C<sub>q</sub>); 139,04 (C<sub>q</sub>); 143,33 (C<sub>eno</sub>); 152,30 (C<sub>q</sub>); 153,94 (C–OCH<sub>3</sub>); 157,0 (C=O); 164,44 (C=N). C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: 366,14 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 367,2 (100%).

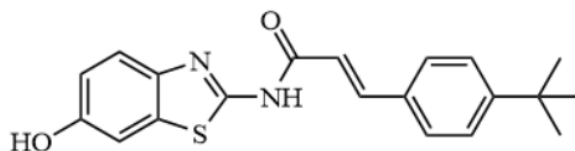
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-N-(5,6-dimetoxibenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (78)** – Rendimento: 70%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,46;  $R_T$ : 0,93 min; Grau de pureza: 99%;  $P_F$ : 130-131 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3158  $\nu$ (N–H); 1678  $\nu$ (C=O); 1628  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1039  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 852  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,35 (*s*, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 3,88 (*d*, 6H, *J*= 5,68, CH<sub>3</sub>); 6,97 (*d*, 1H, *J*= 15,73, CH<sub>eno</sub>); 7,37 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,46-7,55 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,58-7,68 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,66 (*d*, 1H, *J*= 15,7, CH<sub>eno</sub>); 12,45 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  31,36 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,1 (C<sub>terc</sub>); 56,19 (OCH<sub>3</sub>); 56,41 (OCH<sub>3</sub>); 103,94 (C<sub>Ar</sub>); 104,16 (C<sub>Ar</sub>); 119,11 (C<sub>q</sub>); 123,64 (C<sub>eno</sub>); 126,16 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 128,38 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 132,03 (C<sub>q</sub>); 142,98 (C<sub>eno</sub>); 143,19 (C<sub>q</sub>); 147,43 (C–OCH<sub>3</sub>); 149,39 (C–OCH<sub>3</sub>); 156,97 (C<sub>q</sub>); 164,11 (C=O); 168,13 (C=N). C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S: 396,15 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 397,1 (100%); 211,1 (1,7%).

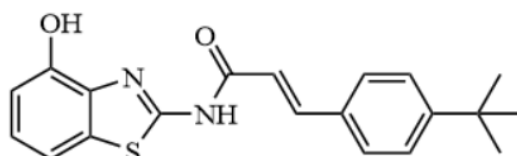
REFERÊNCIA: INÉDITA.





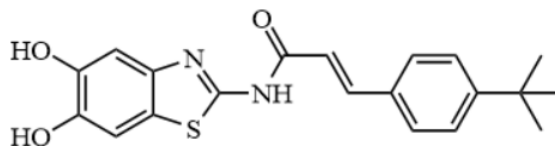
**(E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-N-(6-hidroxibenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (79)** – Rendimento: 99%; Aspecto: pó amarelo amorfo;  $R_F$ : 0,45;  $R_T$ : 1,44 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 168-169 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3152  $\delta$ (O–H); 2960  $\nu$ (N–H); 1682  $\nu$ (C=O); 1603  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1090  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 916  $\nu$ (S–C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1,28 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 6,87-6,92 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub> e CH<sub>eno</sub>); 7,3 (d, 1H,  $J$ = 2,23, CH<sub>Ar</sub>); 7,47 (d, 2H,  $J$ = 8,38, CH<sub>Ar</sub>); 7,54-7,59 (m, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,72 (d, 1H,  $J$ = 15,83, CH<sub>eno</sub>); 9,55 (br s, 1H, OH); 12,35 (br s, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  31,35 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,1 (C<sub>terc</sub>); 106,94 (C<sub>Ar</sub>); 115,72 (C<sub>Ar</sub>); 119,13 (C<sub>Ar</sub>); 121,58 (C<sub>eno</sub>); 126,38 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 128,39 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 132,01 (C<sub>q</sub>); 133,48 (C<sub>q</sub>); 142,22 (C<sub>eno</sub>); 142,99 (C<sub>q</sub>); 153,83 (C–C<sub>terc</sub>); 154,66 (C–OH); 155,59 (C=O); 164,24 (C=N). C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: 352,12 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 353,1 (100%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-N-(4-hidroxibenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (80)** – Rendimento: 98%; Aspecto: pó amarelo amorfo;  $R_F$ : 0,4;  $R_T$ : 2,1 min; Grau de pureza: 99%;  $P_F$ : 168-169 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3320  $\delta$ (O–H); 2962  $\nu$ (N–H); 1660  $\nu$ (C=O); 1618  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1021  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 948  $\nu$ (S–C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1,16 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 6,71 (d, 1H,  $J$ = 7,73, CH<sub>Ar</sub>); 6,77 (d, 1H,  $J$ = 15,83, CH<sub>eno</sub>); 6,98 (t, 1H,  $J$ = 7,9, CH<sub>Ar</sub>); 7,25 (d, 1H,  $J$ = 7,89, CH<sub>Ar</sub>); 7,34-7,4 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,44-7,47 (m, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,62 (d, 1H,  $J$ = 15,81, CH<sub>eno</sub>); 9,68 (br s, 1H, OH); 12,44 (br s, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  31,36 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; 35,11 (C<sub>terc</sub>); 111,78 (C<sub>Ar</sub>); 112,29 (C<sub>Ar</sub>); 118,94 (C<sub>eno</sub>); 125,02 (C<sub>Ar</sub>); 126,4 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 128,42 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 131,99 (C<sub>q</sub>); 133,82 (C<sub>q</sub>); 138,5 (C<sub>eno</sub>); 143,18 (C<sub>q</sub>); 150,43 (C–C<sub>terc</sub>); 153,89 (C–OH); 156,08 (C=O); 164,40 (C=N). C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: 352,12 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 353,2 (100%); 187,1 (1,5%).

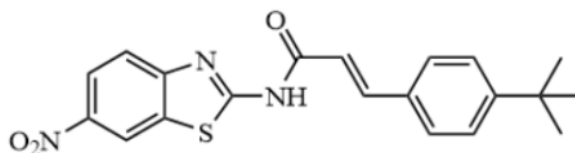
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-N-(5,6-di-hidroxi-benzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (81) –**

Rendimento: 99%; Aspecto: pó marrom amorfo;  $R_F$ : 0,38;  $R_T$ : 1,14 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 183-184 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3191  $\delta$ (O–H); 1680  $\nu$ (C=O); 1621  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1106  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 985  $\nu$ (S–C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1,61 (*s*, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 7,2 (*d*, 2H,  $J$ = 15,83, CH<sub>eno</sub>); 7,42 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,56 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,75-7,81 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,87-7,87 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 8,02 (*d*, 1H,  $J$ = 15,83, CH<sub>eno</sub>); 12,62 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  31,60 ((C<sub>H</sub>3)<sub>3</sub>); 35,34 (C<sub>terc</sub>); 107,08 (C<sub>Ar</sub>); 119,45 (C<sub>eno</sub>); 122,81 (C<sub>Ar</sub>); 126,41 (C<sub>Ar</sub>); 126,62 (C<sub>Ar</sub>); 128,59 (C<sub>Ar</sub>); 128,73 (C<sub>Ar</sub>); 132,29 (C<sub>q</sub>); 142,64 (C–OH); 143,02 (C–OH); 144,6 (C<sub>eno</sub>); 154,01 (C<sub>q</sub>); 156,28 (C–C<sub>terc</sub>); 164,16 (C=O); 168,37 (C=N). C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S: 368,12 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 369,1 (100%); 131,0 (1,1%).

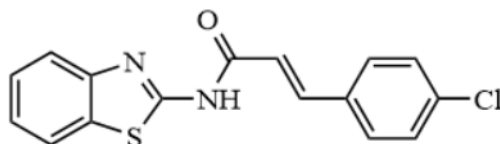
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-N-(6-nitro-benzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (82) –**

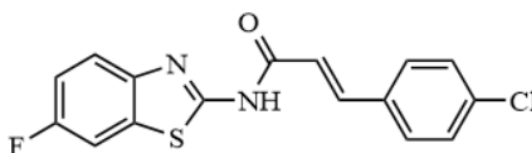
Rendimento: 68%; Aspecto: pó amarelo intenso amorfo;  $R_F$ : 0,38;  $R_T$ : 3,74 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 185-186 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2954  $\nu$ (N–H)<sub>s</sub>; 1678  $\nu$ (C=O); 1605  $\nu$ (C=C); 1048  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 992  $\nu$ (S–C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1,26 (*s*, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 7,11 (*d*, 1H,  $J$ = 15,36, CH<sub>eno</sub>); 7,37-7,47 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,57-7,66 (*m*, 3H, CH<sub>eno</sub> e CH<sub>Ar</sub>); 7,9 (*d*, 1H,  $J$ = 8,94, CH<sub>Ar</sub>); 8,08 (*dd*, 1H,  $J$ = 8,98 e 2,1, CH<sub>Ar</sub>); 12,69 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  31,38 ((C<sub>H</sub>3)<sub>3</sub>); 35,50 (C<sub>terc</sub>); 117,29 (C<sub>Ar</sub>); 118,08 (C<sub>eno</sub>); 119,59 (C<sub>Ar</sub>); 121,3 (C<sub>Ar</sub>); 125,97 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 128,20 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 132,03 (C<sub>q</sub>); 132,76 (C<sub>q</sub>); 141,10 (C<sub>eno</sub>); 142,36 (C–NO<sub>2</sub>); 152,68 (C–C<sub>terc</sub>); 159,05 (C<sub>q</sub>); 166,08 (C=O); 172,24 (C=N). C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S: 381,11 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 382,1 (100%); 187,2 (1,8%); 131,2 (1,4%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



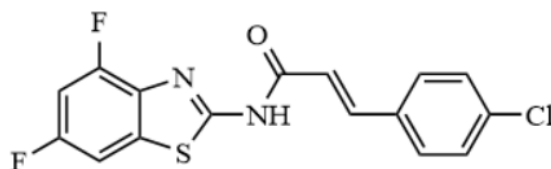
**(E)-N-(benzo[d]thiazol-2-yl)-3-(4-clorofenil)acrilamida (83)** – Rendimento: 95%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,72;  $R_T$ : 1,67 min; Grau de pureza: 99%;  $P_F$ : 289-290 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3160  $\nu(\text{N-H})_s$ ; 1687  $\nu(\text{C=O})$ ; 1625  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1091  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 987  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  6,95 (*d*, 1H,  $J= 15,37$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,31 (*t*, 1H,  $J= 7,46$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,44 (*t*, 1H,  $J= 7,46$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,52-7,58 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,67-7,70 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,75-7,81 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$  e  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,99 (*d*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,63 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  120,61 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 121,02 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 122,2 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 124,09 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,64 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,64 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,29 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 132,13 ( $\text{C}_q$ ); 133,59 ( $\text{C}_q$ ); 135,45 ( $\text{C}-\text{Cl}$ ); 142,19 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 149,10 ( $\text{C}_q$ ); 158,48 ( $\text{C=O}$ ); 164,34 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{OS}$ : 314,03 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 315,0 (100%); 224,0 (1,2%); 151,0 (4,6%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



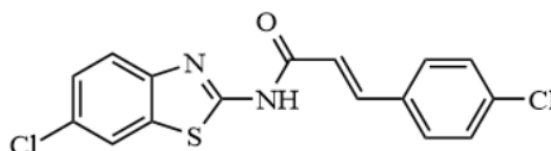
**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl)acrilamida (84)** – Rendimento: 65%; Aspecto: pó marrom pálido amorfo;  $R_F$ : 0,32;  $R_T$ : 1,41 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 237-238 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3085  $\nu(\text{N-H})_s$ ; 1692  $\nu(\text{C=O})$ ; 1615  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1109  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 943  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  6,94 (*d*, 1H,  $J= 15,92$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,31 (*dd*, 1H,  $J= 9,03$  e  $2,32$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,52-7,58 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,6 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,67-7,7 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,74-7,79 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$  e  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 12,65 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  122,07 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 122,19 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 127,8 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,38 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,65 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,29 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,39 ( $\text{C}-\text{F}$ ); 133,58 ( $\text{C}_q$ ); 133,67 ( $\text{C}_q$ ); 135,47 ( $\text{C}-\text{Cl}$ ); 142,98 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 145,85 ( $\text{C}_q$ ); 160,74 ( $\text{C=O}$ ); 164,4 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{ClFN}_2\text{OS}$ : 332,02 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 333,1 (100%); 300,0 (2,5%); 266,1 (1,02%); 164,9 (2,05%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



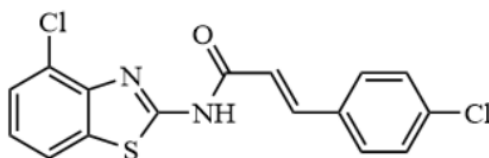
**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(4,6-difluorobenzothiazol-2-il)acrilamida (85)** – Rendimento: 61%;  
 Aspecto: pó marrom amorfo;  $R_F$ : 0,42;  $R_T$ : 1,43 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 271-272 °C.  
 ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3190  $\nu(\text{N-H})$ ; 1678  $\nu(\text{C=O})$ ; 1628  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1012  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ;  
 940  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  6,89 (*d*, 1H,  $J=15,92$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,36 (*dd*, 1H,  $J=$   
 10,26 e 2,02,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,51-7,58 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,63-7,69 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,77-7,82 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$   
 e  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 12,91 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  104,79 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 105,09 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ );  
 117,32 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 120,23 ( $\text{C}_q$ ); 129,64 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,32 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 131,35 ( $\text{C}_q$ ); 133,22 ( $\text{C}_q$ );  
 133,48 ( $\underline{\text{C}}-\text{Cl}$ ); 135,55 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 142,54 ( $\underline{\text{C}}-\text{F}$ ); 147,18 ( $\underline{\text{C}}-\text{F}$ ); 159,07 ( $\text{C}=\text{N}$ ); 164,53 ( $\text{C}=\text{O}$ ).  
 $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{ClF}_2\text{N}_2\text{OS}$ : 350,01 g/mol; LRMS ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 351,0 (100%); 165,0 (6,3%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



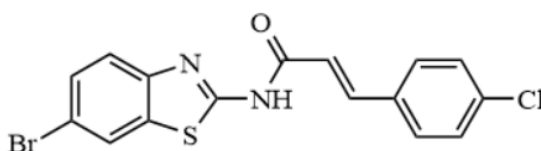
**(E)-N-(6-clorobenzothiazol-2-il)-3-(4-clorofenil)acrilamida (86)** – Rendimento: 45%;  
 Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,45;  $R_T$ : 2,68 min; Grau de pureza: 98%;  $P_D$ : 298-299  
 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3066  $\nu(\text{N-H})_s$ ; 1684  $\nu(\text{C=O})$ ; 1624  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1098  
 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 988  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  6,94 (*d*, 1H,  $J=15,37$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,46  
 (*dd*, 1H,  $J=8,61$  e 1,72,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,52-7,55 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,67-7,70 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,73 (*s*, 1H,  
 $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,79 (*d*, 1H,  $J=15,46$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 8,13 (*d*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,71 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75  
 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  120,39 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 121,92 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 122,23 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,98 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,12 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ );  
 129,66 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,32 ( $\text{C}_q$ ); 133,54 ( $\underline{\text{C}}-\text{Cl}$ ); 133,85 ( $\underline{\text{C}}-\text{Cl}$ ); 135,52 ( $\text{C}_q$ ); 142,43 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ );  
 148,02 ( $\text{C}_q$ ); 159,34 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 164,48 ( $\text{C}=\text{N}$ ).  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{OS}$ : 347,99 g/mol; LRMS ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z$   
 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 349,0 (100%); 184,9 (1,5%); 164,9 (5,1%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



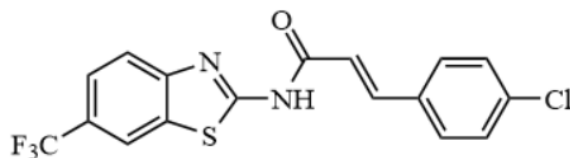
**(E)-N-(4-clorobenzo[d]tiazol-2-il)-3-(4-clorofenil)acrilamida (87)** – Rendimento: 89%; Aspecto: pó rosa pálido amorfo;  $R_F$ : 0,37;  $R_T$ : 2,6 min; Grau de pureza: 97%;  $P_F$ : 150-151 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3181  $\nu(\text{N-H})$ ; 1692  $\nu(\text{C=O})$ ; 1624  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1010  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 955  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  6,93 (*d*, 1H,  $J=15,8$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,30 (*t*, 1H,  $J=7,82$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,54 (*d*, 3H,  $J=8,51$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,68 (*d*, 2H,  $J=8,56$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,81 (*d*, 1H,  $J=15,83$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,99 (*dd*, 1H,  $J=7,82$  e  $0,72$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 13,06 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  120,41 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 121,36 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 124,81 ( $\underline{\text{C}}-\text{Cl}$ ); 124,88 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,67 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,67 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,31 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 133,53 ( $\text{C}_q$ ); 133,77 ( $\text{C}_q$ ); 135,53 ( $\underline{\text{C}}-\text{Cl}$ ); 142,48 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 146,04 ( $\text{C}_q$ ); 159,77 ( $\text{C=O}$ ); 164,62 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{OS}$ : 347,99 g/mol; LRMS ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 349,0 (100%); 184,9 (2,7%); 165,0 (5,6%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



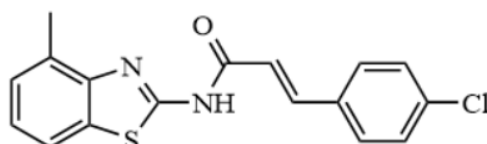
**(E)-N-(6-bromobenzo[d]tiazol-2-il)-3-(4-clorofenil)acrilamida (88)** – Rendimento: 75%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,58;  $R_T$ : 3,0 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 284-285 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2953  $\nu(\text{N-H})$ ; 1683  $\nu(\text{C=O})$ ; 1624  $\nu(\text{CH}_{\text{eno}})$ ; 1056  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 939  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  6,94 (*d*, 1H,  $J=15,83$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,32 (*dd*, 1H,  $J=8,52$  e  $2,04$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,57 (*d*, 2H,  $J=8,94$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,69 (*d*, 2H,  $J=8,94$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,79 (*d*, 1H,  $J=15,83$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,87 (*d*, 1H,  $J=2,04$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 8,27 (*d*, 1H,  $J=2,04$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,68 (*s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  115,47 ( $\underline{\text{C}}-\text{Br}$ ); 119,42 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 122,16 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 124,24 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,16 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,11 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,57 ( $\text{C}_q$ ); 133,91 ( $\text{C}_q$ ); 134,19 ( $\underline{\text{C}}-\text{Cl}$ ); 143,18 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 148,45 ( $\text{C}_q$ ); 158,82 ( $\text{C=O}$ ); 164,32 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{BrClN}_2\text{OS}$ : 391,94 g/mol; LRMS ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ) 392,99 (100%); 352,4 (2,6%); 279,1 (3,0%); 251,0 (1,2%); 164,9 (4,7%); 122,1 (0,7%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



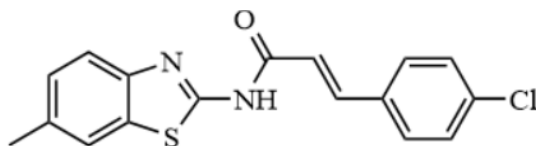
**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(6-(trifluorometil)benzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (89)** – Rendimento: 42%; Aspecto: pó marrom pálido amorfo;  $R_F$ : 0,75;  $R_T$ : 3,13 min; Grau de pureza: 96%;  $P_F$ : 231-232 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3496  $\nu(\text{N-H})_s$ ; 1625  $\nu(\text{C=O})$ ; 1614  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1094  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 939  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  6,96 (*d*, 1H,  $J = 15,92$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,52-7,55 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,68-7,72 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,76 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,81 (*d*, 1H,  $J = 15,96$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,9-7,93 (*m*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 8,51 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,86 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  120,3 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 121,43 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 123,44 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 123,99 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 124,42 ( $\text{C}_{\text{CF}_3}$ ); 129,66 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,35 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 131,34 ( $\text{C}-\text{CF}_3$ ); 132,7 ( $\text{C}_q$ ); 133,5 ( $\text{C}_q$ ); 135,59 ( $\text{C}-\text{Cl}$ ); 142,69 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 151,87 ( $\text{C}_q$ ); 161,73 ( $\text{C=O}$ ); 164,69 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{OS}$ : 382,02 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 383,0 (100%); 164,9 (2,3%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



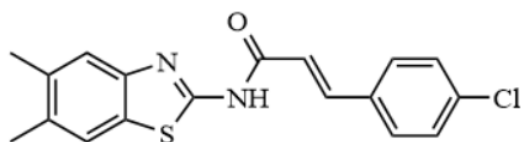
**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(4-metilbenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (90)** – Rendimento: 48%; Aspecto: pó branco amorfo;  $R_F$ : 0,35;  $R_T$ : 2,53 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 210-211 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2972  $\nu(\text{N-H})$ ; 1652  $\nu(\text{C=O})$ ; 1616  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1092  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 940  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  2,58 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 6,96 (*d*, 1H,  $J = 15,92$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,18-7,27 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,54 (*d*, 2H,  $J = 8,45$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,67 (*d*, 2H,  $J = 8,47$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,75-7,81 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$  e  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 12,73 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  18,44 ( $\text{C}_{\text{CH}_3}$ ); 119,58 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 120,67 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 124,02 ( $\text{C}_q$ ); 127,09 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,65 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,23 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,28 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 131,8 ( $\text{C}-\text{CH}_3$ ); 133,62 ( $\text{C}-\text{Cl}$ ); 135,4 ( $\text{C}_q$ ); 142,03 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 148,22 ( $\text{C}_q$ ); 157,69 ( $\text{C=O}$ ); 164,28 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{OS}$ : 328,04 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 329,1 (100%); 165,0 (3,2%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



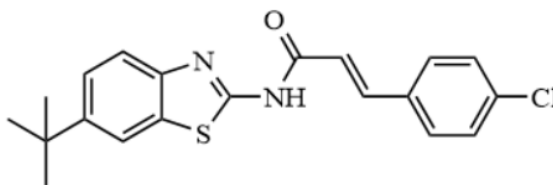
**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(6-metilbenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (91)** – Rendimento: 74%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,32;  $R_T$ : 4,01 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 289-290 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2920  $\nu$ (N–H); 1683  $\nu$ (C=O); 1625  $\nu$ ( $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 1068  $\nu$ ( $\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 985  $\nu$ (S–C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  2,41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 6,95 (d, 1H,  $J=15,83$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,25 (dd, 1H,  $J=8,19$  e 1,2,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,52-7,55 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,62 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,65-7,69 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,74-7,79 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,54 (s, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  21,47 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ); 120,68 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 121,78 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 124,61 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 127,95 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,64 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,25 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 132,28 ( $\text{C}_q$ ); 133,55 ( $\text{C}_q$ ); 133,62 ( $\underline{\text{C}}-\text{Cl}$ ); 135,4 ( $\underline{\text{C}}-\text{CH}_3$ ); 141,99 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 147,1 ( $\text{C}_q$ ); 157,6 (C=O); 164,2 (C=N).  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{OS}$ : 328,04 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 329,1 (100%); 165,2 (3,8%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



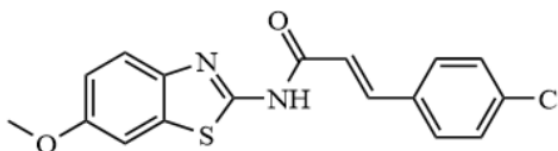
**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(5,6-dimetilbenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (92)** – Rendimento: 85%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,37;  $R_T$ : 5,28 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 265-266 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2983  $\nu$ (N–H); 1666  $\nu$ (C=O); 1625  $\nu$ ( $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 1044  $\nu$ ( $\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 940  $\nu$ (S–C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  2,31 (d, 6H,  $J=2,98$ , ( $\text{CH}_3$ ) $_2$ ); 6,92 (d, 1H,  $J=15,83$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,51-7,54 (m, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,66-7,77 (m, 4H, ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ) $_3$  e  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 12,51 (s, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  20,04 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ); 20,18 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ); 120,7 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 121,37 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 121,92 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,5 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,63 ( $\text{C}_q$ ); 130,11 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,24 ( $\text{C}_q$ ); 132,98 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 133,62 ( $\underline{\text{C}}-\text{Cl}$ ); 135,31 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 135,38 ( $\underline{\text{C}}-\text{CH}_3$ ); 141,90 ( $\underline{\text{C}}-\text{CH}_3$ ); 147,68 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 157,53 ( $\text{C}_q$ ); 159,35 (C=O); 164,1 (C=N).  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{OS}$ : 342,06 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 343,2 (100%); 179,2 (2,0%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(6-(*tert*-butil)benzo[d]tiazol-2-il)-3-(4-clorofenil)acrilamida (93)** – Rendimento: 95%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,42;  $R_T$ : 1,63 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 227-228 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2959  $\nu$ (N–H); 1685  $\nu$ (C=O); 1627  $\nu$ (CH<sub>eno</sub>); 1016  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 979  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,33 (*s*, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 6,94 (*d*, 1H, *J*= 15,83, CH<sub>eno</sub>); 7,45-7,54 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,66-7,69 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,77 (*d*, 1H, *J*= 15,83, CH<sub>eno</sub>); 7,99 (*d*, 1H, *J*= 1,76, CH<sub>Ar</sub>); 12,54 (*s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  31,88 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 35,15 (C<sub>terc</sub>); 118,26 (C<sub>Ar</sub>); 120,42 (C<sub>eno</sub>); 120,71 (C<sub>Ar</sub>); 124,41 (C<sub>Ar</sub>); 129,38 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 129,64 (C<sub>q</sub>); 130,25 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 132,17 (C<sub>q</sub>); 133,63 (C–Cl); 135,4 (C<sub>q</sub>); 142,01 (C<sub>eno</sub>); 146,99 (C–C<sub>terc</sub>); 158,01 (C=O); 164,18 (C=N). C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>OS: 370,09 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 371,2 (100%).

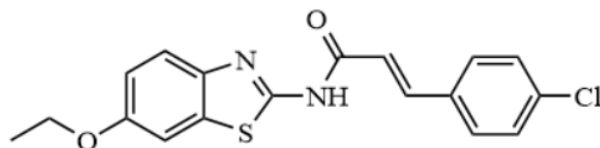
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(6-metoxibenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (94)** – Rendimento: 68%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,78;  $R_T$ : 2,45 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 245-246 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2933  $\nu$ (N–H); 1685  $\nu$ (C=O); 1627  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1031  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 945  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  3,8 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,93 (*d*, 1H, *J*= 15,73, CH<sub>eno</sub>); 7,03 (*d*, 1H, *J*= 8,38, CH<sub>Ar</sub>); 7,52-7,58 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,64-7,69 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,76 (*d*, 1H, *J*= 15,64, CH<sub>eno</sub>); 12,5 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  56,09 (OCH<sub>3</sub>); 105,18 (C<sub>Ar</sub>); 115,44 (C<sub>Ar</sub>); 120,7 (C<sub>Ar</sub>); 121,64 (C<sub>eno</sub>); 129,64 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 130,24 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 133,47 (C<sub>q</sub>); 133,65 (C–Cl); 135,37 (C<sub>q</sub>); 141,87 (C<sub>eno</sub>); 143,24 (C<sub>q</sub>); 156,41 (C–OCH<sub>3</sub>); 156,65 (C=O); 164,06 (C=N). C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: 344,04 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 345,1 (100%); 181,2 (1,9%).

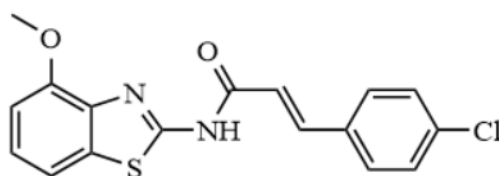
REFERÊNCIA: INÉDITA.





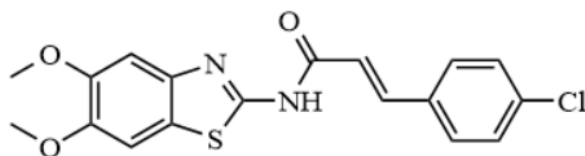
**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(6-etoxibenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (95)** – Rendimento: 77%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,32;  $R_T$ : 2,13 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 264-265 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2927  $\nu(\text{N-H})$ ; 1684  $\nu(\text{C=O})$ ; 1634  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1065  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 947  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1,34 (*t*, 3H,  $J=1,34$ ,  $\text{CH}_3$ ); 4,06 (*q*, 2H,  $J=6,92$ ,  $\text{CH}_2$ ); 6,93 (*d*, 1H,  $J=15,92$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,02 (*dd*, 1H,  $J=8,84$  e  $2,42$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,52-7,57 (*m*, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,62 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,65-7,69 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,76 (*d*, 1H,  $J=15,83$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 12,49 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  15,16 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ); 64,06 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 105,82 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 115,79 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 120,70 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 121,63 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,38 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,64 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,24 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,4 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 133,46 ( $\text{C}_q$ ); 133,65 ( $\text{C}_q$ ); 135,37 ( $\underline{\text{C}}-\text{Cl}$ ); 141,86 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 143,15 ( $\text{C}_q$ ); 155,88 ( $\underline{\text{C}}-\text{O}$ ); 156,37 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 164,05 ( $\text{C}=\text{N}$ ).  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ : 358,05 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 359,1 (100%); 195,0 (1,6%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



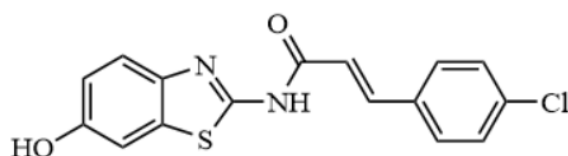
**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(4-metoxibenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (96)** – Rendimento: 55%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,6;  $R_T$ : 2,75 min; Grau de pureza: 97%;  $P_F$ : 212-213 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3234  $\nu(\text{N-H})$ ; 1669  $\nu(\text{C=O})$ ; 1625  $\nu(\text{CH}_{\text{eno}})$ ; 1086  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 958  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  3,92 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 6,89 (*d*, 1H,  $J=15,83$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,0 (*d*, 1H,  $J=7,91$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,26 (*t*, 1H,  $J=7,96$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,51-7,55 (*m*, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,68 (*d*, 2H,  $J=8,47$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,78 (*d*, 1H,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 12,77 (*s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  56,28 ( $\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ); 108,13 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 113,99 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 120,59 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 125,07 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,63 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,27 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 133,5 ( $\text{C}_q$ ); 133,59 ( $\text{C}_q$ ); 135,42 ( $\underline{\text{C}}-\text{Cl}$ ); 139,0 ( $\underline{\text{C}}-\text{OCH}_3$ ); 142,03 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 152,32 ( $\text{C}_q$ ); 156,91 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 164,12 ( $\text{C}=\text{N}$ ).  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ : 344,04 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 345,1 (100%); 266,2 (10,7%); 181,2 (1,9%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



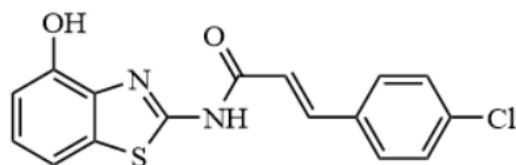
**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(5,6-dimetoxibenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (97)** – Rendimento: 85%; Aspecto: pó amarelo amorfo;  $R_F$ : 0,41;  $R_T$ : 1,2 min; Grau de pureza: 96%;  $P_F$ : 219-220 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3085  $\nu(\text{N-H})$ ; 1691  $\nu(\text{C=O})$ ; 1614  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1010  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 942  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  3,82 (*d*, 6H,  $J=6,05$ ,  $(\text{CH}_3)_2$ ); 6,95 (*d*, 1H,  $J=15,73$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,31 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,52-7,52 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,6 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,65-7,7 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,74 (*d*, 1H,  $J=15,73$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 12,46 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  56,19 ( $\text{OCH}_3$ ); 56,4 ( $\text{OCH}_3$ ); 103,93 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 104,14 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 120,53 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 124,95 ( $\text{C}_q$ ); 129,38 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,2 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 133,67 ( $\text{C}_q$ ); 135,67 ( $\text{C-Cl}$ ); 141,68 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 142,98 ( $\text{C}_q$ ); 147,48 ( $\text{C-OCH}_3$ ); 149,41 ( $\text{C-OCH}_3$ ); 163,79 ( $\text{C=O}$ ); 167,89 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$ : 374,05 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 375,1 (100%); 209,1 (1,7%); 167,2 (0,92%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



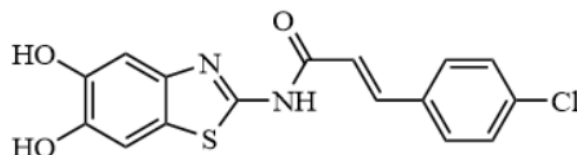
**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(6-hidroxibenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (98)** – Rendimento: 95%; Aspecto: pó amarelo amorfo;  $R_F$ : 0,31;  $R_T$ : 0,89 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 222-223 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3286  $\delta(\text{O-H})$ ; 2919  $\nu(\text{N-H})$ ; 1685  $\nu(\text{C=O})$ ; 1630  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1050  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 973  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7,25-7,32 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$  e  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,67 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,89-7,95 (*m*, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 8,05 (*d*, 2H,  $J=7,91$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 8,12 (*d*, 1H,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 9,94 (*br s*, 1H, OH); 12,79 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  106,96 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 115,77 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 120,79 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 121,63 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 129,63 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,21 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 133,48 ( $\text{C}_q$ ); 133,67 ( $\text{C}_q$ ); 135,32 ( $\text{C-Cl}$ ); 141,7 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 142,21 ( $\text{C}_q$ ); 154,71 ( $\text{C-OH}$ ); 155,51 ( $\text{C=O}$ ); 163,93 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ : 330,02 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 331,1 (100%); 167,0 (3,6%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



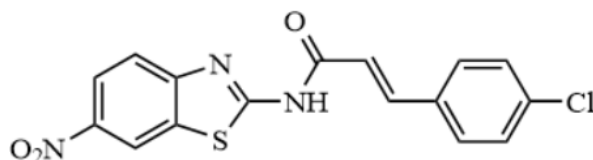
**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(4-hidroxi benzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (99)** – Rendimento: 93%; Aspecto: pó amarelo amorfo;  $R_F$ : 0,32;  $R_T$ : 1,17 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 222-223 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3320  $\delta$ (O–H); 2969  $\nu$ (N–H); 1683  $\nu$ (C=O); 1625  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1050  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 934  $\nu$ (S–C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,84 (*d*, 1H,  $J=7,73$ , CH<sub>Ar</sub>); 6,93 (*d*, 1H,  $J=15,92$ , CH<sub>eno</sub>); 7,11 (*t*, 1H,  $J=7,8$ , CH<sub>Ar</sub>); 7,38 (*d*, 1H,  $J=7,82$ , CH<sub>Ar</sub>); 7,54 (*d*, 2H,  $J=7,91$ , CH<sub>Ar</sub>); 7,68 (*d*, 2H,  $J=8$ , CH<sub>Ar</sub>); 7,77 (*d*, 1H,  $J=15,92$ , CH<sub>eno</sub>); 9,81 (*br s*, 1H, OH); 12,63 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  111,8 (C<sub>Ar</sub>); 112,31 (C<sub>Ar</sub>); 120,74 (C<sub>eno</sub>); 125,1 (C<sub>Ar</sub>); 129,65 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 130,25 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 133,64 (C<sub>q</sub>); 133,81 (C<sub>q</sub>); 135,37 (C–Cl); 138,48 (C<sub>eno</sub>); 141,88 (C<sub>q</sub>); 150,47 (C–OH); 155,99 (C=O); 164,09 (C=N). C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: 330,02 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 331,1 (100%); 252,1 (2,4%); 167,0 (6,4%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



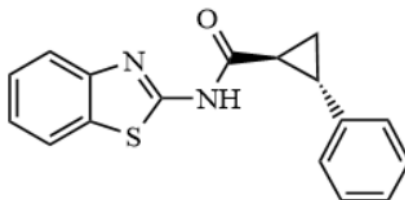
**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(5,6-diidroxi benzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (100)** – Rendimento: 91%; Aspecto: pó amarelo amorfo;  $R_F$ : 0,31;  $R_T$ : 1,17 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 219-220 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3320  $\delta$ (O–H); 2921  $\nu$ (N–H); 1664  $\nu$ (C=O); 1620  $\nu$ (C=C<sub>eno</sub>); 1050  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 973  $\nu$ (S–C). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,67 (*d*, 1H, CH<sub>eno</sub>); 6,86 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 6,99 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,23-7,3 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,36 (*br s*, 1H, OH); 7,41-7,51 (*m*, 3H, (CH<sub>Ar</sub>)<sub>2</sub> e CH<sub>eno</sub>); 8,93 (*br s*, 1H, OH); 12,1 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  107,16 (C<sub>Ar</sub>); 107,24 (C<sub>Ar</sub>); 121,23 (C<sub>eno</sub>); 122,98 (C<sub>q</sub>); 129,73 (C<sub>Ar</sub>); 129,97 (C<sub>Ar</sub>); 130,52 (C<sub>q</sub>); 130,75 (C–Cl); 134,06 (C<sub>Ar</sub>); 135,61 (C–OH); 141,83 (C<sub>eno</sub>); 144,77 (C–OH); 146,42 (C–OH); 156,28 (C<sub>q</sub>); 163,95 (C=O); 168,24 (C=N). C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S: 346,02 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 347,1 (100%); 165,0 (4,1%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



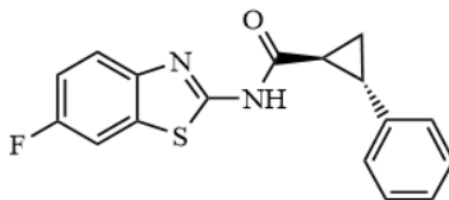
**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(6-nitrobenzo[d]tiazol-2-il)acrilamida (101)** – Rendimento: 68%;  
 Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,52;  $R_T$ : 3,48 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 138-139 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2947  $\nu(\text{N-H})$ ; 1685  $\nu(\text{C=O})$ ; 1621  $\nu(\text{CH}_{\text{eno}})$ ; 1051  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 912  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,95 (*d*, 1H,  $J= 15,83$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,54 (*d*, 2H,  $J= 8,47$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,70 (*d*, 2H,  $J= 8,47$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,83 (*d*, 1H,  $J= 15,83$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,9 (*d*, 1H,  $J= 9,03$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 8,28 (*dd*, 1H,  $J= 8,98$  e  $2,42$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 9,06 (*d*, 1H,  $J= 2,42$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 13,04 (*s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  119,53 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 120,21 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 121,05 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 122,26 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,68 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,40 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 132,88 ( $\text{C}_q$ ); 133,45 ( $\underline{\text{C}}-\text{Cl}$ ); 135,67 ( $\text{C}_q$ ); 142,97 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 143,42 ( $\underline{\text{C}}-\text{NO}_2$ ); 154,13 ( $\text{C}_q$ ); 158,44 ( $\text{C=O}$ ); 164,17 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}$ : 359,01 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 360,1 (100%); 165,2 (7,3%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



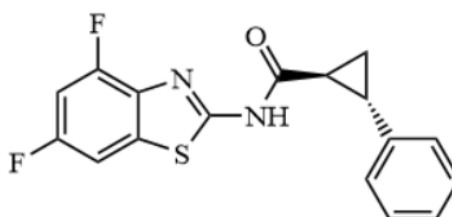
**(E)-N-(benzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (102)** – Rendimento: 60%;  
 Aspecto: pó marrom pálido cristalino;  $R_F$ : 0,9;  $R_T$ : 1,33 min; Grau de pureza: 97%;  $P_F$ : 216-217 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3233  $\nu(\text{N-H})$ ; 3062  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 1649  $\nu(\text{C=O})$ ; 1077  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 972  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1,29-1,42 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,05-2,1 (*m*, 1H,  $\text{CH}_{\text{ciclo}}$ ); 2,32-2,36 (*m*, 1H,  $\text{CH}_{\text{ciclo}}$ ); 6,98-7,02 (*m*, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,06-7,12 (*m*, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,21 (*td*, 1H,  $J= 1,21$ ; 0,8,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,52 (*d*, 1H,  $J= 7,91$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,75 (*d*, 1H,  $J= 7,54$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,42 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  17,12 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 25,96 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{ciclo}}$ ); 26,82 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{ciclo}}$ ); 120,99 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 122,13 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 123,98 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,57 ( $(\text{C}_{\text{Ar}})_3$ ); 126,89 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,9 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 131,93 ( $\text{C}_q$ ); 140,43 ( $\text{C}_q$ ); 148,99 ( $\text{C}_q$ ); 158,24 ( $\text{C=O}$ ); 171,51 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{OS}$ : 294,08 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 295,1 (100%); 151,2 (3,5%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



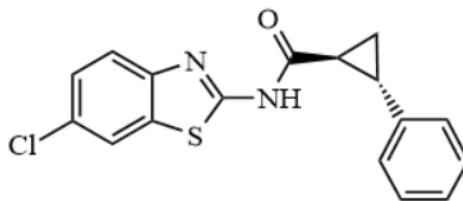
**(E)-N-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (103)** – Rendimento: 71%; Aspecto: pó marrom pálido cristalino;  $R_F$ : 0,65;  $R_T$ : 1,48 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 220-221 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3129  $\nu$ (N-H); 3040  $\nu$ (CH<sub>2</sub>); 1684  $\nu$ (C=O); 1078  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 948  $\nu$ (S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,5-1,63 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,25-2,31 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 2,53-2,57 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 7,19-7,23 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,26-7,33 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,73 (*dd*, 1H, *J*= 8,86; 4,7, CH<sub>Ar</sub>); 7,88 (*dd*, 1H, *J*= 8,75; 4,7, CH<sub>Ar</sub>), 12,64 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  17,1 (CH<sub>2</sub>); 25,94 (CH<sub>ciclo</sub>); 26,84 (CH<sub>ciclo</sub>); 108,41 (C<sub>Ar</sub>); 114,45 (C<sub>Ar</sub>); 121,98 (C<sub>Ar</sub>); 126,58 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 126,88 (C<sub>Ar</sub>); 128,89 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 133,13 (C<sub>q</sub>); 133,27 (C<sub>q</sub>); 140,44 (C<sub>q</sub>); 145,73 (C-F); 158,3 (C=O); 171,6 (C=N). C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>2</sub>OS: 312,07 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 313,1 (100%); 169,2 (2,5%); 145,1 (1,6%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



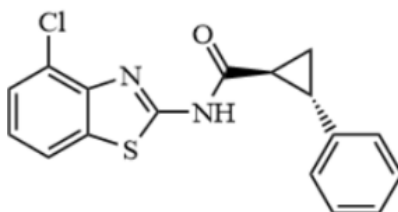
**(E)-N-(4,6-difluorobenzo[d]thiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (104)** – Rendimento: 82%; Aspecto: pó branco amorfo;  $R_F$ : 0,52;  $R_T$ : 3,21 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 260-261 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3253  $\nu$ (N-H); 3064  $\nu$ (CH<sub>2ciclo</sub>); 1682  $\nu$ (C=O); 1085  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 990  $\nu$ (S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,53 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,22-2,27 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 2,54-2,59 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 7,19-7,23 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,28-7,40 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,79 (*dd*, 1H, *J*= 8,33 e 1,72, CH<sub>Ar</sub>); 12,93 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  17,25 (CH<sub>2</sub>); 25,93 (CH<sub>ciclo</sub>); 27,01 (CH<sub>ciclo</sub>); 102,37 (C<sub>Ar</sub>); 104,79 (C<sub>Ar</sub>); 126,6 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 126,93 (C<sub>Ar</sub>); 128,91 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 128,98 (C<sub>Ar</sub>); 135,32 (C<sub>q</sub>); 140,32 (C<sub>Ar</sub>); 156,86 (C-F); 158,88 (C-F); 171,74 (C=O); 176,5 (C=N). C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>OS: 330,06 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 331,2 (100%); 187,1 (2,2%); 145,3 (3,0%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



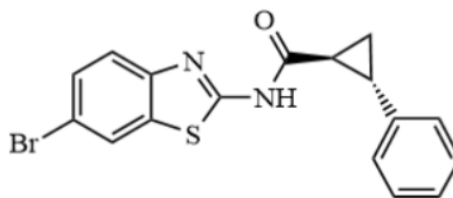
**(E)-N-(6-clorobenzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (105)** – Rendimento: 80%; Aspecto: pó marrom pálido cristalino;  $R_F$ : 0,65;  $R_T$ : 2,11 min; Grau de pureza: 97%.  $P_F$ : 239-240 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3152  $\nu$ (N–H); 3064  $\nu$ (CH<sub>2</sub>); 1689  $\nu$ (C=O); 1078  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 971  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,51 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,26-2,31 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 2,53-2,58 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 7,19-7,23 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,28-7,33 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,44 (*dd*, 1H, *J* = 8,56; 2,1, CH<sub>Ar</sub>); 7,72 (*d*, 1H, *J* = 8,66, CH<sub>Ar</sub>); 8,11 (*d*, 1H, *J* = 2,04, CH<sub>Ar</sub>); 12,71 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  17,16 (CH<sub>2</sub>); 25,99 (CH<sub>ciclo</sub>); 26,95 (CH<sub>ciclo</sub>); 121,88 (C<sub>Ar</sub>); 122,18 (C<sub>Ar</sub>); 126,59 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 126,9 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 127,99 (C–Cl); 128,9 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 133,67 (C<sub>q</sub>); 140,4 (C<sub>q</sub>); 147,91 (C<sub>q</sub>); 159,12 (C=O); 171,69 (C=N). C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>OS: 328,04 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 329,1 (100%); 185,1 (1,4%); 145,2 (1,9%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



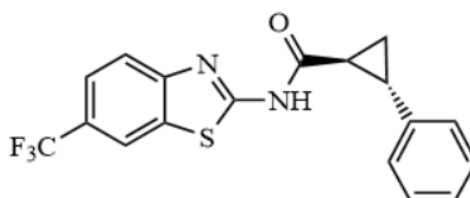
**(E)-N-(4-clorobenzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (106)** – Rendimento: 78%; Aspecto: pó branco amorfo;  $R_F$ : 0,46;  $R_T$ : 3,31 min; Grau de pureza: 97%;  $P_F$ : 124-125 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3542  $\nu$ (N–H); 2925  $\nu$ (CH<sub>2ciclo</sub>); 1668  $\nu$ (C=O); 1051  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 996  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,52 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,25-2,31 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 2,53-2,59 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 7,19-7,23 (*m*, 4H, CH<sub>Ar</sub>); 7,26-7,33 (*m*, 4H, CH<sub>Ar</sub>); 7,52 (*d*, 1H, *J* = 7,91, CH<sub>Ar</sub>); 7,96 (*d*, 1H, *J* = 7,9, CH<sub>Ar</sub>); 13,09 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  17,34 (CH<sub>2</sub>); 25,87 (CH<sub>ciclo</sub>); 27,00 (CH<sub>ciclo</sub>); 121,32 (C<sub>Ar</sub>); 124,81 (C<sub>Ar</sub>); 124,85 (C<sub>Ar</sub>); 126,37 (C<sub>Ar</sub>); 126,62 (C<sub>Ar</sub>); 126,92 (C<sub>q</sub>); 128,82 (C<sub>Ar</sub>); 128,91 (C<sub>q</sub>); 133,54 (C<sub>q</sub>); 140,34 (C<sub>Ar</sub>); 140,7 (C<sub>q</sub>); 145,89 (C–Cl); 159,37 (C=O); 171,79 (C=N). C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>OS: 328,04 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 329,1 (100%); 185,2 (3,5%); 145,3 (1,1%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



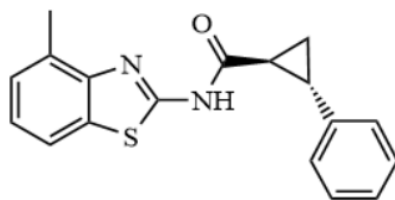
**(E)-N-(6-bromobenzo[d]thiazol-2-yl)-2-phenilciclopropanocarboxamida (107)** – Rendimento: 78%; Aspecto: pó marrom escuro cristalino;  $R_F$ : 0,92;  $R_T$ : 2,33 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 219-220 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3126  $\nu$ (N-H); 3086  $\nu$ (CH<sub>2</sub>); 1691  $\nu$ (C=O); 1084  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 972  $\nu$ (S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,51-1,64 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,26-2,31 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 2,53-2,58 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 7,19-7,23 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,28-7,34 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,55 (*dd*, 1H, *J* = 8,56; 1,9, CH<sub>Ar</sub>); 7,65 (*d*, 1H, *J* = 8,56, CH<sub>Ar</sub>); 8,24 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 12,72 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  17,17 (CH<sub>2</sub>); 25,97 (CH<sub>ciclo</sub>); 26,97 (CH<sub>ciclo</sub>); 115,88 (C-Br); 122,6 (C<sub>Ar</sub>); 124,7 (C<sub>Ar</sub>); 126,59 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 126,9 (C<sub>Ar</sub>); 128,89 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 129,57 (C<sub>q</sub>); 134,17 (C<sub>q</sub>); 140,38 (C<sub>Ar</sub>); 148,21 (C<sub>q</sub>); 159,06 (C=O); 171,69 (C=N). C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>2</sub>OS: 371,99 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 373,0 (100%); 229,0 (1,7%); 145,2 (1,4%).

