



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS A. C. SIMÕES
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
QUÍMICA TECNOLÓGICA E INDUSTRIAL



WADJA FEITOSA DOS SANTOS SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS ATIVOS CONTRA OS VÍRUS DENGUE E
ZIKA: UM COMBATE ÀS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS**

Maceió, AL
2024

WADJA FEITOSA DOS SANTOS SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS ATIVOS CONTRA OS VÍRUS DENGUE E
ZIKA: UM COMBATE ÀS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao Curso de Química Tecnológica
e Industrial da Universidade Federal de
Alagoas, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharelado em Química Tecnológica
e Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Edeildo Ferreira da
Silva-Júnior

Maceió, AL
2024

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central Divisão de
Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586d Silva, Wadja Feitosa dos Santos.

Desenvolvimento de compostos ativos contra os vírus dengue e Zika : um combate às doenças negligenciadas / Wadja Feitosa dos Santos Silva. – Maceió, 2024.

56 f. : il.

Orientador: Edeildo Ferreira da Silva-Júnior.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química Tecnológica e Industrial) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 51-

1. NS2B/NS3 (Peptídeos hidrolases) - Síntese. 2. Antivirais. 3. Zika vírus. I. Título.

CDU: 661.163

*Dedico este trabalho primeiramente à Deus e à
minha mãe, por sempre apoiar minhas escolhas
e incentivar o estudo e aperfeiçoamento da
minha carreira profissional.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder a vida, proporcionar força para superar todos os obstáculos que surgiram no decorrer do curso de graduação e me auxiliar na realização do cumprimento deste sonho.

Aos meus pais, Geovânia dos Santos Flores e Derli da Silva Flores, que foram fatores essenciais em todos os momentos da minha vida e me incentivaram nos momentos de grande sobrecarga. Em especial, à minha mãe, pelo apoio incondicional em todas as etapas decisivas, e também, por me incentivar regularmente a não desistir dos meus objetivos e pelo grandioso exemplo de superação.

Ao meu namorado, Marcos André Oliveira dos Santos, e toda a sua família, por serem auxílio em momentos decisivos e companheiros fiéis. Em especial, ao meu namorado, por ter sido um grande presente de Deus em minha vida e sempre me apoiar em todos os momentos de grande carga psicológica e física, servindo como um alívio e parceiro presente.

Aos meus colegas e amigos do grupo GPQBioMol, que me ajudaram desde o primeiro momento e me auxiliaram em dúvidas sobre os projetos de pesquisa, além de serem grandes parceiros em todos os momentos de minha jornada acadêmica.

E, por fim, um agradecimento especial ao meu orientador Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva-Júnior, pelos ensinamentos que impulsionaram o meu desenvolvimento no decorrer da formação profissional e instrução na pesquisa e inovação. Sem ele, não poderia desenvolver o presente trabalho que me levou a querer continuar na área da pesquisa e me inspirou para o desenvolvimento de compostos antivirais voltados a doenças negligenciadas. Também, o agradeço por ser um grande amigo e me ajudar em todos os momentos. Certamente, agradeço a todos os meus professores que me instruíram ao longo do curso de graduação, pois os professores são nossa base e nos impulsionam ao crescimento contínuo.

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas.”

(Marie Curie)

RESUMO

A febre do Zika, uma doença tropical negligenciada (DTN), causada pelo vírus Zika (ZIKV), cujo é um Flavivírus pertencente à família *Flaviviridae*, que é principalmente transmitido pela picada de mosquitos infectados das espécies *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*, durante o repasto sanguíneo. No Brasil, um total de 1,3 milhões de indivíduos foram infectados em 2016 e no Estado de Alagoas, 393 casos de Zika foram documentados em 2019. Dentre estes, 32 casos foram reportados em pacientes gestantes. Nesses casos, o ZIKV pode levar a um aumento da taxa de microcefalia em recém-nascidos. Nos primeiros meses de 2024, foram documentados cerca de 2 milhões de casos de dengue, incluindo 16.494 casos de dengue grave e mais de 600 óbitos confirmados. Considerando tais informações, se torna extremamente importante pesquisar novos compostos químicos com potencial atividade antiviral contra esses vírus. Nos ciclos PIBIC 2020-2022, nosso grupo de pesquisa foi capaz de identificar quatro novos inibidores da NS2B/NS3 (K_i entre 7 e 15 μM), pertencentes à classe das cianoacrilamidas, sendo os primeiros inibidores dessa classe capazes de atuar de modo competitivo sobre tal alvo. Uma vez que todos os derivados são equipotentes e apresentam os mesmos tipos de interações com a NS2B/NS3 do ZIKV, o derivado **LQM471** foi selecionado como protótipo para tais modificações, onde duas regiões da molécula foram exploradas. Desse modo, duas novas séries de compostos sintetizadas foram devidamente caracterizadas por técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

Palavras-chave: NS2B/NS3, Síntese, Desenvolvimento de antivirais, vírus Zika.

ABSTRACT

Zika fever, a neglected tropical disease (NTD), caused by the Zika virus (ZIKV), which is a Flavivirus belonging to the *Flaviviridae* family, is mainly transmitted by the bite of infected mosquitoes of the *Aedes aegypti* and *Ae. species albopictus*, during the blood meal. In Brazil, a total of 1.3 million individuals were infected in 2016 and in the State of Alagoas, 393 cases of Zika were documented in 2019. Of these, 32 cases were reported in pregnant patients. In these cases, ZIKV can lead to an increased rate of microcephaly in newborns. In the first months of 2024, around 2 million cases of dengue were documented, including 16.494 cases of severe dengue and more than 600 confirmed deaths (COE). Considering such information, it becomes extremely important to research new chemical compounds with potential antiviral activity against these viruses. In the PIBIC cycle (2020-2022), our research group was able to identify four new NS2B/NS3 inhibitors ($K_i = 7\text{-}15\ \mu\text{M}$), belonging to the cyanoacrylamide class, being the first inhibitors of this class capable of acting competitively on such a target. As all derivatives are equipotent and present the same types of interactions with ZIKV NS2B/NS3, the **LQM471** derivative was selected as a prototype for such modifications, where two regions of the molecule were explored. Thus, two new series of synthesized compounds were properly characterized by spectroscopic and spectrometric techniques.

Keywords: NS2B/NS3, Synthesis, Design of antivirals, Zika virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Morfologia dos flavivírus DENV e ZIKV.....	19
Figura 2	–	Visão geral do ciclo de infecção do flavivírus em nível celular.....	20
Figura 3	–	Rota sintética para obtenção de derivados 2-ciano-3-propanamidas <i>N</i> -substituídas.....	25
Figura 4	–	Visão geral do planejamento dos compostos direcionados a protease NS2B/NS3 do DENV.....	33
Figura 5	–	Rotas sintéticas utilizadas neste estudo para obter os compostos alvo.....	34
Figura 6	–	Curvas de determinação da concentração inibitória média (IC ₅₀) para os compostos LQM467 , 471 , 472 , e 474 frente a