REFERÊNCIA: (MACKINNON et al., 2013).



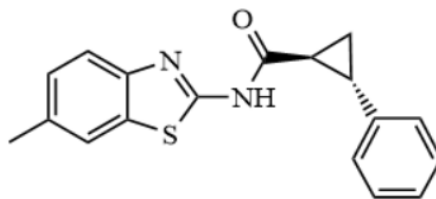
**(E)-2-phenil-N-(6-(trifluorometil)benzo[d]thiazol-2-yl)ciclopropanocarboxamida (108)** – Rendimento: 67%; Aspecto: pó marrom escuro amorfo;  $R_F$ : 0,48;  $R_T$ : 2,35 min; Grau de pureza: 99%;  $P_F$ : 167-168 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3362  $\nu$ (N-H); 3140  $\nu$ (CH<sub>2</sub>); 1694  $\nu$ (C=O); 1081  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 964  $\nu$ (S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,53-1,66 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,18-2,34 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 2,53-2,6 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 7,15-7,33 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,42-7,55 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,9 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 8,09 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 8,47 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 12,8 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  17,27 (CH<sub>2</sub>); 26,07 (CH<sub>ciclo</sub>); 27,11 (CH<sub>ciclo</sub>); 117,94 (C<sub>Ar</sub>); 121,34 (CF<sub>3</sub>); 126,34 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 126,6 (C<sub>Ar</sub>); 126,91 (C<sub>Ar</sub>); 128,7 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 128,89 (C<sub>q</sub>); 131,97 (C-CH<sub>3</sub>); 132,54 (C<sub>q</sub>); 140,36 (C<sub>Ar</sub>); 151,82 (C<sub>q</sub>); 156,32 (C=O); 172,02 (C=N). C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>OS: 362,07 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 363,1 (100%); 145,2 (1,8%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(4-metilbenzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (109)** – Rendimento: 66%; Aspecto: pó marrom pálido cristalino;  $R_F$ : 0,7;  $R_T$ : 1,92 min; Grau de pureza: 97%;  $P_F$ : 110-111 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3500  $\nu$ (N-H); 2923  $\nu$ (CH<sub>2</sub>); 1654  $\nu$ (C=O); 1078  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 969  $\nu$ (S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,48-1,62 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,27-2,33 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 2,55 (*s*, 4H, CH<sub>3</sub> e CH<sub>ciclo</sub>); 7,16-7,23 (*m*, 5H, CH<sub>Ar</sub>); 7,25-7,33 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,77 (*d*, 1H, *J*= 7,26, CH<sub>Ar</sub>); 12,75 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  17,15 (CH<sub>2</sub>); 18,41 (CH<sub>3</sub>); 25,79 (CH<sub>ciclo</sub>); 26,73 (CH<sub>ciclo</sub>); 119,51 (C<sub>Ar</sub>); 123,92 (C<sub>q</sub>); 126,6 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 126,86 (C<sub>Ar</sub>); 127,06 (C<sub>Ar</sub>); 128,9 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 130,26 (C-CH<sub>3</sub>); 131,58 (C<sub>q</sub>); 140,46 (C<sub>Ar</sub>); 148,07 (C<sub>q</sub>); 157,41 (C=O); 171,45 (C=N). C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>OS: 308,09 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 309,1 (100%); 165,2 (2,1%).

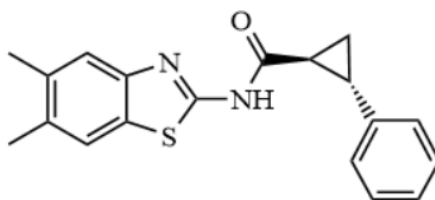
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(6-metilbenzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (110)** – Rendimento: 61%; Aspecto: pó rosa pálido amorfo;  $R_F$ : 0,37;  $R_T$ : 1,71 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 223-224 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3125  $\nu$ (N-H); 3031  $\nu$ (CH<sub>2</sub>); 1686  $\nu$ (C=O); 1081  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 970  $\nu$ (S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,48-1,62 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,25-2,31 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 2,4 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,52-2,56 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 7,19-7,24 (*m*, 4H, CH<sub>Ar</sub>); 7,28-7,32 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,61 (*d*, 1H, *J*= 8,19, CH<sub>Ar</sub>); 7,74 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 12,53 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  17,01 (CH<sub>2</sub>); 21,42 (CH<sub>3</sub>); 25,92 (CH<sub>ciclo</sub>); 26,73 (CH<sub>ciclo</sub>); 120,63 (C<sub>Ar</sub>); 121,72 (C<sub>Ar</sub>); 126,59 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 126,86 (C<sub>Ar</sub>); 127,85 (C<sub>q</sub>); 128,88 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 132,1 (C<sub>q</sub>); 133,41 (C-CH<sub>3</sub>); 140,48 (C<sub>Ar</sub>); 146,99 (C<sub>q</sub>); 157,38 (C=O); 171,33 (C=N). C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>OS: 308,1 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 309,1 (100%); 165,2 (0,8%).

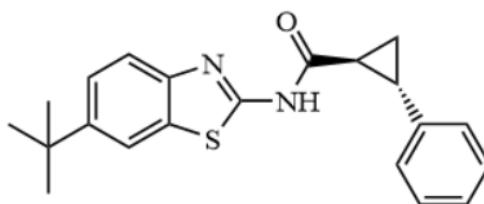
REFERÊNCIA: INÉDITA.





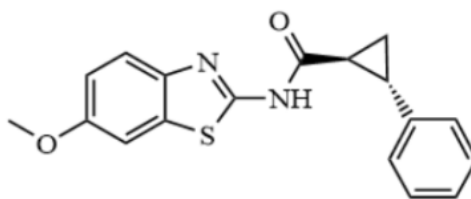
**(E)-N-(5,6-dimetilbenzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (111)** – Rendimento: 84%; Aspecto: pó lilás pálido amorfo;  $R_F$ : 0,48;  $R_T$ : 2,11 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 194-195 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3175  $\nu(\text{N-H})$ ; 3065  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 1685  $\nu(\text{C=O})$ ; 1082  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 982  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1,47-1,61 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,24-2,28 (*m*, 1H,  $\text{CH}_{\text{ciclo}}$ ); 2,3 (*s*, 6H,  $(\text{CH}_3)_2$ ); 2,52-2,55 (*m*, 1H,  $\text{CH}_{\text{ciclo}}$ ); 7,18-7,23 (*m*, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,27-7,32 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,52 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,68 (*s*, 1H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,51 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  16,95 ( $\underline{\text{CH}}_2$ ); 19,98 ( $\underline{\text{CH}}_3$ ); 20,14 ( $\underline{\text{CH}}_3$ ); 25,9 ( $\underline{\text{CH}}_{\text{ciclo}}$ ); 26,68 ( $\underline{\text{CH}}_{\text{ciclo}}$ ); 121,37 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 121,86 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,59 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,84 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,88 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,3 ( $\text{C}_q$ ); 132,79 ( $\underline{\text{C}}-\text{CH}_3$ ); 135,17 ( $\text{C}_q$ ); 140,5 ( $\underline{\text{C}}-\text{CH}_3$ ); 147,57 ( $\text{C}_q$ ); 157,32 ( $\text{C=O}$ ); 171,21 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OS}$ : 322,11 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 323,1 (100%); 179,1 (1,3%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



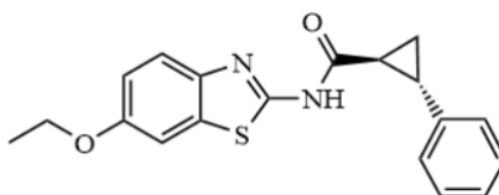
**(E)-N-(6-(terc-butil)benzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (112)** – Rendimento: 62%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo;  $R_F$ : 0,49;  $R_T$ : 3,58 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 118-119 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2958  $\nu(\text{N-H})$ ; 2867  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 1687  $\nu(\text{C=O})$ ; 1078  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 932  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1,33 (*s*, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ); 1,49-1,63 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{2\text{ciclo}}$ ); 2,25-2,31 (*m*, 1H,  $\text{CH}_{\text{ciclo}}$ ); 2,53-2,57 (*m*, 1H,  $\text{CH}_{\text{ciclo}}$ ); 7,19-7,23 (*m*, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,26-7,33 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,47 (*dd*, 1H,  $J= 8,61$  e  $2,01$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,64 (*d*, 1H,  $J= 8,47$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,95 (*d*, 1H,  $J= 1,76$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,54 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  17,04 ( $\underline{\text{CH}}_2$ ); 25,97 ( $\text{CH}_{\text{ciclo}}$ ); 26,72 ( $\text{CH}_{\text{ciclo}}$ ); 31,88 ( $(\underline{\text{CH}}_3)_3$ ); 35,13 ( $\text{C}_{\text{terc}}$ ); 118,19 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 120,39 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 124,33 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,37 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,57 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,87 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,87 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,89 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 131,97 ( $\text{C}_q$ ); 140,49 ( $\text{C}_q$ ); 146,86 ( $\underline{\text{C}}-\text{C}_{\text{terc}}$ ); 157,78 ( $\text{C}_q$ ); 171,30 ( $\text{C=O}$ ); 178,14 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{OS}$ : 350,15 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 351,2 (100%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(6-metoxibenzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (113)** – Rendimento: 68%; Aspecto: pó marrom pálido cristalino;  $R_F$ : 0,81;  $R_T$ : 1,26 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 178-179 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3250  $\nu(\text{N-H})$ ; 3067  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 1672  $\nu(\text{C=O})$ ; 1060  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 967  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1,48-1,62 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,24-2,29 (*m*, 1H,  $\text{CH}_{\text{ciclo}}$ ); 2,52-2,56 (*m*, 1H,  $\text{CH}_{\text{ciclo}}$ ); 3,8 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 7,01 (*dd*, 1H,  $J= 8,75; 2,37$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,18-7,23 (*m*, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,27-7,32 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,55 (*d*, 1H,  $J= 2,23$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,76 (*d*, 1H,  $J= 8,84$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,49 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  16,97 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 25,91 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{ciclo}}$ ); 26,65 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{ciclo}}$ ); 56,09 ( $\text{CH}_3$ ); 105,16 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 115,34 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 121,34 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,57 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,85 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,89 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 133,25 ( $\text{C}_q$ ); 140,51 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 143,09 ( $\text{C}_q$ ); 156,23 ( $\underline{\text{C}}-\text{OCH}_3$ ); 156,58 ( $\text{C=O}$ ); 171,18 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ : 324,09 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 325,1 (100%); 181,1 (2,4%).

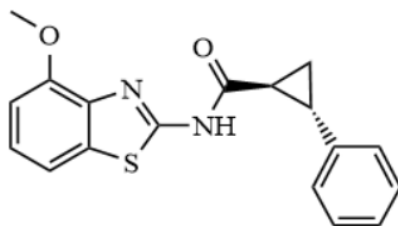
REFERÊNCIA: (PEI et al., 2016).



**(E)-N-(6-etoxibenzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (114)** – Rendimento: 81%; Aspecto: pó rosa pálido cristalino;  $R_F$ : 0,36;  $R_T$ : 1,63 min; Grau de pureza: 96%;  $P_F$ : 178-179 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3136  $\nu(\text{N-H})$ ; 3089  $\nu(\text{CH}_2)$ ; 1689  $\nu(\text{C=O})$ ; 1044  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 969  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1,34 (*t*, 3H,  $J= 6,9$ ,  $\text{CH}_3$ ); 1,47-1,62 (*m*, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,24-2,3 (*m*, 1H,  $\text{CH}_{\text{ciclo}}$ ); 2,52-2,56 (*m*, 1H,  $\text{CH}_{\text{ciclo}}$ ); 4,06 (*q*, 2H,  $J= 6,92$ ,  $\text{OCH}_2$ ); 7,00 (*dd*, 1H,  $J= 8,8; 2,42$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,18-7,23 (*m*, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,28-7,32 (*m*, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,53 (*d*, 1H,  $J= 2,42$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,6 (*d*, 1H,  $J= 8,75$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,46 (*br s*, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  15,16 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ); 16,96 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 25,88 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{ciclo}}$ ); 26,64 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{ciclo}}$ ); 64,07 ( $\text{OCH}_2$ ); 105,85 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 115,69 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 121,57 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,57 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,84 ( $\text{C}_q$ ); 128,88 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ );

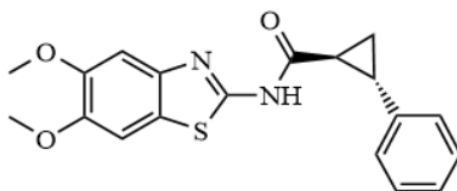
133,25 (C<sub>q</sub>); 140,51 (C<sub>Ar</sub>); 143,26 (C<sub>q</sub>); 155,81 (C–OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 156,21 (C=O); 171,17 (C=N).  
C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: 338,11 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 339,1 (100%); 195,1 (2,3%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(4-metoxibenzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (115)** – Rendimento: 61%; Aspecto: pó marrom pálido cristalino; R<sub>F</sub>: 0,75; R<sub>T</sub>: 1,30 min; Grau de pureza: 96%; P<sub>F</sub>: 193-194 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3244 ν(N–H); 3034 ν(CH<sub>2</sub>); 1685 ν(C=O); 1042 ν(C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 966 ν(S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1,5-1,62 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,19-2,24 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 2,53-2,57 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 3,9 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,98 (*d*, 1H, *J*= 7); 7,19-7,23 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,24-7,27 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,51 (*d*, 1H, *J*= 7,91, CH<sub>Ar</sub>); 12,75 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 17,06 (CH<sub>2</sub>); 25,98 (CH<sub>ciclo</sub>); 26,70 (CH<sub>ciclo</sub>); 56,23 (CH<sub>3</sub>); 108,13 (C<sub>Ar</sub>); 113,95 (C<sub>Ar</sub>); 124,94 (C<sub>Ar</sub>); 126,59 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 126,87 (C<sub>Ar</sub>); 128,90 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 133,29 (C<sub>Ar</sub>); 138,84 (C<sub>q</sub>); 140,45 (C<sub>q</sub>); 152,3 (C–OCH<sub>3</sub>); 156,68 (C=O); 171,25 (C=N). C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: 324,09 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 325,1 (100%); 181,1 (2,1%).

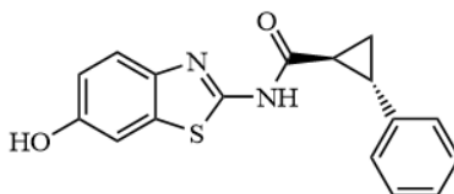
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(5,6-dimetoxibenzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (116)** – Rendimento: 59%; Aspecto: pó marrom pálido cristalino; R<sub>F</sub>: 0,67; R<sub>T</sub>: 1,02 min; Grau de pureza: 98%; P<sub>F</sub>: 184-185 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3543 ν(N–H); 3128 ν(CH<sub>2</sub>); 1672 ν(C=O); 1068 ν(C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 963 ν(S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1,47-1,61 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,25-2,31 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 2,52-2,54 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 3,8 (*d*, 6H, *J*= 3,63, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 7,18-7,23 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,28-7,32 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,53 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 12,44 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 16,93 (CH<sub>2</sub>); 25,87 (CH<sub>ciclo</sub>); 26,59 (CH<sub>ciclo</sub>); 56,19 (CH<sub>3</sub>); 56,43 (CH<sub>3</sub>); 104,02 (C<sub>Ar</sub>); 104,19 (C<sub>Ar</sub>); 123,33 (C<sub>q</sub>); 126,55 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 126,84 (C<sub>Ar</sub>); 128,89 (C<sub>Ar</sub>–

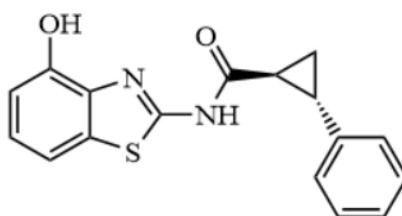
$C_{Ar}$ ); 140,54 ( $C_q$ ); 142,99 ( $C_q$ ); 147,38 ( $C-OCH_3$ ); 149,34 ( $C-OCH_3$ ); 156,74 ( $C=O$ ); 170,92 ( $C=N$ ).  $C_{19}H_{18}N_2O_3S$ : 354,1 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ( $[M+H]^+$ ) 355,1 (100%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(6-hidroxibenzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (117)** – Rendimento: 98%; Aspecto: pó amarelo amorfo;  $R_F$ : 0,65;  $R_T$ : 0,79 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 161-162 °C. ATR-IV (transmitância/ $cm^{-1}$ ): 3179  $\delta$ (O-H); 2965  $\nu$ (N-H); 2852  $\nu$ (CH<sub>2</sub>); 1675  $\nu$ (C=O); 1196  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 957  $\nu$ (S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  3,0-3,28 (*m*, 4H, CH<sub>2</sub> e (CH<sub>ciclo</sub>)<sub>2</sub>); 6,17 (*s*, 1H, OH); 7,21 (*dd*, 1H, *J*= 8,7 e 2,46, CH<sub>Ar</sub>); 7,63-7,67 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,69 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,72-7,77 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,83 (*d*, 1H, *J*= 8,86, CH<sub>Ar</sub>); 9,95 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  28,51 (CH<sub>ciclo</sub>); 30,08 (CH<sub>ciclo</sub>); 62,6 (CH<sub>2</sub>); 106,97 (C<sub>Ar</sub>); 115,69 (C<sub>Ar</sub>); 122,06 (C<sub>Ar</sub>); 125,83 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 127,71 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 129,14 (C<sub>Ar</sub>); 133,37 (C<sub>q</sub>); 141,68 (C<sub>q</sub>); 142,04 (C<sub>q</sub>); 153,61 (C-OH); 154,85 (C=O); 174,99 (C=N).  $C_{17}H_{14}N_2O_2S$ : 310,08 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ( $[M+H]^+$ ) 311,1 (100%).

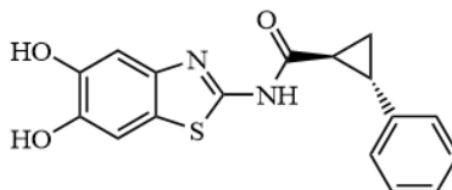
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(4-hidroxibenzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (118)** – Rendimento: 88%; Aspecto: pó amarelo amorfo;  $R_F$ : 0,61;  $R_T$ : 0,92 min; Grau de pureza: 96%;  $P_F$ : 243-244 °C. ATR-IV (transmitância/ $cm^{-1}$ ): 3429  $\delta$ (O-H); 3029  $\nu$ (N-H); 2968  $\nu$ (CH<sub>2</sub>); 1710  $\nu$ (C=O); 1087  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 937  $\nu$ (S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  2,57-2,387 (*m*, 4H, CH<sub>2</sub> e (CH<sub>ciclo</sub>)<sub>2</sub>); 5,87 (*s*, 1H, OH); 6,78 (*dd*, 1H, *J*= 7,83 e 0,72, CH<sub>Ar</sub>); 7,09 (*t*, 1H, *J*= 7,92, CH<sub>Ar</sub>); 7,21-7,27 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,31-7,37 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 9,71 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  28,51 (CH<sub>ciclo</sub>); 30,13 (CH<sub>ciclo</sub>); 62,46 (CH<sub>2</sub>); 111,86 (C<sub>Ar</sub>); 112,26 (C<sub>Ar</sub>); 125,44 (C<sub>Ar</sub>); 126,04 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 127,76 (C<sub>Ar</sub>); 129,1 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 133,58 (C<sub>q</sub>); 137,86 (C<sub>q</sub>); 141,87 (C<sub>q</sub>); 150,53 (C-

OH); 153,97 (C=O); 175,11 (C=N). C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: 310,08 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 311,1 (100%).

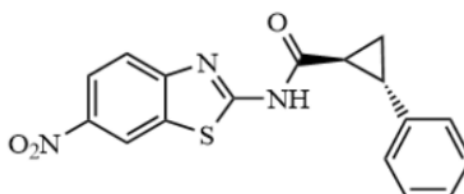
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(5,6-dihidrobenzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (119) –**

Rendimento: 99%; Aspecto: pó amarelo amorfo; R<sub>F</sub>: 0,63; R<sub>T</sub>: 0,66 min; Grau de pureza: 96%; P<sub>F</sub>: 288-289 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3187  $\delta$ (O–H); 1671  $\nu$ (C=O); 1058  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 923  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  2,54-2,84 (*m*, 4H, CH<sub>2</sub> e (CH<sub>ciclo</sub>)<sub>2</sub>); 5,74-5,79 (*m*, 2H, (OH)<sub>2</sub>); 6,93 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,21-7,25 (*m*, 4H, CH<sub>Ar</sub>); 7,3-7,35 (*m*, 3H, (CH<sub>Ar</sub>)<sub>2</sub> e NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  28,5 (CH<sub>ciclo</sub>); 30,07 (CH<sub>ciclo</sub>); 62,52 (CH<sub>2</sub>); 106,79 (C<sub>Ar</sub>); 107,3 (C<sub>Ar</sub>); 122,42 (C<sub>Ar</sub>); 125,85 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 127,69 (C<sub>q</sub>); 129,11 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 141,95 (C<sub>q</sub>); 142,14 (C–OH); 144,53 (C–OH); 145,98 (C<sub>q</sub>); 154,07 (C=O); 174,62 (C=N). C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S: 326,07 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 327,1 (100%).

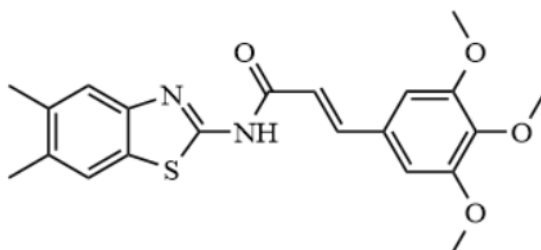
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(6-nitrobenzo[d]tiazol-2-il)-2-fenilciclopropanocarboxamida (120) –** Rendimento: 52%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo; R<sub>F</sub>: 0,61; R<sub>T</sub>: 1,48 min; Grau de pureza: 95%; P<sub>F</sub>: 240-241 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3350  $\nu$ (N–H); 3068  $\nu$ (CH<sub>2</sub>); 1690  $\nu$ (C=O); 1047  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 940  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,55-1,67 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,29-2,35 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 2,55-2,62 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 7,2-7,23 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,28-7,33 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,87 (*d*, 1H, *J*= 8,94, CH<sub>Ar</sub>); 8,26 (*dd*, 1H, *J*= 8,8; 2,28, CH<sub>Ar</sub>); 9,03 (*d*, 1H, *J*= 2,23, CH<sub>Ar</sub>); 13,03 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  17,41 (CH<sub>2</sub>); 26,05 (CH<sub>ciclo</sub>); 27,36 (CH<sub>ciclo</sub>); 119,46 (C<sub>Ar</sub>); 121,03 (C<sub>Ar</sub>); 122,2 (C<sub>Ar</sub>); 126,63 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 126,96 (C<sub>Ar</sub>); 128,9 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 132,72 (C<sub>q</sub>); 140,25 (C<sub>q</sub>); 143,42 (C–NO<sub>2</sub>); 153,97 (C<sub>q</sub>); 163,75 (C=N); 172,19 (C=O).

$C_{17}H_{13}N_3O_3S$ : 339,07 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 340,1 (100%); 196,0 (1,6%); 145,2 (3,1%).

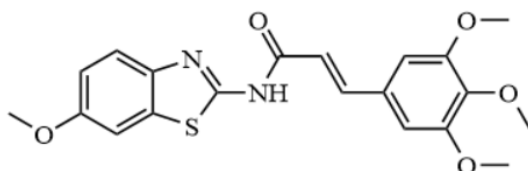
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-N-(5,6-dimetilbenzo[d]tiazol-2-il)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilamida (121)** –

Rendimento: 68%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo; R<sub>F</sub>: 0,52; R<sub>T</sub>: 2,85 min; Grau de pureza: 96%; P<sub>F</sub>: 242-243 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 2948  $\nu$ (N–H); 1686  $\nu$ (C=O); 1669  $\nu$ (CH<sub>eno</sub>); 1049  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 998  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  2,31 (*d*, 6H, *J*= 2,51, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3,71 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,84 (*s*, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6,9 (*d*, 1H, *J*= 15,73, CH<sub>eno</sub>); 6,99 (*s*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,55 (*s*, 1H, CH<sub>Ar</sub>); 7,68-7,73 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub> e CH<sub>eno</sub>); 12,37 (*s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  20,03; (CH<sub>3</sub>); 20,19 (CH<sub>3</sub>); 56,39 ((OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 60,62 (OCH<sub>3</sub>); 106,16 (C<sub>Ar</sub>); 106,2 (C<sub>Ar</sub>); 119,29 (C<sub>eno</sub>); 121,37 (C<sub>Ar</sub>); 121,9 (C<sub>Ar</sub>); 129,51 (C<sub>q</sub>); 130,28 (C–CH<sub>3</sub>); 132,87 (C<sub>q</sub>); 135,26 (C–CH<sub>3</sub>); 139,98 (C–OCH<sub>3</sub>); 143,41 (C<sub>eno</sub>); 147,71 (C<sub>q</sub>); 153,52 ((C–OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 164,35 (C=O); 168,19 (C=N). C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S: 398,13 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  ([M+H]<sup>+</sup>) 399,2 (100%); 221,2 (2,0%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



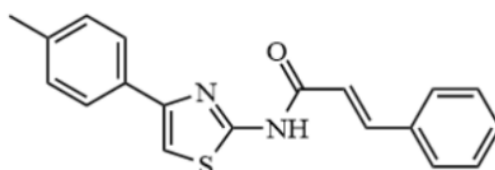
**(E)-N-(6-metoxibenzo[d]tiazol-2-il)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilamida (122)** – Rendimento: 65%; Aspecto: pó amarelo pálido amorfo; R<sub>F</sub>: 0,82; R<sub>T</sub>: 1,51 min; Grau de pureza: 99%; P<sub>F</sub>: 136-137 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 2934  $\nu$ (N–H); 1675  $\nu$ (C=O); 1607  $\nu$ (CH<sub>eno</sub>); 1000  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 907  $\nu$ (S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  3,71 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,81 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,84 (*s*, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6,9 (*d*, 1H, *J*= 15,73, CH<sub>eno</sub>); 7,0 (*s*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,03 (*dd*, 1H, *J*= 8,84; 2,42, CH<sub>Ar</sub>); 7,58 (*d*, 1H, *J*= 2,32; CH<sub>Ar</sub>); 7,65 (*d*, 1H, *J*= 8,84, CH<sub>Ar</sub>); 7,71 (*d*, 1H, *J*=

15,8, CH<sub>eno</sub>); 12,34 (*s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 55,94 (OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 57,23 (OCH<sub>3</sub>); 60,17 (OCH<sub>3</sub>); 105,56 (C<sub>Ar</sub>); 105,75 (C<sub>Ar</sub>); 118,84 (C<sub>Ar</sub>); 120,92 (C<sub>Ar</sub>); 121,45 (C<sub>eno</sub>); 129,06 (C<sub>q</sub>); 129,83 (C<sub>q</sub>); 132,42 (C<sub>Ar</sub>); 134,8 (C<sub>Ar</sub>); 139,53 (C–O); 142,96 (C<sub>eno</sub>); 147,26 (C<sub>q</sub>); 153,06 (C–O)<sub>2</sub>; 157,09 (C–O); 163,9 (C=O); 167,74 (C=N). C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S: 400,11 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 401,2 (100%); 221,2 (2,2%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.

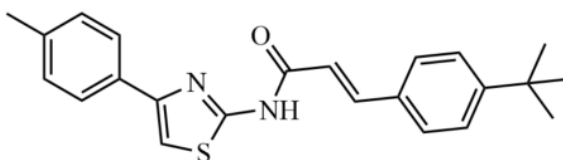
#### 4.5.4 Acoplamento do 4-(*p*-toluil)-2-aminotiazol aos ácidos cinâmicos e ao ácido *trans*-fenilciclopropanocarboxílico

Os procedimentos experimentais para obtenção dos derivados (**123-126**) são idênticos aos descritos na seção referente à síntese dos derivados não-halogenados de 2-aminobenzo[*d*]tiazóis com os correspondentes ácidos carboxílicos. Entretanto, há uma diferença quando à purificação destes. Após o término da reação, o produto foi lavado e filtrado com uma solução saturada NaHCO<sub>3</sub> (3 x 10 mL) e H<sub>2</sub>O destilada (3 x 25 mL), rendendo o produto impuro. Então, uma recristalização utilizando-se etanol e H<sub>2</sub>O destilada (2:1) foi realizada, resultando no produto purificado (ZHANG et al., 2009).



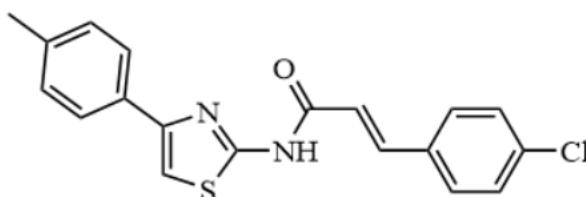
**(E)-N-(4-(*p*-tolil)tiazol-2-il)cinamamida (123)** – Rendimento: 71%; Aspecto: pó laranja pálido amorfo; R<sub>F</sub>: 0,48; R<sub>T</sub>: 2,07 min; Grau de pureza: 95%; P<sub>F</sub>: 154-155 °C. ATR-IV (transmitância/cm<sup>-1</sup>): 3025 ν(N–H); 1696 ν(C=O); 1675 ν(C=C<sub>eno</sub>); 1084 ν(C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 913 ν(S–C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2,32 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,95 (*d*, 1H, *J*= 15,83, CH<sub>eno</sub>); 7,24 (*d*, 2H, *J*= 8,01, CH<sub>Ar</sub>); 7,45-7,49 (*m*, 3H, CH<sub>Ar</sub>); 7,58 (*s*, 1H, CH<sub>tio</sub>); 7,64 (*dd*, 2H, *J*= 7,54; 1,5, CH<sub>Ar</sub>); 7,74 (*d*, 1H, *J*= 15,83, CH<sub>eno</sub>); 7,8 (*d*, 2H, *J*= 8,19, CH<sub>Ar</sub>); 12,49 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 21,77 (CH<sub>3</sub>); 108,63 (C<sub>tio</sub>); 120,55 (C<sub>eno</sub>); 126,61 (C<sub>Ar</sub>); 128,98 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 129,17 (C<sub>Ar</sub>); 129,88 (C<sub>Ar</sub>); 130,08 (C<sub>Ar</sub>–C<sub>Ar</sub>); 130,29 (C<sub>q</sub>); 131,33 (C–CH<sub>3</sub>); 132,62 (C<sub>Ar</sub>); 135,27 (C<sub>q</sub>); 138,1 (C<sub>Ar</sub>); 143,17 (C<sub>eno</sub>); 150,17 (C<sub>q</sub>); 158,86 (C=N); 164,36 (C=O). C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S: 320,1 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 321,1 (100%); 191,1 (1,3%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-3-(4-(*tert*-butil)fenil)-N-(4-(*p*-tolil)tiazol-2-il)acrilamida (124)** – Rendimento: 70%; Aspecto: pó laranja pálido amorfo;  $R_F$ : 0,58;  $R_T$ : 1,29 min; Grau de pureza: 95%;  $P_F$ : 167-168 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 2962  $\nu(\text{N-H})$ ; 1708  $\nu(\text{C=O})$ ; 1674  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}})$ ; 1085  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 979  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1,29 (s, 12H,  $\text{CH}_3$  e  $(\text{CH}_3)_3$ ); 6,90 (d, 1H,  $J= 15,83$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,24 (d, 2H,  $J= 8,01$ ,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,47-7,50 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,68-7,73 (m, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$  e  $\text{CH}_{\text{tio}}$ ); 7,78-7,81 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 8,05 (d, 1H,  $J= 15,83$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 12,44 (br s, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  21,26 ( $\text{CH}_3$ ); 31,35 ( $(\text{CH}_3)_3$ ); 35,02 ( $\text{C}_{\text{terc}}$ ); 110,21 ( $\text{C}_{\text{tio}}$ ); 119,46 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 124,69 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,15 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,37 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,31 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,48 ( $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,77 ( $\text{C}_q$ ); 131,97 ( $\text{C}-\text{CH}_3$ ); 137,56 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 144,24 ( $\text{C}_q$ ); 149,63 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 153,53 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 153,74 ( $\text{C}_q$ ); 158,39 ( $\text{C=N}$ ); 163,98 ( $\text{C=O}$ ).  $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{OS}$ : 376,16 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 377,2 (100%).

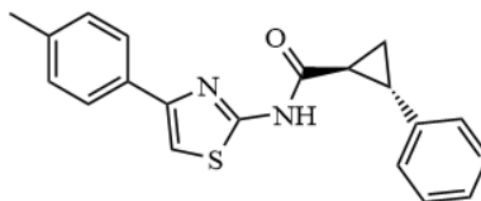
REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-3-(4-clorofenil)-N-(4-(*p*-tolil)tiazol-2-il)acrilamida (125)** – Rendimento: 75%; Aspecto: pó marrom pálido amorfo;  $R_F$ : 0,43;  $R_T$ : 1,41 min; Grau de pureza: 99%;  $P_F$ : 194-195 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3263  $\nu(\text{N-H})$ ; 1708  $\nu(\text{C=O})$ ; 1691  $\nu(\text{C=C}_{\text{eno}}$ ); 1087  $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}})$ ; 979  $\nu(\text{S-C})$ . RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  2,32 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 7,24 (d, 1H,  $J= 8$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$ ); 7,52-7,61 (m, 3H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,65-7,7 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 7,75 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{tio}}$ ); 7,8 (d, 2H,  $J= 8$ ,  $\text{CH}_{\text{eno}}$  e  $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ); 12,53 (br s, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  21,49 ( $\text{CH}_3$ ); 108,23 ( $\text{C}_{\text{tio}}$ ); 120,53 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 120,75 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 125,02 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 126,09 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 127,86 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 128,26 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,38 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 129,64 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,15 ( $\text{C}_{\text{Ar}}$ ); 130,41 ( $\text{C}_q$ ); 132,07 ( $\text{C}-\text{CH}_3$ ); 133,67 ( $\text{C}_q$ ); 135,16 ( $\text{C}-\text{Cl}$ ); 142,99 ( $\text{C}_{\text{eno}}$ ); 158,29 ( $\text{C}_q$ ); 163,65 ( $\text{C=O}$ ); 167,89 ( $\text{C=N}$ ).  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{OS}$ : 354,06 g/mol; LRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 355,1 (100%).



REFERÊNCIA: INÉDITA.



**(E)-2-fenil-N-(4-(p-tolil)thiazol-2-il)ciclopropanocarbamida (126)** – Rendimento: 65%; Aspecto: pó marrom cristalino;  $R_F$ : 0,95;  $R_T$ : 2,35 min; Grau de pureza: 98%;  $P_F$ : 195-196 °C. ATR-IV (transmitância/ $\text{cm}^{-1}$ ): 3293  $\nu$ (N-H); 3066  $\nu$ (CH<sub>2</sub>); 1664  $\nu$ (C=O); 1082  $\nu$ (C<sub>Ar</sub>=C<sub>Ar</sub>); 957  $\nu$ (S-C). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1,45-1,59 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,23-2,29 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 2,31 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,51-2,53 (*m*, 1H, CH<sub>ciclo</sub>); 7,18-7,23 (*m*, 5H, CH<sub>Ar</sub>); 7,28-7,32 (*m*, 2H, CH<sub>Ar</sub>); 7,52 (*s*, 1H, CH<sub>tio</sub>); 7,77 (*d*, 2H, *J*= 8,28, CH<sub>Ar</sub>); 12,53 (*br s*, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  16,81 (CH<sub>2</sub>); 21,25 (CH<sub>3</sub>); 25,67 (CH<sub>ciclo</sub>); 26,42 (CH<sub>ciclo</sub>); 107,59 (C<sub>tio</sub>); 126,06 (C<sub>Ar</sub>); 126,58 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 126,81 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 128,88 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 129,74 (C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>); 132,1 (C<sub>q</sub>); 137,52 (C-CH<sub>3</sub>); 140,58 (C<sub>q</sub>); 149,32 (C<sub>q</sub>); 158,21 (C=N); 170,73 (C=O). C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>OS: 334,11 g/mol; LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>) 335,2 (100%).

REFERÊNCIA: INÉDITA.

#### 4.6 Avaliação Biológica dos Inibidores

##### 4.6.1 Ensaios enzimáticos fluorimétricos

As atividades inibitórias dos compostos finais (estes com pureza  $\geq 95\%$ ) foram determinadas por meio de ensaios fluorimétricos adaptados a partir da literatura (STEUER et al., 2009). As proteases do ZIK e DENV2 foram obtidas por expressão heteróloga, utilizando-se a bactéria *Escherichia coli*, realizada por colaboradores do AK-Schirmeister (WU et al., 2015). O aumento da fluorescência, como resultado da clivagem do substrato fluorogênico Boc-Gly-Arg-Arg-AMC (*Bachem*), foi monitorado usando-se um leitor de microplacas da marca TECAN<sup>®</sup>, modelo *Infinite F200 Pro*. O substrato e as séries de diluições dos inibidores foram preparadas como soluções estoques em DMSO (20 mmol/L). Inicialmente, uma triagem biológica dos inibidores foi realizada na concentração fixa de 20  $\mu\text{M}$ . Diluições seriadas dos compostos com atividade  $\geq 60\%$  de inibição foram preparadas em DMSO e utilizadas para a

determinação dos valores de concentração inibitória para 50% ( $IC_{50}$ ). Durante todos os experimentos, DMSO puro foi utilizado como controle negativo.

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas (sem pré-incubação), onde cada ensaio foi realizado em placas *white-flat-bottom* de 96 poços (com capacidade para 200  $\mu$ L, cada), contendo 180  $\mu$ L do tampão (50 mM Tris HCl, 1 mM Chaps, 20% glicerol, com pH igual a 9), 5  $\mu$ L da protease (DENV2 à 50 nM ou ZIKV à 26 nM), 10  $\mu$ L de DMSO ou do inibidor e, então, 5  $\mu$ L do substrato.

A quantidade de substrato clivado foi determinada pelo monitoramento da fluorescência observada durante as análises ( $\lambda_{ex}$ : 380 nm,  $\lambda_{em}$ : 450 nm, T: 25 °C, ciclos: 21, intervalo cinético: 30 segundos, amplificação: 65, tempo de integração: 20  $\mu$ s). Em adição, o *software* GRAFIT® v. 5.0.13 foi empregado no processamento e análise dos dados gerados (LEATHERBARROW, 2010), onde a atividade enzimática residual foi determinada levando-se em consideração a concentração dos inibidores. A partir desta, os valores de  $IC_{50}$  foram obtidos por aplicação de regressão não-linear usando a equação de Hill (1), mostrada abaixo:

$$y = \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s} + y_{min} ,$$

equação 1

onde  $y$  (fluorescência/minuto) representa a taxa de hidrólise do substrato enzimático (medida como o aumento da fluorescência por minuto) de acordo com a concentração do inibidor,  $[I]$ . O  $y_{max}$  representa o valor máximo da curva de dose-resposta que é observada em baixas concentrações do inibidor;  $y_{min}$  representa o valor mínimo de  $y$  que é obtido em altas concentrações do inibidor; e o  $s$  denota o fator de curva (também chamado de coeficiente Hill), cujo caracteriza a inclinação da parte média aproximadamente linear da curva dose-resposta (LUDEWIG et al., 2010).

#### 4.7 Modelagem *In silico*

O *screening* virtual tem se tornado um passo essencial nos estudos envolvendo a descoberta de fármacos, do composto *hit* até a otimização do *lead* (KORB; STÜTZLE; EXNER, 2009; VISWANATHAN et al., 2014). Tipicamente, a efetividade e segurança de um fármaco irá depender do reconhecimento seletivo que este apresenta por um determinado alvo

macromolecular (BAXTER et al., 1998; SILVA-JÚNIOR; ARAÚJO-JÚNIOR; AQUINO, 2017). Baseando-se nisto, diferentes técnicas contidas no âmbito da química computacional foram aplicadas no estudo dos potenciais inibidores das enzimas NS2B-NS3 e nsP2, as quais serão explicadas nas seções seguintes.

#### 4.7.1 Detalhes computacionais

Todos os experimentos envolvendo *docking* molecular e DFT foram realizados em um notebook DELL® modelo 5500U, com processador Intel® Core(TM) i-7 4ª-geração, CPU 2,40 GHz, memória RAM de 16 GB e plataforma Windows® 8.1.

As simulações de dinâmica molecular envolvendo a nsP2 do CHIKV foram realizadas em um DELL® Workstation Precision, modelo T3600 6C, com processador Intel® Xeon E5-1660, CPU 3,3 GHz, memória RAM de 16 GB e plataforma Linux®.

#### 4.7.2 Métodos *In silico* aplicados ao desenvolvimento dos potenciais inibidores da NS2B-NS3 dos vírus Dengue e Zika

##### 4.7.2.1 *Docking* molecular

O *docking* molecular de pequenos ligantes flexíveis em alvos biomacromoleculares permanece como a técnica computacional mais difundida (DAR; MIR, 2017; PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017; SALMASO; MORO, 2018). Este é um método estocástico que realiza uma busca pela energia mínima global relacionada a uma função de pontuação (do inglês, *scoring function*), baseando-se nos modos de ligação dos correspondentes ligantes (KORB; STÜTZLE; EXNER, 2009; TROTT; OLSON, 2010). No *docking* molecular, considera-se que através do planejamento de ligantes que interajam de forma eficiente com a biomacromolécula, uma molécula *hit* será obtida com uma alta afinidade por seu correspondente alvo (ELDRIDGE et al., 1997; SALMASO; MORO, 2018).

Baseando-se nestas informações, o *docking* molecular de todos os inibidores foi realizado frente à NS2B-NS3 do DENV2. Inicialmente, todos os inibidores foram desenhados, convertidos em estruturas tridimensionais e, em seguida, minimizados energeticamente através da aplicação do método semi-empírico *Austin Model 1* (AM1), utilizando-se o software ARGUSLAB® v. 4.0.1 (<http://www.arguslab.com>) (THOMPSON, 2004). O arquivo contendo a estrutura tridimensional da enzima NS2B-NS3 do DENV2 foi obtido no *Research*

*Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank - RCSB PDB*, sob o código: 2FOM (<https://www.rcsb.org/structure/2FOM>). Para o pré-tratamento da biomacromolécula e execução dos *dockings* propriamente ditos, o *software* GOLD® v. 5.4.0 (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>) foi empregado durante todas as etapas de simulação (CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE, 2015). Apenas a estrutura cristalina da NS2B-NS3 do DENV2 foi utilizada nesta etapa devido esta apresentar uma alta similaridade com a mesma protease no ZIKV. Além disso, tal estrutura contém a conformação correta do sítio alostérico para esta protease (BRECHER et al., 2017). Neste sentido, todas as moléculas cocrystalizadas à estrutura da protease foram removidas, incluindo as moléculas de água e íons. Em seguida, as coordenadas referentes à caixa de busca foram introduzidas como sendo  $x$ : -10,189;  $y$ : -10,64 e  $z$ : 17,996 (sítio ativo) e  $x$ : -10,004;  $y$ : -8,839 e  $z$ : 7,879 (sítio alostérico). Tais coordenadas foram extraídas de outros trabalhos previamente publicados (BARTHELIS, 2018; MILLIES et al., 2018; WU et al., 2015). Adicionalmente, permitiu-se que todos os átomos aceptores e doadores de interação de hidrogênio fossem tratados como acessível ao solvente e todos os inibidores foram admitidos como capazes de detectar cavidades na superfície da enzima. Uma eficiência de busca de 200% foi estabelecida. Então, 4 (quatro) diferentes funções de pontuação foram aplicadas, sendo estas *Chemical Piecewise Linear Potential* (CHEMPLP), *GoldScore*, *ChemScore* e *Astex Statistical Potential* (ASP). Por fim, o valor do coeficiente de correlação ( $r^2$ ) para cada função de pontuação foi determinado, bem como, as contribuições energéticas das interações (interações de hidrogênio e hidrofóbicas/Van der Waals) foram individualmente analisadas.

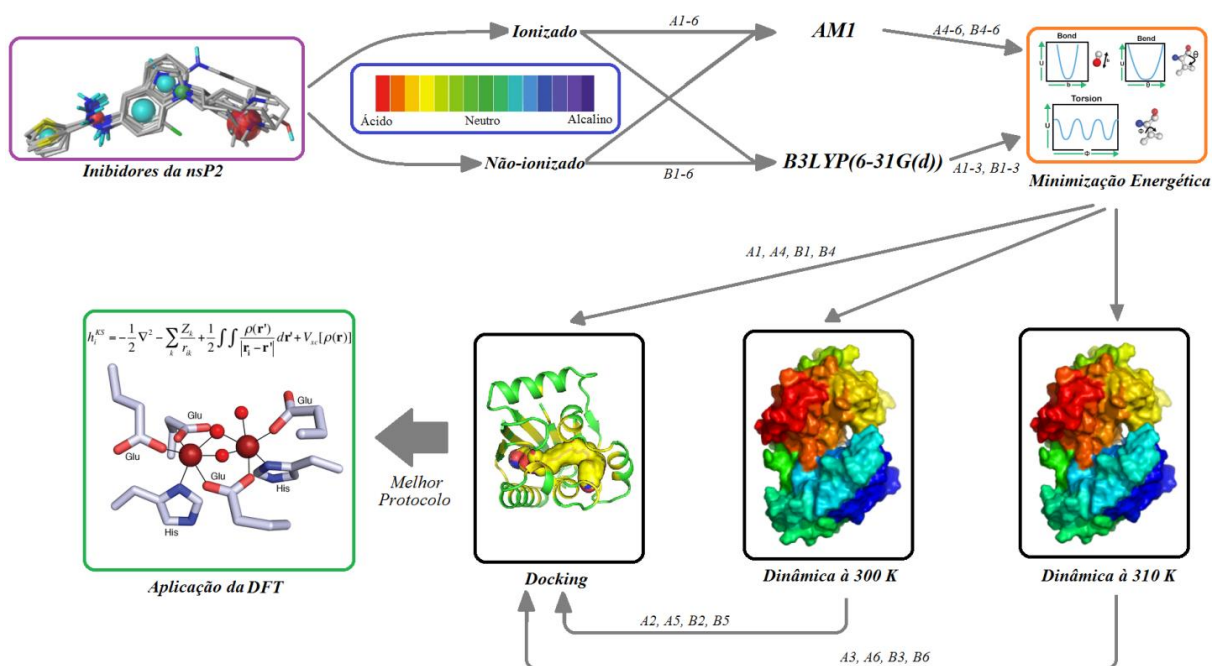
#### 4.7.3 Desenvolvimento do Protocolo Virtual para Planejamento de Inibidores da Enzima nsP2 do CHIKV

O desenvolvimento de um protocolo virtual se faz necessário uma vez que não há nenhum protocolo computacional direcionado à busca de novos compostos inibidores da enzima nsP2. Dessa forma, diferentes técnicas computacionais foram aplicadas para explorar os inibidores da nsP2 existentes, incorporando condições fisiológicas, predizendo as conformações ligantes e aplicando a teoria do funcional de densidade (DFT) para investigar o mecanismo catalítico deste alvo. Neste sentido, a possibilidade de um mecanismo covalente também foi exaustivamente explorada. Nas seções que se seguem, todos os detalhes sobre a construção de tal protocolo serão fornecidos e devidamente explicados.

#### 4.7.3.1 Desenvolvimento do protocolo virtual - Visão geral

Inicialmente, decidiu-se investigar a influência de vários parâmetros usualmente empregados em estudos de *screening* virtual. Posteriormente, os parâmetros mais influentes na predição das atividades dos inibidores da nsP2 previamente selecionados foram melhor explorados. Dentre estes, os seguintes parâmetros foram avaliados: *i*) ionização em pH fisiológico (tipicamente 7,4); *ii*) minimização energética inicial dos inibidores pelos métodos AM1 e DFT-B3LYP/6-31G(d); *iii*) *docking* molecular utilizando as quatro funções de pontuação anteriormente descritas, para a estrutura do PDB (em condições não-nativas); *iv*) *docking* molecular utilizando as quatro funções de pontuação anteriormente descritas, para as estruturas obtidas por simulações de dinâmica molecular à temperatura de 300 e; *v*) 310 Kelvin (ambas em condições nativas) e, por fim, *vi*) determinação das energias livres de Gibbs para interações não-covalentes e covalentes através da aplicação de cálculos de DFT. Baseando-se nisto, todos os parâmetros foram misturados entre si e 12 (doze) protocolos virtuais diferentes foram gerados. Estes protocolos foram divididos em duas categorias, *A* e *B*, onde *A* representa o conjunto de inibidores ionizados; e *B* representa o conjunto não-ionizado. Adicionalmente, o número de protocolos varia de 1 a 6, onde estes irão depender das condições empregadas. Por fim, durante a execução destes protocolos, um rigoroso fluxograma de trabalho foi seguido, ilustrado na Figura 29. Nas próximas seções, todos os detalhes metodológicos serão fornecidos.

**Figura 29 – Fluxograma utilizado para o desenvolvimento do protocolo virtual para explorar inibidores da nsP2 do vírus Chikungunya.**

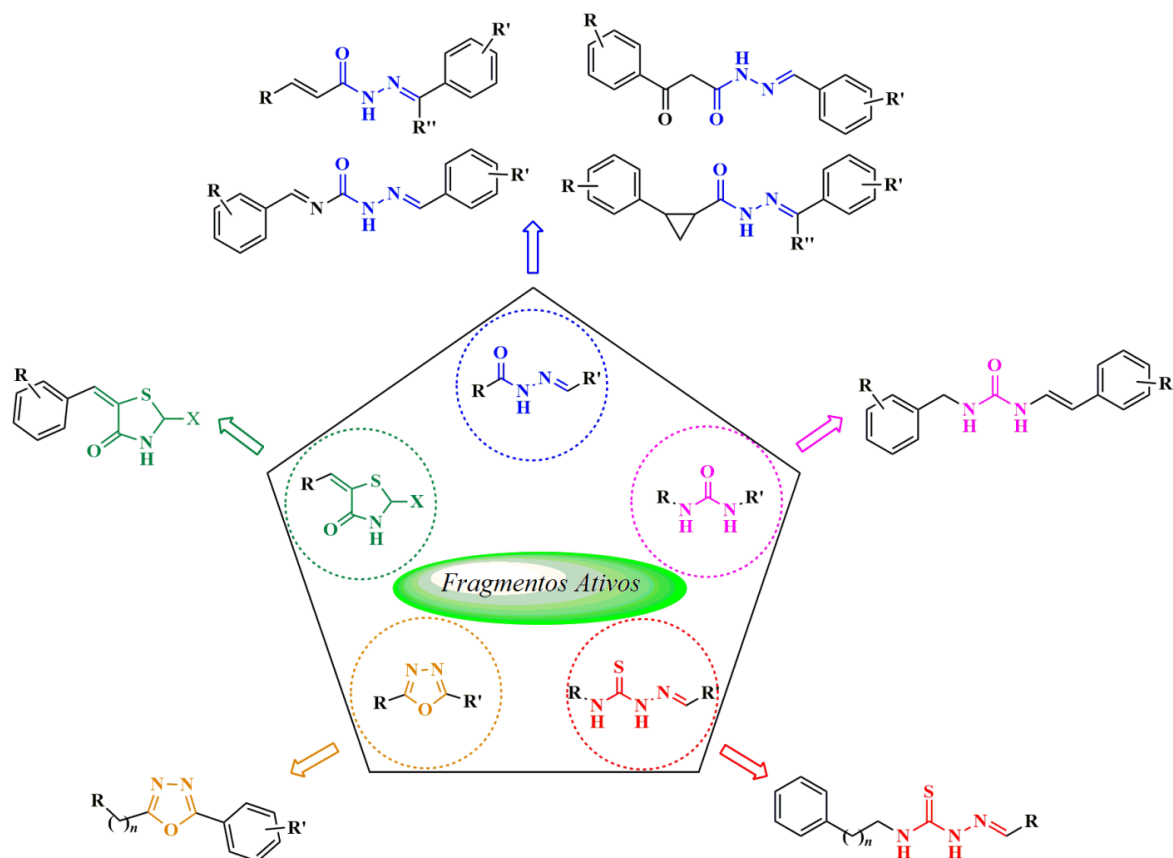


FONTE: Autor, 2019.

#### 4.7.3.1.1 Seleção dos inibidores da nsP2 e a minimização energética

No total, 31 inibidores da nsP2 (ver volume 2, página 353) foram encontrados na literatura e utilizados para a criação do banco de dados. Somente compostos com  $IC_{50} \leq 10 \mu M$  ou inibição máxima  $\geq 80\%$  foram considerados como ativos. Dentre estes, análogos das acilidrazonas (por exemplo, acrilamidas, semicarbazonas, oxoacilidrazonas e acilidrazona de fenilciclopropano), ureias, tiazolidinas/rodaninas, oxadiazóis e tiossemicarbazonas foram selecionados (Figura 30). Os valores energéticos da conformação de menor energia para cada um dos inibidores foram obtidos por aplicação de duas teorias, AM1 (método semi-empírico) e B3LYP/6-31G(d) (método quântico). Estes métodos têm sido utilizados para obtenção de comprimentos e ângulos de ligação acurados (DEEB; CLARE, 2008; SILVA-JÚNIOR; ARAÚJO-JÚNIOR; AQUINO, 2017). Por fim, dois conjuntos de inibidores foram gerados, ambos contendo exatamente os mesmos 31 compostos, contudo o primeiro deles foi minimizado pelo método AM1 e o segundo, B3LYP/6-31G(d).

**Figura 30 – Visualização esquemática dos compostos selecionados.**



FONTE: Autor, 2019. Em azul: acilidrazonas (p.ex. acrilamidas, semicarbazonas, oxoacilidrazonas e acilidrazonas de fenilciclopropanos); rosa: ureias; verde: tiazolidinas/rodaninas; laranja: oxadiazóis; vermelho: tiossemicarbazonas. Em ( )<sub>n</sub>: -CH<sub>2</sub>- ou -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-; e X: -NH<sub>2</sub> e =S. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v.12.

#### 4.7.3.1.2 Simulações de dinâmica molecular da nsP2

Tipicamente, as simulações de dinâmica molecular (MD) têm sido amplamente utilizadas em estudos envolvendo a formação de complexos entre macromoléculas e ligantes, com a finalidade de explorar a estabilidade destes e suas respectivas energias em função do tempo (SENTHILKUMAR et al., 2016). Adicionalmente, tais simulações fornecem o comportamento dinâmico de proteínas durante a formação do complexo com ligantes (SENTHILKUMAR et al., 2016). Esta técnica computacional aplica uma combinação de teorias de mecânica molecular (MM) e do *continuum* solvente para avaliar a energia de ligação a partir da formação deste complexo (SENTHILKUMAR et al., 2016). Para o desenvolvimento deste protocolo, a estrutura cristalográfica da protease nsP2 (PDB ID: 3TRK, com resolução de 2,397 Å, cadeia A, da linhagem *S27-Africana* do CHIKV) foi obtida no RSCB PDB

(<https://www.rcsb.org/structure/3TRK>). As moléculas de água e íons cocrystalizados ao arquivo original do PDB foram removidos e os átomos de hidrogênios foram adicionados, usando o software GROMACS® (<http://www.gromacs.org/>) (JIANG et al., 2017; SENTHILKUMAR et al., 2016). Baseando-se em condições fisiológicas, o campo de força *Optimized Potential for Liquid Simulations* (OPLS) foi usado para modelar as interações dos aminoácidos na protease a pH 7,4. Adicionalmente, o método *Single Point Charge* (SPC) foi usado para modelar a água do sistema e, em seguida, os íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> foram adicionados à concentração de 0,15 M (JIANG et al., 2017; SINGH et al., 2012). Tais parâmetros têm sido amplamente utilizados em uma variedade de estudos de estabilidade térmica envolvendo proteínas (CHEN et al., 2016a; JIANG et al., 2017; KUNDU; ROY, 2008; PAUL et al., 2014). Diferentes temperaturas (300 e 310 Kelvin) foram implementadas neste protocolo, uma vez que o estudo de macromoléculas por simulações de MD em diferentes temperaturas é capaz de fornecer informações quanto à influência destas sobre a atividade catalítica, desnaturação/inativação térmica e perturbação do sítio ativo (JIANG et al., 2017). Além disso, a MD à 310 K (36,8 °C) pode ser aplicada para simular o ambiente biológico de células hospedeiras, dentro do organismo de mamíferos (CAPRILES; DARDENNE, 2007). Neste protocolo, a MD à 310 K foi empregada como um controle negativo, uma vez que todos os inibidores têm sido selecionados a partir de estudos *in vitro* realizados à 25 °C (300 K). Anteriormente ao início das simulações de MD, o sistema foi equilibrado em duas fases usando os métodos NVT e NPT, ambos durante tempo de 100 ps. Por fim, as alterações conformacionais do sistema foram observadas em função do tempo, onde estas foram computadas como o desvio médio dos quadrados-mínimos (RMSD) (SILVA et al., 2017), como mostrado na equação (2) abaixo:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N m_i (r_i - r_i^0)^2}{\sum_{i=1}^N m_i}}$$

equação 2

onde  $m_i$  representa a massa do átomo;  $r_i^0$  e  $r_i$  são as coordenadas do átomo ( $i$ ) no estado inicial e durante as simulações de MD, respectivamente (AJLOO et al., 2015; SILVA et al., 2017).



#### 4.7.3.1.3 *Docking* molecular dos inibidores da nsP2

Os procedimentos metodológicos relacionados ao *docking* molecular dos inibidores da nsP2 são idênticos aos detalhes fornecidos na seção de *docking* molecular dos potenciais inibidores da NS2B-NS3. Entretanto, há diferença quanto às coordenadas utilizadas, uma vez que a nsP2 apresenta uma estrutura completamente diferente das proteases do ZIKV e DENV2.

Todas as simulações utilizando a nsP2 foram realizadas considerando a região da díade catalítica (Cys1013 e His1083), como descrita em estudos anteriores (BASSETTO et al., 2013; JADAV et al., 2015). As coordenadas desta díade (*pocket 4*) nas três estruturas (cristal PDB, nsP2 após dinâmica à 300 K e 310 K) foram computadas como  $x= 5,181; 62,625; 34,53; y= 5,063; 30,74; 64,22; e z= -11,705; 55,05; 49,735$ , respectivamente. Todas as coordenadas usadas foram baseadas em simulações de *docking* molecular reportadas na literatura (BASSETTO et al., 2013; GIANCOTTI et al., 2018; NGUYEN; YU; KELLER, 2015; TARDUGNO et al., 2018), exceto para a estrutura à 310 K, a qual é inédita.

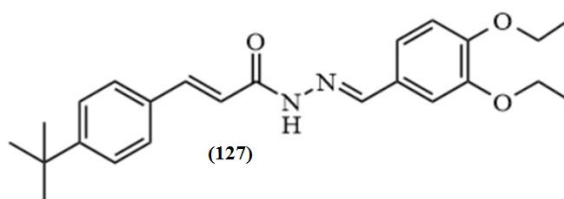
#### 4.7.3.1.4 Investigação de mecanismo de inibição não-covalente ( $\Delta G_{\text{não-covalente}}$ ) e covalente ( $\Delta G_{\text{covalente}}$ ) usando mecânica quântica (QM)

Embora os programas de *docking* molecular sejam bem sucedidos na utilização de convenientes funções de pontuação (SILVA et al., 2017; YURIEV; RAMSLAND, 2013), a aplicação de um modelo de solvatação implícito (DM), e a incorporação de cálculos semi-empíricos (SE) e/ou mecânicos quânticos (QM) tem sido usados para incrementar significativamente a pontuação final de cada ligante (HOMEYER et al., 2014; HUANGA; CAFLISCHA, 2010; LAGARIAS et al., 2018; LI; LIU; WANG, 2010; SILVA-JÚNIOR et al., 2017a; ZHANG; WONG; LIGHTSTONE, 2014), e elucidar corretamente o mecanismo catalítico de cisteíno proteases (ARAFET; FERRER; MOLINER, 2015, 2017; ARAFET et al., 2014, 2017; AWOONOR-WILLIAMS; WALSH; ROWLEY, 2017; MÉNDEZ-LUCIO et al., 2012; MLADENOVIC et al., 2008).

Estudos envolvendo *softwares* para simulação de *docking* amplamente empregados em *screening* virtuais concluíram que não há *software* capaz de prever valores acurados de energia livre de Gibbs para interações não-covalentes ( $\Delta G_{\text{não-covalente}}$ ) ou covalentes ( $\Delta G_{\text{covalente}}$ ), bem como suas respectivas barreiras energéticas nos estados transicionais ( $\Delta G^\ddagger$ ) (BURSULAYA et al., 2003; CUMMINGS et al., 2005; KONTOYIANNI; SOKOL; MCCLELLAN, 2005; WARREN et al., 2006). Em contraste, a mecânica quântica (QM) pode ser empregada para a

modelagem de sistemas biológicos devido sua habilidade em descrever sistema químicos com valores de  $\Delta G_{\text{não-covalente}}$ ,  $\Delta G_{\text{covalente}}$  e  $\Delta G^\ddagger$  quantitativamente acurados (AWOONOR-WILLIAMS; WALSH; ROWLEY, 2017; MALMSTROM; WATOWICH, 2011; SILVA-JÚNIOR et al., 2017a). Baseando-se nisto, os cálculos de DFT foram realizados usando 3 (três) funcionais diferentes, sendo estes B3LYP, M06 e  $\omega$ B97X-D, todos com nível de teoria fixo em 6-31G(d). Todos os cálculos de QM foram executados no *software* SPARTAN'14<sup>®</sup> v. 1.1.4 (<http://ww2.wavefun.com/>) (WAVEFUNCTION, 2014). Para esta investigação, o composto (127) (Figura 31) foi selecionado como inibidor de referência, devido seus valores de EC<sub>50</sub> (3,2 ± 1,8 μM), índice de seletividade (SI: 32) e inibição máxima (100%) à concentração de 12,5 μM (GIANCOTTI et al., 2018).

**Figura 31 – Estrutura química do composto de referência utilizado no estudo por DFT.**



FONTE: Autor, 2019.

A pose ligante para este composto foi necessária para execução dos cálculos, onde esta foi obtida previamente pelo *docking* molecular. Então, todas os funcionais foram aplicados para fornecer os valores acurados de  $\Delta G_{\text{não-covalente}}$  a partir da formação do complexo. É sabido que os efeitos da entropia de solvatação usando a água requer uma estimativa acurada da organização média das moléculas, que inclui a aplicação de Hamiltonianas ao sistema. Normalmente, este valor demonstra altas flutuações e, além disso, possui um custo computacional elevado. Assim, uma interessante alternativa pode ser obtida comparando-se as diferenças de entropia a partir das diferenças de energia livre entre os pontos inicial e final, para cada simulação (PETER et al., 2004). Os valores de  $\Delta G_{\text{não-covalente}}$  foram obtidos aplicando-se a equação (3), onde o  $\Delta G_{\text{não-covalente}}$  foi calculado como a diferença entre a energia do complexo ligante-macromolécula ( $E_{\text{complexo}}$ ) e a soma das energias da macromolécula ( $E_{\text{macro}}$ ) e do inibidor ( $E_{\text{lig}}$ ), consideradas separadamente:

$$\Delta G_{\text{não-covalente}} = [E_{\text{complexo}} - (E_{\text{macro}} + E_{\text{lig}})]$$

equação 3

Nestes cálculos, os efeitos eletrostáticos e estéricos do ambiente circundante ao sítio ativo foram completamente ignorados. Por fim, todos estes procedimentos foram realizados exatamente como descrito em trabalhos (colaboração e autoral) do correspondente autor desta tese previamente publicados (MARQUES et al., 2018; SILVA-JÚNIOR et al., 2017a).

Basicamente, o mecanismo catalítico de cisteína proteases depende de dois resíduos no sítio ativo, que tipicamente é composto por uma cisteína (Cys) e uma histidina (His). Em adição, sabe-se que o ambiente fisiológico auxilia o grupo imidazol do resíduo His na abstração de um próton da Cys, conduzindo à geração de uma espécie altamente nucleofílica, chamado de par iônico Cys(S<sup>-</sup>)/His(H<sup>+</sup>). Este par iônico é responsável pela alta reatividade dessa classe de proteases frente a grupos eletrofílicos, amplamente utilizados no planejamento de inibidores covalentes (ARAFET; FERRER; MOLINER, 2015, 2017; ARAFET et al., 2014, 2017). Baseando-se nessas informações, os mesmos métodos de DFT descritos anteriormente foram aplicados para prever a formação e estabilidade deste par iônico, bem como para descrever os valores de  $\Delta G_{\text{covalente}}$  e  $\Delta G^\ddagger$  para o mecanismo catalítico em nível atômico.

#### 4.7.3.1.5 Aplicação do novo protocolo virtual à série de inibidores racionalmente planejados

O novo protocolo virtual desenvolvido foi aplicado aos compostos planejados, com a finalidade de identificar os compostos mais promissores e obter-se informações quanto às interações entre os ligantes e o alvo biomacromolecular.

#### 4.7.3.1.6 Avaliação da atividade biológica dos análogos frente à enzima nsP2 do vírus Chikungunya

O colaborador desta tese, o Prof. Dr. Jochen Bodem, da Universidade de Würzburg – Alemanha, coordenador do grupo de pesquisa AK-Bodem, ficou responsável por fornecer os dados relacionados à toxicidade dos compostos, bem como à atividade inibitória *in vitro* frente à nsP2 isolada e sobre cultura de células infectadas com o CHIKV. Por fim, uma metodologia específica, desenvolvida pelo AK-Bodem foi empregada como método de obtenção dos resultados desejados.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Fundamentação Teórica

Uma profunda revisão da literatura foi realizada para obtenção de bases teóricas que justificassem a execução da presente tese de doutorado. Diversos trabalhos publicados foram analisados e organizados em um texto dissertativo, contendo os mais diversos e recentes avanços na área de química medicinal do ZIKV e DENV. Dessa forma, a primeira parte da fundamentação teórica desta tese de doutoramento foi publicada no formato de capítulo de livro internacional, com o título de *Recent Advances in Inhibitors of Flavivirus NS2B-NS3 Protease from Dengue, Zika, and West Nile Virus*, no livro *Vector-Borne Diseases & Treatment – Volume 3* (SILVA-JÚNIOR; SCHIRMEISTER; ARAÚJO-JÚNIOR, 2018). Neste, também foram inclusos os recentes avanços no desenvolvimento de compostos ativos frente ao vírus da febre do Nilo Ocidental.

No que se refere à fundamentação teórica do CHIKV contida nesta tese, esta também foi publicada. No entanto, uma profundidade maior foi dada ao tópico, uma vez que foram inclusos todos os trabalhos (até o ano de 2017) envolvendo compostos ativos obtidos a partir de fontes naturais, sintéticas/semissintéticas e triagem virtual. O texto final foi publicado pela editora Elsevier®, na *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (SILVA-JÚNIOR et al., 2017b). Tal trabalho recebeu grande destaque dentro da comunidade científica, fazendo com este tenha sido selecionado como capa do volume publicado em Agosto de 2017. Além disso, paralelo ao projeto de doutorado do correspondente autor desta tese, outros trabalhos foram executados, rendendo publicações em revistas científicas de circulação internacional (ver Apêndices A-E).

### 5.2 Síntese dos Novos Inibidores Potencialmente *Duais*

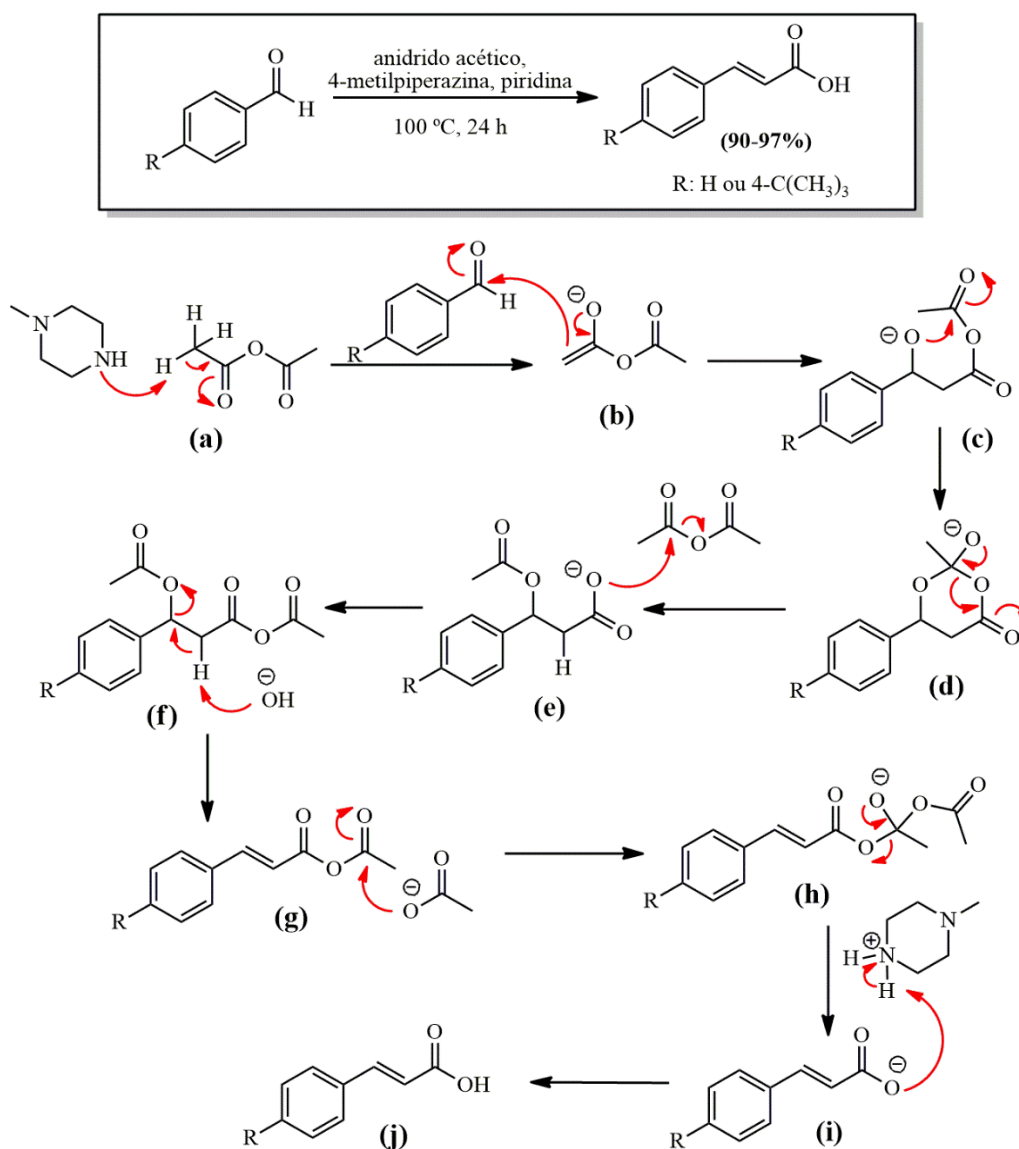
De modo geral, todos os compostos sintetizados foram obtidos em rendimentos satisfatórios, incluindo os compostos intermediários, os quais serviram como material de partida para obtenção dos compostos finais. A seguir, todos os mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos compostos intermediários e finais serão descritos em detalhes, acompanhados de seus respectivos esquemas reacionais. Ao final de cada tópico relacionado à síntese dos compostos, uma discussão sobre a caracterização química destes será fornecida, levando-se em consideração os principais sinais observados (p.ex. picos, bandas de estiramento, etc) em seus respectivos espectros experimentalmente obtidos por meio de análises

espectroscópicas e/ou espectrométricas. Por fim, toda a discussão referente aos espectros encontra-se de acordo com referências fundamentais da área (AITKEN, 2010; BIBLE; SEARLE, 1965; JACOBSEN, 2017; PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

### 5.2.1 Síntese dos derivados do ácido cinâmico (4-H e 4-*terc*-butila)

Os ácidos cinâmicos, não substituído (4-H) e o 4-*terc*-butila, foram obtidos através da reação de *Perkin* (Figura 32), com rendimento de 90 e 97%, respectivamente. Tal reação é amplamente empregada na síntese deste tipo de composto químico. Esta gera um ácido aromático  $\alpha,\beta$ -insaturado por condensação aldólica de um aldeído aromático e um ácido anidrido, na presença de uma base (DIPPY; EVANS, 1950; PERKIN, 1877). Inicialmente, a base abstrai um próton do anidrido acético, formando uma ligação eno e repelindo o par de elétrons para o oxigênio (**a**). Em seguida, a carbonila é reestabelecida, conduzindo à deslocalização eletrônica que promove um ataque na carbonila do aldeído aromático, cujo repele o par de elétrons para o oxigênio do aldeído (**b**). Este, por sua vez, ataca nucleofilicamente a carbonila do éster do anidrido, fechando um anel de 6-membros e, novamente, repelindo os elétrons para o átomo de oxigênio (**c**). O reestabelecimento desta carbonila promove a deslocalização de elétrons em direção à carbonila do éster adjacente (**d**). Posteriormente, a espécie nucleofílica formada realiza um ataque nucleofílico à carbonila de uma nova molécula do anidrido acético (**e**). O ânion hidróxido abstrai o próton ácido, conduzindo à formação de uma dupla ligação e liberação um ânion acetato, por meio de uma reação do tipo  $\beta$ -eliminação (**f**). Então, o ânion acetato ataca nucleofilicamente a carbonila terminal, repelindo um par de elétrons da carbonila para o átomo de oxigênio (**g**). O reestabelecimento desta carbonila (**h**) promove a liberação de uma espécie aniônica (**i**). Por fim, uma reação ácido-base permite que o acetato cinâmico abstraia um próton da base (carregada positivamente), o que conduz ao reestabelecimento da neutralidade ambas as espécies (**j**).

**Figura 32 – Mecanismo reacional proposto para obtenção dos ácidos cinâmicos.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaboração utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12.

### 5.2.1.1 Caracterização química dos derivados do ácido cinâmico (4-H e 4-*terc*-butila)

Após a obtenção dos derivados do ácido cinâmico (**39**) e (**40**), análises espectroscópicas de IV e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram realizadas, afim de validar os compostos sintetizados. Considerando os espectros de IV (ver volume 2), em ambos os derivados, observa-se uma banda de deformação angular ( $\delta$ ) para a ligação C–O em 2830 e 2949 cm<sup>-1</sup>, para o (**39**) e (**40**), respectivamente. Adicionalmente, estiramentos ( $\nu$ ) C=O foram observados entre 1671 (**39**) e 1668 (**40**) cm<sup>-1</sup>. Em geral, estes dois sinais (deformação e estiramento) são suficientemente significativos para confirmar a presença da função ácida em ambos os compostos. Ainda com

relação aos espectros de IV, estiramentos em 1627 e 1074  $\text{cm}^{-1}$  (**39**) e 1621 e 1110  $\text{cm}^{-1}$  (**40**) referem-se aos sinais provenientes das ligações  $\text{C}=\text{C}_{\text{eno}}$  e  $\text{C}=\text{C}$  aromáticas, respectivamente.

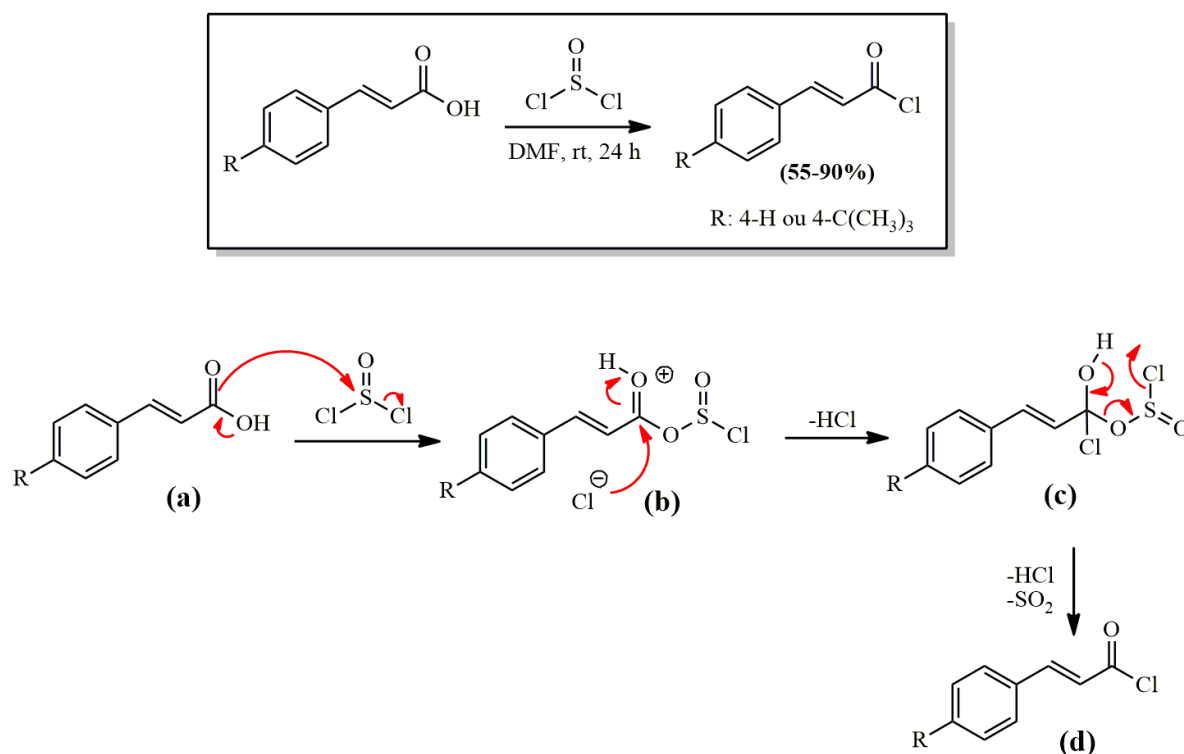
Considerando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , o derivado (**40**) difere do seu análogo não substituído (**39**) basicamente pela presença do grupo 4-*terc*-butila, o qual é observado como um simpleto (*s*) intenso em 1,26 ppm. Em ambos os compostos, dois dupletos (*d*) entre 6,46-6,52 e 7,55-7,59 são observados, exibindo constantes de acoplamento (*J*) de 16,1 Hz. Adicionalmente, um simpleto de base larga (*br s*) é verificado em 12,38 (**39**) e 12,32 (**40**) referente à hidroxila do grupamento ácido carboxílico. No espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , verifica-se que os sinais dos dois  $\text{C}_{\text{eno}}$  e um  $\text{C}=\text{O}$  apresentam-se em ~119, ~144 e ~168 ppm, respectivamente. Entretanto, para o análogo (**40**) são observados dois sinais característicos referentes ao grupo 4-*terc*-butila, sendo um destes em 31,35 ppm para as três metilas ( $(\text{CH}_3)_3$ ) e o outro em 35,0 ppm, referente ao carbono quaternário do grupo *terc*-butila.

### 5.2.2 Síntese dos cloretos de acilas dos ácidos cinâmicos (4-H e 4-*terc*-butila)

Considerando a baixa reatividade dos análogos 2-aminobenzo[*d*]tiazóis contendo halogênios frente aos ácidos cinâmicos e do ácido fenilciclopropano, a conversão da função ácida em cloreto de acila foi necessária, objetivando-se substituir o fraco grupo abandonador ( $\text{OH}^-$ ) por um melhor ( $\text{Cl}^-$ ) (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012a). No entanto, tal reação não foi realizada para o ácido fenilciclopropano, uma vez que o produto acilado deste foi obtido comercialmente, bem como, para o ácido 4-clorocinâmico, cujo apresentou reatividade suficiente. A conversão dos ácidos carboxílicos em cloretos de acilas foi procedida através da utilização de cloreto de tionila ( $\text{SOCl}_2$ ), com rendimentos entre 55 e 90% (Figura 33). Inicialmente, o átomo de enxofre (altamente eletrofílico) é atacado pelo ácido carboxílico (**a**), liberando um ânion cloreto para o meio reacional. Em seguida, este ânion abstrai um próton da carbonila do éster formado, neutralizando a espécie química formada. Esta, é uma espécie intermediária altamente eletrofílica e instável, a qual sofre uma reprotonação por ação da molécula de HCl anteriormente formada. Tal reprotonação fornece um poder eletrofílico suficiente para permitir a reação desta até com um fraco nucleófilo como íon cloreto (**b**). Em seguida, a dupla ligação da função acila é reestabelecida, liberando o ânion sulfóxido (**c**). Por fim, a dupla ligação da carbonila é reestabelecida, formando o cloreto de acila desejado (**d**) juntamente com a eliminação do  $\text{SO}_2$  reconstituído e HCl.



**Figura 33 – Mecanismo reacional proposto para obtenção de cloretos de acilas a partir de ácidos cinâmicos.**



FONTE: Autor, 2019.

#### 5.2.2.1 Caracterização química dos cloretos de acilas dos ácidos cinâmicos (4-H e 4-*terc*-butila)

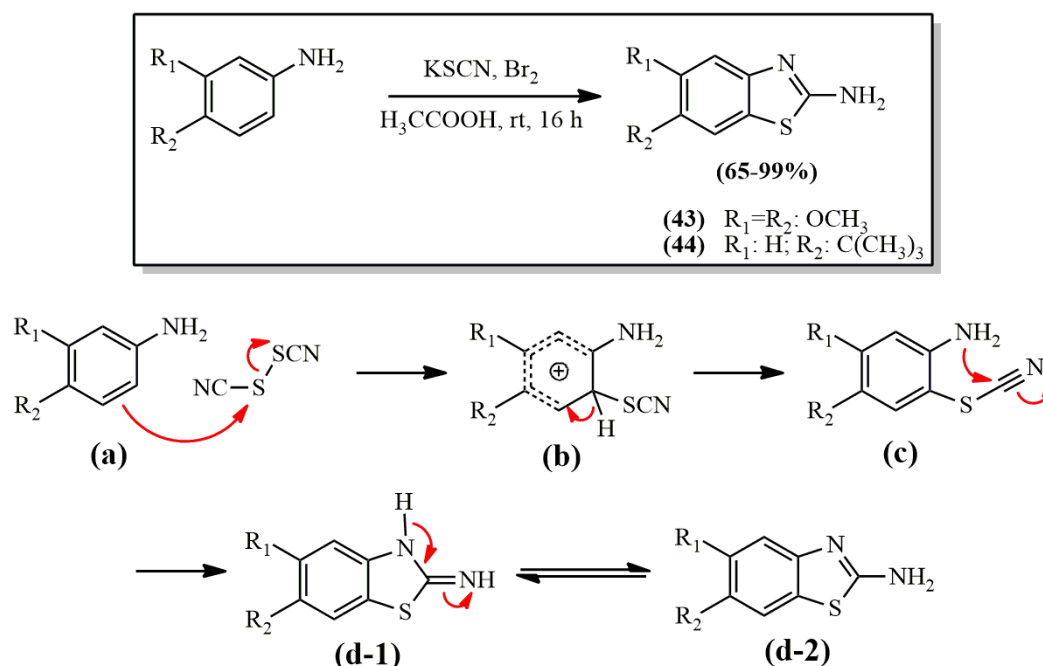
Tipicamente, os derivados do ácido cinâmico possuem sinais característicos, como discutido anteriormente. De modo similar, os seus correspondentes cloretos de acilas apresentam particularidades que permitem identificar as moléculas com segurança (ver volume 2), sendo a ausência do sinal da OH (no RMN de <sup>1</sup>H) e o deslocamento do sinal da ligação C=O (no RMN de <sup>13</sup>C) os principais pontos a serem considerados. No IV, o cloreto de cinamoíla (**41**) demonstra estiramentos ( $\nu$ ) característicos em 1676, 1627 e 1066 cm<sup>-1</sup> para as ligações C=O, C=C<sub>eno</sub> e C=C aromática, respectivamente. Quando comparados aos sinais provenientes do seu análogo 4-*terc*-butilado (**42**), verifica-se que os sinais para estas mesmas ligações apresentam-se ligeiramente deslocados à esquerda do espectro de IV, com valores de 1758, 1707 e 1071 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. No RMN de <sup>1</sup>H, observa-se que composto (**42**) apresenta um dos sinais do hidrogênio da ligação C-H<sub>eno</sub> deslocado no sentido de campo alto (6,76 ppm), enquanto seu análogo não substituído (**41**) exibe comportamento contrário (7,34 ppm). Ainda com relação ao composto (**42**), este exibe um sinal intenso em 1,29 ppm referente aos 9 (nove) hidrogênios do

grupo *terc*-butila. Com relação aos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , ambos os derivados apresentam sinais para os carbonos da ligação eno (C=C) em faixas ligeiramente divergentes, sendo estas entre 117,35-144,53 e 116,44-148,94 ppm. Embora, os mesmos apresentam deslocamentos químicos para a carbonila (C=O) idênticos, sendo este ~163 ppm.

### 5.2.3 Síntese do derivado 2-amino-5,6-dimetoxibenzo[*d*]tiazol

De modo geral, derivados de anilinas substituídas (3,4-dimetoxila e 4-*terc*-butila) podem ser convertidos nos correspondentes 2-aminobenzotiazóis (**43** e **44**), utilizando-se tiocianato de potássio e uma solução de bromo em ácido acético (TRAPANI et al., 2001). Tais compostos foram obtidos com rendimentos entre 65 e 99%, respectivamente. Esta metodologia sintética utilizando anilinas ricas em elétrons procede não via formação da tioureia (reação de *Hugershoff*), entretanto, o bromo atua como um antioxidante, liberando dirhodane *in situ* a partir do sal de tiocianato. Dirhodane, exercendo o papel de um pseudo-halogênio, é facilmente polarizável em meio ácido, reagindo por substituição aromática eletrofílica com a anilina (**a**). Subsequentemente, o ânion rodanida abstrai um próton, conduzindo à rearomatização (**b**) e, então, conduzindo à formação do tiocianato aromático (**c**). Em meio reacional contendo um ácido fraco, o par de elétrons livre da amina ataca nucleofilicamente o carbono polarizado positivamente do tiocianato (**c**), fechando o anel de 5-membros e, subsequentemente, sofrendo tautomerismo (**d-1**) para fornecer os correspondentes 2-aminobenzo[*d*]tiazóis (**d-2**) (VOLLHARDT; SCHORE, 2011) (Figura 34).

**Figura 34 – Mecanismo reacional proposto para a obtenção dos análogos 2-aminobenzo[d]tiazóis.**



FONTE: Autor, 2019.

### 5.2.3.1 Caracterização química dos derivados 2-aminobenzo[d]tiazóis

De modo geral, estes derivados (**43** e **44**) possuem sinais característicos que são observados tanto nos espectros de IV quanto nos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ver volume 2). Nos espectros de IV são observados estiramentos assimétricos e simétricos ( $\nu_{as}$  e  $\nu_s$ ) para a ligação N–H, nas faixas de 3370-3431 e 3280-3350  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Os estiramentos ( $\nu$ ) para as ligações C=C aromáticas são observados na faixa contida entre 1044-1053  $\text{cm}^{-1}$ . Por fim, a ligação S–C do tiazol apresenta-se como um pequeno estiramento na faixa entre 905 e 981  $\text{cm}^{-1}$ . Com relação aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para estes 2-aminobenzo[d]tiazóis, verifica-se as metoxilas do composto (**43**) são observadas em 3,76 ppm, enquanto as metilas do composto (**44**) em 1,27 ppm. Isso se deve ao fato de que os sinais das metoxilas (**43**) são observados em campo mais baixo do que os sinais das metilas (**44**). Ainda, tal fato é totalmente plausível devido ao efeito de desblindagem ser mais pronunciado no derivado metoxilado, uma vez que o grupo alquila está diretamente ligado ao oxigênio da função éter. Este mesmo efeito é responsável pela observação dos sinais das metoxilas em campo mais baixo nos espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , sendo estes entre 56,14-56,66 ppm. O sinal da amina primária ( $\text{NH}_2$ ) nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  é observado na faixa entre 7,19 e 8,88 ppm. Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , o (**43**) apresenta

sinal para o deslocamento químico do carbono da ligação C=N do tiazol em 167 ppm. Entretanto, o análogo contendo o grupamento 4-*terc*-butila (**44**) apresenta um sinal para este mesmo carbono mais deslocado em direção ao campo mais baixo (172,48 ppm), o que pode estar relacionado ao caráter menos doador de elétrons, quando comparado com o seu análogo contendo metoxilas como substituintes.

#### 5.2.4 Síntese dos derivados 2-aminobenzo[*d*]tiazóis acoplados aos análogos dos ácidos carboxílicos racionalmente planejados

Nas próximas seções, mecanismos reacionais e esquemas ilustrativos serão apresentados e discutidos como anteriormente, no entanto, a discussão referente à caracterização química dos compostos planejados será fornecida após todas as seções relacionadas aos mecanismos reacionais envolvidos na obtenção dos mesmos.

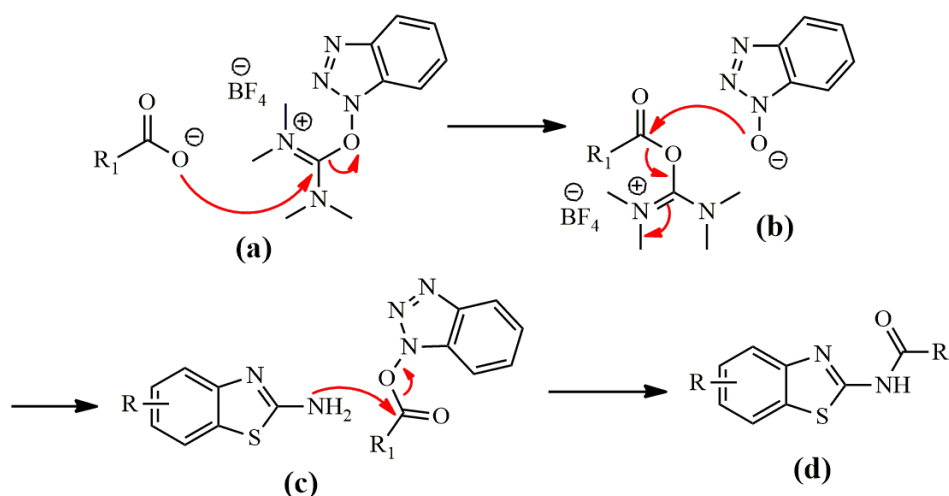
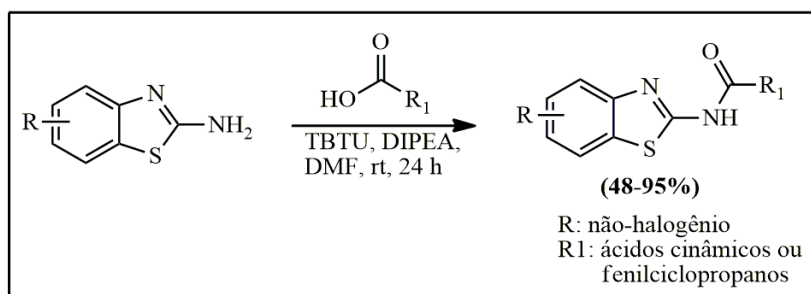
Inicialmente, outras moléculas monossustituídas com halogênios inseridos na posição 4 foram planejados, porém apenas o derivado contendo um átomo de cloro foi obtido. Acredita-se que os halogênios flúor e bromo inativam a amina primária do benzotiazol, impedindo o acoplamento com o correspondente ácido carboxílico. Entretanto, não se chegou a uma conclusão sobre qual fenômeno químico poderia ser responsável por tal efeito. Em adição, a posição 5 é completamente inativa, não sendo obtido nenhum derivado monossustituído para esta posição, independentemente de ser halogênio ou não.

##### 5.2.4.1 Síntese dos derivados 2-aminobenzo[*d*]tiazóis (não halogenados) acoplados aos análogos dos ácidos carboxílicos

A formação de ligações amidas é a mais comum das reações dentro do campo de estudo da química medicinal moderna, devido à sua alta diversidade, seletividade e rendimentos (BROWN; BOSTRÖM, 2016). O acoplamento de amidas foi usado para conectar os derivados 2-aminobenzo[*b*]tiazóis com diferentes ácidos carboxílicos (Figura 35). Tais reações foram realizadas utilizando-se os métodos padrões, o sal de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1',3,3'-tetrametilamino tetrafluoroborato (TBTU) e *N,N'*-Di-isopropiletilamina (DIPEA), esta última como base. De acordo com tal metodologia, os derivados desejados foram obtidos com rendimentos entre 48 e 95%. O primeiro passo da reação de acoplamento por TBTU é a ativação do correspondente carboxilato. Esse ataque nucleofílico do ácido carboxílico ao carbono polarizado positivamente do cátion urônio-TBTU conduz à eliminação de HOBT (*a*). Em

seguida, o intermediário **(b)** é convertido em um hidroxibenzotriazol éster-ativado **(c)**. A força propulsora dessa reação é a formação irreversível da tetrametilureia (WU et al., 2015). A amina suficientemente nucleofílica é capaz de formar a respectiva amida por meio da aminólise **(d)**.

**Figura 35 – Mecanismo reacional para obtenção dos derivados 2-aminobenzo[*d*]tiazóis não-halogenados acoplados aos correspondentes ácidos carboxílicos.**



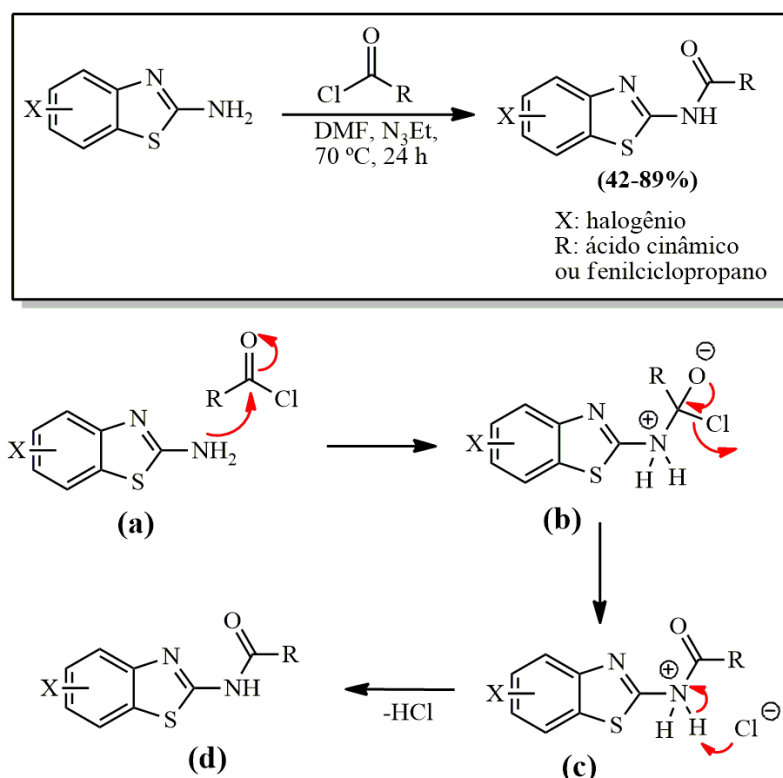
FONTE: Autor, 2019.

#### 5.2.4.2 Síntese dos derivados 2-aminobenzo[*d*]tiazóis (halogenados) acoplados aos análogos dos ácidos carboxílicos

Devido à baixa reatividade dos derivados 2-aminobenzo[*d*]tiazóis contendo halogênios como substituintes, derivados de cloretos de acila (cinamoíla e ciclopropanoíla) foram utilizados para a obtenção dos produtos desejados, com rendimentos entre 42 e 89% (Figura 36). Basicamente, a reação é procedida através de um mecanismo tipo *Schotten-Baumann*, cujo é utilizado tipicamente na obtenção de amidas a partir de aminas e cloretos de acilas (SMITH; MARCH, 2007). No entanto, existem outras adaptações relativamente mais recentes das condições reacionais de *Schotten-Baumann* (BABINSKI; SOLTANI; FRANTZ, 2008;

FRANTZ et al., 2002; OLIMPIERI; VOLONTERIO; ZANDA, 2008). A reação é inicialmente procedida por uma adição, onde o par de elétrons livre da amina primária ataca nucleofilicamente o carbono polarizado positivamente do derivado acilado ( $C^{\delta+}-O^{\delta-}$ ), formando uma ligação covalente **(a)**. Neste processo, dois elétrons da ligação C–O são repelidos inteiramente para o oxigênio, deixando este átomo com carga negativa **(b)**. O segundo passo reacional é caracterizado por uma eliminação, uma vez que a dupla ligação é reestabelecida (regeneração da carbonila), que libera o ânion cloreto para o meio reacional **(c)**. Por fim, este abstrai um próton do nitrogênio positivamente carregado, neutralizando a espécie química final **(d)**.

**Figura 36 – Mecanismo reacional para obtenção dos derivados 2-aminobenzo[d]tiazóis halogenados acoplados aos correspondentes ácidos carboxílicos.**



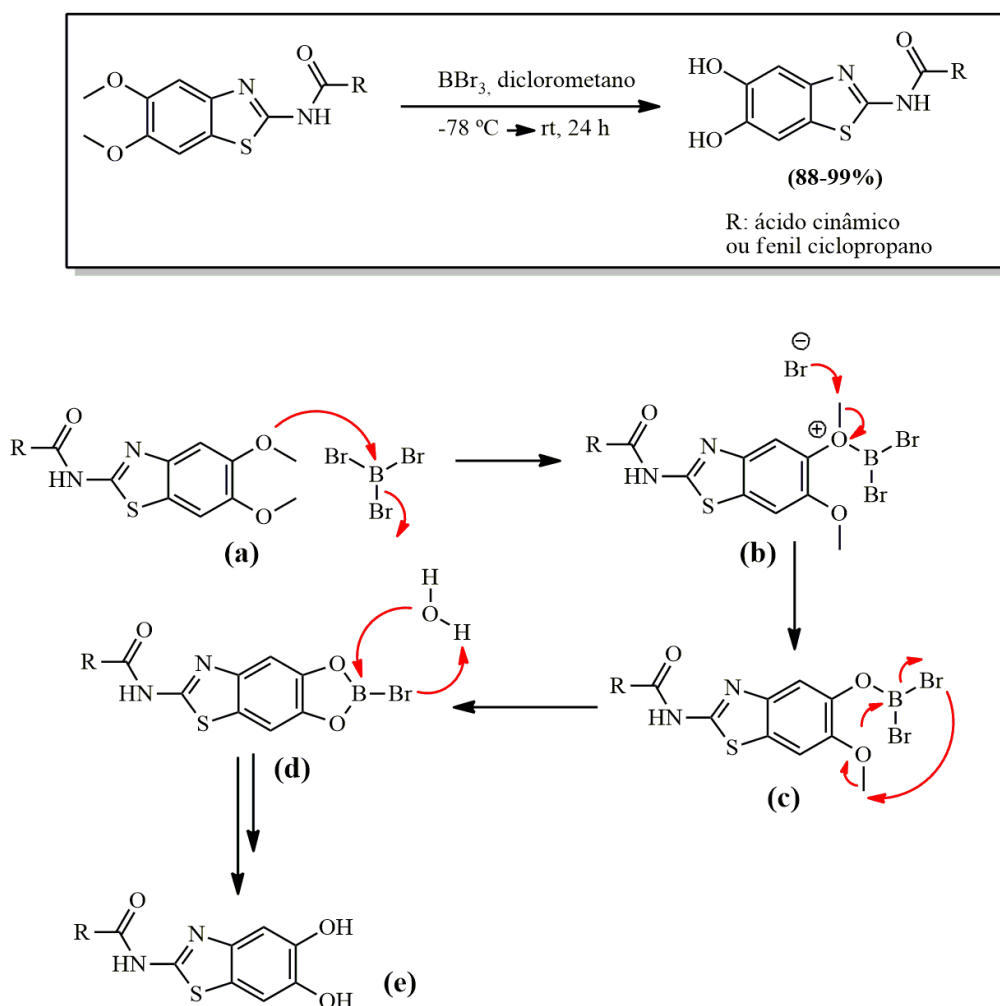
FONTE: Autor, 2019.

#### 5.2.4.3 Síntese dos derivados hidroxilados dos 2-aminobenzo[d]tiazóis acoplados aos análogos dos ácidos carboxílicos

Uma estratégia sintética utilizando-se  $\text{BBr}_3$  foi empregada para clivar os grupos protetores metoxila(s) e/ou etoxila(s) dos derivados finais sintetizados (BARTHELIS, 2018;

MCOMIE; WATTS; WEST, 1968). Para a realização deste método, uma solução de  $\text{BBr}_3$  em diclorometano à temperatura de  $-78^\circ\text{C}$  foi usada para promover a desproteção dos éteres, com rendimentos entre 88 e 99% (Figura 37). No primeiro passo reacional, o composto deficiente em elétrons, o  $\text{BBr}_3$ , forma um complexo de coordenação com uma base dura de Lewis, como o oxigênio  $sp^3$  (**a**). Para a clivar dos grupos alquila, o ânion brometo ataca estes para formar um brometo de alquila (**b**). Adicionalmente, para a desalquilação do grupo alquila adjacente (quando for o caso) ocorre a repetição deste mecanismo (**c**), enquanto a formação de um composto cíclico também é procedida (**d**). Este ciclo intermediário é desfeito através da adição de água (**d**), rendendo o produto duplamente desprotegido (**e**) (KOSAK et al., 2015).

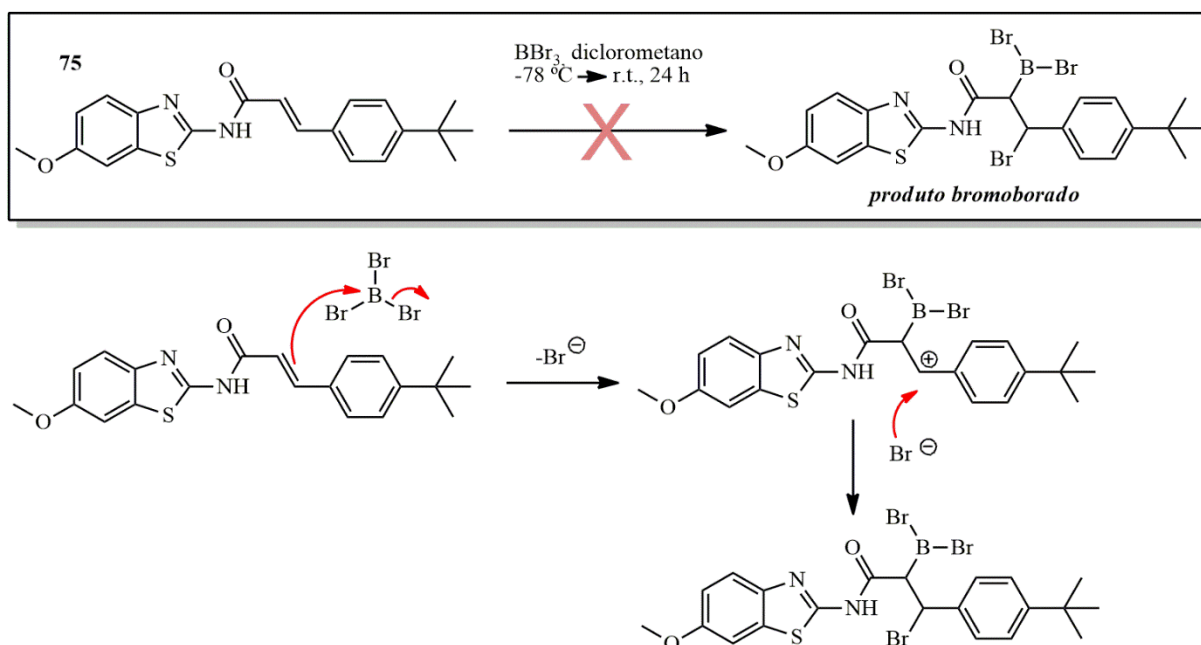
**Figura 37 – Mecanismo reacional para obtenção dos derivados hidroxilados dos 2-aminobenzo[d]tiazóis acoplados aos análogos dos ácidos carboxílicos.**



FONTE: Autor, 2019. O derivado dimetoxilado foi usado como modelo para o mecanismo proposto.

Apesar da presença da acrilamida na região central dos derivados dos ácidos cinâmicos, que funciona como um típico clássico acceptor de Michael (DAI et al., 2008; POON; MUNDY; SHATTUCK, 2002; SMITH; MARCH, 2007), esta é completamente estável na presença de  $\text{BBr}_3$  (nas condições descritas acima). Devido à grande deficiência de elétrons do  $\text{BBr}_3$ , a dupla ligação da acrilamida poderia reagir com este por um mecanismo de adição eletrofílica, destruindo a insaturação (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012b; SMITH; MARCH, 2007). Baseando-se nisto, poderia ocorrer uma reação do tipo bromoboração (Figura 38) (HARA et al., 1990; SUZUKI; HARA; HUANG, 2006), cujo mecanismo se inicia com o ataque eletrofílico da dupla ligação sobre o  $\text{BBr}_3$ , liberando um ânion brometo para o meio, o qual ataca o carbocátion resultante da quebra da dupla ligação, formando uma nova ligação covalente. Entretanto, tal fato não foi observado, caracterizando-se como um procedimento inédito para esta classe de moléculas, uma vez que não há dados na literatura demonstrando este tipo de reação em acrilamidas.

**Figura 38 – Mecanismo proposto para bromoboração dos inibidores.**



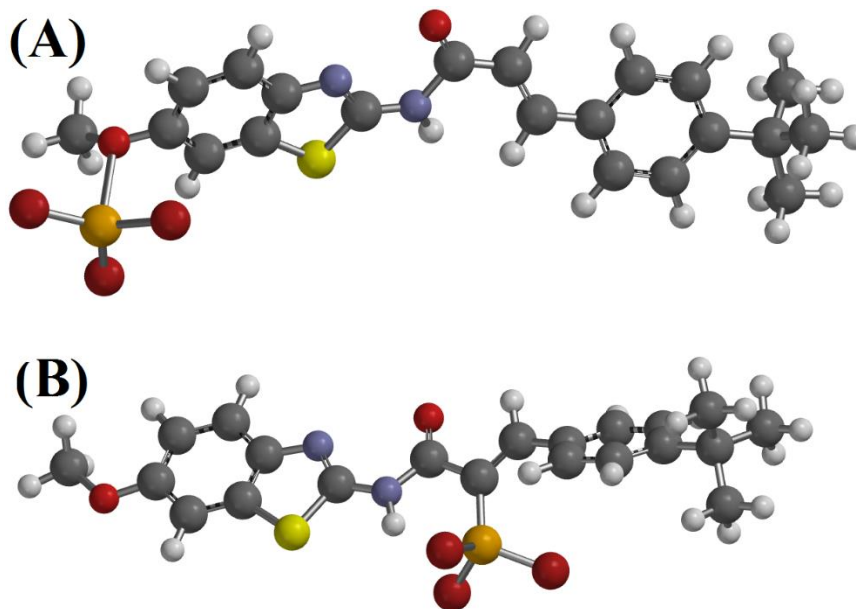
FONTE: Autor, 2019. O composto (**75**) foi utilizado como exemplo. Ilustração elaborada utilizando-se o software ChemDraw® v. 12.

Diante de tais informações, cálculos utilizando DFT foram realizados para obter-se maiores esclarecimentos sobre os mecanismos descritos nas figuras 37 e 38. Basicamente, o estado de transição para o primeiro ataque em cada um dos mecanismos (Figura 39) foi analisado usando B3LYP/6-31G(d). Dessa forma, verificou-se que o estado de transição para



desmetilação (A) é aproximadamente  $80 \text{ kcal mol}^{-1}$  mais favorável do que o estado de transição para a bromoboração (B). Assim, corroborando com os resultados experimentais obtidos.

**Figura 39** – Estados de transição analisados em nível atomístico usando DFT B3LYP/6-31G(d).



FONTE: Autor, 2019. Figura elaborada utilizando-se o *software* SPARTAN'14®.

#### 5.2.4.3.1 Caracterização química dos derivados 2-aminobenzo[*d*]tiazóis acoplados aos análogos dos ácidos carboxílicos racionalmente planejados

Quanto às características físico-químicas dos compostos sintetizados, observa-se que não há um padrão entre as diferentes séries de moléculas, mesmo estas sendo muito similares. No geral, os compostos derivados do ácido cinâmico não substituído (**45-63**) apresentam os menores tempos de retenção ( $R_T$ ), encontrando-se na faixa entre 0,64 e 2,08 minutos. Em contraste, os derivados do ácido 4-*terc*-butilcinâmico (**64-82**) apresentam maiores valores de  $R_T$ , estando entre 0,93 e 4,28 minutos. Tal fato está totalmente relacionado ao aumento da quantidade de carbonos nas estruturas dos compostos, uma vez que há a introdução do grupo 4-*terc*-butila na porção terminal da molécula, tornando a molécula menos polar e, conseqüentemente, exibindo um maior  $R_T$  em uma coluna cromatográfica em fase reversa ( $C_{18}$ ) (COLLINS; BRAGA, 2006). Os pontos de fusão ( $P_F$ ) revelam que todos os compostos possuem uma faixa similar de fusão, sendo entre 95 e 316 °C. No entanto, os compostos (**48**) e (**50**) não exibiram um  $P_F$ , devido os mesmos terem sido degradados antes mesmo da fusão do material.

Para estes, então, foram admitidos pontos de degradação ( $P_D$ ) nas faixas entre 298-299 e 315-316 °C, respectivamente.

A discussão sobre os resultados provenientes das análises espectroscópicas de IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  terá como foco os principais fragmentos estruturais que servem como características para distinguir as moléculas sintetizadas. Dessa forma, as vibrações harmônicas geradas pelos estiramentos ( $\nu$ ) das ligações N–H (amida), C=O (amida), C=C (*eno*),  $\text{CH}_2$  (ciclopropano) e S–C (tiazol) foram consideradas como pontos cruciais para a caracterização estrutural das moléculas finais por IV. Adicionalmente, os picos e seus respectivos valores de deslocamentos químicos para o hidrogênio da amida (NH) e para o carbono do tiazol (C=N) foram considerados representativos para caracterização estrutural por RMN. Tais grupos funcionais foram selecionados como pontos essenciais, devido estes sugerirem o acoplamento entre os dois farmacóforos (através da amida, atuando como um *linker*), confirmando que os dois farmacóforos estão unidos sem alterações estruturais, ou seja, presença do farmacóforo 1 (ligação S–C do tiazol) e 2 (ligação C=C *eno* ou presença do  $\text{CH}_{2\text{ciclo}}$ ).

Assim, os espectros de IV demonstram que os compostos exibem estiramento da ligação N–H na faixa entre 3543 e 2950  $\text{cm}^{-1}$ . No entanto, os derivados do fenilciclopropano (**102-120**) apresentam a faixa de  $\nu(\text{N-H})$  mais alta, estando entre 3543 e 2958  $\text{cm}^{-1}$ , provavelmente relacionada à presença do ciclopropano adjacente à amida. Contrariamente, derivados do ácido 4-*terc*-butilcinâmico (**64-82**) apresentam a menor faixa de  $\nu(\text{N-H})$ , estando entre 3063 e 2950  $\text{cm}^{-1}$  (influência da 4-*terc*-butila terminal). Em geral, o estiramento referente à ligação C=O apresenta valores praticamente constantes dentre todos os compostos sintetizados, com valores variando entre 1694 e 1650  $\text{cm}^{-1}$ . Para os derivados do ácido cinâmico, o estiramento da ligação C=C<sub>*eno*</sub> é considerado um fator determinante para esta classe química. Dessa forma, observa-se que este varia na faixa entre 1628 e 1598  $\text{cm}^{-1}$ . Com relação aos derivados (**102-120**), cujo possuem um anel ciclopropano no lugar da dupla ligação típica dos ácidos cinâmicos, observa-se que os estiramentos das ligações H–C–H ( $\text{CH}_{2\text{ciclo}}$ ) são exibidos na faixa entre 2923 e 3140  $\text{cm}^{-1}$ , próximos aos estiramentos da ligação N–H da amida. Por fim, todos os compostos apresentam um estiramento sutil que corresponde à ligação S–C do anel tiazol, ocorrendo na faixa entre 996 e 905  $\text{cm}^{-1}$ .

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , verifica-se que o deslocamento químico ( $\delta$ ) do sinal referente ao hidrogênio da amida (N– $^1\text{H}$ ) ocorre na faixa entre 10,12 e 13,06 ppm, para os compostos sintetizados. No entanto, observa-se que tal sinal apresenta-se mais deslocado em direção ao campo baixo na série derivada do ácido 4-clorocinâmico (**83-101**), ocorrendo entre 12,46 e 13,06 ppm. Tal fato está diretamente relacionado à presença do substituinte 4-cloro na

fenila do farmacóforo 2, o que causa um efeito retirador de elétrons (que se desloca por ressonância sobre a molécula) e desblinda este hidrogênio. Efeito inverso é constatado com a presença do grupamento 4-*terc*-butila terminal (**102-120**), onde este sinal pode ser observado em 10,12 ppm. Com relação ao sinal de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o carbono da ligação C=N do anel tiazol, este é observado na faixa entre 163,99 e 178,14 ppm para todos os compostos. Adicionalmente, evidencia-se que os compostos (**102-120**) exibem a mais alta faixa de valores para o deslocamento químico deste sinal, ocorrendo entre 170,92 e 178,14 ppm. Este fato, muito provavelmente, está relacionado à presença do anel ciclopropano que, por sua vez, interrompe a ressonância entre a fenila terminal (farmacóforo 2) e o benzotiazol (farmacóforo 1). Assim, o ambiente químico adjacente a este carbono (composto pelos heteroátomos  $N_{\text{tiazol}}$ ,  $S_{\text{tiazol}}$  e  $N_{\text{amida}}$ ) exerce um forte efeito de desblindagem sobre o carbono da ligação C=N, conduzindo a um aumento do seu valor de  $\delta$  e, conseqüentemente, deslocando o sinal à esquerda do espectro (campo baixo) (JACOBSEN, 2017; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Os espectros obtidos por espectrometria de massas de baixa resolução (LRMS) forneceram a validação final das estruturas propostas, confirmando que estas realmente foram sintetizadas. Adicionalmente, observou-se que todas as massas foram obtidas como sendo o somatório da massa molecular acrescida de 1 (um) Da, ou seja,  $M+1H^{1+}$ , com exceção dos compostos (**50**) e (**69**), que apresentaram massas adicionadas de 3 Da [ $(M+3H^{3+})$ ]. Isso é totalmente compreensível, uma vez que a técnica de ESI foi empregada, permitindo a detecção de íons pseudomoleculares, cujo estão relacionados às ionizações das moléculas analisadas (AITKEN, 2010).

### 5.3 Resultados Relacionados aos Vírus do Zika e Dengue

#### 5.3.1 Avaliação da atividade biológica dos análogos frente à protease NS2B-NS3 dos vírus Zika e Dengue

De modo geral, todos os análogos sintetizados foram avaliados quanto aos seus respectivos potenciais como inibidores da protease NS2B-NS3 do ZIKV. Durante esta etapa, todos os derivados foram testados em uma concentração fixa de 20  $\mu\text{M}$ . Contudo, apenas os compostos que exibiram percentual de inibição (% inibição)  $\geq 60\%$  foram utilizados para a determinação dos valores de  $\text{IC}_{50}$ . Além disso, tais compostos foram então testados frente à protease do DENV2 e, igualmente aos experimentos envolvendo ZIKV, apenas os compostos com inibição  $\geq 60\%$  foram avaliados para determinação dos valores de  $\text{IC}_{50}$ .

Todos os resultados obtidos e, posteriormente, analisados foram agrupados nas tabelas de 3 a 6. Estes foram organizados por similaridade química dentro de quatro séries de compostos, sendo: ácido cinâmico (Tabela 3); ácido 4-*terc*-butilcinâmico (Tabela 4); ácido 4-clorocinâmico (Tabela 5); e fenilciclopropano (Tabela 6). Para cada tabela de dados, a relação estrutura-atividade (REA) foi profundamente discutida.

### 5.3.1.1 Série dos derivados do ácido cinâmico não substituído

**Tabela 3 – Atividade inibitória dos derivados do ácido cinâmico não substituído frente à protease NS2B-NS3 dos vírus Zika e Dengue.**

Número	R	NS2B-NS3 (20 μM)*	
		ZIKV IC <sub>50</sub> ± SD ou %inibição	DENV2 IC <sub>50</sub> ±SD ou %inibição
45	6- <i>H</i>	n.a.	n.d.
46	6- <i>F</i>	n.a.	n.d.
47	4,6- <i>F</i>	n.a.	n.d.
48	6- <i>Cl</i>	n.a.	n.d.
49	4- <i>Cl</i>	n.a.	n.d.
50	6- <i>Br</i>	n.a.	n.d.
51	6- <i>CF</i> <sub>3</sub>	n.a.	n.d.
52	4- <i>CH</i> <sub>3</sub>	n.a.	n.d.
53	6- <i>CH</i> <sub>3</sub>	n.a.	n.d.
54	5,6- <i>CH</i> <sub>3</sub>	n.a.	n.d.
55	6- <i>C(CH</i> <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	4,29%	n.d.
56	6- <i>OCH</i> <sub>3</sub>	26,14%	n.d.
57	6- <i>OCH</i> <sub>2</sub> <i>CH</i> <sub>3</sub>	<b>13,6 ± 1,8 μM (74%)</b>	<b>34,3%</b>
58	4- <i>OCH</i> <sub>3</sub>	n.a.	n.d.
59	5,6- <i>OCH</i> <sub>3</sub>	34,25%	n.d.
60	6- <i>OH</i>	18,59%	n.d.
61	4- <i>OH</i>	52,38%	n.d.
62	5,6- <i>OH</i>	29,2%	n.d.

<b>63</b>	6-NO <sub>2</sub>	31,48%	n.d.
-----------	-------------------	--------	------

\*: todos os experimentos foram realizados em triplicatas; SD: desvio-padrão; n.a.: não ativo; n.d.: não determinado.

Em geral, a maioria dos compostos contidos nesta série foram completamente inativos (n.a.) frente à NS2B-NS3, na concentração de 20 µM. No entanto, quatro análogos desta série apresentaram valores de inibição, sendo o (**57**) o composto mais promissor da série (IC<sub>50</sub> de 13,6 µM e 74,11% de inibição a 20 µM). Entretanto, este análogo apresentou pobre inibição sobre a protease do DENV2 (34,3%). Ademais, considerando as informações contidas na Tabela 3, uma descrição completa da REA é fornecida a seguir.

Inicialmente, observa-se que o análogo não substituído (**45**) é completamente inativo. O mesmo é verificado para os derivados halogenados, contendo substituintes tais como 6-F (**46**), 4,6-F (**47**), 6-Cl (**48**), 4-Cl (**49**), 6-Br (**50**) e 6-CF<sub>3</sub> (**51**).

Os análogos contendo apenas grupos alquilas, tais como 4-CH<sub>3</sub> (**52**), 6-CH<sub>3</sub> (**53**), 5,6-CH<sub>3</sub> (**54**) também não exibem nenhuma atividade, com exceção do 6-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (**55**), cujo apresenta baixa atividade (4,29%).

Em contraste, os compostos contendo grupos alcóxila como substituintes (**56-59**) podem ser considerados como sendo os candidatos mais promissores desta série de compostos. Neste sentido, a introdução de uma metóxila (-OCH<sub>3</sub>) na posição 6 (**56**) conduz à obtenção de um composto com 26,14% de inibição enzimática. Entretanto, quando tal grupamento é introduzido na posição 4 (**58**), observa-se a completa inativação da molécula resultante. Em contrapartida, quando uma nova metóxila é inserida na posição 5 do (**56**), gerando o análogo (**59**), verifica-se um aumento da atividade inibitória, chegando a 34,25% de inibição da NS2B-NS3 do ZIKV à concentração de 20 µM. Já a substituição da 6-OCH<sub>3</sub> do (**56**) por uma etóxila (6-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) fornece o composto (**57**), cujo é o melhor derivado da série de compostos, exibindo 74,11% de inibição na concentração testada. Dessa forma, o valor de IC<sub>50</sub> para este foi determinado como sendo 13,6 µM. Contudo, tal composto não apresenta atividade significativa sobre a protease do DENV2, observando-se inibição de 34,3%. Tal fato torna-se interessante, pois sugere que este candidato possuam certa seletividade para a protease do ZIKV, explicando a baixa atividade frente à protease do DENV2.

Dentre derivados hidroxilados (**60-62**), o composto contendo uma hidroxila na posição 4 (**61**) demonstrou a melhor atividade, sendo 52,38% de inibição à concentração de 20 µM. Entretanto, quando esta hidroxila é deslocada para a posição 6 (**60**), resulta em composto 35%

menos ativo. Além disso, se uma nova hidroxila for adicionada à posição 5 (**62**) conduz a um aumento da atividade (~11%), em comparação com seu precursor (**60**).

Por fim, a introdução do grupo nitro (-NO<sub>2</sub>) na posição 6 (**63**) permite obter-se um análogo com similar perfil ao (**59**), apresentando 31,48% de inibição.

Considerando todas as informações provenientes do estudo de REA desta série de compostos, possibilita-se inferir que grupos fracos retiradores e/ou doadores de elétrons (como por exemplo, halogênios e alquilas, respectivamente) são extremamente desvantajosos, gerando análogos químicos completamente inativos. Em contraste, grupos fortes retiradores e/ou doadores de elétrons (como por exemplo, nitro e alcoxila, respectivamente) podem ser considerados como sendo os substituintes mais promissores nesta série de compostos.

### 5.3.1.2 Série dos derivados do ácido 4-*terc*-butilcinâmico

**Tabela 4 – Atividade inibitória dos derivados do ácido 4-*terc*-butilcinâmico frente à protease NS2B-NS3 dos vírus Zika e Dengue.**

Número	R	NS2B-NS3 (20 μM)*	
		ZIKV IC <sub>50</sub> ± SD ou %inibição	DENV2 IC <sub>50</sub> ± SD ou %inibição
<b>64</b>	6- <i>H</i>	41,57%	n.d.
<b>65</b>	6- <i>F</i>	n.a.	n.d.
<b>66</b>	4,6- <i>F</i>	40,19%	n.d.
<b>67</b>	6- <i>Cl</i>	11,32%	n.d.
<b>68</b>	4- <i>Cl</i>	n.a.	n.d.
<b>69</b>	6- <i>Br</i>	3,03%	n.d.
<b>70</b>	6- <i>CF</i> <sub>3</sub>	n.a.	n.d.
<b>71</b>	4- <i>CH</i> <sub>3</sub>	7,0%	n.d.
<b>72</b>	6- <i>CH</i> <sub>3</sub>	n.a.	n.d.
<b>73</b>	5,6- <i>CH</i> <sub>3</sub>	<b>15,7 ± 2,6 μM (62%)</b>	<b>20,0 ± 1,2 μM (61%)</b>
<b>74</b>	6- <i>C(CH</i> <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	n.a.	n.d.
<b>75</b>	6- <i>OCH</i> <sub>3</sub>	<b>7,6 ± 0,9 μM (99%)</b>	<b>11,0 ± 0,8 μM (64%)</b>
<b>76</b>	6- <i>OCH</i> <sub>2</sub> <i>CH</i> <sub>3</sub>	37,8%	n.d.

<b>77</b>	4- <i>OCH</i> <sub>3</sub>	42,42%	n.d.
<b>78</b>	5,6- <i>OCH</i> <sub>3</sub>	7,04%	n.d.
<b>79</b>	6- <i>OH</i>	12,52%	n.d.
<b>80</b>	4- <i>OH</i>	<b>15,2 ± 1,2 μM (76%)</b>	27,99%
<b>81</b>	5,6- <i>OH</i>	53,75%	n.d.
<b>82</b>	6- <i>NO</i> <sub>2</sub>	n.a.	n.d.

\*: todos os experimentos foram realizados em triplicatas; SD: desvio-padrão; n.a.: não ativo; n.d.: não determinado.

Com relação a esta série de análogos, observa-se que o análogo não substituído (**64**) apresenta 41,57% de inibição. De maneira oposta, os derivados halogenados 6-F (**65**), 4-Cl (**68**) e 6-CF<sub>3</sub> (**70**) não demonstram nenhuma atividade frente à NS2B-NS3 do ZIKV. No entanto, os compostos contendo os substituintes 4,6-F (**66**), 6-Cl (**67**) e 6-Br (**69**) exibem algum percentual de inibição, sendo 40,19; 11,32 e 3,03%, respectivamente.

Considerando os análogos contendo apenas metilas (**71-74**), verifica-se que a metila (CH<sub>3</sub>) na posição 6 leva a um composto completamente inativo (**72**). Entretanto, o deslocamento desta para a posição 4 fornece um derivado (**71**) com fraca inibição, apenas 7,0%. Em contrapartida, a inserção de metilas nas posições 5 e 6 conduz a um composto promissor (**73**), cujo demonstrou 62,84% de inibição e, posteriormente, obteve-se um valor de IC<sub>50</sub> de 15,7 μM sobre a protease do ZIKV. Baseando-se nisto, este análogo foi avaliado frente à protease do DENV2, onde observou-se um perfil de inibição percentual similar ao visualizado no ensaio com a protease do ZIKV, entretanto, este análogo apresentou um valor de IC<sub>50</sub> maior para a protease do DENV2. A partir de tais observações, pode-se sugerir que este composto atua sobre as duas enzimas de modo análogo, sem distinção entre as proteases, portanto, caracterizando um compostos não seletivo.

Analogamente à série derivada do ácido cinâmico não substituído, os compostos contendo éteres como substituintes (**75-78**) também são encontrados nos derivados mais promissores desta série. Considerando tais compostos, verifica-se que o análogo com metoxilas nas posições 5 e 6 (**78**) apresenta uma pobre atividade inibitória, apenas 7,04%. A introdução de uma metoxila na posição 4 (**77**) aumenta a atividade do composto resultante, cujo apresenta inibição de 42,42%. Ademais, a transferência desta para a posição 6 (**75**) resulta na obtenção do análogo mais promissor desta série, o qual exhibe inibição de 99,74% da atividade da NS2B-NS3 do ZIKV. Dessa forma, a determinação do valor de IC<sub>50</sub> foi necessária, onde obteve-se o valor de 7,6 μM. Tendo-se em vista tal resultado, a avaliação deste sobre a protease do DENV2

foi realizada, revelando uma inibição de 64,1%, a qual resultou em um valor de  $IC_{50}$  de 11  $\mu$ M. Baseando-se nas informações coletadas para este derivado, pode-se afirmar que este possui baixa seletividade para distinguir entre as enzimas testadas, porém este apresenta maior afinidade para a protease do ZIKV, o que reflete diretamente no valor de  $IC_{50}$ . Na sequência, a substituição do 6-OCH<sub>3</sub> (**75**) por um grupamento 6-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (**76**) conduz à grande perda na atividade inibitória, resultando em um análogo que demonstra inibir apenas 37,8% da atividade enzimática.

Considerando os derivados hidroxilados (**79-81**), verifica-se que o composto com uma hidroxila na posição 4 (**80**) é o mais ativo dentre estes, cujo exibiu 76,53% de inibição à concentração de 20  $\mu$ M. Novas diluições foram realizadas para este composto, onde encontrou-se um  $IC_{50}$  de 15,2  $\mu$ M. Porém, o composto (**80**) não demonstrou significativa atividade frente à protease do DENV2, tendo apenas 27,99% de inibição. Baseando-se nestas observações, o composto (**80**) pode ser considerado como um composto seletivo para a protease do ZIKV. Quando esta hidroxila é deslocada para a posição 6 (**79**), observa-se uma brusca redução da atividade antiviral, conduzindo a um composto com inibição de 12,52% da atividade enzimática. Adicionalmente, quando uma nova hidroxila é introduzida na posição 5 do composto (**79**), gera-se o composto (**81**), o qual exibe uma maior atividade do que seu precursor, levando a uma inibição de 53,75% da atividade da protease do ZIKV.

Por fim, a inserção de um grupo 6-NO<sub>2</sub> na posição 6 resulta na completa inativação da molécula resultante (**82**).

De modo geral, verifica-se que esta série de compostos segue um perfil semelhante à série do ácido cinâmico não substituído, sendo novamente os halogênios e as alquilas (fracos retiradores e doadores de elétrons, respectivamente) responsáveis por gerarem compostos pobremente ativos, com exceção do (**73**). Em paralelo, os análogos com substituintes alcóxilas (fortes doadores de elétrons) apresentam a melhor atividade dentro da série. Contrariamente à série do ácido cinâmico não substituído, o grupamento nitro (forte retirador de elétrons) é responsável por gerar um composto totalmente inativo.



## 5.3.1.3 Série dos derivados do ácido 4-cloro cinâmico

**Tabela 5 – Atividade inibitória dos derivados do ácido 4-clorocinâmico frente à protease NS2B-NS3 dos vírus Zika e Dengue.**

Número	R	NS2B-NS3 (20 μM)*	
		ZIKV IC <sub>50</sub> ou %inibição	DENV2 IC <sub>50</sub> ou %inibição
83	6-H	20,91%	n.d.
84	6-F	28,34%	n.d.
85	4,6-F	15,46%	n.d.
86	6-Cl	24,81%	n.d.
87	4-Cl	n.a.	n.d.
88	6-Br	13,84%	n.d.
89	6-CF <sub>3</sub>	25,01%	n.d.
90	4-CH <sub>3</sub>	25,04%	n.d.
91	6-CH <sub>3</sub>	26,32%	n.d.
92	5,6-CH <sub>3</sub>	19,32%	n.d.
93	6-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	9,78%	n.d.
94	6-OCH <sub>3</sub>	14,2%	n.d.
95	6-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	47,15%	n.d.
96	4-OCH <sub>3</sub>	n.a.	n.d.
97	5,6-OCH <sub>3</sub>	33,4%	n.d.
98	6-OH	17,48%	n.d.
99	4-OH	52,18%	n.d.
100	5,6-OH	43,98%	n.d.
101	6-NO <sub>2</sub>	<b>20,64 ± 2,2 μM (82%)</b>	<b>19,6%</b>

\*: todos os experimentos foram realizados em triplicatas; SD: desvio-padrão; n.a.: não ativo; n.d.: não determinado.

Analisando-se os dados da tabela mostrada acima, constata-se que o análogo não substituído (**83**) é capaz de inibir 20,91% da atividade enzimática da protease do ZIKV. Similarmente, os derivados halogenados contendo 6-F (**84**), 4,6-F (**85**), 6-Cl (**86**), 6-Br (**88**) e

6-CF<sub>3</sub> (**89**) exibem valores de inibição aproximados entre eles, variando entre 13,84 e 28,34%. Adicionalmente, quando um átomo de cloro é introduzido na posição 4 (**87**), gera-se um análogo completamente inativo. Interessantemente, verifica-se que os análogos fluorados na posição 6 (**84** e **89**) fornecem os melhores valores de inibição dentre os halogenados, onde tais compostos apresentam valores de inibição de 28,34 e 25,01%, respectivamente. Entretanto, a inserção de dois átomos de flúor simultaneamente, nas posições 4 e 6 do (**83**), gerando o (**85**), conduz à redução da atividade em mais de 10%, quando comparado com os compostos (**84**) e (**89**). O análogo contendo um átomo de bromo na posição 6 (**88**) expressa significativa redução da atividade (~10%), quando comparado com os compostos (**84**), (**86**) e (**89**).

Considerando os derivados que contém apenas alquilas como substituintes (**90-93**), observa-se que o grupo metila na posição 6 (**91**) confere maior atividade (26,32%), quando comparado aos seus análogos contendo grupos metilas nas posições 4 (**90**) ou 5 e 6 (**92**), os quais apresentam valores de inibição de 25,04 e 19,32%, respectivamente. Quando um grupo alquila volumoso, como no caso do 6-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (**93**), é introduzido na molécula, observa-se uma robusta redução na atividade.

Ao analisar os compostos contendo grupos alcóxilais (**94-97**), verifica-se que estes representam os derivados mais promissores da série. Neste sentido, observa-se que um grupo etoxila na posição 6 (**95**) expressa a melhor atividade, com 47,15% de inibição da NS2B-NS3 do ZIKV. Quando a etoxila é substituída por uma metoxila (**94**), observa-se uma acentuada redução da atividade, apresentando apenas 14,2% de inibição. Além disso, quando esta metoxila é deslocada para a posição 4, constata-se a completa inativação da molécula resultante (**96**). Em adição, o análogo dimetoxilado nas posições 5 e 6 (**97**) apresenta a terceira maior atividade da série, com 33,4% de inibição.

Dentre os derivados hidroxilados (**98-100**), o composto contendo uma hidroxila na posição 6 (**98**) apresenta a menor atividade dentre estes, sendo esta 17,48% de inibição. Adicionalmente, quando uma nova hidroxila é introduzida à posição 5 deste composto, gerando o composto (**100**), verifica-se que há um aumento na atividade inibitória (43,98%). Por fim, quando a hidroxila do composto (**98**) é deslocada para a posição 4 (**99**), obtém-se a melhor atividade dentre os compostos hidroxilados, apresentando 52,18% de inibição da protease do ZIKV.

Por fim, a introdução do grupo nitro na posição 6 resulta no melhor candidato sintetizado dentro dessa série (**101**). Este exibe 82,9% de inibição enzimática à concentração de 20 µM. Desta forma, seu valor de IC<sub>50</sub> foi determinado como sendo 20,64 µM. Considerando-se tal composto como sendo um análogo moderadamente ativo, o mesmo foi avaliado frente à

protease do DENV2, onde observou-se que este foi capaz de inibir apenas 19,6% da atividade enzimática. Dessa forma, pode-se sugerir que tal composto apresenta uma maior afinidade pela enzima do ZIKV.

Baseando-se em todos os dados apresentados acima, é possível afirmar que os efeitos dos grupos doadores ou retiradores (fortes ou fracos) de elétrons é mais sutil dentro desta série. Entretanto, o nitro (grupo fortemente retirador de elétrons), bem como alcóxilas (grupo fortemente doador de elétrons) parecem novamente ser capazes de influenciar positivamente o perfil biológico desta série.

#### 5.3.1.4 Série dos derivados do fenilciclopropano

**Tabela 6 – Atividade inibitória dos derivados do fenilciclopropano frente à protease NS2B-NS3 dos vírus Zika e Dengue.**

Número	R	NS2B-NS3 (20 µM)*	
		ZIKV IC <sub>50</sub> ± SD ou %inibição	DENV2 IC <sub>50</sub> ± SD ou %inibição
102	6-H	n.a.	n.d.
103	6-F	2,37%	n.d.
104	4,6-F	19,1%	n.d.
105	6-Cl	n.a.	n.d.
106	4-Cl	8,18%	n.d.
107	6-Br	1,05%	n.d.
108	6-CF <sub>3</sub>	n.a.	n.d.
109	4-CH <sub>3</sub>	1,49%	n.d.
110	6-CH <sub>3</sub>	n.a.	n.d.
111	5,6-CH <sub>3</sub>	n.a.	n.d.
112	6-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	n.a.	n.d.
113	6-OCH <sub>3</sub>	3,6%	n.d.
114	6-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2,01%	n.d.
115	4-OCH <sub>3</sub>	n.a.	n.d.

<b>116</b>	<i>5,6-OCH<sub>3</sub></i>	n.a.	n.d.
<b>117</b>	<i>6-OH</i>	3,98%	n.d.
<b>118</b>	<i>4-OH</i>	n.a.	n.d.
<b>119</b>	<i>5,6-OH</i>	<b>28,35 ± 0,8 μM (65%)</b>	<b>24,11%</b>
<b>120</b>	<i>6-NO<sub>2</sub></i>	12,17%	n.d.

\*: todos os experimentos foram realizados em triplicatas; SD: desvio-padrão; n.a.: não ativo; n.d.: não determinado.

De modo geral, esta série de derivados pode ser considerada como sendo a mais inativa frente à NS2B-NS3 do ZIKV e DENV2. Fato este não surpreendente, uma vez que esse tipo de *scaffold* tipicamente está relacionado aos compostos ativos sobre à nsP2 do CHIKV, como descrito na fundamentação teórica deste trabalho, bem como na seção do planejamento racional dos derivados sintéticos.

Inicialmente, observa-se que os compostos contendo os substituintes 6-H (**102**), 6-Cl (**105**), 6-CF<sub>3</sub> (**108**), 6-CH<sub>3</sub> (**110**), 5,6-CH<sub>3</sub> (**111**), 6-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (**112**), 4-OCH<sub>3</sub> (**115**), 5,6-OCH<sub>3</sub> (**116**) e 4-OH (**118**) são completamente inativos.

De modo geral, halogênios podem ser considerados como os substituintes mais interessantes para este tipo de estrutura molecular, apesar de apresentarem efeitos praticamente insignificantes. O flúor na posição 6 (**103**) gera um análogo com 2,37% de inibição, no entanto, quando um novo átomo de flúor é introduzido na posição 4 (**104**), observa-se o aumento da atividade em aproximadamente 8 (oito) vezes. Quando um átomo de cloro está presente na posição 4 (**106**), verifica-se atividade de 8,18%, diferentemente dos seus análogos (**105**) e (**108**). No entanto, um átomo de bromo nesta mesma posição (**107**) reduz tal atividade (1,05%). A partir destas observações pode-se afirmar que os halogênios na posição 6 desfavorecem a atividade inibitória. Os substituintes alquilas representam os grupamentos menos promissores desta série, uma vez que apenas o 4-CH<sub>3</sub> (**109**) apresenta 1,49% de inibição, enquanto os demais congêneres (**110**, **111** e **112**) são completamente inativos. Os derivados contendo éteres como substituintes não se mostram promissores, diferentemente do observado nas séries anteriormente discutidas. As moléculas contendo metoxilas nas posições 4 (**115**) ou 5 e 6 (**116**) são completamente inativas. Entretanto, o análogo contendo metoxila na posição 6 (**113**) apresenta baixa atividade (3,6%), a qual é reduzida com a substituição desta por uma etoxila (**114**), resultando em 2,01% de inibição.

Com relação aos derivados hidroxilados (**117-119**), verifica-se que o (**118**) é inativo frente à enzima do ZIKV. Contudo, quando a hidroxila é deslocada para a posição 6 (**117**),

verifica-se uma baixa atividade (3,98%). Em contraste, quando grupos hidroxilas estão presentes nas posições 5 e 6 (**119**) a melhor atividade da série é observada (65,51%). Assim, novas análises revelaram que tal composto possui um  $IC_{50}$  de 28,35  $\mu$ M frente à NS2B-NS3 do ZIKV. Em contrapartida, esta molécula não apresenta a mesma atividade frente à enzima do DENV2 (24,11%).

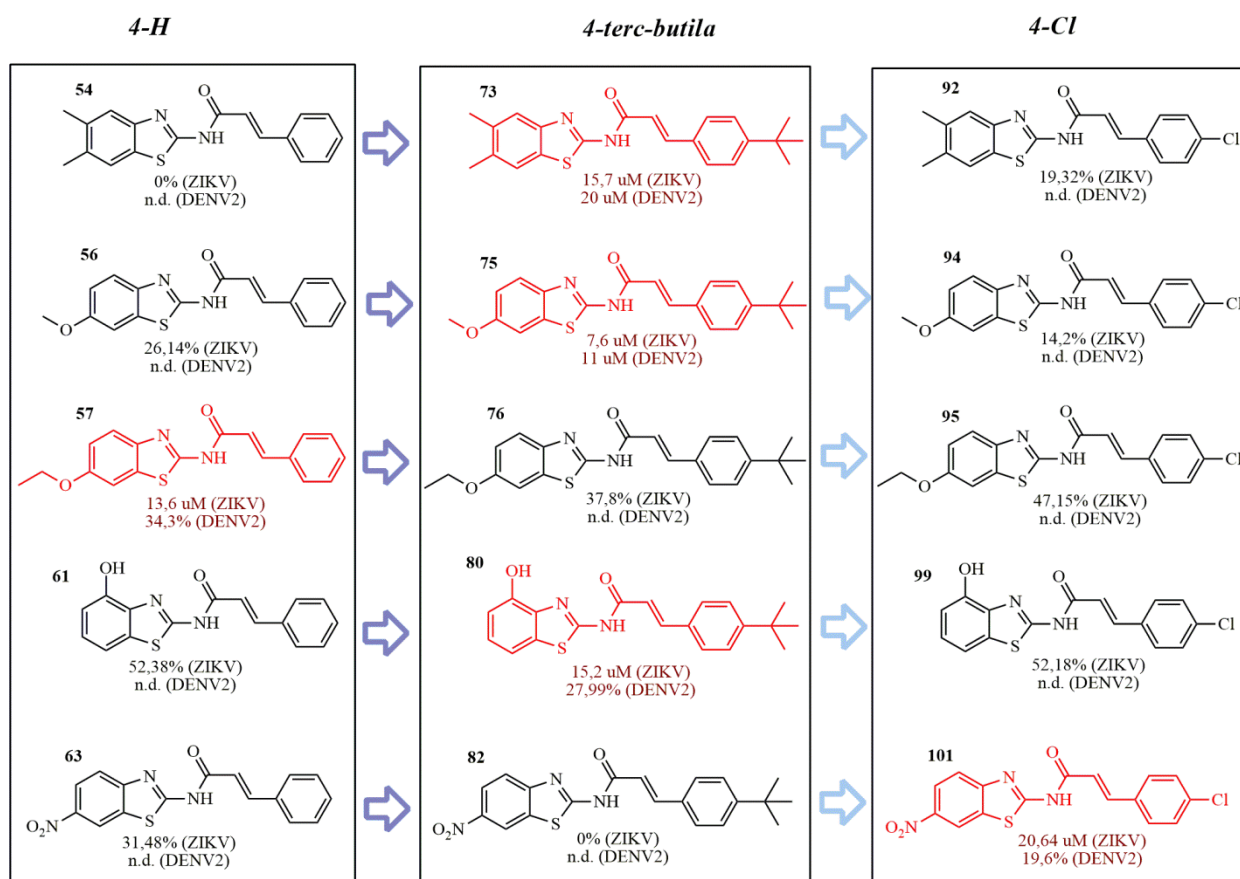
Por fim, a introdução de um grupo nitro na posição 6 (**120**) resulta em uma molécula que apresenta baixo poder de inibição da atividade enzimática, com apenas 12,17%.

Devido ao grande número de compostos inativos e/ou pouco ativos, a REA desta série de moléculas apresenta-se limitada, uma vez que independentemente do grande número de substituintes, pouca variação no perfil de inibição foi observada. Assim, as informações obtidas para esta série não permitem um estabelecimento seguro de parâmetros relacionados à atividade. Além disso, não é possível fornecer uma conexão com os conceitos de grupos doadores e retiradores de elétrons, uma vez que as atividades não sugerem tais influências. Por fim, acredita-se que fatores estéricos/conformacionais (devido a presença do ciclopropano na estrutura) podem estar influenciando a atividade destas moléculas.

### 5.3.2 Relação estrutura-atividade entre as séries de compostos derivados do ácido cinâmico

A partir das informações observadas nas Tabelas 3-5, torna-se possível discutir sobre a REA entre as diferentes séries de compostos (séries 4-H, 4-*terc*-butila e 4-Cl), respeitando a similaridade estrutural entre as moléculas contidas nestas (Figura 40). Não foi possível incluir a derivada do fenilciclopropano nesta discussão, uma vez que está apresenta um esqueleto químico diferente das demais e, como dito anteriormente, tal série fornece limitadas informações quanto à REA.

**Figura 40 – Similaridade estrutural dos derivados selecionados para REA interséries.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o software ChemDraw® v. 12.

Baseando-se na figura acima, verifica-se que a utilização do ácido cinâmico não substituído se mostra vantajoso unicamente quando o farmacóforo 1 possui um grupamento etoxila na posição 6 (**57**).

Da mesma forma, demonstra-se que a introdução do grupo *tert*-butila à fenila do farmacóforo 2 representa uma significativa modificação estrutural, uma vez que esta aparece em três análogos promissores (**73**, **75** e **80**). No entanto, em alguns casos, a introdução da *tert*-butila reduz significativamente a atividade inibitória, como observado para os análogos (**76**) e (**82**).

Por fim, a inserção do *para*-cloro na fenila do ácido cinâmico fornece derivados com maior atividade (**95** e **101**) do que seus correspondentes precursores, quando comparados com os análogos contendo o grupo *tert*-butila (**76** e **82**). Adicionalmente, um promissor candidato é gerado quando simultaneamente dois grupos retiradores de elétrons (6-NO<sub>2</sub> e 4'-Cl) são introduzidos na molécula, fornecendo a molécula (**101**).

### 5.3.3 Modificações estruturais dos compostos mais promissores

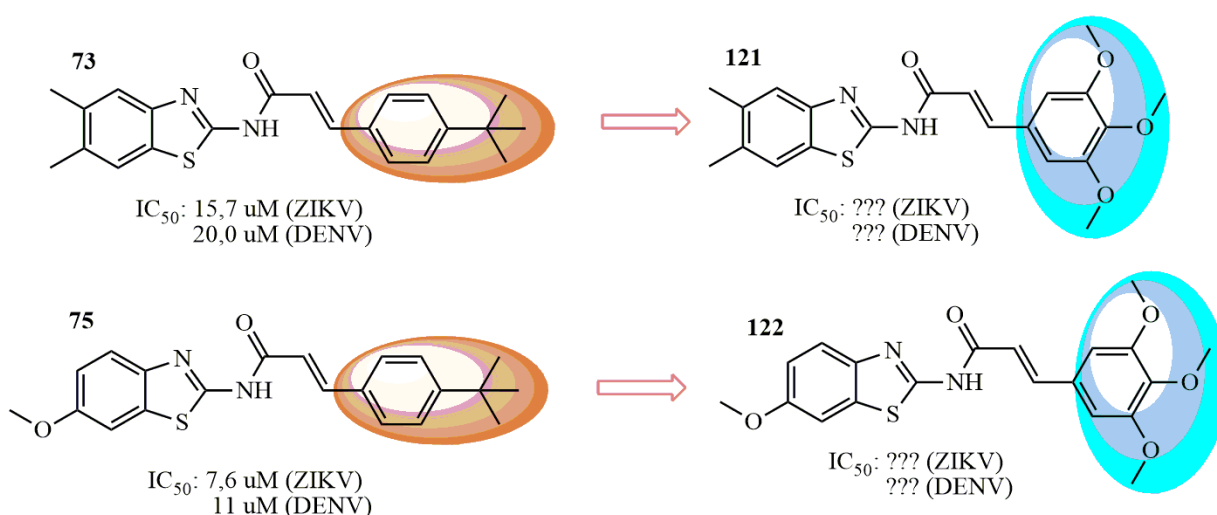
Os compostos **(73)** e **(75)** foram considerados como os mais promissores devido ambos apresentarem atividade sobre à NS2B-NS3 do ZIKV e DENV2. Dessa forma, tais compostos foram selecionados para serem modificados quanto às regiões dos farmacóforos 1 e 2.

#### 5.3.3.1 Modificações dos compostos **(73)** e **(75)**

##### 5.3.3.1.1 Introdução do grupo trimetoxilbenzeno (farmacóforo 2)

Observando-se os resultados contidos nas Tabelas 3-5, verifica-se que os derivados contendo alcóxililas como substituintes no farmacóforo 1 apresentam atividades superiores, quando comparados aos seus demais congêneres. Neste sentido, decidiu-se adicionar metoxilas nos compostos **(73)** e **(75)**, utilizando-se um derivado trimetoxilado do ácido cinâmico (Figura 41). Por fim, tal modificação foi desvantajosa, uma vez que foram obtidos derivados **(121)** e **(122)** com alta fluorescência, o que impossibilitou a determinação da atividade biológica dos mesmos, por métodos fluorimétricos.

**Figura 41 – Derivados trimetoxilados dos compostos mais promissores.**

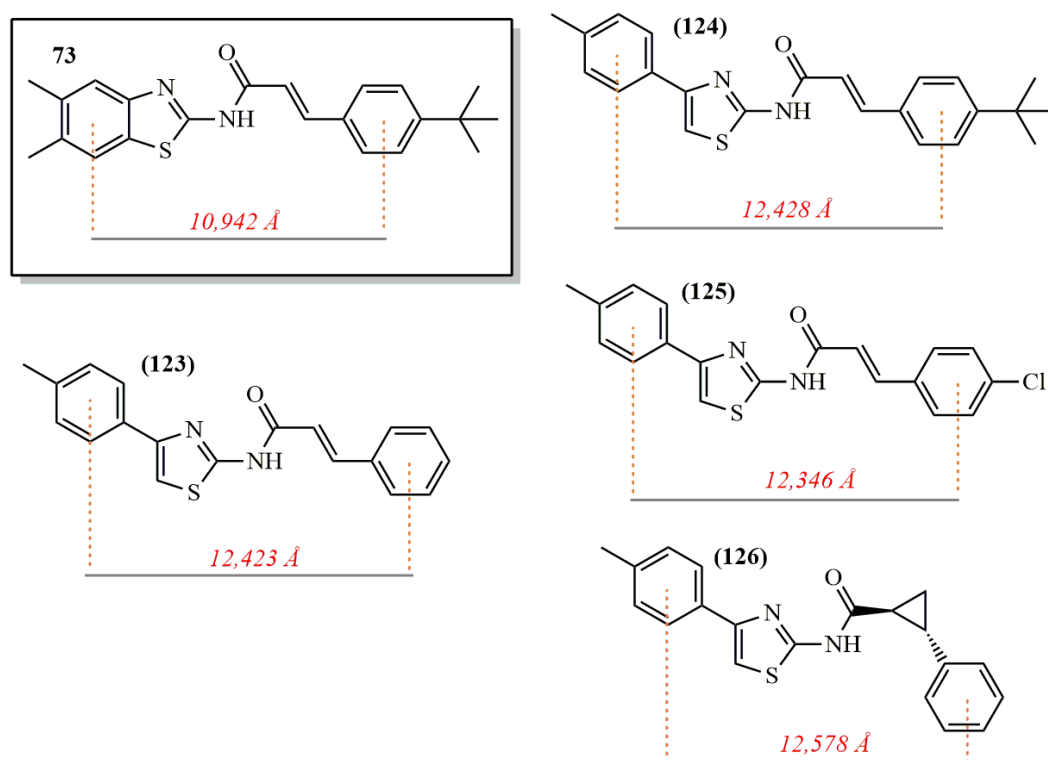


FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o software ChemDraw® v. 12.

### 5.3.3.1.2 Substituição do núcleo benzo[*d*]tiazol (farmacóforo 1)

Considerando que os compostos metilados (incluindo o **73**) apresentam significantes resultados, decidiu-se modificar o núcleo benzo[*d*]tiazol por um núcleo fenil-4-tiazol, entretanto, mantendo-se apenas uma metila como substituinte na fenila (Figura 42). Basicamente, a ideia de tal modificação foi promover uma redução do fenômeno de conjugação entre as duas fenilas, reduzindo o efeito ressonância. Ademais, outros derivados do fenil-4-tiazol contendo diferentes substituintes foram planejados, porém nenhum deles foi obtido, devido à baixa reatividade dos mesmos.

**Figura 42 – Substituição do núcleo benzo[*d*]tiazol por fenil-4-tiazol.**



FONTE: Autor, 2019. Distâncias calculadas em Ångström usando o *software* SPARTAN'14® configurado com o método semi-empírico AM1. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v.12.

Em seguida, os novos derivados sintetizados (**123-126**) foram testados frente à NS2B-NS3 do ZIKV, exatamente como discutido anteriormente para os respectivos precursores (Tabela 7). A partir dos dados obtidos, observa-se que a modificação do benzo[*d*]tiazol por um núcleo fenil-4-tiazol com a fenila terminal não substituída (**123**) e/ou 4'-Cl (**125**) gera um composto completamente inativo. O derivado contendo o anel ciclopropano (**126**) apresenta



pobre atividade sobre a enzima do ZIKV (12,1%). Por fim, observa-se que mais uma vez o derivado do ácido 4-*tert*-butilcinâmico (**124**) apresenta atividade promissora (68,56%). Dessa forma, seu valor de IC<sub>50</sub> foi determinado experimentalmente como sendo 14,91 µM.

Fatidicamente, verificou-se que tal análogo era um clássico caso de composto *PAINS*. Adicionalmente, Devine *et al.* (2015) também relatou tal observação para esta classe de compostos, nomeando-a de *PrAT's* (do inglês, *Promiscuous 2-AminoThiazoles*). Como consequência, outros derivados contendo o núcleo fenil-4-tiazol, os quais seriam sintetizados, foram excluídos do planejamento sintético desta tese.

**Tabela 7 – Atividade inibitória dos derivados do fenil-4-tiazol frente à protease NS2B-NS3 dos vírus Zika e Dengue.**

Número	X	R	NS2B-NS3 (20 µM)*	
			ZIKV IC <sub>50</sub> ± SD ou %inibição	DENV2 IC <sub>50</sub> ± SD ou %inibição
123		-H	n.a.	n.d.
124		-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	14,91 ± 1,14 µM	1,75%
125		-Cl	n.a.	n.d.
126		-H	12,10%	n.d.

\*: todos os experimentos foram realizados em triplicatas; SD: desvio-padrão; n.a.: não ativo; n.d.: não determinado.

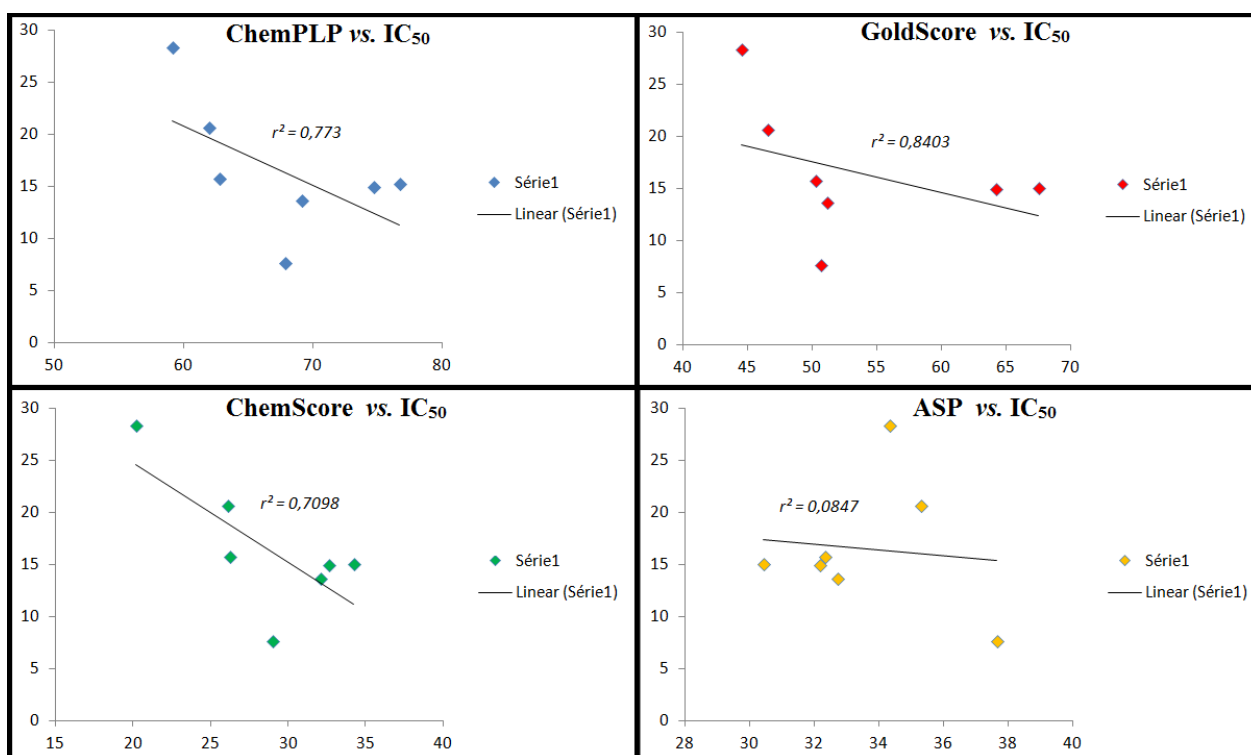
#### 5.3.4 Docking molecular dos compostos mais promissores

Após a obtenção dos resultados da avaliação biológica dos derivados mais promissores (**57**, **73**, **75**, **80**, **101**, **119** e **124**) frente às proteases dos vírus Zika e Dengue, um estudo envolvendo *docking* molecular foi realizado com o intuito de (i) identificar o algoritmo genético (GA) de busca mais satisfatório para a predição dos resultados experimentais; (ii) visualizar em

qual região da macromolécula tais compostos irão preferencialmente se ligar, podendo ser no sítio ativo ou no bolso hidrofóbico (inibição alostérica); (iii) visualizar os resíduos de aminoácidos mais comumente encontrados nas interações destes análogos com a macromolécula alvo e, por fim (iv) avaliar as contribuições energéticas das interações envolvidas na formação do complexo enzima-ligante.

Inicialmente, quatro diferentes GA's foram empregados para a obtenção dos resultados de *docking* molecular, sendo eles o CHEMPLP, GoldScore, ChemScore e ASP. Após a obtenção dos resultados gerados como valores *FitScore* (variando entre 20,21 e 76,77), estes foram correlacionados com os correspondentes valores de  $IC_{50}$  para os derivados selecionados, obtendo-se um valor de coeficiente de correlação ( $r^2$ ) para cada GA utilizados (Figura 43).

**Figura 43 – Coeficientes de correlação ( $r^2$ ) para os diferentes algoritmos genéticos (GA's) de busca empregados nos experimentos de *docking* molecular.**



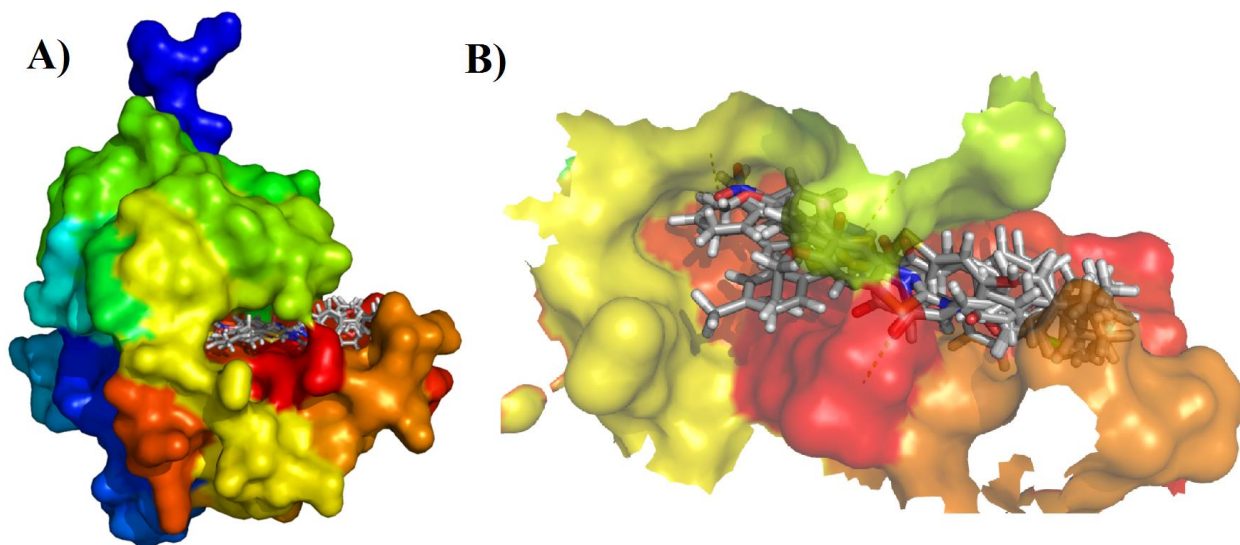
FONTE: Autor, 2019. \*Gráficos elaborados utilizando-se o software *Microsoft Office Excel*® 2016.

De modo geral, três dos quatro GA's aplicados demonstraram resultados satisfatórios, com valores de  $r^2$  variando entre 0,7 e 0,84. Um método é considerado satisfatório quando o valor de  $r^2$  é maior ou igual a 0,5 (SILVA-JÚNIOR; AQUINO; ARAÚJO-JÚNIOR, 2017). Em contraste, o algoritmo ASP exibiu pobre perfil de predição ( $r^2 = 0,08$ ) para os compostos selecionados, assim, não possuindo validade para este estudo.

Diante dos resultados de  $r^2$  apresentado na figura acima, o GoldScore foi selecionado como sendo o detentor do maior poder de predição para esta pequena série de compostos. Neste sentido, os valores de *FitScore* obtidos para os derivados analisados foram 50,24 (**57**), 51,11 (**73**), 50,61 (**75**), 67,47 (**80**), 46,5 (**101**), 44,51 (**119**) e 64,18 (**124**). Por fim, os dados obtidos a partir da aplicação desse GA serão profundamente discutidos nesta seção.

Inicialmente, verificou-se que todos os derivados analisados preferencialmente se ligam ao sítio alostérico (bolso hidrofóbico) (Figura 44, A). Por meio da inspeção visual do sítio alostérico, percebeu-se que os compostos apresentam sua maior proporção da estrutura molecular inserida neste bolso (Figura 44, B).

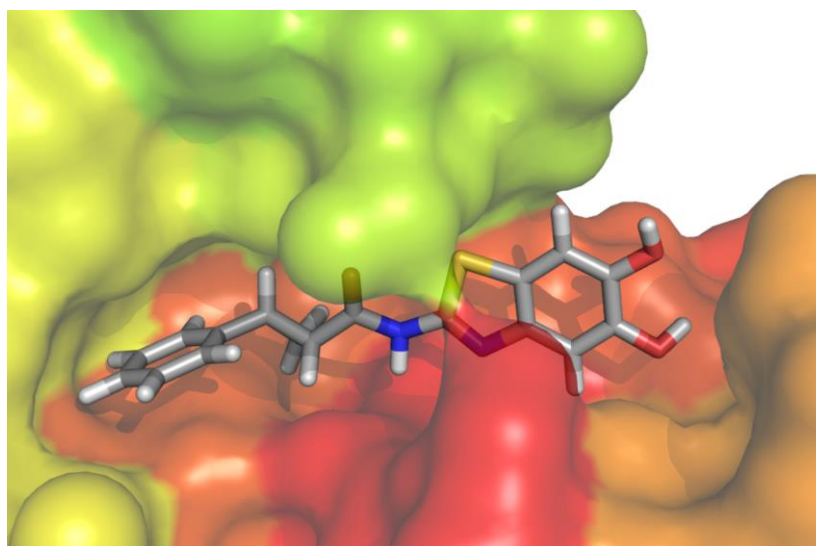
**Figura 44** – Compostos **57**, **73**, **75**, **80**, **101**, **119** e **124** em complexo com a NS2B-NS3 do DENV2.



FONTE: Autor, 2019. Em (A), *cluster* formado pelos compostos (**57**, **73**, **75**, **80**, **101**, **119** e **124**) inseridos no sítio alostérico (bolso hidrofóbico ou *pocket*) da NS2B-NS3 do DENV2 (PDB ID: 2FOM); Em (B), aproximação do *cluster* evidenciando a orientação dos análogos dentro do sítio alostérico. Ilustração elaborada utilizando-se o software *PyMol*® v. 0.99.

Além disso, verifica-se que estes apresentam seus núcleos benzotiazóis orientados em direção à porção mais profunda deste bolso, com exceção do análogo (**119**), cujo apresenta uma orientação invertida em relação aos seus análogos (Figura 45). Tal fato, muito provavelmente está relacionado à presença do anel ciclopropano na estrutura deste, o qual promove uma torção na região central da molécula e, então, impede a entrada desta no sítio de ligação de modo similar aos demais compostos.

**Figura 45 – Visualização do composto 119 inserido no bolso hidrofóbico da NS2B-NS3 do DENV2.**



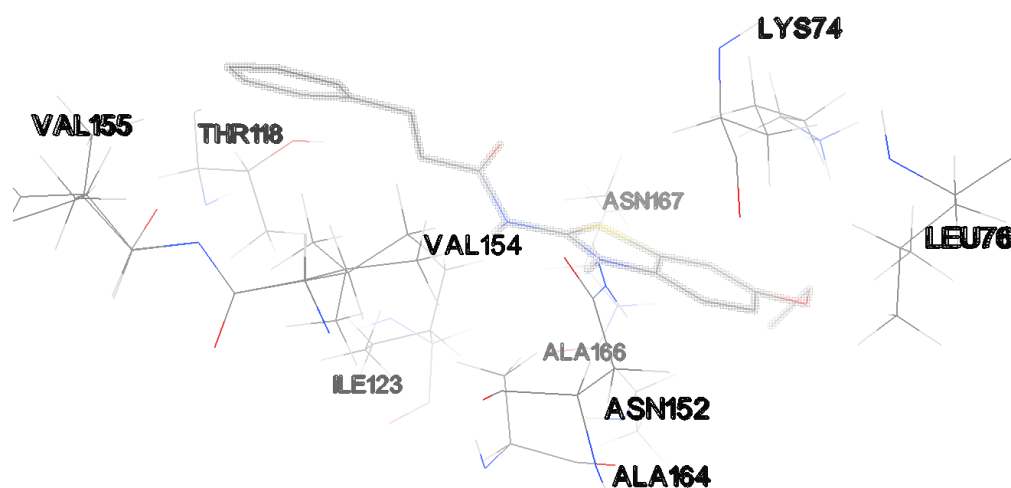
FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software PyMol*® v. 0.99.

Após a identificação dos sítios envolvidos nos complexos destes compostos, dar-se-á foco nas interações entre os átomos dos ligantes e os resíduos de aminoácidos provenientes de cada sítio. Além disso, uma relação entre as interações comumente observadas será discutida, a qual será utilizada para classificar tais interações como vantajosa ou desvantajosa.

De modo geral, os compostos (**57**, **73**, **75**, **80**, **101**, **119** e **124**) interagem com diversos aminoácidos em seus respectivos sítios de ligação, variando entre 10 e 15 resíduos, tais como Leu76, Trp83, Leu85, Gly148, Leu149, Asn152, Val154 e Ala164 (Figura 46).

Iniciando-se pelo o composto (**57**), observa-se que este composto interage com 10 aminoácidos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2. Em adição, o composto (**57**) realiza suas correspondentes interações somente por meio de interações hidrofóbicas, ou seja, não há interações de hidrogênio presentes, bem como, eletrostáticas. Interessantemente, verificou-se que tal composto interage com o resíduo Asn152, o qual também foi observado para os demais compostos que se ligam no sítio alostérico enzimático. Por fim, tal resíduo interage com a região do núcleo benzotiazol do composto (**57**), juntamente com os resíduos Lys74, Leu76, Ala164, Ala166 e Asn167, enquanto os demais resíduos envolvidos interagem com restante da molécula.

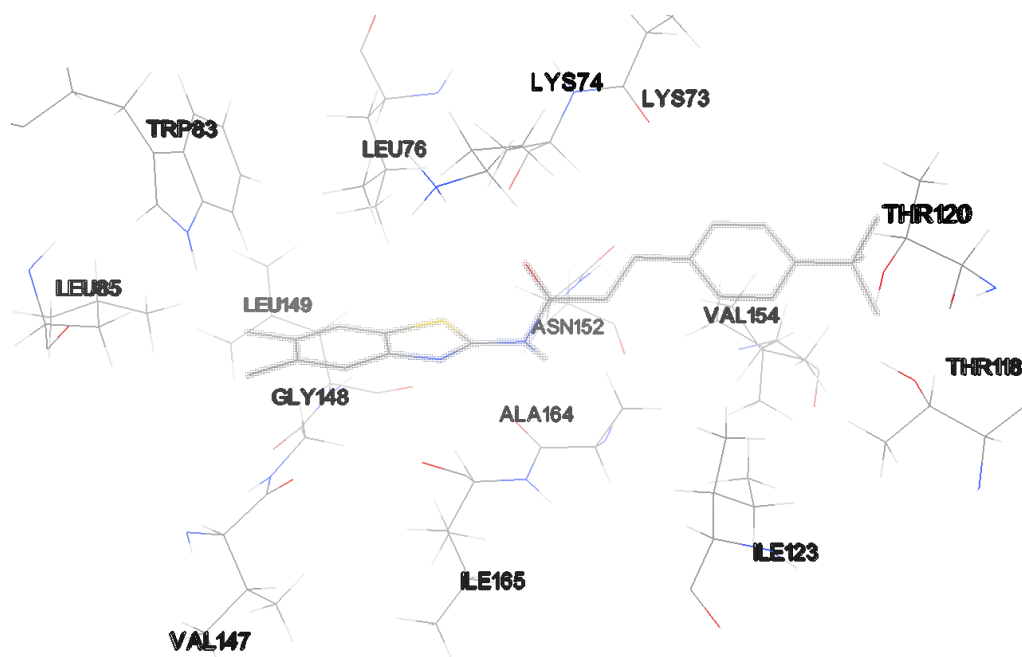
**Figura 46 – Interações para o composto 57 inseridos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools v. 1.5.6.

De maneira geral, o derivado (**73**) possui o maior número de interações com o sítio alostérico, 15 aminoácidos envolvidos. Assim como observado para o composto (**57**), não há a presença de interações de hidrogênio, apenas interações hidrofóbicas. Entretanto, o análogo (**73**) apresenta uma interação exclusiva, onde o resíduo Lys73 está envolvido. Este interage hidrofobicamente com a fenila derivada do ácido 4-*terc*-butil cinâmico (Figura 47). Adicionalmente, pode-se sugerir que a interação com este resíduo favoreça a estabilidade do complexo, aumentando a valor de *FitScore* para este composto (o mais alto dos compostos analisados).

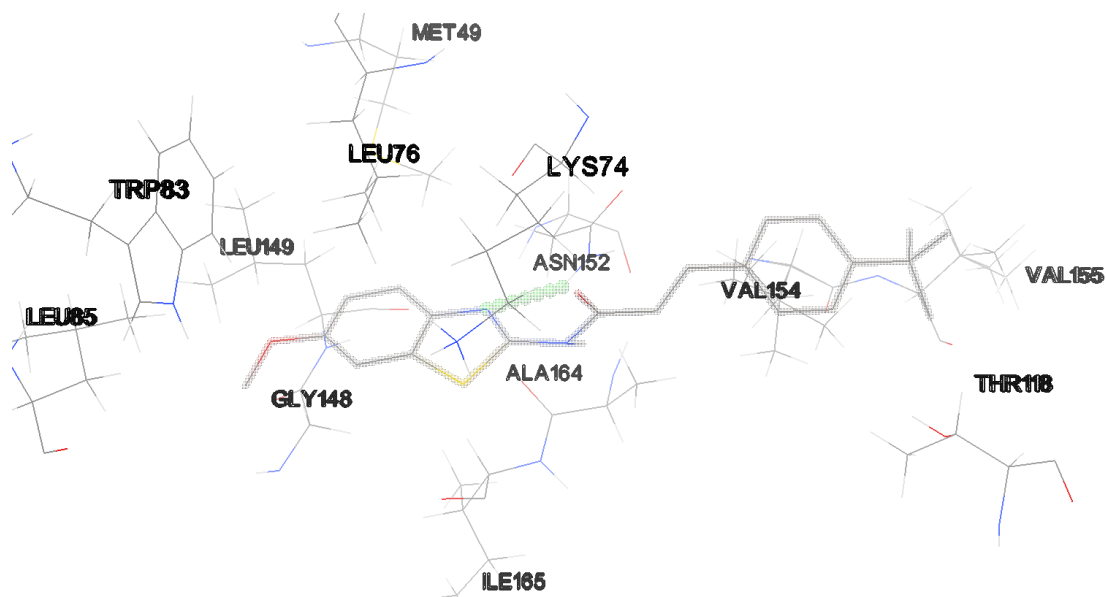
**Figura 47 – Interações para o composto 73 inseridos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools v. 1.5.6.

Já o composto (75) apresenta 13 aminoácidos envolvidos em suas interações. Em contraste aos análogos anteriores, este derivado apresenta uma interação de hidrogênio, a qual ocorre entre o par de elétrons do nitrogênio do tiazol (funcionando como aceptor) e um dos hidrogênios do resíduo Asn152 (funcionando como doador). Além disso, foi observado que esta interação ocorre a uma distância de 2,38 Å. Em adição, dois aminoácidos são exclusivamente observados no complexo (75)-N2B-NS3, sendo eles Met49 e Val155. Baseando-se nisto, é possível sugerir que tais resíduos atuem como auxiliares na estabilização deste complexo. Entretanto, estes não parecem prover a mesma eficiência que o Lys73 para o (73), onde observa-se que a fenila derivada do ácido 4-*terc*-butil cinâmico aparentemente está mais livremente localizada, ou seja, menos envolvida em interações (Figura 48).

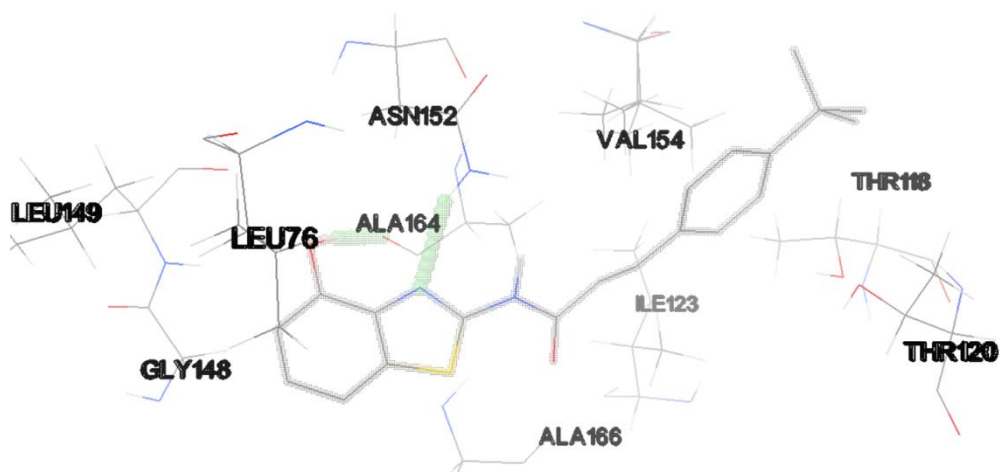
**Figura 48 – Interações para o composto 75 inseridos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools v. 1.5.6. As interações de hidrogênio estão representadas como pontos na cor verde.

O análogo (**80**) interage com 10 aminoácidos no sítio alostérico (Figura 49). Este composto apresenta tanto interações hidrofóbicas quanto de hidrogênio. Neste sentido, verificou-se que o par eletrônico do nitrogênio do anel tiazol atua como um acceptor de ligação de hidrogênio, interagindo com o hidrogênio do resíduo Asn152 a uma distância de 2,09 Å. Adicionalmente, observou-se uma outra interação de hidrogênio, sendo a Ala164 atuando como um acceptor e a 4-OH sendo o doador, com distância de 2,03 Å. Por fim, percebe-se que a região da fenil *terc*-butila é estabilizada pelos aminoácidos Thr118, 120, Ile123 e Val154.

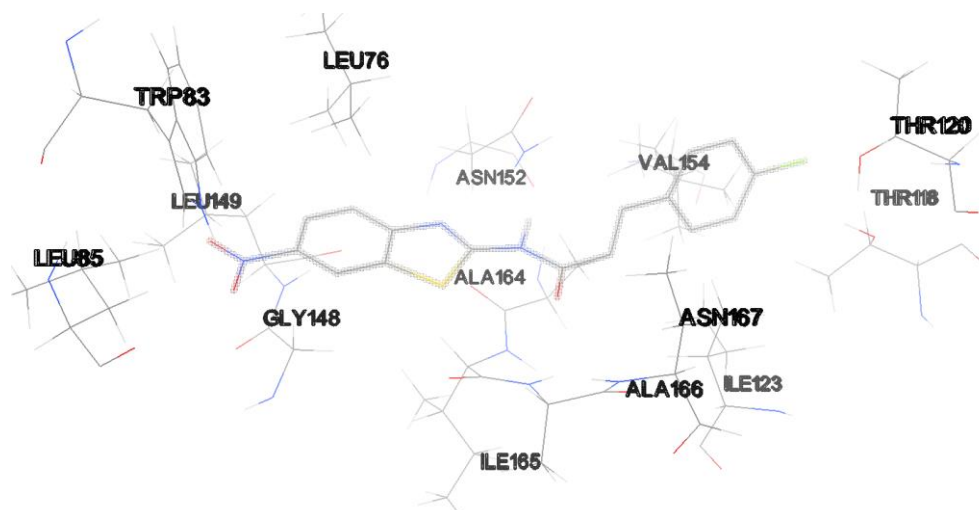
**Figura 49 – Interações para o composto 80 inseridos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools v. 1.5.6. As interações de hidrogênio estão representadas como pontos na cor verde.

O análogo (**101**) é o derivado com o segundo maior número de interações envolvidas em seu complexo, 14 aminoácidos no total. Assim como os compostos (**57**) e (**73**), este não possui interações de hidrogênio, apenas hidrofóbicos como seus congêneres sintéticos. Os resíduos Ala 166 e 167 interagem hidrofobicamente com a ligação dupla entre carbonos (C=C) da acrilamida. Além disso, observa-se que a fenila derivada do ácido 4-clorocinâmico está mais livremente acessível ao solvente do que os compostos anteriormente discutidos (Figura 50). Assim, acredita-se que tal liberdade diminui a estabilidade deste complexo formado.

**Figura 50 – Interações para o composto 101 inseridos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2.**

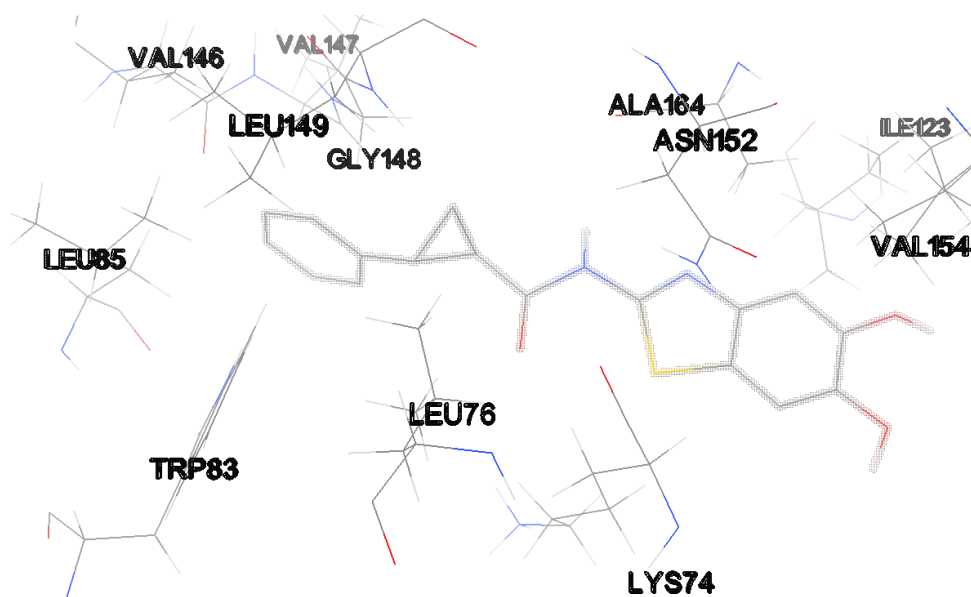


FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools v. 1.5.6.



Por fim, o derivado (**119**) apresenta o segundo menor número de interações envolvidas em seu complexo, sendo apenas 12 aminoácidos. Assim como a maioria dos análogos analisados, o composto (**119**) não apresenta interações de hidrogênio. Como discutido anteriormente, o anel ciclopropano promove uma torção na região próxima à fenila terminal, dessa forma, impedindo a entrada deste composto em uma orientação semelhante àquela observada para os demais compostos. Tal torção promove a interação hidrofóbica entre o anel ciclopropano e a Leu76. Além disso, a diferente orientação deste derivado dentro do bolso hidrofóbico permite que uma interação do tipo  $\pi$ - $\pi$  *stacking* (em forma de T) seja possível entre a fenila terminal e o sistema aromático do Trp83 perpendicularmente posicionado. Por fim, definitivamente a inversão da orientação deste composto contribui de forma negativa, o que resultou no menor valor de *FitScore* dos compostos estudados por *docking* molecular (Figura 51).

**Figura 51 – Interações para o composto 119 inseridos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2.**

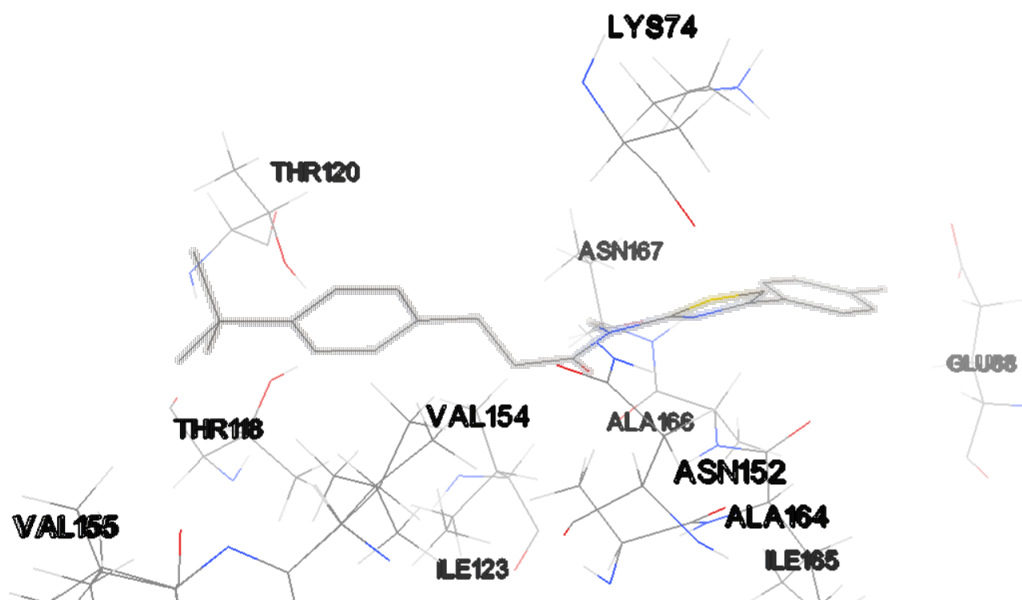


FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools v. 1.5.6.

O derivado contendo o fenil-4-tiazol como farmacóforo 1 (**124**) interage com 12 aminoácidos no sítio alostérico da NS2B-NS3 (Figura 52). Na inspeção visual, não foram observadas interações de hidrogênio, ou seja, este composto basicamente interage via interações hidrofóbicas. Adicionalmente, verifica-se que os resíduos Thr118, Ile123, Val152 e 155 são responsáveis por estabilizar a região da fenil *terc*-butila (farmacóforo 2). Em contraste, os

aminoácidos Lys74, Glu88, Asn152, Ala164, Ile165, Ala166 e Asn167 atuam na estabilização do fenil-4-tiazol (farmacóforo 1).

**Figura 52 – Interações para o composto 124 inseridos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools v. 1.5.6.

Obviamente, todas as informações descritas quanto às vantagens e desvantagens de determinadas interações supracitadas são apenas especulações, baseadas na inspeção visual dos complexos formados. Desse modo, torna-se indispensável uma maior exploração dos dados energéticos gerados durante o *docking* molecular, afim de se obter informações mais consistentes e precisas, uma vez que a análise completa destas está relacionada ao surgimento de novos análogos com promissoras propriedades farmacológicas (SENTHILKUMAR et al., 2016).

Na tabela 8, diferentes parâmetros relacionados às interações entre os ligantes e o alvo macromolecular estão expressos, bem como suas respectivas contribuições energéticas que culminam nos correspondentes valores de *FitScore*. Basicamente, os parâmetros levados em consideração são interações de hidrogênio inter- e intramoleculares (*Hb\_inter* e *Hb\_intra*, respectivamente) e Van der Waals intermoleculares (*Vdw\_inter*).

**Tabela 8 – Parâmetros energéticos relacionados à obtenção dos valores de *FitScore* para os análogos 57, 73, 75, 80, 101, 120 e 124.**

Composto	<i>FitScore</i>	Parâmetros Energéticos (kcal·mol <sup>-1</sup> )		
		Hb_inter	Hb_intra	Vdw_inter
<b>57</b>	50,24	0,0	0,0	32,72
<b>73</b>	51,11	0,0	0,0	39,39
<b>75</b>	50,61	-2,74	0,0	38,92
<b>80</b>	67,47	-2,80	0,0	48,17
<b>101</b>	46,5	0,0	0,0	36,15
<b>120</b>	44,51	0,0	0,0	37,01
<b>124</b>	64,18	0,0	0,0	34,44

FONTE: Autor, 2019. Valores energéticos obtidos utilizando-se o *Gold*<sup>®</sup> v. 5.4.0.

A partir das informações expressas na tabela acima, pode-se observar que a contribuição energética mais significativa está relacionada às interações hidrofóbicas/Van der Waals entre os ligantes e seus correspondentes sítio de ligação (*Vdw\_inter*), com valores variando entre 32,72 e 48,17 kcal·mol<sup>-1</sup>. Neste sentido, o análogo (**80**) apresenta o maior valor de *Vdw\_inter* (48,17 kcal·mol<sup>-1</sup>), o que é totalmente plausível, uma vez que este composto apresenta um grande número de aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas em seu respectivo sítio de ligação. Contrariamente, o derivado (**57**) apresenta o menor valor de *Vdw\_inter* (32,72 kcal·mol<sup>-1</sup>), o que está relacionado ao seu reduzido número de interações hidrofóbicas (10 aminoácidos).

Em geral, nenhum dos compostos avaliados apresenta interações de hidrogênio intramoleculares (*Hb\_intra*), o que resulta em nenhuma influência sobre a determinação dos valores finais de *FitScore*.

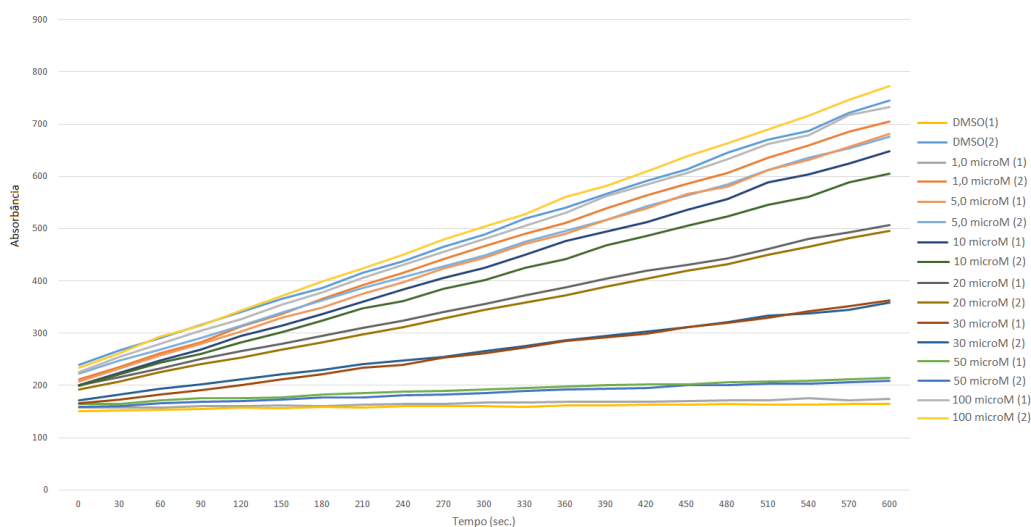
Em adição, verifica-se que apenas os compostos (**75**) e (**80**) apresentam interações de hidrogênio intermoleculares (*Hb\_inter*) durante a formação de seus respectivos complexos ligante-macromolécula. Por fim, tais interações contribuem com -2,74 e -2,8 kcal·mol<sup>-1</sup> para estabilização final do complexo, respectivamente. Evidentemente, o composto (**80**) é melhor estabilizado, uma vez que apresenta duas interações de hidrogênio.

### 5.3.5 Determinação experimental do sítio de ligação dos análogos ativos frente à NS2B-NS3

Após a determinação dos valores da porcentagem de inibição e dos respectivos valores de  $IC_{50}$ , bem como, das informações geradas pelo *docking* molecular, necessita-se validar experimentalmente o sítio de ligação para tais compostos. Basicamente, esta etapa tem a finalidade de confirmar se os compostos são inibidores clássicos (ou seja, que se ligam no sítio ativo) ou não clássicos (que se ligam a um sítio alostérico) (BRECHER et al., 2017), como previsto pelo *docking* molecular anteriormente discutido. Após a obtenção dos resultados experimentais, foi revelado que os compostos sintetizados nesse trabalho são inibidores alostéricos da protease NS2B-NS3 do ZIKV e DENV2, uma vez que não foi verificada a formação de um platô (o que indicaria uma competição pelo o sítio ativo) durante a obtenção das curvas de inibição, em função do tempo e das diferentes concentrações do substrato e do inibidor (Figura 53).

Tal resultado corrobora perfeitamente com os dados obtidos por *docking* molecular, bem como é reforçado por Brecher e coautores (2017), os quais desenvolveram estudos que verificaram que inibidores não-competitivos não se ligam à conformação aberta da NS2B-NS3 do DENV2 (PDB ID: 2FOM).

**Figura 53 – Curvas de inibição para os compostos promissores em função tempo e concentração.**



FONTE: Autor, 2019. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas. O composto (**119**) foi utilizado como modelo para representação deste gráfico. Ilustração elaborada utilizando-se o *software Microsoft Office Excel*® 2010.

## 5.4 Resultados Relacionados ao Vírus Chikungunya

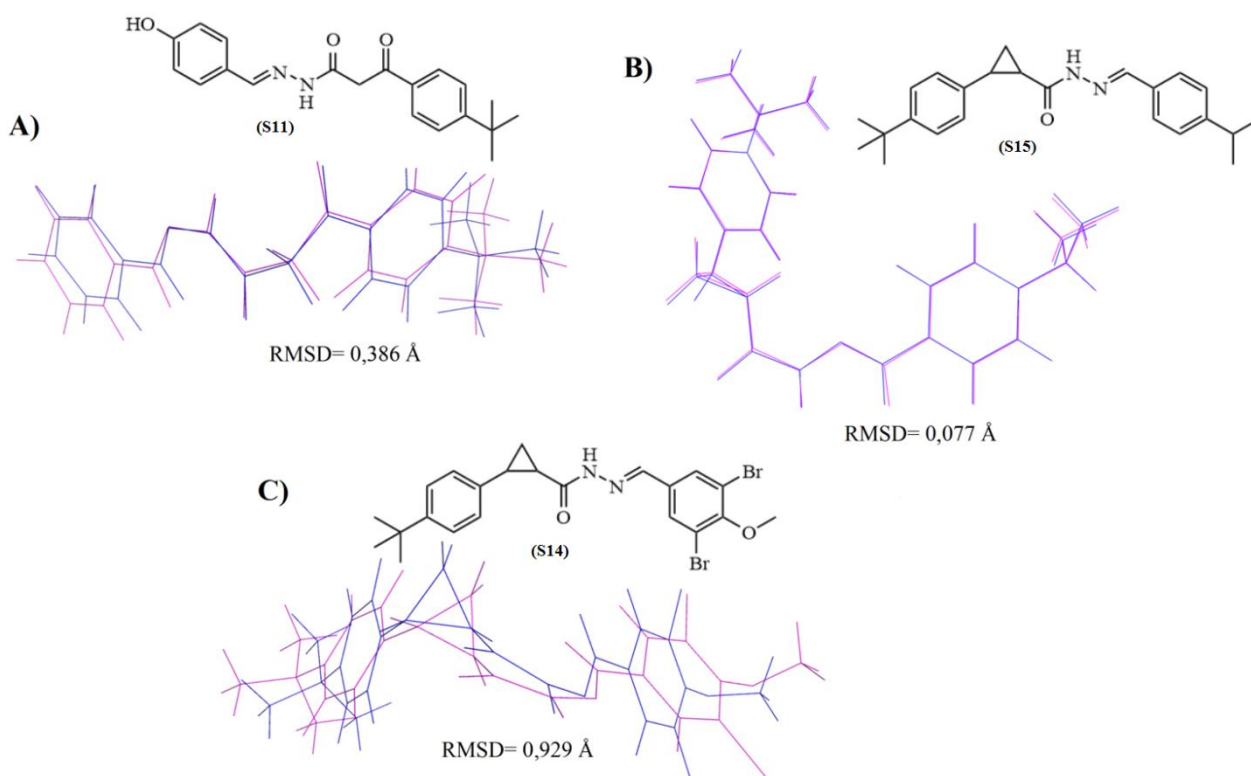
### 5.4.1 Desenvolvimento do protocolo virtual para o planejamento de compostos ativos frente ao CHIKV

#### 5.4.1.1 Minimização energética dos inibidores

Os métodos AM1 e B3LYP/6-31G(d) podem prever comprimentos e ângulos de ligações com valores acurados, em diferentes funções orgânicas. Entretanto, os métodos semi-empíricos (por exemplo, o AM1) possuem uma baixa capacidade em prever valores energéticos para conformações de menor energia (SILVA-JÚNIOR; ARAÚJO-JÚNIOR; AQUINO, 2017). As diferenças entre as conformações (em RMSD) foram determinadas após todos os inibidores (total de 31) terem sido minimizados por ambos os métodos (ver Volume 2, página 353).

Em geral, nenhuma correlação significativa foi observada entre os resultados obtidos. No entanto, algumas informações interessantes puderam ser derivadas a partir dos valores de RMSD, considerando as estabilidades energéticas das conformações. Foi possível verificar que o composto (**S11**) é o mais estável dos inibidores, de acordo com dados obtidos por B3LYP/6-31G(d) (Figura 54, A). Adicionalmente, foi verificado que o composto (**S15**) demonstra uma conformação similar em ambos os métodos de cálculos teóricos (Figura 54, B). Com relação aos resultados obtidos por B3LYP/6-31G(d), verificou-se que o composto (**S14**) exibe a conformação mais estável para este nível de teoria, na qual é adotada uma conformação completamente diferente daquela obtida por AM1 (Figura 54, C).

**Figura 54 – Sobreposição das conformações para o inibidores S11 (A), S15 (B) e S14 (C) obtidas por aplicação dos métodos AM1 (rosa) e B3LYP/6-31G(d) (azul).**



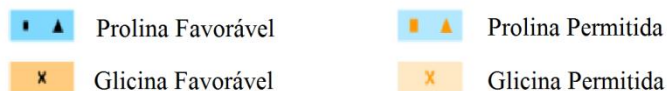
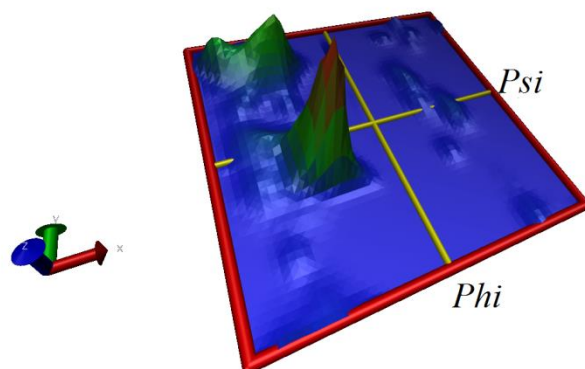
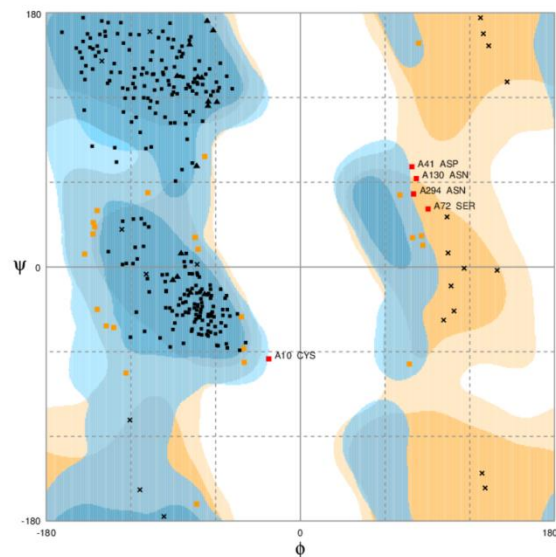
FONTE: Autor, 2019. As conformações obtidas por AM1 estão mostradas em rosa, enquanto as obtidas por B3LYP/6-31G(d) estão em azul. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* PyMol® v.0.99.

#### 5.4.1.2 Simulações de dinâmica molecular

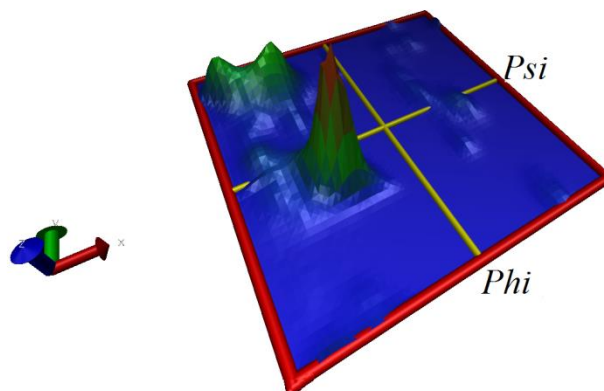
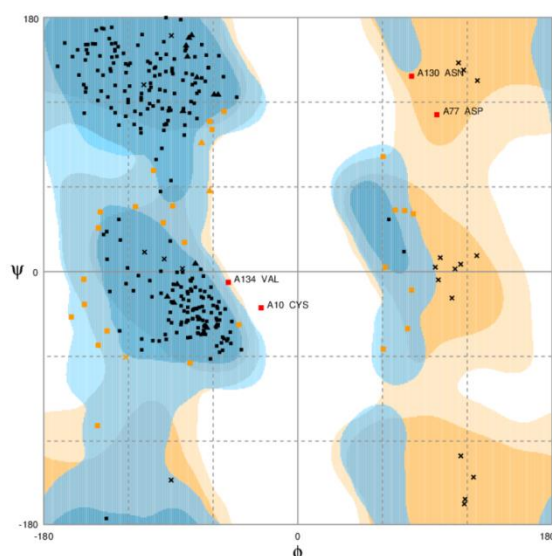
Inicialmente, a enzima nsP2 do CHIKV foi submetida a duas diferentes simulações de MD, em duas temperaturas diferentes (300 e 310 K), onde a estabilidade do sistema foi monitorada em função do tempo. As novas estruturas tridimensionais da protease nsP2 (uma em 300 K e a outra, 310 K) foram validadas. A validação das conformações das cadeias laterais dos aminoácidos contidos nestes modelo tridimensionais foi realizada por análise dos gráficos de Ramachandran (Figura 55), os quais representam a distribuição dos ângulos diedros *Phi* ( $\phi$ ) e *Psi* ( $\psi$ ) dos aminoácidos glicina (Gly) e prolina (Pro) na enzima (LOVELL et al., 2003).

**Figura 55 – Gráficos uni- e tridimensionais de Ramachandran para a distribuição dos ângulos diedros Phi ( $\phi$ ) e Psi ( $\psi$ ) dos aminoácidos glicina e prolina nas temperaturas de 300 K (A) e 310 K (B).**

a) nsP2 à 300 K



b) nsP2 à 310 K



FONTE: Autor, 2019. Gráficos de Ramachandran elaborados usando o *web software* RAMPAGE® (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

Os gráficos de Ramachandran foram usados como método de validação para a protease à 300 e 310 K. Para a nsP2 gerada à 300 K (Figura 55, A), 91% dos resíduos estão nas regiões mais favoráveis (azul escuro); 7,4% estão localizados nas regiões permitidas (laranja escuro) e

1,6% estão localizados nas regiões proibidas (pontos em vermelho). Com relação à nsP2 gerada à temperatura de 310 K (Figura 55, B), observou-se que 89,4% dos resíduos estão localizados nas regiões mais favoráveis (azul escuro); 9,3% estão em regiões permitidas (laranja escuro) e 1,3% estão localizados nas regiões proibidas (pontos em vermelho).

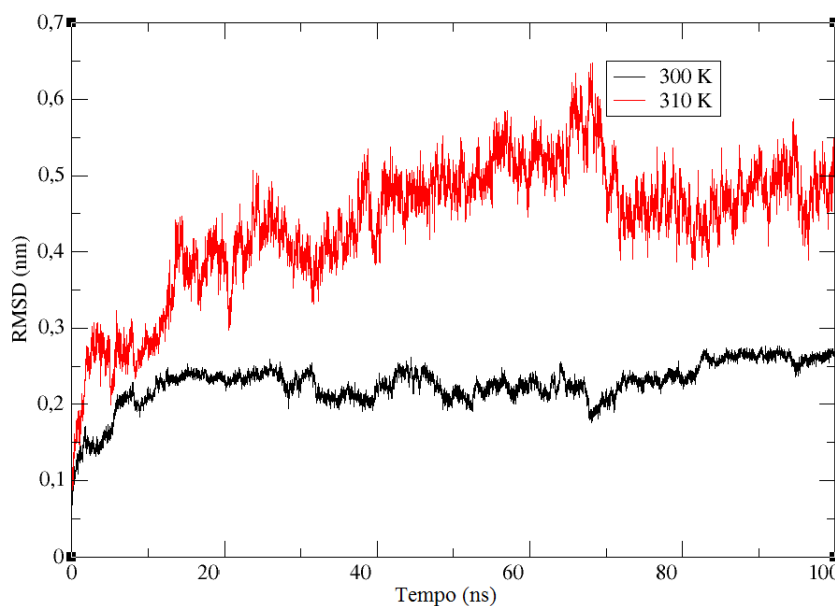
Os pontos no quadrante superior-esquerdo indicam que o modelo contém tanto estruturas em *alfa*-hélice, quanto folhas-*beta* (NAJIBI et al., 2017). Tal informação é confirmada quando observa-se o gráfico tridimensional de Ramachandran (rever Figura 55), onde é demonstrada uma grande concentração de aminoácidos no interior deste quadrante. Baseando-se nisto, pode-se concluir que ambos os modelos gerados (300 e 310 K) são altamente confiáveis e seguros (BURKOFF et al., 2016; NAJIBI et al., 2017).

#### 5.4.1.2.1 Análise da estabilidade estrutural da nsP2 (300 e 310 K) por RMSD

As coordenadas de cada ponto em ambas as simulações foram comparadas com as coordenadas extraídas da estrutura cristalográfica obtida no PDB. Então, os gráficos de RMSD foram gerados a partir das coordenadas dos átomos de  $C_{\alpha}$  na estrutura do PDB e, separadamente, nas conformações após simulações à 300 e 310 K (Figura 56). Para a estrutura à 300 K, observa-se que esta apresenta grande estabilidade durante todo o tempo de simulação (100 ns), com um valor médio de RMSD igual a 0,5 nm. Baseando-se nesse valor, pode-se sugerir que a simulação de MD à 300 K forneceu uma estrutura com grande estabilidade (NAJIBI et al., 2017). Já para a nsP2 à 310 K, observa-se o contrário, onde são exibidas muitas flutuações durante o tempo de simulação. O sistema à 300 K atingiu o equilíbrio após aproximadamente 20 ns. Em contraste, o sistema à 310 K pode ser considerado com equilibrado após 75 ns.



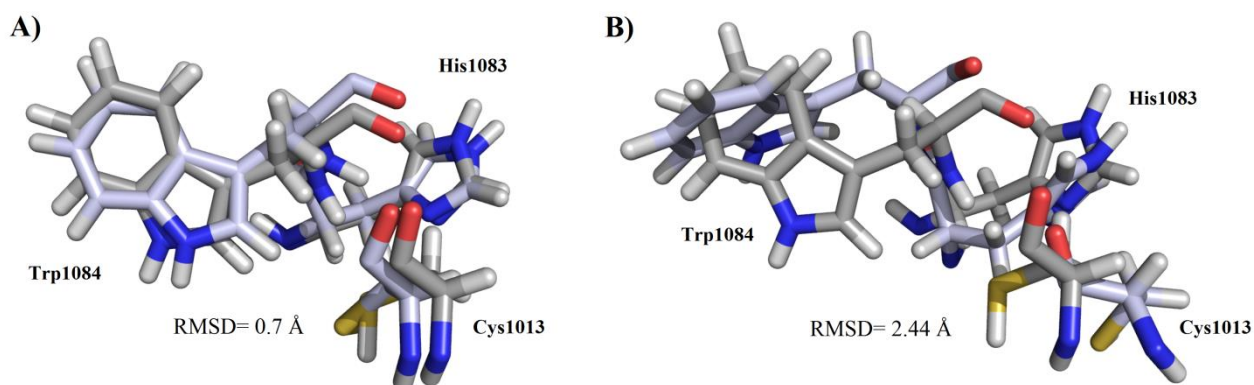
**Figura 56 – Flutuações dos valores de RMSD durante as simulações de dinâmica molecular (100 ns) à temperatura de 300 K (preto) e 310 K (vermelho).**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* XmGRACE®

Os valores de RMSD para o sítio ativo (Cys1013, His1083 e Trp1084) foram determinados para ambas as estruturas (300 e 310 K) e, estes, comparados à estrutura do arquivo PDB original (Figura 57). Adicionalmente, verificou-se que o sítio ativo à 300 K apresenta uma conformação similar à estrutura do PDB, com um valor de RMSD de 0,7 Å. Adicionalmente, um desvio significativo foi observado quando o sítio ativo à 310 K e a estrutura original do PDB foram comparadas, exibindo um RMSD de 2,44 Å.

**Figura 57 – Comparação entre os sítios da nsP2 após simulações de dinâmica à 300 K (A) e 310 K (B).**



FONTE: Autor, 2019. Carbonos em cinza, estrutura original do PDB. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* PyMOL® v.0.99.

Com relação à díade catalítica (Cys1013 e His1083, rever Figura 57), uma alteração nos valores da distância entre o átomo de enxofre da cisteína e o átomo de nitrogênio da histidina foi observada. De acordo com Nguyen e colaboradores (2015), a distância suficientemente necessária para ocorrer a transferência do próton (geração do par iônico) é 4,8 Å. Na estrutura do PDB, a distância observada entre estes átomos é de 4,02 Å. Após as simulações de MD à 300 K, tal distância foi aumentada para 4,36 Å, provavelmente devido à alta torção da orientação adotada pelo o resíduo Cys1013, em comparação à estrutura PDB. Considerando estes resíduos à 310 K, uma aproximação entre estes átomos foi observada (4,12 Å), devido à rotação de 180° no resíduo His1083. Além disso, estas variações esperadas na distância entre os resíduos da díade catalítica estão diretamente relacionadas ao aumento da temperatura (CAPRILES; DARDENNE, 2007).

#### 5.4.1.3 *Docking* molecular dos inibidores na nsP2

Tipicamente, o *docking* molecular utiliza algoritmos que podem prever as poses de um inibidor ligado a um sítio ativo com precisão (VISWANATHAN et al., 2014). Quando um grande número de compostos é ranqueado, empregando-se diferentes funções de pontuação para a determinação das poses de menor energia, pode-se obter resultados como maior confiabilidade (CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE, 2015). Considerando isto, quatro funções de pontuação diferentes (CHEMPLP, GoldScore, ChemScore e ASP) foram incorporadas em 12 diferentes metodologias, as quais foram aplicadas para prever a melhor correlação com os valores de EC<sub>50</sub> obtidos experimentalmente. Na tabela 10, o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) é mostrado para cada metodologia aplicada para o conjunto de inibidores da nsP2. Adicionalmente, a influência individual de cada parâmetro, tais como (a) *ionização* ou *não-ionização*; (b) *minimização energética inicial* (AM1 ou B3LYP/6-31G(d)); (c) *simulações de MD à 300 ou 310 K*; (d) *melhor função de pontuação para docking molecular* foram profundamente discutidas, baseando-se na tabela 10.

**Tabela 10 – Coeficiente de correlação ( $r^2$ ) calculado para cada metodologia aplicada à identificação da melhor correlação com os dados experimentais de inibição da nsP2.**

Método	Valor de $r^2$			
	CHEMPLP	GoldScore	ChemScore	ASP
<b>A1</b>	0,69	0,57	0,39	0,41
<b>A2</b>	0,76	0,60	0,09	0,68
<b>A3</b>	0,64	0,38	0,32	0,36
<b>A4</b>	0,62	0,53	0,57	0,63
<b>A5</b>	0,72	0,59	0,08	0,67
<b>A6</b>	0,67	0,30	0,62	0,66
<b>B1</b>	0,71	0,59	0,39	0,41
<b>B2</b>	0,75	0,59	0,19	0,42
<b>B3</b>	0,65	0,38	0,35	0,37
<b>B4</b>	0,63	0,58	0,58	0,63
<b>B5</b>	0,71	0,63	0,11	0,64
<b>B6</b>	0,64	0,31	0,60	0,73

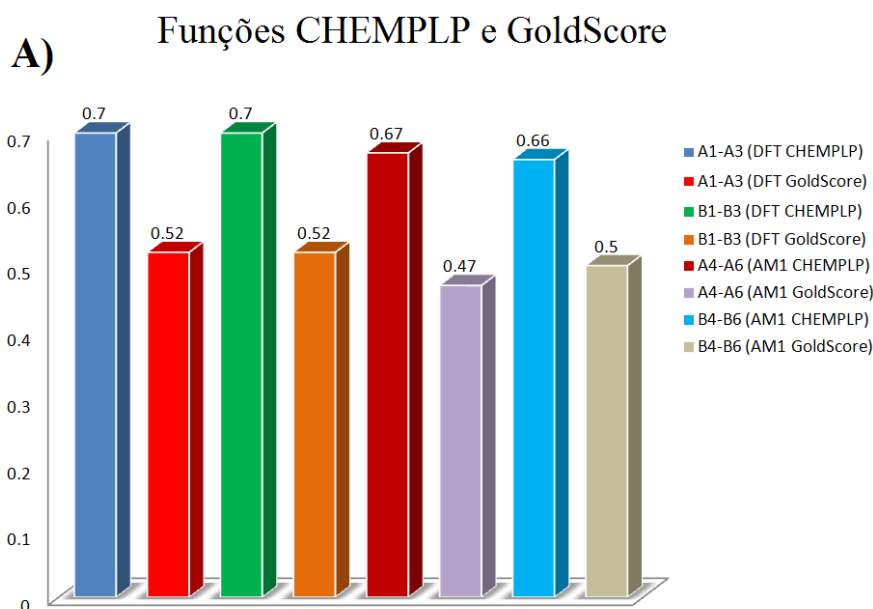
*(a) Influência da Ionização*

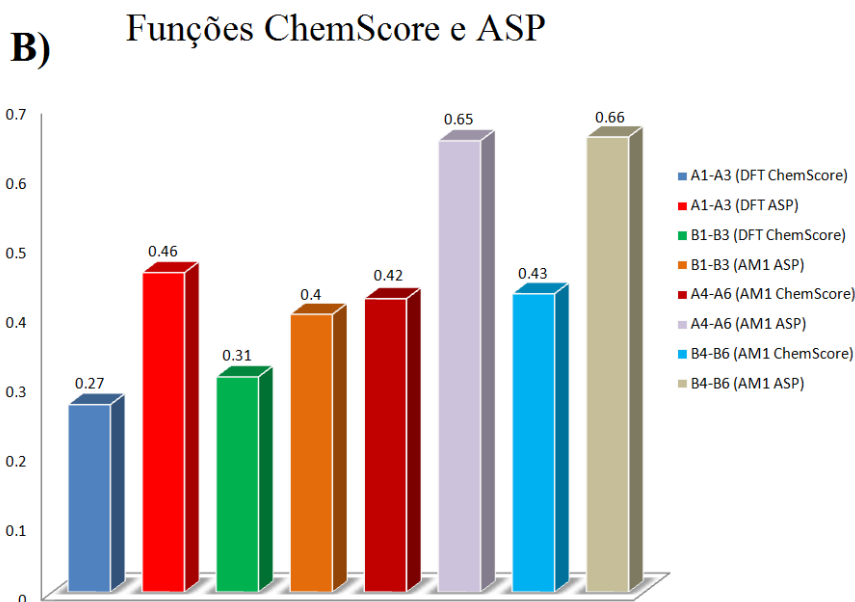
Considerando os dados contidos na tabela acima, verifica-se que não há diferença significativa entre os compostos ionizados (métodos A1-A6) e não ionizados (métodos B1-B6). Embora, algumas informações adicionais podem ser derivadas a partir desta análise. Os compostos ionizados e não-ionizados demonstraram o mesmo valor médio de  $r^2$ , sendo este igual a 0,68, empregando-se a função de pontuação CHEMPLP. Além disso, este valor sugere uma grande contribuição para o valor final de  $r^2$ . Em contraste, as funções GoldScore e ChemScore exibiram o maior valor médio de  $r^2$  (0,51 e 0,37, respectivamente) para os compostos não-ionizados, quando comparados aos ionizados (0,49 e 0,34, respectivamente). Por fim, a função ASP mostrou um melhor valor médio de  $r^2$  para os compostos ionizados (0,56), enquanto que apresentou um valor médio de  $r^2$  igual a 0,53 para os compostos não-ionizados. Todos estes valores médios de  $r^2$  foram obtidos através da soma dos valores individuais  $r^2$  e, então, divididos por 6 (número de metodologias para cada função de pontuação utilizada).

*(b) Influência da Minimização Energética Inicial*

Na Figura 58, é possível observar que as funções CHEMPLP e GoldScore foram capazes de prever os melhores valores médios de  $r^2$  (0,7 e 0,52, respectivamente) para os inibidores inicialmente minimizados com o B3LYP/6-31G(d), utilizando-se as metodologias A1-A3 e B1-B3. Contrariamente, as funções ChemScore e ASP demonstraram melhor valor médio de  $r^2$  para o conjunto de inibidores inicialmente minimizados com o AM1, aplicando-se os métodos A4-A6 ( $r^2$  médio de 0,42 e 0,65, respectivamente) e B4-B6 ( $r^2$  médio de 0,43 e 0,66, respectivamente). Por fim, é possível sugerir que o B3LYP/6-31G(d) é o melhor método para minimização energética inicial, usando-se a função de pontuação CHEMPLP. Entretanto, o tipo de minimização energética inicial irá depender do tipo de função de pontuação que será aplicada ao conjunto de dados.

**Figura 58 – Valores médios de  $r^2$  para a minimização energética inicial usando diferentes metodologias e a relação delas como as funções de pontuação.**





FONTE: Autor, 2019. Todos os valores médios de  $r^2$  foram calculados por meio do somatório de cada  $r^2$  individual e dividido por 3 (número de metodologias por função de pontuação empregada).

*(c) Influência das Funções de Pontuação e Simulações de MD à 300 e 310 K*

Considerando os dados da Tabela 10, verifica-se que as metodologias envolvendo a nsP2 à 310 K (A3, A6, B3 e B6) demonstram um baixo poder de predição, com valores médios de  $r^2$  iguais a 0,65; 0,34; 0,47; 0,51 (médias para A3-A6) e 0,64; 0,34; 0,47; 0,55 (médias para B3-B6), para as funções CHEMPLP, GoldScore, ChemScore e ASP, respectivamente. De acordo com estes resultados, a estrutura da nsP2 obtida por simulações de DM à 310 K demonstram ser uma interessante alternativa como controle negativo, devido seu baixo poder de predição, o qual pode estar relacionado com as diferentes orientações observadas para os resíduos do sítio de ligação à 310 K, como discutido anteriormente.

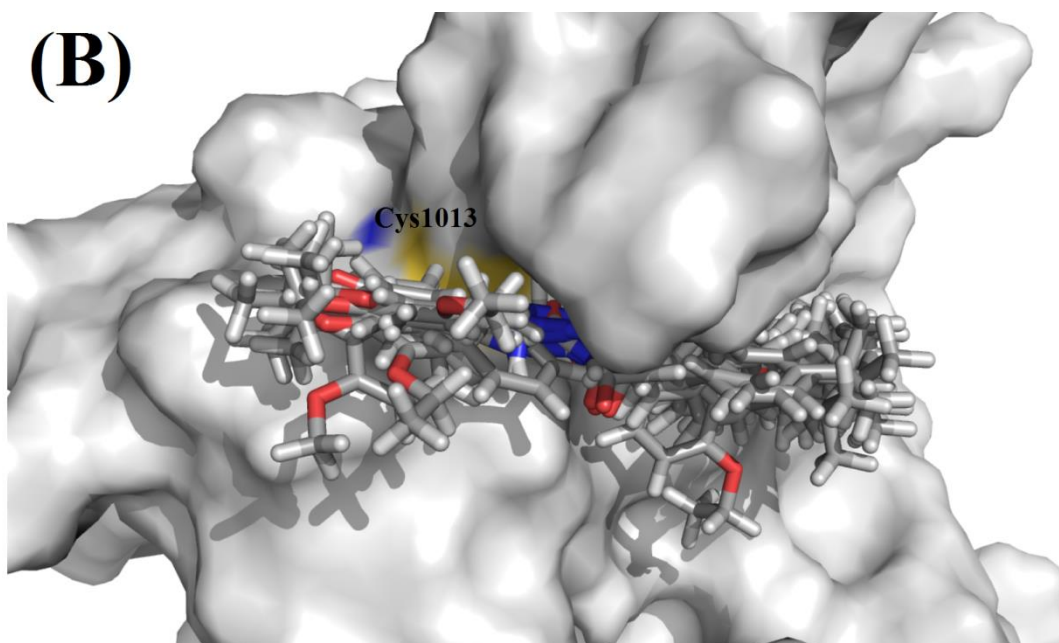
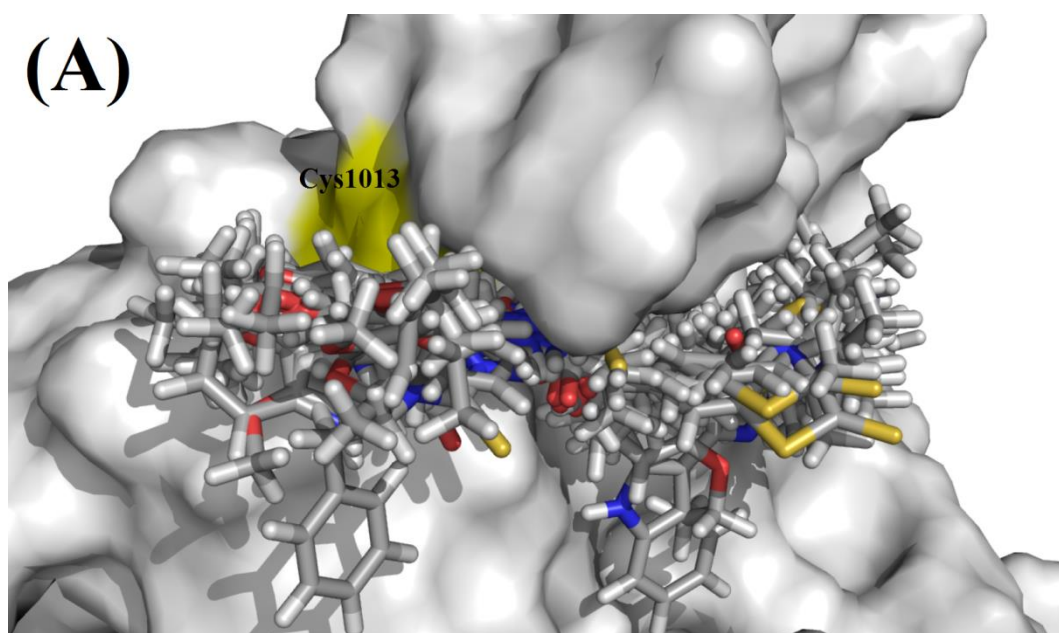
Em adição, é possível observar que a função ChemScore foi o algoritmo mais fraco em prever uma correlação com os dados experimentais, com valores de  $r^2$  variando entre 0,08 (A5) e 0,62 (A6). Além disso, esta função de pontuação demonstrou um valor médio de  $r^2$  de 0,35 (menor do que o valor observado à 310 K). A função GoldScore apresentou valores de  $r^2$  variando entre 0,36 (A6) e 0,63 (B5), e um  $r^2$  médio de 0,5. Adicionalmente, a função ASP mostrou valores de  $r^2$  variando entre 0,36 (A3) e 0,67 (A5), com um valor médio de  $r^2$  de 0,55. Neste sentido, as funções GoldScore e ASP podem ser consideradas como funções com qualidade intermediária em prever a correlação entre os valores de *FitScore* e  $EC_{50}$ . A função CHEMPLP demonstrou ter a melhor habilidade em prever a correlação com os dados

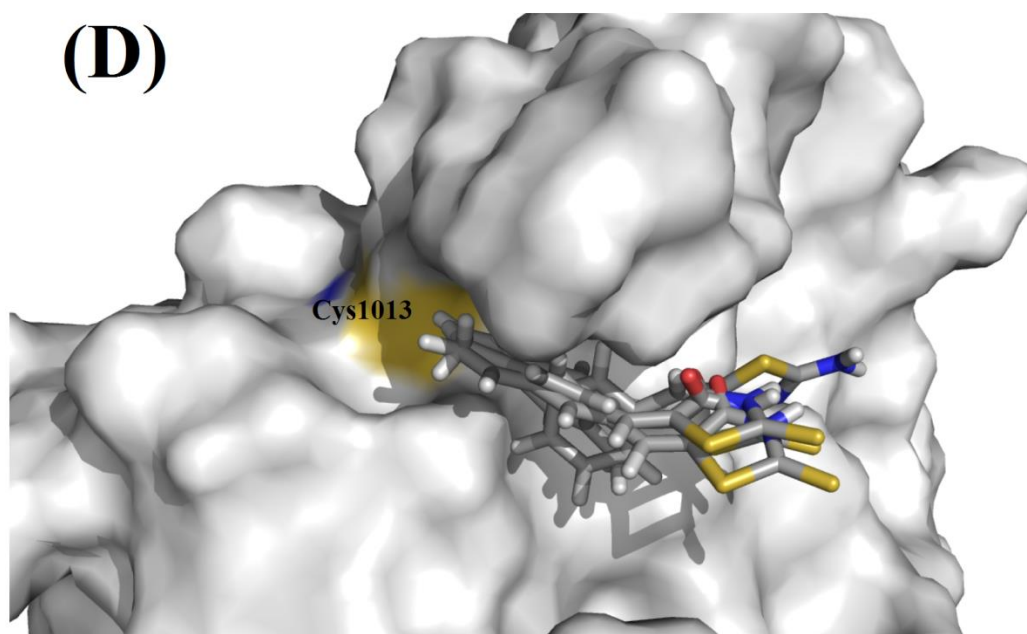
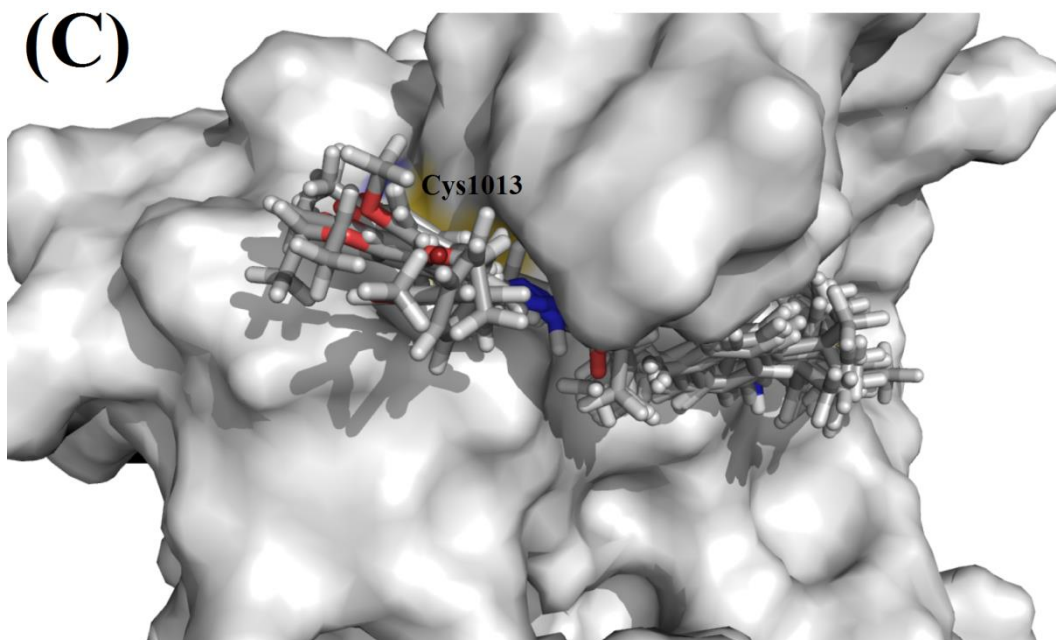
experimentais, com valores de  $r^2$  variando entre 0,63 (B4) e 0,76 (A2), e um valor médio de  $r^2$  de 0,68. Baseando-se nestes resultados, as metodologias com os maiores valores de  $r^2$  observados foram A2 e B2 (0,76 e 0,75, respectivamente), usando-se a função CHEMPLP. Tais resultados reforçam ainda mais que a ionização dos inibidores da nsP2 tem baixa influência sobre a predição das atividades. Comumente, a função CHEMPLP tem exibido altas taxas de sucesso na predição de conformações ligantes (poses) e correlação com dados experimentais em estudos de *screening* virtuais, resultados confirmados por diversos ensaios de validação (CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE, 2015).

A função CHEMPLP forneceu valores de *FitScore* variando entre 35,71 e 64,27. Com relação às diferentes classes de compostos químicos dos inibidores, constatou-se que os derivados da tiazolidina/rodanina apresentam a mais alta afinidade para esta enzima do CHIKV, com um valor médio de *FitScore* igual a 55,76. Em sequência, as acrilamidas e tiossemicarbazonas também apresentaram boa afinidade, com valores médios de 54,99 e 52,03, respectivamente. Adicionalmente, os fenilciclopropanos e ureias têm exibido uma afinidade intermediária, como valores médios de 49,85 e 43,48, respectivamente. Por fim, os oxadiazóis apresentaram a menor afinidade pela nsP2, com um valor médio de 36,31.

Mais detalhes podem ser derivados a partir dos resultados de *docking* molecular dos inibidores e a sítio ativo da nsP2 (*pocket 4*) (Figura 59, A). A função CHEMPLP foi capaz de prever que todos os inibidores estão localizados parcial ou completamente inseridos no *pocket 4*, próximo ao resíduo Cys1013. As acrilamidas demonstram que a amida (bem como, acilidrazona) se localizam no gargalo do *pocket 4*, cujo separa ambos os sistemas aromáticos. Em adição, os grupos *terc*-butila presente neste tipo de inibidores encontram-se orientados em sentido oposto à Cys1013 (Figura 59, B). Exatamente o mesmo perfil de ligação é observado para os derivados com acilidrazona acopladas a fenilciclopropanos, corroborando com o fato de que as acilidrazonas preferencialmente irão se ligar à região do gargalo, deixando os sistemas aromáticos volumosos em sentido oposto à Cys1013 (Figura 59, C). Por fim, as tiazolidinas encontram-se parcialmente localizadas no interior do *pocket 4*, com o anel tiazolidínico (ou rodanina) permanecendo do lado oposto do resíduo Cys1013 (Figura 59, D).

Figura 59 – Conjunto de inibidores em complexo com o sítio ativo da nsP2 do CHIKV.





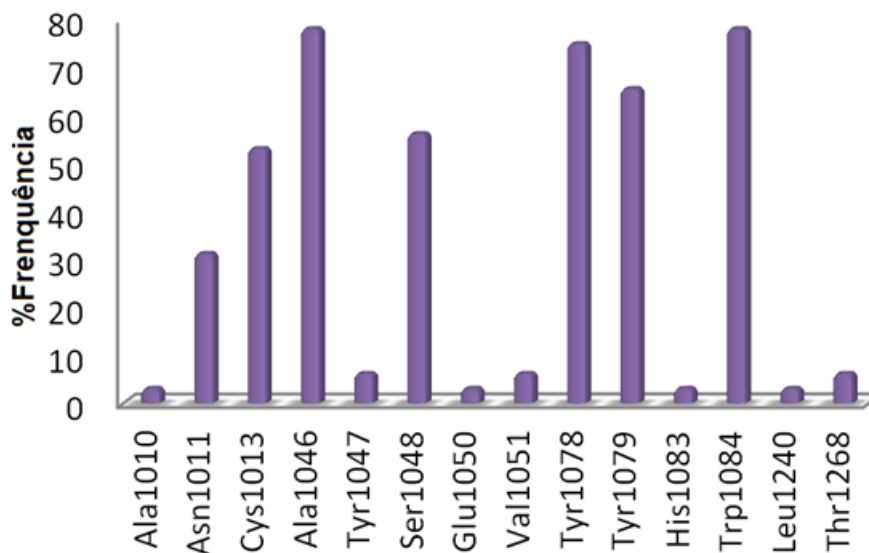
FONTE: Autor, 2019. Em (A), todos os inibidores complexo ao *pocket 4*. Derivados das acrilamidas (B); ciclopropanoacilidrazonas (C); e tiazolidinas/rodaninas (D). A localização da Cys1013 está marcada em amarelo. Ilustração elaborada utilizando-se o software PyMOL® v. 0.99.

Com relação às interações observadas para os inibidores, interações de hidrogênio e hidrofóbicas são as mais comuns. Neste sentido, foi assumido que a distância máxima para uma interação de hidrogênio é 3,5 Å, e uma distância de 4,0 Å para contatos hidrofóbicos (FERREIRA DA SILVA-JÚNIOR et al., 2017; NGUYEN; YU; KELLER, 2015).



Após os experimentos de *docking* molecular, um gráfico gerado contendo a frequência com que alguns resíduos de aminoácidos são observados em interações entre os inibidores e o sítio ativo (Figura 60).

**Figura 60 – Frequência de visualização de resíduos do sítio ativo da nsP2.**



FONTE: Autor, 2019. Gráfico elaborado utilizando-se o *software* Microsoft® Office Excel 2007.

Considerando a figura acima, constata-se que 14 aminoácidos estão envolvidos nas interações dos inibidores e a nsP2. Todos os 31 inibidores analisados são capazes de interagir com os aminoácido do *pocket* 4. De acordo com Jadav e colaboradores (2012 e 2015), os aminoácidos mais importantes na interação com inibidores são Tyr1047, Trp1084 e Asp1126. Embora, os mais frequentemente observados para o conjunto de inibidores analisados foram Ala1046 e Trp1084, ambos presentes em 78% das interações destes inibidores. Em adição, os aminoácidos Cys1013, Ser1048, Tyr1078 e 1079 foram observados com alta frequência na formação dos complexos, sendo 53, 56, 75 e 65%, respectivamente. Os resíduos Tyr1047 (6%), Val1051 (6%) e Thr1268 (6%) demonstraram baixa frequência na formação dos complexos. Interessantemente, o resíduo His1083 (3%) que, frequentemente aparece associado à atividade anti-CHIKV de inibidores da nsP2 (BASSETTO et al., 2013; JADAV et al., 2012, 2015), não demonstrou significativa influência nos estudos por *docking*. Além disso, pode ser sugerido que somente a díade catalítica não é responsável pelas atividades observadas nos ensaios biológicos. Claramente, existe a participação de outros aminoácidos, os quais irão atuar em sinergismo, resultando na inibição da nsP2. Por fim, constata-se a presença de aminoácidos que não

pertencem a nenhum dos *pockets*, são eles Ala1010 (3%), Asn1011 (31%), Leu1240 (4%) e Thr1268 (9%). Estes, muito provavelmente, estão associados às regiões circundantes ao sítio de ligação e, por sua vez, não exercem influência sobre a atividade biológica dos compostos.

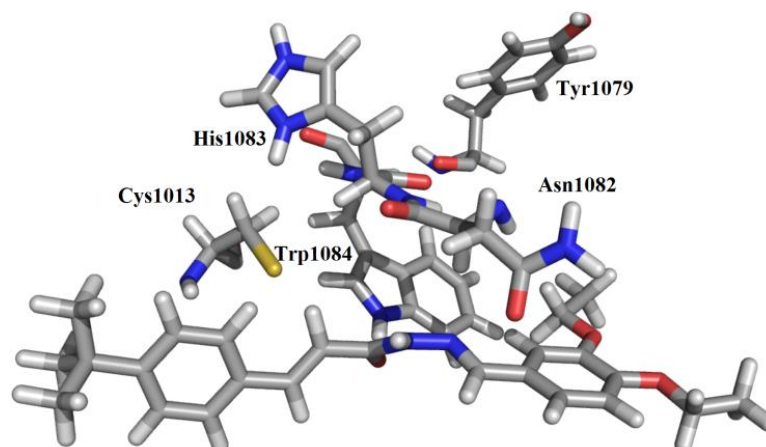
Baseando-se no fato de que a His1083 apresenta uma mínima influência na inibição da nsP2, torna-se possível sugerir que a His1083 desempenha um papel fundamental na desprotonação da Cys1013, como discutido anteriormente. Então, o *S*-nucleófilo (Cys1013) poderia estar envolvido no mecanismo de inibição *via* ligação covalente, provavelmente por um ataque a um grupo eletrofílico presente em alguns dos inibidores selecionados. Em geral, o mecanismo covalente de cisteína proteases elucidado por QM são bem descritos na literatura (ARAFET; FERRER; MOLINER, 2015, 2017; ARAFET et al., 2014, 2017; MÉNDEZ-LUCIO et al., 2012). Considerando estas informações, decidiu-se investigar a importância da desprotonação da Cys1013, bem como a possível existência de um mecanismo covalente de inibição, usando diferentes níveis de teoria.

#### 5.4.1.4 Investigação de mecanismo não covalente e covalente de inibição da nsP2 por mecânica quântica (QM)

Normalmente, a predição das energias livres de ligação podem ser consideradas como um desafio para o *docking* molecular em estudos de *screening* virtual (AWOONOR-WILLIAMS; WALSH; ROWLEY, 2017; NGUYEN; YU; KELLER, 2015; SILVA-JÚNIOR et al., 2017a). Baseando-se nisto, os cálculos de QM podem fornecer valores acurados de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) para a formação dos complexos (SILVA-JÚNIOR et al., 2017a).

O composto (**127**) foi selecionado como um inibidor de referência para ser analisado em nível quântico, considerando seu excelente perfil biológico,  $EC_{50}$ :  $3,2 \pm 1,8 \mu\text{M}$ ,  $EC_{90}$ :  $11 \pm 4 \mu\text{M}$ ,  $CC_{50}$ :  $101 \pm 50 \mu\text{M}$ , SI: 32, e inibição máxima: 100 % à concentração de  $12,5 \mu\text{M}$ , de acordo com resultados obtidos por Giancotti e coautores (2018), bem como por Bassetto e colaboradores (2013a). Inicialmente, o sítio de ligação para o composto (**127**) foi extraído a partir dos estudos de *docking* (Figura 61), e este foi usado como ponto de partida para a determinação dos mecanismos de inibição não-covalente ( $\Delta G_{\text{não-covalente}}$ ) e covalente ( $\Delta G_{\text{covalente}}$ ), usando os funcionais B3LYP, M06 e  $\omega$ B97X-D.

**Figura 61 – Sítio de ligação para o composto de referência usado para prever os valores de  $\Delta G_{\text{não-covalente}}$  e  $\Delta G_{\text{covalente}}$ .**

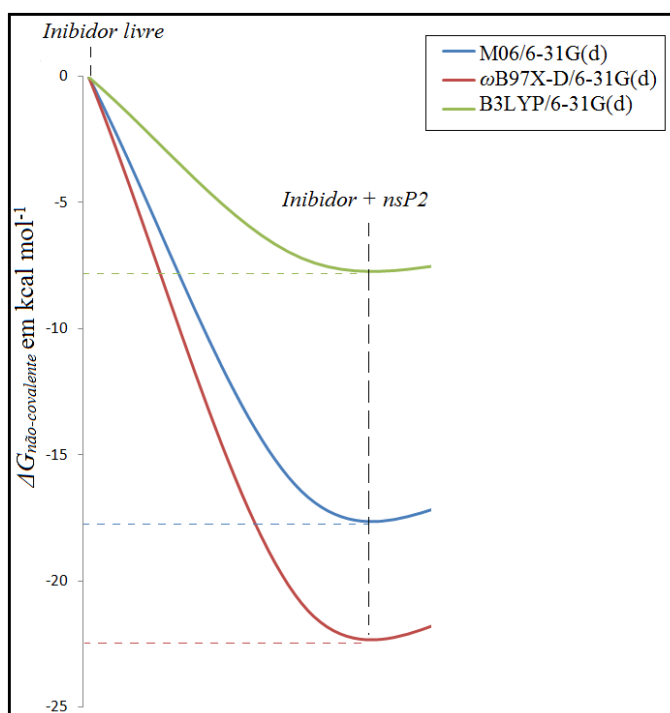


FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* PyMOL® v.0.99.

Com relação à Figura 61, é possível verificar que o composto (**127**) interage apenas com os aminoácidos do *pocket* 4, o que pode explicar os resultados experimentais dos ensaios biológicos utilizando este composto (BASSETTO et al., 2013; GIANCOTTI et al., 2018; TARDUGNO et al., 2018).

Os métodos B3LYP, M06 e  $\omega$ B97X-D, com nível de teoria 6-31G(d), foram capazes de prever valores de  $\Delta G_{\text{não-covalente}}$  de -7,18; -16,35 e -20,86 kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 62). Em geral, o método B3LYP/6-31G(d) previu pobremente um valor de  $\Delta G_{\text{não-covalente}}$ , sugerindo uma baixa afinidade entre o composto (**127**) e a enzima nsP2. Em contraste, os funcionais modernos, como  $\omega$ B97X-D/6-31G(d) e M06/6-31G(d) (AWOONOR-WILLIAMS; WALSH; ROWLEY, 2017), foram excelentes para prever valores de  $\Delta G_{\text{não-covalente}}$ , corroborando com os resultados experimentais (GIANCOTTI et al., 2018; TARDUGNO et al., 2018). Além disso, esses dois métodos podem ser considerados confiáveis e comparáveis entre si.

**Figura 62 – Perfil energético previsto para o mecanismo não covalente de inibição da nsP2.**



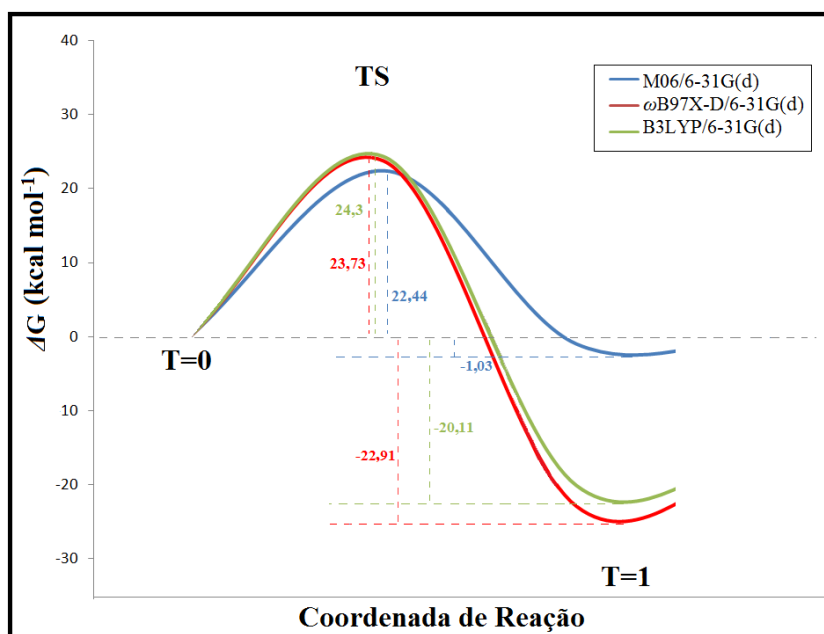
FONTE: Autor, 2019. Gráfico elaborado utilizando-se o *software* Microsoft® Office Excel 2007.

Basicamente, interações não-covalentes pelas quais um composto se liga ao seu alvo ocorrem através de modos canônicos, tais como interações de hidrogênio, dispersão de *London* e interações dipolo-dipolo (AWOONOR-WILLIAMS; WALSH; ROWLEY, 2017). Além disso, esses tipos de interações são bastante fracas, levando a ligações reversíveis (AWOONOR-WILLIAMS; WALSH; ROWLEY, 2017). Em contraste, compostos contendo grupos químicos reativos específicos podem se ligar a seus alvos por um modo mais forte, como uma ligação covalente (ARAFET; FERRER; MOLINER, 2017; AWOONOR-WILLIAMS; WALSH; ROWLEY, 2017). Em geral, um aminoácido apropriado, por exemplo Cys, Ser, Thr, Lys, His, pode atuar como um nucleófilo e atacar um grupo eletrofílico em um potencial inibidor. Em alguns casos, a ligação covalente formada é fortemente exergônica, levando à inibição irreversível. Por outro lado, quando essa ligação covalente é fracamente exergônica, esta pode ser reversível em alguns casos (ARAFET et al., 2017; AWOONOR-WILLIAMS; WALSH; ROWLEY, 2017).

O mecanismo catalítico das cisteíno proteases depende dos resíduos Cys e His. Neste sentido, é necessário que o grupo -SH do resíduo de Cys seja polarizado fortemente, finalmente levando à formação do par de íons altamente nucleofílico (ARAFET; FERRER; MOLINER,

2015, 2017; ARAFET et al., 2014, 2017; RAMAKRISHNAN et al., 2017; TURK et al., 1998). Esse par iônico é formado devido à diferença entre os valores de pKa desses dois aminoácidos. Assim, o equilíbrio entre o estado protonado e desprotonado do resíduo Cys é deslocado em direção ao estado desprotonado, cujo é reativo frente a grupos eletrofílicos (ARAFET et al., 2017; AWOONOR-WILLIAMS; WALSH; ROWLEY, 2017). Adicionalmente, as simulações de MD revelaram que este par iônico está a uma distância de 4,35 Å, entre o átomo de S (Cys1013) e o átomo de N (His1083), corroborando com os resultados obtidos por Strauss e coautores (1992). Com base nisto, a formação do par iônico Cys(S<sup>-</sup>)1013/His(H<sup>+</sup>)1083 é um parâmetro interessante a ser analisado usando DFT/B3LYP, M06 e  $\omega$ B97X-D com nível de teoria 6-31G(d) (Figura 63), considerando que esta etapa é o ponto de partida para a inibição através de um potencial mecanismo covalente (ARAFET; FERRER; MOLINER, 2015; AWOONOR-WILLIAMS; WALSH; ROWLEY, 2017; MLADENOVIC et al., 2008).

**Figura 63 – Coordenada de reação para a formação do par iônico Cys(S<sup>-</sup>)1013/His(H<sup>+</sup>)1083 na nsP2.**



FONTE: Autor, 2019. Gráfico elaborado utilizando-se o *software* Microsoft® Office Excel 2007.

Na Figura 63, a coordenada de reação para a formação do par iônico Cys(S<sup>-</sup>)1013/His(H<sup>+</sup>)1083 foi dividida em um processo de três etapas, considerando T = 0 como Cys1013 e His1083 em estados neutros (ponto de partida); TS como intermediário da transferência do próton; e T = 1, quando o par iônico é completamente formado. É possível verificar que todos os funcionais previram a transferência do próton em condições fisiológicas,

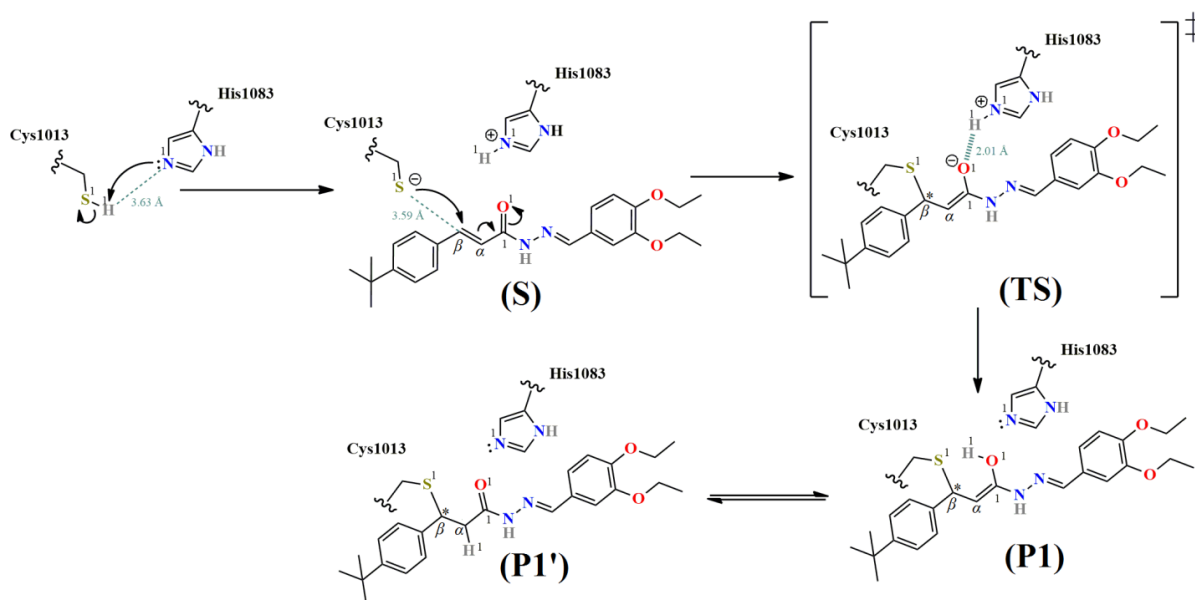
com valores de barreira limitantes similares ( $TS = \Delta G^\ddagger$ ), variando entre 22,44 e 24,3 kcal mol<sup>-1</sup>. Além disso, estes valores de  $\Delta G^\ddagger$  são semelhantes aos valores de  $\Delta G^\ddagger$  obtidos por Arafet e colaboradores (2017), em simulações envolvendo QM/MM de outras cisteíno proteases, onde verificaram que este tipo de transferência de próton ocorre com uma barreira energética de 18,5 kcal mol<sup>-1</sup>.

Com relação ao T = 1, o método M06 previu um par de íons com estabilidade muito próxima às espécies Cys1013/His1083 neutras, com um valor  $\Delta G_{covalente}$  de -1,03 kcal mol<sup>-1</sup>. Em contraste, os funcionais B3LYP e  $\omega$ B97X-D foram capazes de prever um perfil de energia similar, com valores de  $\Delta G_{covalente}$  iguais a -20,11 e -22,91 kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Finalmente, o Cys(S<sup>-</sup>)1013/His(H<sup>+</sup>)1083 formado é mais estável do que a espécie neutra Cys1013/His1083. Este fato corrobora com estudos potenciométricos experimentais envolvendo cisteíno proteases realizados por Lewis e coautores (1976), cujo mostraram que o resíduo de Cys existe preferencialmente como um ânion tiolato (S<sup>-</sup>), em pH fisiológico. Além disso, Han e colaboradores (1999) desenvolveram um estudo QM/MM do sítio ativo de algumas cisteíno proteases, onde concluíram que o par iônico se torna mais estável do que sua forma neutra no ambiente proteico. Finalmente, este fato é reforçado em estudos recentes desenvolvidos por Arafet e coautores (2015; 2017a; e 2017b) usando cálculos de QM/MM para obter o mecanismo atomístico para diferentes cisteíno proteases.

O composto (**127**), um derivado da acrilamida, exibe uma excelente afinidade para o local de ligação da enzima nsP2, confirmado pelo valor de  $\Delta G_{n\grave{a}o-covalente}$ . Assim, decidiu-se investigar um possível mecanismo de inibição covalente, resultante da reatividade dos compostos de acrilamida, cujo são considerados como eletrófilos moderadamente reativos (AWOONOR-WILLIAMS; WALSH; ROWLEY, 2017). Neste sentido, as adições de tio-Michael são em geral fracamente exergônicas, então estas podem ser frequentemente reversíveis (ARAFET et al., 2017; AWOONOR-WILLIAMS; WALSH; ROWLEY, 2017).

Em geral, a adição do tipo tio-Michael envolve uma desprotonação do grupo tiol (Cys1013) para formar o ânion tiolato (Cys(S<sup>-</sup>)/His(H<sup>+</sup>), a formação de um intermediário enolato (TS) e a protonação do enolato para formar os produtos tioéter (P1 e P1') (AWOONOR-WILLIAMS; WALSH; ROWLEY, 2017; BREUNING et al., 2010; PREVITI et al., 2017). Assim, o hipotético mecanismo covalente de inibição para o composto (**127**) no sítio de ligação da nsP2 (Figura 64) foi explorado em nível quântico, usando métodos DFT tais como B3LYP,  $\omega$ B97X-D e M06, com 6-31G(d) como nível de teoria.

**Figura 64 – Mecanismo covalente de inibição da nsP2 (hipotético).**

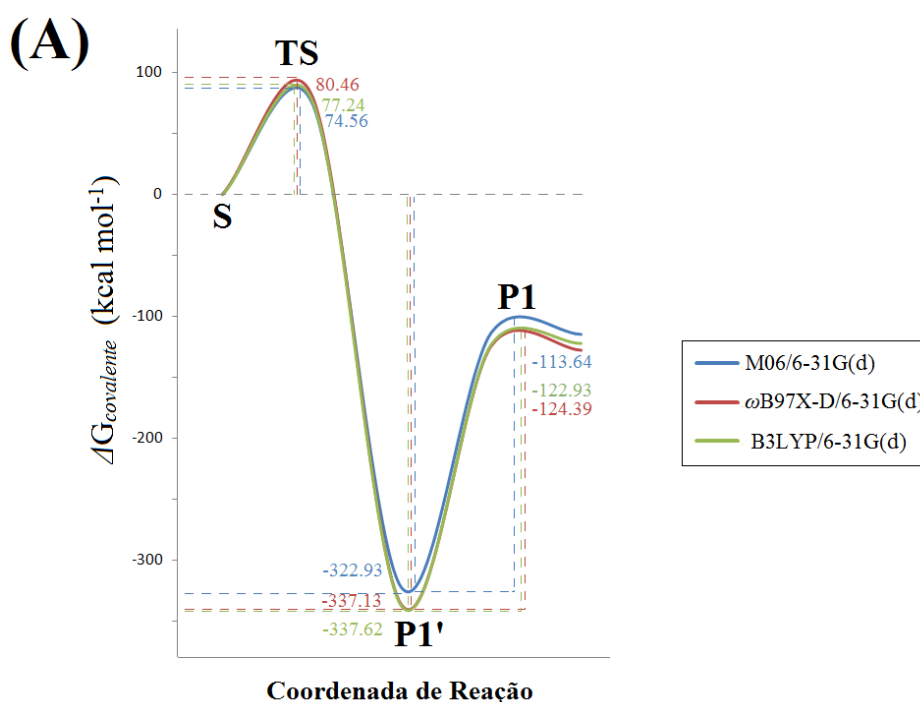


FONTE: Autor, 2019. S: tiolato ataca a dupla ligação da acrilamida; TS: intermediário enolato como estado de transição; P1 e P1': produto tioéter com equilíbrio tautomérico cetona-enol, respectivamente. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v.12.

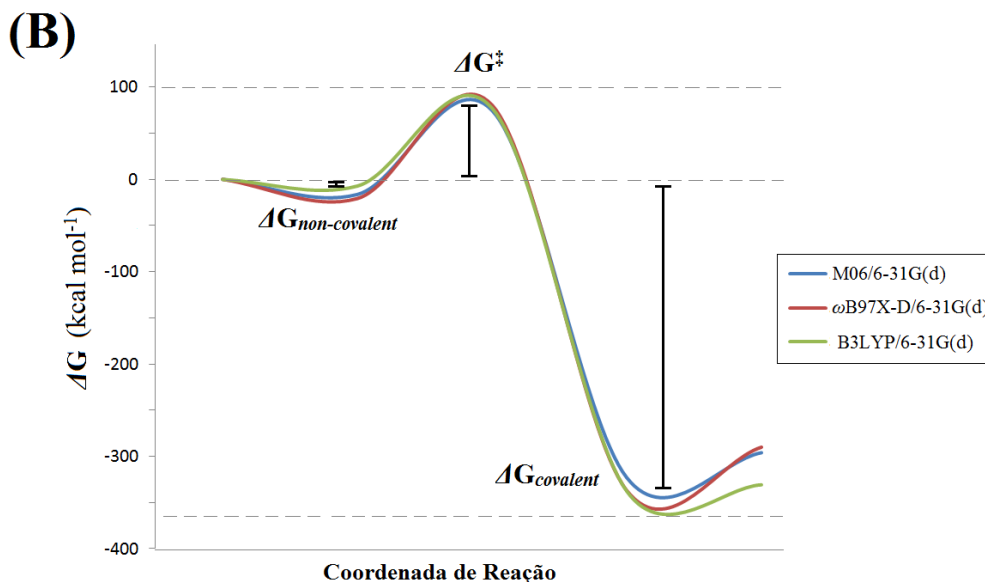
Em relação à Figura 64, a transferência do próton ocorre do grupo S<sup>1</sup>-H<sup>1</sup> (Cys1013) para o N<sup>1</sup> (His1083) a uma distância de 3,63 Å, levando à formação de tiolato. Subsequentemente, o ânion tiolato (S<sup>-</sup>) realiza um ataque nucleofílico no átomo C<sub>β</sub> do sistema α, β-insaturado (C<sub>β</sub>=C<sub>α</sub>-(C<sup>1</sup>=O<sup>1</sup>)NH) da acrilamida, com uma distância de 3,59 Å. Este ataque nucleofílico gera um centro estereogênico no C<sub>β</sub>, cujo é responsável por deslocar a densidade eletrônica para o átomo O<sup>1</sup>, levando à formação da espécie enolato (TS), com uma barreira energética de 80,46, 77,24 e 74,56 kcal mol<sup>-1</sup>, previsto pelos métodos M06, B3LYP e ωB97X-D, respectivamente. Neste sentido, o funcional ωB97X-D/6-31G(d) forneceu uma barreira de baixa energia e, conseqüentemente, o TS mais estável, corroborando com os resultados obtidos por Smith e coautores (2013), onde foi mostrado que o ωB97X-D prediz intermediários estáveis em adições do tipo tio-Michael. Adicionalmente, ambos os resíduos Cys1013 e His1083 estão envolvidos no TS. Nesta etapa, o intermediário enolato é estabilizado por uma interação de hidrogênio (C-O<sup>1</sup>...H<sup>1</sup>-N<sup>1</sup>), com uma distância de 2,01 Å. Finalmente, o tioéter pode ser encontrado como um tautomerismo entre as formas álcool (P1) e cetona (P1') (equilíbrio cetona-enólico), após a abstração do H<sup>1</sup> pelo ânion O<sup>1</sup>. Assim, o derivado cetona-tioéter (P1') é extremamente mais estável, com valores de ΔG de -322,93; -337,13 e -337,62 kcal mol<sup>-1</sup>, resultantes dos cálculos usando M06, ωB97X-D e B3LYP, respectivamente. Em contraste, o derivado álcool tioéter (P1) é menos estável, com valores de -113,64, -122,93 e -124,39 kcal mol<sup>-1</sup>, usando M06,

B3LYP e,  $\omega$ B97X-D, respectivamente. Como consequência, o produto deste mecanismo provavelmente será mais encontrado como um derivado ceto-éter do que um derivado enólico. Finalmente, esses cálculos de DFT foram capazes de prever o diagrama de energia  $\Delta G_{\text{covalente}}$  para este hipotético mecanismo de inibição covalente (Figura 65, A). Além disso, um perfil de ligação esquemático para a formação de um complexo covalente entre o inibidor (**127**) e a nsP2 ( $\Delta G_{\text{covalente}}$ ) foi comparado com o perfil não-covalente ( $\Delta G_{\text{não-covalente}}$ ), bem como com os valores de  $\Delta G^\ddagger$  (Figura 65, B). Basicamente, é possível verificar uma alta diferença entre os valores de energia  $\Delta G_{\text{não-covalente}}$  e  $\Delta G_{\text{covalente}}$ , sugerindo uma excelente estabilidade do produto tioéter, no mecanismo covalente. No entanto, valores elevados de barreiras ( $\Delta G^\ddagger$ ) foram observados, variando entre 80,46 e 74,56 kcal mol<sup>-1</sup>. De acordo com estudos de QM/MM desenvolvidos por Arafet e coautores (2015; 2017a; e 2017b), os valores de  $\Delta G^\ddagger$  podem variar entre 5,8 e 29,5 kcal mol<sup>-1</sup>. Além disso, esses altos valores de  $\Delta G^\ddagger$  sugerem que a reação será um processo extremamente endotérmico, caracterizando um processo não realístico. Em sentido, é possível sugerir que o sítio de ligação nsP2 não pode realizar um mecanismo covalente, de modo que os derivados da acrilamida podem inibir a enzima apenas com base em modos de interações não-covalentes.

**Figura 65 – Comparação entre as duas coordenadas de reação: não-covalente (A) e covalente (B).**







FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* Microsoft® Office Excel 2007.

Por fim, todos os dados gerados a partir da criação e aplicação deste novo protocolo virtual e aqui descritos foram agrupados e organizados na forma de artigo científico, cujo texto final encontra-se submetido à *Nature Scientific Reports* até a data de defesa desta tese de doutorado.

#### 5.4.1.5 Aplicação do novo protocolo virtual à série de inibidores racionalmente planejados

Após a criação do protocolo virtual direcionado à exploração de informações químicas quanto aos inibidores da nsP2 do CHIKV encontrados na literatura, decidiu-se aplicar o mesmo no estudo dos compostos finais sintetizados nesta tese.

O protocolo criado e estabelecido nesta tese revelou que os compostos sintetizados podem ser considerados como promissores, uma vez que o CHEMPLP revelou que estes apresentam valores de *FitScore* entre 46,75 e 61,31, os quais são superiores aos valores de *FitScore* usados para construir o respectivo protocolo.

Em geral, os derivados do ácido cinâmico não substituídos (**45-63**) apresentam valores de *FitScore* entre 51,43 (**58**) e 61,31 (**55**); os derivados do ácido 4-*terc*-butilcinâmico (**64-82**) apresentam uma faixa de *FitScore* entre 46,75 (**68**) e 56,2 (**71**); os derivados do ácido 4-clorocinâmico (**83-101**) apresentam valores de *FitScore* entre 51,83 (**85**) e 56,64 (**95**); e os derivados do fenilciclopropano (**102-120**) exibem valores de *FitScore* entre 48,65 (**114**) e 58,61 (**112**).

Adicionalmente, os compostos trimetoxilados (**121** e **122**) apresentaram valores de *FitScore* promissores, sendo 52,67 e 53,18, respectivamente.

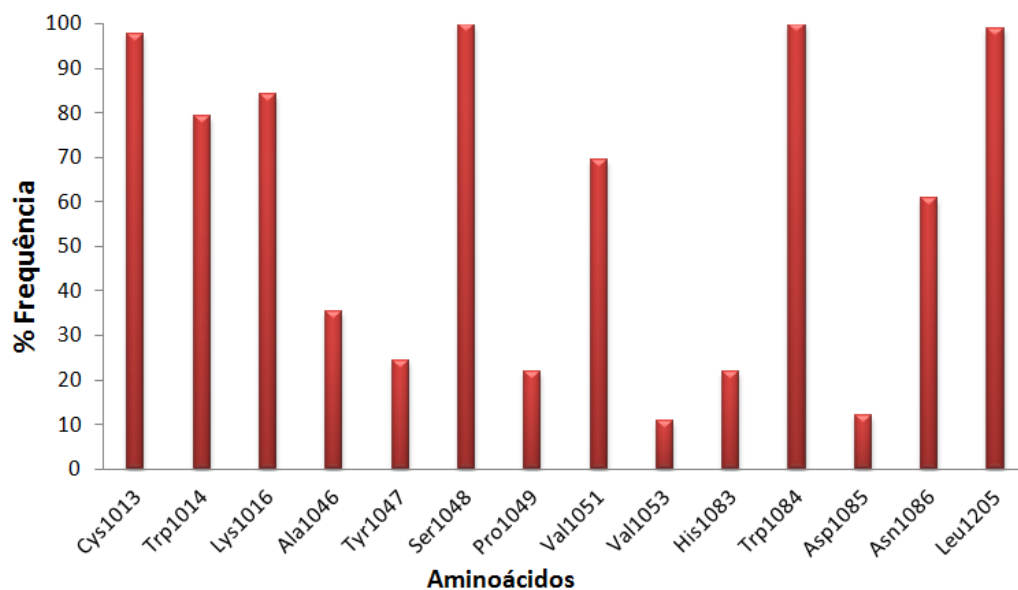
Por fim, os análogos do fenil-4-tiazol (**123-126**) apresentam valores de *FitScore* elevados, estando entre 54,99 (**123**) e 57,93 (**126**).

De modo geral, pode-se afirmar que os derivados do ácido cinâmico 4-clorocinâmico (**83-101**) representam a classe de compostos mais promissores, uma vez que esta apresenta a menor variação entre os valores mínimo e máximo de *FitScore* ( $\Delta = 4,81$ ); seguida pela classe dos ácidos 4-*terc*-butilcinâmicos (**64-82**), cujo apresenta  $\Delta = 9,45$ .

Após a determinação dos valores de *FitScore*, a inspeção visual dos complexos entre os compostos finais e o sítio ativo da nsP2 foi realizada. Desse modo, uma gráfico de frequência de visualização dos resíduos de aminoácidos envolvidos na interações de tais compostos como este alvo foi gerado (Figura 66). Ao analisar-se o gráfico abaixo é possível constatar que os resíduos mais frequentemente observados são Cys1013 (98%), Ser1048 (100%), Trp1084 (100%) e Leu1205 (99%). Fato interessante quanto comparados com os dados obtidos através de compostos previamente publicados e utilizados para gerar o protocolo virtual utilizado, onde observa-se que o resíduo Cys1013 está presente em 53% das interações com inibidores da nsP2; enquanto que o Trp1084 é encontrado em 78% destas. Em contraste, o resíduo His1083 (22%) apresenta maior frequência de interação para os compostos racionalmente planejados. Baseando-se nestas informações, acredita-se que os compostos planejados e sintetizados provavelmente são compostos mais potentes do que aqueles encontrados na literatura e descritos na fundamentação teórica deste trabalho, uma vez que os resíduos Cys1013, His1083 e Trp1084 são observados majoritariamente nas interações destes compostos. Tais resíduos são frequentemente associados à atividade anti-CHIKV através da inibição da enzima nsP2 (BASSETTO et al., 2013; GIANCOTTI et al., 2018; JADAV et al., 2015; TARDUGNO et al., 2018).

Em adição, alguns resíduos de aminoácidos não pertencentes aos *pockets* da nsP2 foram observados nas interações dos compostos sintetizados, similarmente aos compostos encontrados na literatura. Entretanto, os compostos racionalmente planejados apresentam uma alta frequência em complexos, sendo estes Trp1014 (79%), Lys1016 (84%), Val1053 (10%) e Asp1085 (12%). Estes, não foram observados nas interações dos compostos utilizados para criar o protocolo virtual empregado nestas análises. Por fim, tais resíduos são de regiões adjacentes ao *pocket 4*, os quais devem ter sido detectados devido o *software* Gold ser capaz de analisar um espaço circundante de até 10Å, tendo-se o ligante como ponto central (CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE, 2015).

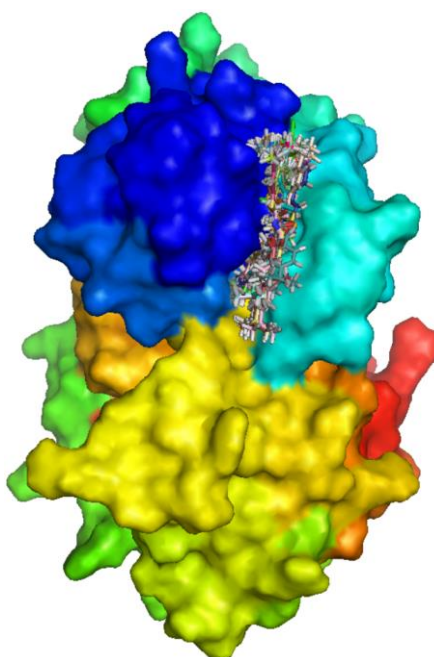
**Figura 66 – Frequência de visualização de resíduos do sítio ativo da nsP2 em complexação com os compostos racionalmente planejados.**



FONTE: Autor, 2019. Gráfico elaborado utilizando-se o *software* Microsoft® Office Excel 2007.

Por fim, foi observado que todos os derivados racionalmente planejados e sintetizados têm afinidade pelo *pocket 4* da nsP2, como os compostos ativos anteriormente descritos na fundamentação teórica (Figura 67).

**Figura 67 – Compostos racionalmente planejados em complexo com a enzima nsP2 do Chikungunya vírus.**



FONTE: Autor, 2019. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* PyMOL® v.0.99.

#### 5.4.1.6 Avaliação da atividade biológica dos análogos frente à enzima nsP2 do Chikungunya vírus

Como combinado entre os grupos de pesquisas, AK-Schirmeister e AK-Bodem, os novos compostos sintetizados foram enviados à Würzburg em Agosto de 2018, para que os testes mencionados na seção de materiais e métodos pudessem ser realizados. Entretanto, até a data de defesa desta tese de doutorado, nenhum dado referente aos ensaios biológicos envolvendo os compostos finais sintetizados e a atividade anti-CHIKV (através da inibição *in vitro* da enzima nsP2, bem como de células infectadas com o vírus) foi liberado pelo o grupo AK-Bodem. Contudo, quando os resultados forem liberados, estes serão analisados e devidamente discutidos quanto à potencial atividade dual dos compostos. Por fim, tais resultados serão agrupados aos dados experimentais envolvendo DENV e ZIKV apresentados anteriormente e, então, serão submetidos ao *Journal of Medicinal Chemistry*, da Editora *American Chemical Society*.

## **CONCLUSÕES**

---

## 6 CONCLUSÕES

Diversas estratégias inerentes ao campo da química medicinal têm sido utilizadas para o planejamento racional de diversos inibidores de proteases virais. Considerando isto, a hibridização molecular foi aplicada como técnica para a obtenção dos derivados racionalmente planejados, conectando-se o núcleo benzo[*b*]tiazol com os ácidos cinâmico e fenilciclopropanóico, por meio de uma amida atuando como *linker*. Assim, um total de 82 (oitenta e dois) compostos foram sintetizados com rendimentos excelentes. Em seguida, estes foram avaliados biologicamente frente aos alvos biomacromoleculares previamente selecionados. Em geral, verificou-se que 7 (sete) destes compostos híbridos se mostraram promissores, sendo o melhor candidato o inibidor (**75**), com valores de IC<sub>50</sub> de 7,6 e 11 µM para as proteases do Zika e Dengue, respectivamente.

Apesar dos dados obtidos pelo grupo AK-Schirmeister coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tanja Schirmeister, onde foi verificado que derivados do núcleo benzo[*b*]tiazol contendo hidroxilas apresentam atividade superior aos demais substituintes, nesta tese constatou-se que os derivados contendo alcóxilas no farmacóforo 1 são mais promissores que os demais. Ademais, o grupo *terc*-butila na posição *para* do farmacóforo 2 pode ser considerado como o mais significativamente importante para a atividade biológica, uma vez que este grupo está presente em 3 (três) candidatos promissores (**73**, **75** e **92**), fato confirmado na REA inter-séries. Em geral, os derivados do ácido fenilciclopropanóico exibem as atividades mais baixas frente à NS2B-NS3. Acredita-se que o ciclopropano contribui negativamente para esta classe de compostos, uma vez que tal estrutura está mais relacionada à atividade anti-CHIKV. Entretanto, um derivado hidroxilado (**119**) desta série exibiu moderada atividade, com IC<sub>50</sub> de 28,35 µM.

A substituição do farmacóforo 2 *para-terc*-butila por um derivado trimetoxilado é responsável por gerar compostos extremamente fluorescentes (**121** e **122**), os quais inviabilizaram os ensaios biológicos, tornando-se impossível determinar os valores de inibição dos mesmos, considerando-se a metodologia adotada nesta tese. Quanto à substituição do farmacóforo 1 por um núcleo fenil-4-tiazol, observou-se que esta apenas é vantajosa para o derivado contendo a *para-terc*-butila como farmacóforo 2 (**124**), cujo exibiu IC<sub>50</sub> de 14,9 µM. Ainda assim, demonstrando atividade semelhante ao seu precursor (**73**), entretanto, com seletividade para a NS2B-NS3 do ZIKV.

Com relação às simulações de *docking* molecular, quatro algoritmos genéticos (GA) foram utilizados para prever a correlação entre os valores de *FitScores* e os IC<sub>50</sub>. A partir destas, verificou-se que 3 (três) GA's foram capazes de prever uma excelente correlação ( $r^2 \geq$

0,5) entre os dados, com valores de  $r^2$  0,7 (ChemScore) e 0,84 (GoldScore). Em adição, observou-se que os resíduos de aminoácidos mais frequentemente envolvidos na interação ligante-enzima são Leu76, Trp83, Leu85, Gly148, Leu149, Asn152, Val154 e Ala164. As interações de Van der Waals representam o tipo de interação química que mais influencia positivamente a atividade dos compostos no sítio de ligação. Por fim, as simulações de *docking* molecular foram capazes de prever que os compostos mais promissores se ligam no sítio alostérico de inibição. Tal fato, foi confirmado experimentalmente por determinação das curvas de inibição destes.

Com relação à elaboração do protocolo virtual para planejamento de inibidores da nsP2 do CHIKV, foi observado que a minimização de energia usando o nível de teoria DFT B3LYP/6-31G(d) contribui positivamente para o valor final de  $r^2$ . As simulações de MD à 300 e 310 K foram capazes de fornecer estruturas 3D confiáveis para a enzima nsP2. Os resíduos Cys1013, His1083 e Trp1084 da estrutura nsP2 à 300 K estão ligeiramente torçionados, em comparação com a estrutura nsP2 do PDB. Verificou-se que a função de pontuação do CHEMPLP forneceu os melhores valores de  $r^2$  nas análises de *docking* molecular. Dentre as metodologias testadas, o método A2 pode ser considerado como o protocolo virtual mais satisfatório para explorar compostos ativos contra nsP2. O melhor protocolo virtual ( $r^2 = 0,76$ ) segue rigorosamente as etapas: (1) minimização energética inicial usando B3LYP/6-31G(d); (2) as simulações de MD da nsP2 devem ser realizadas à 300 K; (3) o *docking* molecular deve ser realizado usando o CHEMPLP como função de pontuação; (4) todos os valores do *FitScore* devem ser superiores a 35,71; e (5) os resíduos Cys1013, Ala1046, Ser1048, Tyr1078, Asn1079 e Trp1084 devem ser observados em interações entre o inibidor e nsP2. Com relação aos estudos de DFT envolvendo os métodos B3LYP, M06 e  $\omega$ B97X-D, verificou-se que a formação de tiolato (Cys(S<sup>-</sup>)) é plausível e que o par iônico é estável em condições fisiológicas. No entanto, esta espécie reativa não é capaz de realizar um ataque nucleofílico em um acceptor de tipo-Michael, como as acrilamidas. Por fim, todas as informações obtidas através do desenvolvimento deste protocolo inédito contribuirão para a identificação e planejamento de novos inibidores potenciais da enzima nsP2, assim como para os avanços da química medicinal.

De modo geral, as novas moléculas planejadas demonstraram afinidade superior àquelas observadas para a construção do protocolo virtual utilizado neste trabalho, sendo os análogos do ácido cinâmico os mais promissores, enquanto agentes anti-CHIKV. Adicionalmente, verificou-se que o resíduo Cys1013 é exibido em 98% dos complexos formados entre os respectivos compostos e a nsP2.





## 7 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos após aplicação do novo protocolo virtual para o estudo de compostos anti-CHIKV, são esperados excelentes resultados de atividade biológica para os derivados sintetizados, uma vez que estes foram planejados de modo racional.

Para os derivados que apresentarem perfil de fluorescência similar aos compostos **(121)** e **(122)**, a possibilidade de aplicação de tais moléculas como potenciais sondas será considerada em estudos mais direcionados à determinação de tal propriedade.

Quanto às perspectivas para este trabalho como um todo, tanto para os resultados biológicos envolvendo os vírus ZIKV/DENV e CHIKV, a técnica de Titulação Isotérmica por Calorimetria (do inglês, *Isothermal Titration Calorimetry*) será empregada para a determinação da energia livre de *Gibbs* e, conseqüentemente, determinação da eficiência de ligação. Por fim, todos os dados experimentais contidos nesta tese de doutorado serão organizados na forma de artigo científico e submetido ao *Journal of Medicinal Chemistry*, da editora *American Chemical Society (ACS)*.

## **REFERÊNCIAS**

---

## REFERÊNCIAS

AALST, M. VAN et al. Long-term sequelae of chikungunya virus disease: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 15, p. 8–22, 2017.

ABDELNABI, R. et al. Protein kinases C as potential host targets for the inhibition of chikungunya virus replication. **Antiviral Research**, v. 139, p. 79–87, 2017.

ABRAHAM, D. J. **Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery**. 6. ed. Virginia: Wiley-interscience, 1998.

AGUILERA-PESANTES, D. et al. Discovering key residues of dengue virus NS2b-NS3-protease: New binding sites for antiviral inhibitors design. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 492, n. 4, p. 631–642, 2017a.

AGUILERA-PESANTES, D. et al. Discovering key residues of dengue virus NS2b-NS3-protease: New binding sites for antiviral inhibitors design. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 492, n. 4, p. 631–642, 2017b.

AGUILERA-PESANTES, D.; MÉNDEZ, M. A. Structure and sequence based functional annotation of Zika virus NS2b protein: Computational insights. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 492, n. 4, p. 659–667, 2017.

AITKEN, A. Mass Spectrometric Techniques. In: WILSON, K.; WALKER, J. (Eds.). . **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7<sup>a</sup>. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. p. 352–398.

AJLOO, D. et al. Synthesis, characterization, spectroscopy, cytotoxic activity and molecular dynamic study on the interaction of three palladium complexes of phenanthroline and glycine derivatives with calf thymus DNA. **Inorganica Chimica Acta**, v. 430, p. 144–160, 2015.

ALAM, M. et al. A review exploring biological activities of hydrazones. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 6, n. 2, p. 69, 2014.

ALI OU ALLA, S.; COMBE, B. Arthritis after infection with Chikungunya virus. **Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, v. 25, n. 3, p. 337–346, 2011.

AMNERKAR, N. D.; BHUSARI, K. P. Synthesis, anticonvulsant activity and 3D-QSAR study of some prop-2-eneamido and 1-acetyl-pyrazolin derivatives of aminobenzothiazole. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 149–159, 2010.

AMRAOUI, F.; FAILLOUX, A. B. Chikungunya: an unexpected emergence in Europe. **Current Opinion in Virology**, v. 21, p. 146–150, 2016.

ANFASA, F. et al. Hyperferritinemia is a potential marker of chronic chikungunya : A retrospective study on the Island of Curaçao during the 2014 – 2015 retrospective study on the Island of Curac outbreak. **Journal of Clinical Virology**, v. 86, p. 31–38, 2017.

ARAFET, K. et al. Quantum mechanics/molecular mechanics studies of the mechanism of falcipain-2 inhibition by the epoxysuccinate E64. **Biochemistry**, v. 53, n. 20, p. 3336–3346, 2014.

ARAFET, K. et al. Quantum mechanics/molecular mechanics studies of the mechanism of cysteine protease inhibition by peptidyl-2,3-epoxyketones. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 20, p. 12740–12748, 2017.

ARAFET, K.; FERRER, S.; MOLINER, V. First quantum mechanics/molecular mechanics studies of the inhibition mechanism of cruzain by peptidyl halomethyl ketones. **Biochemistry**, v. 54, n. 21, p. 3381–3391, 2015.

ARAFET, K.; FERRER, S.; MOLINER, V. Computational Study of the Catalytic Mechanism of the Cruzain Cysteine Protease. **ACS Catalysis**, v. 7, n. 2, p. 1207–1215, 2017.

AWOONOR-WILLIAMS, E.; WALSH, A. G.; ROWLEY, C. N. **Modeling covalent-modifier drugs** *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2017.

BABINSKI, D.; SOLTANI, O.; FRANTZ, D. E. Stereoselective synthesis of acetoacetate-derived enol triflates. **Organic Letters**, v. 10, n. 13, p. 2901–2904, 2008.

BARTHEL, F. **Synthesis and evaluation of novel flaviviral NS2B/NS3 protease inhibitors**. [s.l.] Eberhard Karls Universität Tübingen, 2018.

BASSETTO, M. et al. Computer-aided identification, design and synthesis of a novel series of compounds with selective antiviral activity against chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 98, n. 1, p. 12–18, 2013.

BAXTER, C. A. et al. Flexible docking using Tabu search and an empirical estimate of binding affinity. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 33, n. 3, p. 367–382, 1998.

BEHNAM, M. A. M. et al. **The Medicinal Chemistry of Dengue Virus** *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016.

BELTRÁN-SILVA, S. L. et al. Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. **Revista Médica del Hospital General de México**, p. 1–8, 2016.

BHAKAT, S. et al. A perspective on targeting non-structural proteins to combat neglected tropical diseases: Dengue, West Nile and Chikungunya viruses. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 87, p. 677–702, 2014.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.

BIBLE, R. H.; SEARLE, G. D. **Interpretation of NMR Spectra - An Empirical Approach**. 1<sup>a</sup>. ed. Nova Iorque: Springer Science, Business Media, LLC, 1965.

BLAISING, J.; POLYAK, S. J.; PÉCHEUR, E. I. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: An update. **Antiviral Research**, v. 107, n. 1, p. 84–94, 2014.

BLOCH, D. **The Cost and Burden of Chikungunya in the Americas**. [s.l.] Universidade de Yale, 2016.

BOLDESCU, V. et al. **Broad-spectrum agents for flaviviral infections: Dengue, Zika and beyond** *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017.

BOURAI, M. et al. Mapping of Chikungunya Virus Interactions with Host Proteins Identified nsP2 as a Highly Connected Viral Component. **Journal of Virology**, v. 86, n. 6, p. 3121–3134, 2012.

BOURJOT, M. et al. Prostratin and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate are potent and selective inhibitors of chikungunya virus replication. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 12, p. 2183–2187, 2012.

BRECHER, M. et al. A conformational switch high-throughput screening assay and allosteric inhibition of the flavivirus NS2B-NS3 protease. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, 2017.

BREUNING, A. et al. Michael acceptor based antiplasmodial and antitrypanosomal cysteine protease inhibitors with unusual amino acids. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1951–1963, 2010.

BRITO, W. A. et al. Development and validation of HPLC-DAD and UHPLC-DAD methods for the simultaneous determination of guanyldrazone derivatives employing a factorial design. **Molecules**, v. 22, n. 9, 2017.

BROWN, D. G.; BOSTRÖM, J. Analysis of Past and Present Synthetic Methodologies on Medicinal Chemistry: Where Have All the New Reactions Gone? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 4443–4458, 2016.

BURKOFF, N. S. et al. Exploiting molecular dynamics in Nested Sampling simulations of small peptides. **Computer Physics Communications**, v. 201, p. 8–18, 2016.

BURSULAYA, B. D. et al. Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 17, n. 11, p. 755–763, 2003.

BURT, F. J. et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3099, n. 16, p. 1–11, 2017.

BUSCH, M.; ERICKSON, G. An overview of Chikungunya virus. **JAAPA : official journal of the American Academy of Physician Assistants**, v. 28, n. 10, p. 54–57, 2015.

BYLER, K. G.; OGUNGBE, I. V.; SETZER, W. N. In-silico screening for anti-Zika virus phytochemicals. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 69, p. 78–91, 2016.

CABARCAS-MONTALVO, M. et al. Discovery of antiviral molecules for dengue: In silico search and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 87–97, 2016.

CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE. **GOLD User Guide A Component of the GOLD Suite** CambridgeCCDC Software Ltd, , 2015. Disponível em: <<https://www.ccdc.cam.ac.uk>>

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. **Zika virus outbreak, Bahia, Brazil** **Emerging Infectious Diseases**, 2015.

CAPRILES, P. V. S. Z.; DARDENNE, L. E. Molecular Dynamics Simulations of Cruzipains 1 and 2 at Different Temperatures. In: SAGOT, M. F.; WALTER, M. E. M. T. (Eds.). . **Advances in Bioinformatics and Computational Biology**. 1. ed. [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. v. 4643p. 1–11.

CARDOSO, M. V. O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti- *Trypanosoma cruzi* agents : Structural design , synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 48–59, 2014.

CARPENTIER, K. S.; MORRISON, T. E. Innate immune control of alphavirus infection. **Current Opinion in Virology**, v. 28, p. 53–60, 2018.

CASALE, T. B. et al. Zika virus: An emerging infectious disease with serious perinatal and neurologic complications. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 2, p. 482–490, 2018.

CHAN, J. F. W. et al. **Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease** **Journal of Infection**, 2016.

CHANDAK, N. H. et al. Neurological complications of Chikungunya virus infection. **Neurology India**, v. 57, n. 2, p. 177, 2009.

CHAPPELL, K. J. et al. West Nile Virus NS2B/NS3 protease as an antiviral target. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 27, p. 2771–2784, 2008.

CHEN, L. et al. Thermal stability and unfolding pathways of hyperthermophilic and mesophilic periplasmic binding proteins studied by molecular dynamics simulation. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 34, n. 7, p. 1576–1589, 2016a.

CHEN, W. N. et al. The dengue virus NS2B-NS3 protease retains the closed conformation in the complex with BPTI. **FEBS Letters**, v. 588, n. 14, p. 2206–2211, 2014.

CHEN, X. et al. **Mechanisms of activation and inhibition of Zika virus NS2B-NS3 protease** **Cell Research**, 2016b.

CHHABRA, M. et al. Chikungunya fever: a re-emerging viral infection. **Indian journal of medical microbiology**, v. 26, n. 1, p. 5–12, 2008.

CHING, K. C. et al. Trisubstituted thieno[3,2-b]pyrrole 5-carboxamides as potent inhibitors of alphaviruses. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 9196–9213, 2015.

CHIRATHAWORN, C. et al. Serum IL-18 and IL-18BP Levels in Patients with Chikungunya Virus Infection. **Viral Immunology**, v. 23, n. 1, p. 113–117, 2010.

CHOKSUPMANEE, O. et al. Structural platform for the autolytic activity of an intact NS2B-NS3 protease complex from dengue virus. **Biochemistry**, v. 51, n. 13, p. 2840–2851, 2012.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. Nucleophilic Substitution at the Carbonyl Group. In: **Organic Chemistry**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2012a. p. 1–1265.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. Electrophilic Addition to Alkenes. In: **Organic Chemistry**. 2. ed. New York: [s.n.]. p. 427–447.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11418–11431, 2006.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: UNICAMP, 2006.

COLLINS, M. H.; METZ, S. W. **Progress and Works in Progress: Update on Flavivirus Vaccine Development Clinical Therapeutics**, 2017.

COUDERC, T. et al. Chikungunya virus infection of corneal grafts. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 6, p. 851–859, 2012.

CUMMINGS, M. D. et al. Comparison of automated docking programs as virtual screening tools. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 962–976, 2005.

DAI, W. et al. Michael addition reactions of cyclanones with acrylamides: Producing 2-carbamoylethyl derivatives or ene-lactams. **Science in China, Series B: Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 1044–1050, 2008.

DAR, A. M.; MIR, S. Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 08, n. 02, p. 356, 2017.



DAS, P. K. et al. Design and validation of novel chikungunya virus protease inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7382–7395, 2016.

DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. et al. Structural optimization of 6-aryl pyridazin-3-ones as novel potent PDE4 inhibitors. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 744–751, 2015.

DE LA CRUZ, L. et al. Binding of low molecular weight inhibitors promotes large conformational changes in the dengue virus ns2b-ns3 protease: Fold analysis by pseudocontact shifts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 47, p. 19205–19215, 2011.

DE LAMBALLERIE, X.; NINOVE, L.; CHARREL, R. N. Antiviral treatment of chikungunya virus infection. **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 9, n. 2, p. 101–104, 2009.

DEEB, O.; CLARE, B. W. Comparison of AM1 and B3LYP-DFT for inhibition of MAO-A by phenylisopropylamines: A QSAR study. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 71, n. 4, p. 352–362, 2008.

DELOGU, I. et al. In vitro antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant. **Antiviral Research**, v. 90, n. 3, p. 99–107, 2011.

DENG, J. et al. Discovery of novel small molecule inhibitors of dengue viral NS2B-NS3 protease using virtual screening and scaffold hopping. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 6278–6293, 2012.

DEVINE, S. M. et al. Promiscuous 2-aminothiazoles (PrATs): A frequent hitting scaffold. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1205–1214, 2015.

DI MOLA, A. et al. Structure-activity relationship study of arbidol derivatives as inhibitors of chikungunya virus replication. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6014–25, 2014.

DIPPY, J. F. J.; EVANS, R. M. The nature of the catalyst in the perkin condensation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 451–456, 1950.

DOWD, K. A. et al. Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype. **Cell Reports**, v. 16, n. 6, p. 1485–1491, 2016.

ELDRIDGE, M. D. et al. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 11, n. 5, p. 425–445, 1997.

ELEFTHERIADOU, I. et al. Selective transduction of astrocytic and neuronal CNS subpopulations by lentiviral vectors pseudotyped with Chikungunya virus envelope. **Biomaterials**, v. 123, p. 1–14, 2017.

ERBEL, P. et al. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 13, n. 4, p. 372–373, 2006.

EVANS, D.; MEIRES, J. L. Chikungunya Virus: A Rising Health Risk in the United States and How Nurse Practitioners Can Help Address and Reduce the Risk. **Journal for Nurse Practitioners**, v. 12, n. 5, p. 289–298, 2016.

FALGOUT, B. et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **Journal of Virology**, v. 65, n. 5, p. 2467–2475, 1991.

FATIMA, Z. et al. Serotype and genotype analysis of dengue virus by sequencing followed by phylogenetic analysis using samples from three mini outbreaks-2007-2009 in Pakistan. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 200, 2011.

FEIBELMAN, K. M. et al. Identification of small molecule inhibitors of the Chikungunya virus nsP1 RNA capping enzyme. **Antiviral Research**, v. 154, n. April, p. 124–131, 2018.

FEINBERG, H. et al. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. **Science**, v. 294, n. 5549, p. 2163–2166, 2001.

FERREIRA DA SILVA-JÚNIOR, E. et al. Molecular Docking Studies Applied to a Dataset of Cruzain Inhibitors. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 13, 2017.

FRANTZ, D. E. et al. Practical Synthesis of Aryl Triflates under Aqueous Conditions. **Organic Letters**, v. 4, n. 26, p. 4717–4718, 2002.

GEIJTENBEEK, T. B. H. et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 575–585, 2000.

GÉRARDIN, P. et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 3, p. 0413–0423, 2008.

GIANCOTTI, G. et al. Rational modifications on a benzylidene-acrylohydrazide antiviral scaffold, synthesis and evaluation of bioactivity against Chikungunya virus. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 149, p. 56–68, 2018.

GIBBONS, R. V; VAUGHN, D. W. **Dengue an escalating problem** *Journal of Association of Physicians of India*, 2015.

GIBBS, A. C. et al. Inhibitor Bound Dengue NS2B-NS3pro Reveals Multiple Dynamic Binding Modes. **Biochemistry**, v. 57, n. 10, p. 1591–1602, 2018.

GIGANTE, A. et al. Identification of [1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7(6H)-ones as novel inhibitors of Chikungunya virus replication. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4000–4008, 2014.

GOVINDARAJAN, M.; BENELLI, G. One-pot fabrication of silver nanocrystals using *Ormocarpum cochinchinense*: Biophysical characterization of a potent mosquitocidal and toxicity on non-target mosquito predators. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, n. 2, p. 377–385, 2016.

HAN, W. G.; TAJKHORSHID, E.; SUHAI, S. QM/MM study of the active site of free papain and of the nma-papain complex. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 16, n. 5, p. 1019–1032, 1999.

HARA, S. et al. Bf<sub>3</sub> etherate mediated 1,4-addition of 1-alkenyldialkoxyboranes to  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones. A stereoselective synthesis of  $\gamma, \delta$ -Unsaturated ketones. **Tetrahedron Letters**, v. 31, p. 247–250, 1990.

HASAN, S. S. et al. **Structural biology of Zika virus and other flaviviruses** *Nature Structural and Molecular Biology*, 2018.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–4523, 2002.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. **Flaviviruses and flavivirus vaccines** *Vaccine*, 2012.

HILL, M. E. et al. The unique cofactor region of Zika virus NS2B-NS3 protease facilitates cleavage of key host proteins. **ACS Chemical Biology**, v. 13, p. 2398–2405, 2018.

HOMEYER, N. et al. Binding free energy calculations for lead optimization: Assessment of their accuracy in an industrial drug design context. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 10, n. 8, p. 3331–3344, 2014.

HUANGA, D.; CAFLISCHA, A. Library screening by fragment-based docking. **Journal of Molecular Recognition**, v. 23, n. 2, p. 183–193, 2010.

HUSSAIN, I.; ALI, A. Exploring the Pharmacological Activities of Hydrazone Derivatives: A Review. **Journal of Phytochemistry and Biochemistry**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2017.

HWANG, J.; JIANG, A.; FIKRIG, E. A potent prolyl tRNA synthetase inhibitor antagonizes Chikungunya and Dengue viruses. **Antiviral Research**, v. 161, n. December 2018, p. 163–168, 2019.

JACOBSEN, N. E. **NMR Data Interpretation Explained - Understanding 1D and 2D NMR Spectra of Organic Compounds and Natural Products**. 1<sup>a</sup>. ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons Ltd, 2017.

JADAV, S. S. et al. Chikungunya Protease Domain – High throughput Virtual Screening. **International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 12, p. 1765–1768, 2012.

JADAV, S. S. et al. Thiazolidone derivatives as inhibitors of chikungunya virus. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 172–178, 2015.

JAIN, J. et al. Dengue Chikungunya co-infection: A live-in relationship?? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, p. 1–9, 2017.

JAIN, S. V et al. Discovery of potent anticonvulsant ligands as dual NMDA and AMPA receptors antagonists by molecular modelling studies. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 11, p. 3465–3484, 2012.

JAMESON, B. et al. Expression of DC-SIGN by Dendritic Cells of Intestinal and Genital Mucosae in Humans and Rhesus Macaques. **Journal of Virology**, v. 76, n. 4, p. 1866–1875, 2002.

JAVELLE, E. et al. The challenge of chronic chikungunya. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 15, p. 3–4, 2017.

JIANG, X. et al. Dynamic Perturbation of the Active Site Determines Reversible Thermal Inactivation in Glycoside Hydrolase Family 12. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 2, p. 288–297, 2017.

JIMONET, P. et al. Riluzole series. synthesis and in vivo “antiglutamate” activity of 6-substituted-2-benzothiazolamines and 3-substituted-2-imino-benzothiazolines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 15, p. 2828–2843, 1999.

KAUR, P. et al. Inhibition of Chikungunya virus replication by harringtonine, a novel antiviral that suppresses viral protein expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 155–167, 2013.

KAUR, P.; CHU, J. J. H. Chikungunya virus: An update on antiviral development and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 19–20, p. 969–983, 2013.

KHAN, M. et al. Cellular IMPDH enzyme activity is a potential target for the inhibition of Chikungunya virus replication and virus induced apoptosis in cultured mammalian cells. **Antiviral Research**, v. 89, n. 1, p. 1–8, 2011.

KIAT, T. S. et al. Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 12, p. 3337–3340, 2006.

KONTOYIANNI, M.; SOKOL, G. S.; MCCLELLAN, L. M. Evaluation of library ranking efficacy in virtual screening. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 11–22, 2005.

KORB, O.; STÜTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced Protein-Ligand docking with PLANTS. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 1, p. 84–96, 2009.

KOROŠEC, B. et al. Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53). **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 955–966, 2013.

KOSAK, T. M. et al. Ether Cleavage Re-Investigated: Elucidating the Mechanism of BBr<sub>3</sub>-Facilitated Demethylation of Aryl Methyl Ethers. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 34, p. 7460–7467, 2015.

KUCHARZ, E. J.; CEBULA-BYRSKA, I. Chikungunya fever. **European Journal of Internal Medicine**, v. 23, n. 4, p. 325–329, 2012.

KUNDU, S.; ROY, D. Temperature-induced unfolding pathway of a type III antifreeze protein: Insight from molecular dynamics simulation. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 27, n. 1, p. 88–94, 2008.

KUTSUNA, S. et al. A case of consecutive infection with Zika virus and Chikungunya virus in Bora Bora, French Polynesia. **Journal of Infection and Chemotherapy**, p. 321–323, 2016.

LAGARIAS, P. et al. Discovery of Novel Adenosine Receptor Antagonists through a Combined Structure- and Ligand-Based Approach Followed by Molecular Dynamics Investigation of Ligand Binding Mode. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 58, n. 4, p. 794–815, 2018.

LEATHERBARROW, R. J. **GraFit**HorleyErithacus Software Ltd, , 2010.

LEE, H.; HALVERSON, S.; EZINWA, N. Mosquito-borne Diseases. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 45, n. 3, p. 393–407, 2018.

LEI, J. et al. Crystal structure of zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. **Science**, v. 353, n. 6298, p. 503–505, 2016.

LEMKE, T. L. et al. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 6. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business, 2008.

LEUNG, J. Y. et al. Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. **Journal of Virology**, v. 82, n. 10, p. 4731–4741, 2008.

LEWIS, S. D.; JOHNSON, F. A.; SHAFER, J. A. Potentiometric determination of ionizations at the active site of papain. **Biochemistry**, v. 15, n. 23, p. 5009–5017, 1976.

LI, H. et al. The Serine Protease and RNA-Stimulated Nucleoside Triphosphatase and RNA Helicase Functional Domains of Dengue Virus Type 2 NS3 Converge within a Region of 20 Amino Acids. **Journal of Virology**, v. 73, n. 4, p. 3108–3116, 1999.

LI, Y.; LIU, Z.; WANG, R. Test MM-PB/SA on true conformational ensembles of protein-ligand complexes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 9, p. 1682–1692, 2010.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23–61, 2003.

LIU, J. L. et al. Selection and characterization of protective anti-chikungunya virus single domain antibodies. **Molecular Immunology**, v. 105, n. December 2018, p. 190–197, 2019.

LOVELL, S. C. et al. Structure validation by C $\alpha$  geometry:  $\phi, \psi$  and C $\beta$  deviation. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 50, n. 3, p. 437–450, 2003.

LOW, J. G. H.; OOI, E. E.; VASUDEVAN, S. G. Current status of dengue therapeutics research and development. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. Suppl 2, p. S96–S102, 2017.

LU, D. et al. Discovery and optimization of phthalazinone derivatives as a new class of potent dengue virus inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 328–337, 2018.

LUCAS-HOURANI, M. et al. A phenotypic assay to identify chikungunya virus inhibitors targeting the nonstructural protein nsP2. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 18, n. 2, p. 172–179, 2013.

LUDEWIG, S. et al. Enzyme kinetics and hit validation in fluorimetric protease assays. **Curr. Topics Med. Chem.**, v. 10, n. 3, p. 368–382, 2010.

LUO, D.; VASUDEVAN, S. G.; LESCAR, J. **The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development** *Antiviral Research*, 2015.

LUO, Y. et al. Synthesis and biological evaluation of N-(4-phenylthiazol-2-yl)cinnamamide derivatives as novel potential anti-tumor agents (Med. Chem. Commun. (2015) 6 (1036)). **MedChemComm**, v. 6, n. 7, p. 1036–1042, 2015.

MACKINNON, C. H. et al. Structure-based design and synthesis of potent benzothiazole inhibitors of interleukin-2 inducible T cell kinase (ITK). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 23, p. 6331–6335, 2013.

MAGALHÃES-MOREIRA, D. R. et al. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 467–478, 2014.

MAHAWATHTHA, M. C. et al. Solution conformations of a linked construct of the Zika virus NS2B-NS3 protease. **Antiviral Research**, v. 142, p. 141–147, 2017.

MAHY, B. W. J. The Evolution and Emergence of RNA Viruses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 899–899, 2010.

MALMSTROM, R. D.; WATOWICH, S. J. Using free energy of binding calculations to improve the accuracy of virtual screening predictions. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 7, p. 1648–1655, 2011.

MARQUES, A. R. et al. Annonalide and derivatives: Semisynthesis, cytotoxic activities and studies on interaction of annonalide with DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 179, p. 156–166, 2018.

MARTINEZ, A. A. et al. Breathing new life into West Nile virus therapeutics; discovery and study of zafirlukast as an NS2B-NS3 protease inhibitor. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 1202–1213, 2018.

MARTINEZ, J. D.; GARZA, J. A. C. LA; CUELLAR-BARBOZA, A. Going Viral 2019: Zika, Chikungunya, and Dengue. **Dermatologic clinics**, v. 37, n. 1, p. 95–105, 2019.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Tropica**, v. 166, p. 155–163, 2017.

MCOMIE, J. F. W.; WATTS, M. L.; WEST, D. E. Demethylation of aryl methyl ethers by boron tribromide. **Tetrahedron**, v. 24, n. 5, p. 2289–2292, 1968.

MÉNDEZ-LUCIO, O. et al. Computational study on the inhibition mechanism of cruzain by nitrile-containing molecules. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 35, p. 28–35, 2012.



MILLIES, B. et al. **New nanomolar inhibitors of NS2B/NS3-Protease of Zika- and Dengue-Virus**. 20. JungChemikerForum Frühjahrssymposium. **Anais...Konstanz**: 2018.

MIRZA, S. B. et al. Virtual screening of eighteen million compounds against dengue virus: Combined molecular docking and molecular dynamics simulations study. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 66, p. 99–107, 2016.

MIRZA, S. B. et al. Discovery of selective dengue virus inhibitors using combination of molecular fingerprint-based virtual screening protocols, structure-based pharmacophore model development, molecular dynamics simulations and in vitro studies. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 79, p. 88–102, 2018.

MITTAL, R. et al. Zika Virus: An Emerging Global Health Threat. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 486, 2017.

MLADENOVIC, M. et al. Atomistic insights into the inhibition of cysteine proteases: First QM/MM calculations clarifying the stereoselectivity of epoxide-based inhibitors. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 37, p. 11798–11808, 2008.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016.

MUKHAMETOV, A. et al. **Allosteric pocket of the dengue virus (serotype 2) NS2B/NS3 protease: In silico ligand screening and molecular dynamics studies of inhibition** **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 2014.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. **A structural perspective of the Flavivirus life cycle** **Nature Reviews Microbiology**, 2005.

MURALI, K. S. et al. Anti—chikungunya activity of luteolin and apigenin rich fraction from *Cynodon dactylon*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 5, p. 352–358, 2015.

MURUGAN, S.; SATHISHKUMAR, R. **Chikungunya infection: A potential re-emerging global threat** **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** Elsevier B.V., , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.07.020>>

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.

NAJIBI, S. M. et al. Protein Structure Classification and Loop Modeling Using Multiple Ramachandran Distributions. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 243–254, 2017.

NG, L. F. P. et al. IL-1 $\beta$ , IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, 2009.

NGUYEN, P. T. V.; YU, H.; KELLER, P. A. Identification of chikungunya virus nsP2 protease inhibitors using structure-base approaches. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 57, p. 1–8, 2015.

NITSCHKE, C. et al. **Biochemistry and medicinal chemistry of the dengue virus protease** *Chemical Reviews*, 2014.

NITSCHKE, C. et al. Peptide-Boronic Acid Inhibitors of Flaviviral Proteases: Medicinal Chemistry and Structural Biology. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 511–516, 2017.

NOBLE, C. G. et al. Ligand-Bound Structures of the Dengue Virus Protease Reveal the Active Conformation. **Journal of Virology**, v. 86, n. 1, p. 438–446, 2012.

OLIMPIERI, F.; VOLONTERIO, A.; ZANDA, M. Three-component, one-pot sequential synthesis of 1,3-disubstituted 5-arylhydantoin. **Synlett**, n. 19, p. 3016–3020, 2008.

OLIVEIRA, A. F. C. D. S. et al. Zirconium catalyzed synthesis of 2-arylidene Indan-1,3-diones and evaluation of their inhibitory activity against NS2B-NS3 WNV protease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 149, p. 98–109, 2018.

OLLIARO, P. et al. Improved tools and strategies for the prevention and control of arboviral diseases: A research-to-policy forum. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, 2018.

OTHMAN, R. et al. Docking of noncompetitive inhibitors into dengue virus type 2 protease: Understanding the interactions with allosteric binding sites. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 8, p. 1582–1591, 2008.

PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 2, p. 91–102, 2017.

PALAYAM, M. et al. Structural insights into a multifunctional inhibitor, “AMTIN” from tubers of *Alocasia macrorrhizos* and its possible role in dengue protease (NS2B-NS3) inhibition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 681–691, 2018.

PAMBUDI, S. et al. A small compound targeting the interaction between nonstructural proteins 2B and 3 inhibits dengue virus replication. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 440, n. 3, p. 393–398, 2013.

PAUL, M. et al. Comparative molecular dynamics simulation studies for determining factors contributing to the thermostability of chemotaxis protein “cheY”. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 32, n. 6, p. 928–949, 2014.

PEI, Z. et al. Fragment Molecular Orbital Method Applied to Lead Optimization of Novel Interleukin-2 Inducible T-Cell Kinase (ITK) Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4352–4363, 2016.

PERERA-LECOIN, M. et al. **Flavivirus entry receptors: An update** *Viruses*, 2013.

PERKIN, W. H. XXVIII.—On some hydrocarbons obtained from the homologues of cinnamic acid; and on anethol and its homologues. **J. Chem. Soc.**, v. 32, p. 660–674, 1877.

PETER, C. et al. Estimating entropies from molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Physics**, v. 120, n. 6, p. 2652–2661, 2004.

PETERSEN, L. R.; POWERS, A. M. Chikungunya: epidemiology. **F1000Research**, v. 1, n. 5, p. 1–8, 2016.

PHOO, W. W. et al. Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. **Nature Communications**, v. 7, 2016.

PIETILÄ, M. K.; HELLSTRÖM, K.; AHOLA, T. Alphavirus polymerase and RNA replication. **Virus Research**, v. 234, p. 44–57, 2017.

PINKHAM, A. M.; YU, Z.; COWAN, J. A. Attenuation of West Nile Virus NS2B/NS3 Protease by Amino Terminal Copper and Nickel Binding (ATCUN) Peptides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 980–988, 2018.

PLANTE, K. et al. Novel chikungunya vaccine candidate with an ires-based attenuation and host range alteration mechanism. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, p. e100214, 2011.

PÖHLMANN, S. et al. DC-SIGN Interactions with Human Immunodeficiency Virus Type 1 and 2 and Simian Immunodeficiency Virus. **Journal of Virology**, v. 75, n. 10, p. 4664–4672, 2001.

POON, T.; MUNDY, B. P.; SHATTUCK, T. W. The Michael Reaction. **Journal of Chemical Education**, v. 79, n. 2, p. 264–267, 2002.

POULIOT, M.; JEANMART, S. **Pan Assay Interference Compounds (PAINS) and Other Promiscuous Compounds in Antifungal Research** *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016.

POULSEN, A.; KANG, C.; KELLER, T. H. Drug design for flavivirus proteases: what are we missing? **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 21, p. 3422–7, 2014.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. **Changing patterns of chikunya virus: Re-emergence of a zoonotic arbovirus** *Journal of General Virology*, 2007.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. **Structure Determination of Organic Compounds - Tables of Spectral Data**. 4<sup>a</sup>. ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.

PREUGSCHAT, F.; STRAUSS, J. H. Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of dengue 2 virus in vitro and in vivo. **Virology**, v. 185, n. 2, p. 689–697, 1991.

PREVITI, S. et al. Development of Novel Peptide-Based Michael Acceptors Targeting Rhodesain and Falcipain-2 for the Treatment of Neglected Tropical Diseases (NTDs). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 16, p. 6911–6923, 2017.

QADIR, A. et al. Potential targets for therapeutic intervention and structure based vaccine design against Zika virus. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, p. 444–460, 2018.

QI, R.-F.; SONG, Z.-W.; CHI, C.-W. Structural Features and Molecular Evolution of Bowman-Birk Protease Inhibitors and Their Potential Application. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, n. 5, p. 283–292, 2005.

RAMAKRISHNAN, C. et al. Structure–function relationship of Chikungunya nsP2 protease: A comparative study with papain. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 89, n. 5, p. 772–782, 2017.

RASHAD, A. A.; MAHALINGAM, S.; KELLER, P. A. Chikungunya virus: Emerging targets and new opportunities for medicinal chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1147–1166, 2014.

RATHER, I. A. et al. **ZIKA virus: An emerging worldwide threat** *Frontiers in Microbiology*, 2017.

RATHORE, A. P. S. et al. Chikungunya virus nsP3 & nsP4 interacts with HSP-90 to promote virus replication: HSP-90 inhibitors reduce CHIKV infection and inflammation in vivo. **Antiviral Research**, v. 103, n. 1, p. 7–16, 2014.

RAWAT, J.; QURAIISHI, M. A. Influence of some 6-methoxy-aminobenzothiazole derivatives on corrosion of ferrous and nonferrous metals under vapor-phase conditions. **Corrosion**, v. 59, n. 3, p. 238–241, 2003.

RAWLINSON, S. M. et al. Dengue virus RNA polymerase NS5: a potential therapeutic target? **Current drug targets**, v. 7, n. 12, p. 1623–1638, 2006.

RECKER, M. et al. **Assessing dengue vaccination impact: Model challenges and future directions**. Vaccine. *Anais...*2016

RIOU, J.; POLETTI, C.; BOËLLE, P. A comparative analysis of Chikungunya and Zika transmission. **Epidemics**, p. 1–10, 2016.

ROBIN, S. et al. Neurologic manifestations of pediatric chikungunya infection. **Journal of child neurology**, v. 23, n. 9, p. 1028–1035, 2008.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. **Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010.

RUSSO, A. T. et al. Structural basis for substrate specificity of alphavirus nsP2 proteases. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 1, p. 46–53, 2010.

RUSSO, A. T.; WHITE, M. A.; WATOWICH, S. J. The Crystal Structure of the Venezuelan Equine Encephalitis Alphavirus nsP2 Protease. **Structure**, v. 14, n. 9, p. 1449–1458, 2006.

SAISAWANG, C. et al. Glutathionylation of chikungunya nsP2 protein affects protease activity. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1861, n. 2, p. 106–111, 2017.

SALMASO, V.; MORO, S. **Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview** *Frontiers in Pharmacology*, 2018.

SANGEETHA, K.; PURUSHOTHAMAN, I.; RAJARAJAN, S. Spectral characterisation, antiviral activities, in silico ADMET and molecular docking of the compounds isolated from *Tectona grandis* to chikungunya virus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 302–310, 2017.

SCHÖNE, T. et al. STD-NMR experiments identify a structural motif with novel second-site activity against West Nile virus NS2B-NS3 protease. **Antiviral Research**, v. 146, p. 174–183, 2017.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491–500, 2010.

SCUOTTO, M. et al. Discovery of novel multi-target indole-based derivatives as potent and selective inhibitors of chikungunya virus replication. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 327–337, 2017.

SEEMA; JAIN, S. K. **Molecular mechanism of pathogenesis of Dengue virus: Entry and fusion with target cell** *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2005.

SELVEY, L. A.; SPEERS, D. J.; SMITH, D. W. Long-term outcomes of Murray Valley encephalitis cases in Western Australia: What have we learnt? **Internal Medicine Journal**, v. 46, n. 2, p. 193–201, 2016.

SENTHILKUMAR, R. et al. Plasma Protein Binding of Anisomelic Acid: Spectroscopy and Molecular Dynamic Simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 12, p. 2401–2412, 2016.

SESA. **Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia e/ou Alterações do Sistema Nervoso Central Relacionadas a Infecções Congênitas**. Fortaleza: [s.n.].

SEYEDI, S. S. et al. Computational Approach Towards Exploring Potential Anti-Chikungunya Activity of Selected Flavonoids. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 24027, 2016.

SHRINET, J.; SRIVASTAVA, P.; SUNIL, S. Transcriptome analysis of *Aedes aegypti* in response to mono-infections and co-infections of dengue virus-2 and chikungunya virus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, p. 1–7, 2017.

SILVA, M. M. et al. Interaction between bioactive compound 11a-N-tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223) and Calf thymus DNA : Spectroscopic approach, electrophoresis and theoretical studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 223–233, 2017.

SILVA-JÚNIOR, E. et al. Dynamic Simulation, Docking and DFT Studies Applied to a Set of Anti-Acetylcholinesterase Inhibitors in the enzyme  $\beta$ -Secretase (BACE-1): An Important Therapeutic Target in Alzheimer`s Disease. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 13, n. 3, p. 1–9, 2017a.

SILVA-JÚNIOR, E.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.; AQUINO, T. Quantum Mechanical (QM) Calculations Applied to ADMET Drug Prediction: A Review. **Current Drug Metabolism**, v. 18, p. 1–16, 2017.

SILVA-JÚNIOR, E. F. et al. Design , synthesis , molecular docking and biological evaluation of thiophen-2-iminothiazolidine derivatives for use against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 4228–4240, 2016.

SILVA-JÚNIOR, E. F. et al. The Medicinal Chemistry of Chikungunya Virus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 16, p. 4219–4244, 2017b.

SILVA-JÚNIOR, E. F.; AQUINO, T. M. DE; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. DE. 3D-QSAR and Pharmacophore Identification Studies Applied to Pyridazin-3-one Derivatives as Potent PDE4 Inhibitors. **International Journal of Pharma and Drug Development**, v. 1, n. 2, p. 11–16, 2017.

SILVA-JÚNIOR, E. F.; SCHIRMEISTER, T.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. DE. Recent Advances in Inhibitors of Flavivirus NS2B-NS3 Protease from Dengue, Zika, and West Nile Viruses. In: **Vector-Borne Diseases & Treatment**. [s.l: s.n.]. p. 1–25.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7<sup>a</sup>. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons Ltd, 2005.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6<sup>a</sup>. ed. Santa Catarina: UFSC, 2010.

SINGH, H. et al. Chikungunya virus inhibition by peptidomimetic inhibitors targeting virus-specific cysteine protease. **Biochimie**, v. 149, p. 51–61, 2018.

SINGH, K. D. et al. Homology modeling, molecular dynamics, e-pharmacophore mapping and docking study of Chikungunya virus nsP2 protease. **Journal of Molecular Modeling**, v. 18, n. 1, p. 39–51, 2012.

SINGH, S. K.; UNNI, S. K. **Chikungunya virus: Host pathogen interaction** *Reviews in Medical Virology*, 2011.

SMITH, J. M.; JAMI ALAHMADI, Y.; ROWLEY, C. N. Range-separated DFT functionals are necessary to model thio-Michael additions. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 11, p. 4860–4865, 2013.

SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's advanced organic chemistry**. 6. ed. [s.l.] Wiley, 2007. v. 6

SOILLEUX, E. J. et al. Expression of human immunodeficiency virus (HIV)-binding lectin DC-SIGNR: Consequences for HIV infection and immunity. **Human Pathology**, v. 33, n. 6, p. 652–659, 2002.

SOLOMON, T.; MALLEWA, M. **Dengue and other emerging flaviviruses** *Journal of Infection*, 2001.

SOURISSEAU, M. et al. Characterization of reemerging chikungunya virus. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 0804–0817, 2007.

SRIVARANGKUL, P. et al. A novel flavanone derivative inhibits dengue virus fusion and infectivity. **Antiviral Research**, v. 151, n. June 2017, p. 27–38, 2018.

ST JOHN, A. L. et al. Contributions of mast cells and vasoactive products, leukotrienes and chymase, to dengue virus-induced vascular leakage. **eLife**, v. 2013, n. 2, 2013.



STEUER, C. et al. Optimization of Assay Conditions for Dengue Virus Protease: Effect of Various Polyols and Nonionic Detergents. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 14, n. 9, p. 1102–1108, 2009.

STRAUSS, E. G. et al. Identification of the active site residues in the nsP2 proteinase of Sindbis virus. **Virology**, v. 191, n. 2, p. 932–940, 1992.

SUZUKI, A.; HARA, S.; HUANG, X. Boron Tribromide. In: **Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis**. 1. ed. New York: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.

SWARBRICK, C. M. D. et al. NS3 helicase from dengue virus specifically recognizes viral RNA sequence to ensure optimal replication. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 22, p. 12904–12920, 2017.

TAKAGI, Y. et al. Discovery of novel cyclic peptide inhibitors of dengue virus NS2B-NS3 protease with antiviral activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 15, p. 3586–3590, 2017.

TARDUGNO, R. et al. Design, synthesis and evaluation against Chikungunya virus of novel small-molecule antiviral agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 869–874, 2018.

TECHER, S. et al. Tonantzitlolones from *Stillingia lineata* ssp. *lineata* as potential inhibitors of chikungunya virus. **Phytochemistry Letters**, v. 12, p. 313–319, 2015.

THANAPATI, S. et al. Impaired NK cell functionality and increased TNF- $\alpha$  production as biomarkers of chronic chikungunya arthritis and rheumatoid arthritis. **Human Immunology**, v. 78, n. 4, p. 370–374, 2017.

THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Research**, v. 99, n. 3, p. 345–370, 2013.

THOMAS, G. **Fundamentals of Medicinal Chemistry**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2003.

THOMPSON, M. **ArgusLab** Washington Planaria Software LLC, , 2004. Disponível em: <<http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html>>

TIMIRI, A. K.; SINHA, B. N.; JAYAPRAKASH, V. **Progress and prospects on DENV protease inhibitors** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2016.

TOMLINSON, S. M.; WATOWICH, S. J. Substrate inhibition kinetic model for West Nile virus NS2B-NS3 protease. *Biochemistry*, v. 47, n. 45, p. 11763–11770, 2008.

TRAPANI, G. et al. Synthesis, in vitro and in vivo cytotoxicity, and prediction of the intestinal absorption of substituted 2-ethoxycarbonyl-imidazo[2,1-b]benzothiazoles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 14, n. 3, p. 209–216, 2001.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDockVina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathogens*, v. 3, n. 12, p. 1895–1906, 2007.

TSETSARKIN, K. A. et al. Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaptation of Chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *Ae. Aegypti* mosquitoes. *PLoS ONE*, v. 4, n. 8, 2009.

TURK, D. et al. **Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases** *Biological Chemistry*, 1998.

VANEY, M.-C.; DUQUERROY, S.; REY, F. A. Alphavirus structure : activation for entry at the target cell surface. *Current Opinion in Virology*, v. 3, n. 2, p. 151–158, 2013.

VASILAKIS, N. et al. Evolutionary Processes among Sylvatic Dengue Type 2 Viruses. *Journal of Virology*, v. 81, n. 17, p. 9591–9595, 2007.

VILLAMIL-GÓMEZ, W. E.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Reply: Dengue RT-PCR-positive, Chikungunya IgM-positive and Zika RT-PCR-positive co-infection in a patient from Colombia. *Journal of Infection and Public Health*, v. 10, n. 1, p. 133–134, 2016.

VISWANATHAN, U. et al. Identification of a Novel Inhibitor of Dengue Virus Protease through Use of a Virtual Screening Drug Discovery Web Portal. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 54, n. 10, p. 2816–2825, 2014.

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. **Organic Chemistry: Structure and Function**. 6. ed. New York: Freeman and Company, 2011.

WADA, Y. et al. Discovery of a novel antiviral agent targeting the nonstructural protein 4 (nsP4) of chikungunya virus. **Virology**, v. 505, n. November 2016, p. 102–112, 2017.

WANG, G.; FU, Z.; HUANG, W. Access to Amide from Aldimine via Aerobic Oxidative Carbene Catalysis and LiCl as Cooperative Lewis Acid. **Organic Letters**, v. 19, n. 13, p. 3362–3365, 2017.

WANG, Y.; LIU, X. Stability and Hopf bifurcation of a within-host chikungunya virus infection model with two delays. **Mathematics and Computers in Simulation**, p. 1–18, 2017.

WARREN, G. L. et al. A critical assessment of docking programs and scoring functions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 20, p. 5912–5931, 2006.

WAVEFUNCTION, I. **Spartan'14** Irvine Wavefunction, Inc., 2014. Disponível em: <<http://ww2.wavefun.com/>>

WENG, Z. et al. Identification of fused bicyclic derivatives of pyrrolidine and imidazolidinone as dengue virus-2 NS2B-NS3 protease inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 751–759, 2017.

WHO. **Relevé épidémiologique hebdomadaire** Weekly epidemiological record. Geneva: [s.n.].

WHO. **Chikungunya - Fact sheets**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>>. Acesso em: 19 out. 2018.

WHO. **Zika Virus: Fact sheet**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>>. Acesso em: 30 set. 2018.

WHO. **Zoonoses**. Disponível em: <<https://www.who.int/zoonoses/en/>>. Acesso em: 6 jan. 2019.

WU, H. et al. Novel dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1100–1109, 2015.

XU, H. et al. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2872–2878, 2006.

YAKOUB, K. et al. Structure-Function Evaluation of Imidazopyridine Derivatives Selective for  $\delta$ -Subunit-Containing  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 5, p. 1951–1968, 2018.

YANG, C. C. et al. Novel dengue virus-specific NS2B/NS3 protease inhibitor, BP2109, discovered by a high-throughput screening assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 229–238, 2011.

YANG, C. C. et al. A novel dengue virus inhibitor, BP13944, discovered by high-Throughput screening with dengue virus replicon cells selects for resistance in the viral NS2B/NS3 protease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 110–119, 2014.

YILDIZ, M. et al. Allosteric inhibition of the NS2B-NS3 protease from dengue virus. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 12, p. 2744–2752, 2013.

YIN, Z. et al. Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 1: Warhead. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 1, p. 36–39, 2006.

YOUNGER, D. S. Epidemiology of Zika Virus. **Neurologic Clinics**, v. 34, n. 4, p. 1049–1056, 2016.

YUAN, L. et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 933–936, 2017.

YURIEV, E.; RAMSLAND, P. A. Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, n. 5, p. 215–239, 2013.

ZHANG, W. T. et al. Design, synthesis, and cytoprotective effect of 2-aminothiazole analogues as potent poly(ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 718–725, 2009.

ZHANG, X.; WONG, S. E.; LIGHTSTONE, F. C. Toward fully automated high performance computing drug discovery: A massively parallel virtual screening pipeline for docking and molecular mechanics/generalized born surface area rescoring to improve enrichment. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 1, p. 324–337, 2014.

ZHOU, G. C. et al. Discovery and SAR studies of methionine-proline anilides as dengue virus NS2B-NS3 protease inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 24, p. 6549–6554, 2013.

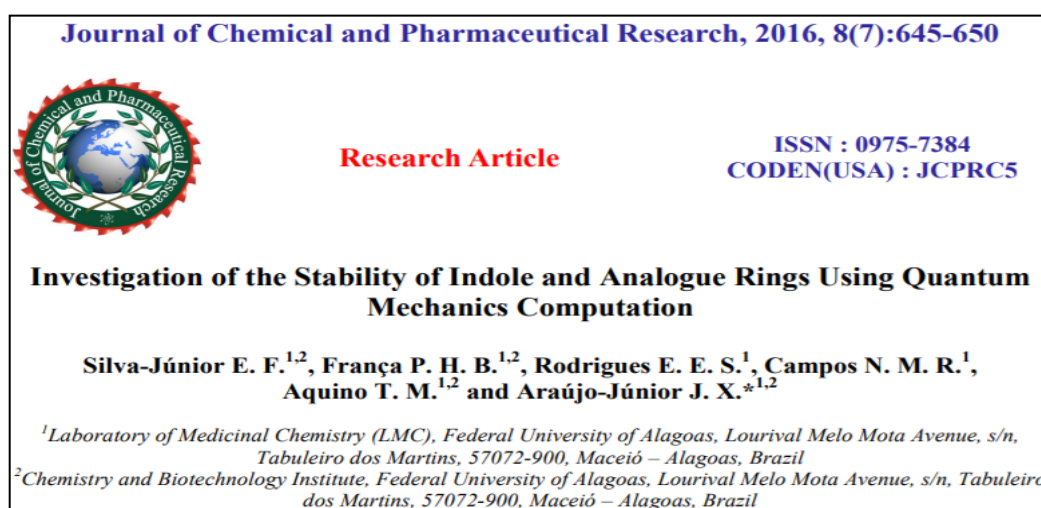
ZHOU, Y. et al. Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. **Journal of Virology**, v. 81, n. 8, p. 3891–3903, 2007.

ZYBERT, I. A. et al. Functional importance of dengue virus maturation: Infectious properties of immature virions. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 12, p. 3047–3051, 2008.

## APÊNDICE A – Mini-projetos: Mecânica quântica (QM) aplicada ao estudo de estruturas heterocíclicas com potenciais atividades biológicas

Baseando-se em métodos computacionais, um estudo computacional de compostos promissores foi realizado. Neste, características químicas foram exploradas e comparadas com dados experimentais. Os resultados foram escritos e publicados no *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, ambos em 2016 (Figuras 1A e 2A, respectivamente).

**Figura 1A - Mecânica quântica aplicada ao estudo de indóis e análogos.**



FONTE: Autor, 2019.

**Figura 2A - Mecânica quântica versus cristalografia de raio-X.**



FONTE: Autor, 2019.

**APÊNDICE B – Mini-projeto: Aplicação da Relação Estrutura-Atividade Quantitativa (QSAR) ao estudo de piridazinonas com atividade anti-PDE4.**

As técnicas de 3D-QSAR e modelagem farmacofórica foram aplicadas ao um conjunto de compostos previamente sintetizado (DE ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2015). Os resultados obtidos foram publicados no *International Journal of Pharma and Drug Development*, em 2017 (Figura 1B).

**Figura 1B - 3D-QSAR e modelagem farmacofórica aplicada a inibidores da PDE4.**



FONTE: Autor, 2019.

## APÊNDICE C – Mini-projeto: Aplicação de *docking* molecular no estudo de inibidores da $\beta$ -Secretase na doença de Alzheimer

Diversos inibidores da enzima  $\beta$ -secretase foram previamente selecionados e extraídos de trabalhos previamente publicados. A partir destes, um protocolo virtual foi criado e desenvolvido para a identificação de compostos ativos e não ativo. O objetivo principal deste era fornecer um método de *screening* virtual rápido e eficaz. Tal protocolo foi publicado no *Current Computer-Aided Drug Design*, em 2017 (Figura 1C).

**Figura 1C - *Docking* molecular aplicado ao estudo de inibidores da  $\beta$ -secretase.**

<i>Send Orders for Reprints to <a href="mailto:reprints@benthamscience.ae">reprints@benthamscience.ae</a></i>
<i>Current Computer-Aided Drug Design, 2017, 13, 000-000</i>
1
<b>RESEARCH ARTICLE</b>
<b>Dynamic Simulation, Docking and DFT Studies Applied to a Set of Anti-Acetylcholinesterase Inhibitors in the enzyme <math>\beta</math>-Secretase (BACE-1): An Important Therapeutic Target in Alzheimer's Disease</b>
Edeildo F. Silva-Júnior <sup>1</sup> , Paulo H. Barcellos França <sup>2</sup> , Lucindo J. Quintans-Júnior <sup>3</sup> , Francisco J. B. Mendonça-Junior <sup>4</sup> , Luciana Scotti <sup>5</sup> , Marcus T. Scotti <sup>5</sup> , Thiago M. de Aquino <sup>1</sup> and João X. de Araújo-Júnior <sup>1,*</sup>
<sup>1</sup> Laboratory of Medicinal Chemistry, Federal University of Alagoas, Nursing and Pharmacy School, Maceió-AL, Brazil; <sup>2</sup> Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceio-AL, Brazil; <sup>3</sup> University of Sergipe, Post-graduate Program in Health Science, Aracaju-SE, Brazil; <sup>4</sup> State University of Paraíba, Laboratory of Synthesis and Drug Delivery, João Pessoa-PB, Brazil; <sup>5</sup> Federal University of Paraíba, João Pessoa-PB, Brazil

FONTE: Autor, 2019.



## APÊNDICE D – Revisão: Aplicação de QM no estudo de metabolismo de fármacos

O Editor-Chefe, Dr. Michael Sinz, do *Current Drug Metablism*, da editora *BenthamScience*<sup>®</sup>, ficou sabendo das atividades científicas envolvendo o correspondente autor desta tese e diversos métodos computacionais aplicados ao estudo de compostos ativos, então convidou-o para contribuir em um volume especial da revista. Dessa forma, o texto intitulado: *Quantum Mechanical (QM) Calculations Applied to ADMET Drug Prediction: A Review*, foi publicado no volume 18 de 2017 (Figura 1D).

**Figura 1D - Cálculos de QM aplicados ao metabolismo de fármacos e/ou compostos ativos.**

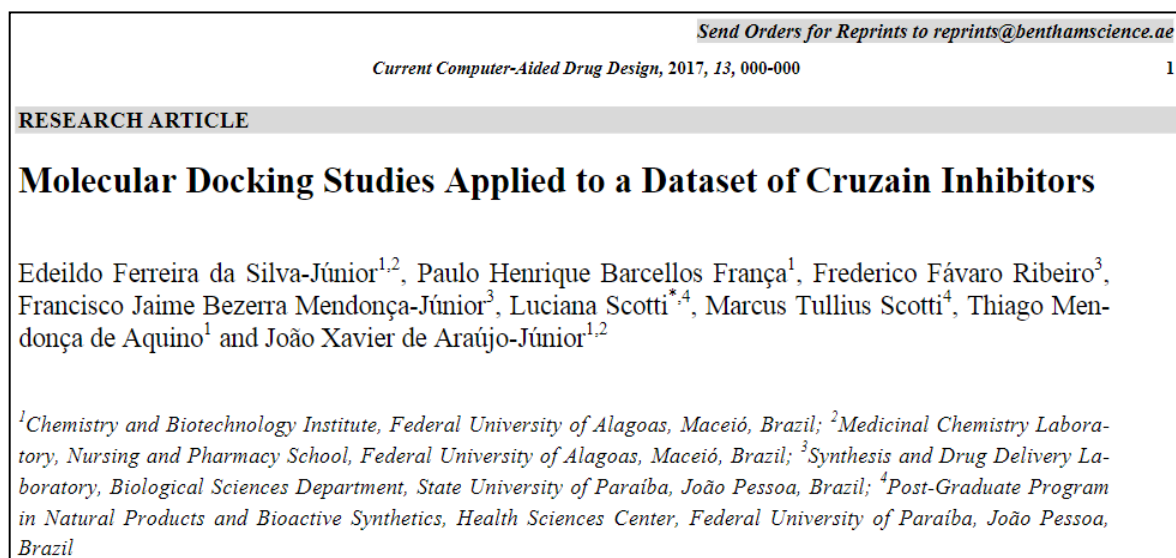
<i>Send Orders for Reprints to <a href="mailto:reprints@benthamscience.ae">reprints@benthamscience.ae</a></i>	
<i>Current Drug Metabolism</i> , 2017, 18, 000-000	
1	
<b>REVIEW ARTICLE</b>	
<b>Quantum Mechanical (QM) Calculations Applied to ADMET Drug Prediction: A Review</b>	
E.F. Silva-Júnior <sup>a,b</sup> , T.M. Aquino <sup>b</sup> and J.X. Araújo-Júnior <sup>a,b,*</sup>	
<sup>a</sup> Laboratory of Medicinal Chemistry, Nursing and Pharmacy School, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil; <sup>b</sup> Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil	
<b>ARTICLE HISTORY</b> Received: October 06, 2016 Revised: November 07, 2016 Accepted: January 17, 2017  DOI: 10.2174/1389200218666170316094514	<b>Abstract:</b> The discovery of new drugs is generally considered a long and expensive process, which often leads to molecules with low efficacy and high toxicity, which in many cases can be related to metabolism. In an attempt to reduce these failures and the production costs of a new drug, <i>in silico</i> studies have been used to obtain important information about the behavior of these compounds in the metabolism phases: absorption, distribution, metabolism (or biotransformation) and elimination (or excretion). Quantum Mechanical (QM) calculations are based on Schrödinger's equation that can be used to develop models and theoretical parameters able to explain properties observed experimentally. In recent years, there has been an increase in the development of studies involving the application of QM methods to describe properties related to ADMET profile of new compounds. Amongst these, the most commonly used methods are <i>ab initio</i> (Hartree-Fock), Semiempirical (AM1 and PM3) and Density Functional Theory (DFT). The application of these methods allows the modeling of the predicted profile of absorption and elimination of chalcone-chloroquinoline hybrids; the ability of drugs to cross the blood-brain barrier (distribution); proposal of the route for oxidation of several compounds, via CYP450; and to predict the toxicity of pyrethroid analogs. Finally, QM methods can be considered as a valuable tool in the prediction of metabolism when applied to drug discovery.
<b>Keywords:</b> Hartree-Fock, <i>ab initio</i> , DFT, semiempirical, metabolism, ADMET.	

FONTE: Autor, 2019.

**APÊNDICE E – Projeto: Síntese, atividade biológica e modelagem molecular de novos inibidores da enzimas cruzaina e rodesaina dos *Trypanosoma cruzi* e *T. rhodesiense*, respectivamente.**

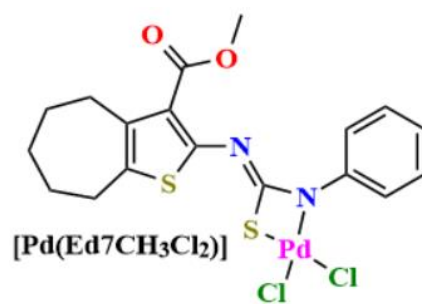
O correspondente autor desta tese iniciou seu respectivo período de doutoramento em um projeto direcionado à obtenção de compostos ativos frente à enzima cruzaina do *T. cruzi*. Assim, um protocolo virtual foi criado e desenvolvido para auxiliar na seleção de compostos promissores, o qual foi publicado (Figura 1E) no *Current Computer-Aided Drug Design*, no ano de 2017. Baseando-se nas atividades científicas do autor desta tese, o Prof. Goutam Brahmachari (Índia), no papel de Editor da Elsevier®, convidou-o para contribuir em livro especial da editora. Tal convite rendeu o capítulo intitulado: *Anti-Trypanosomatid Heterocyclic Compounds of Natural Origin and Inspired by Nature* (Oficialmente lançado em 1º de Abril, 2019). Por fim, esse projeto continuou a ser desenvolvido no AK-Schirmeister (Mainz, Alemanha), onde um derivado tioureico complexado ao Paládio(II) (Figura 2E) apresentou significativa atividade em ensaios biológicos frente à rodesaina do *T. rhodesiense*, à concentração de 10 µM (resultados não publicados).

**Figura 1E - Triagem virtual de compostos ativos frente à cruzaina do *Trypanosoma cruzi*.**



FONTE: Autor, 2019.

Figura 2E - Composto *hit* frente à rodesaína do *Trypanosoma rhodesiense*.



% inibição = 97,5% (rodesaína)

FONTE: Autor, 2019.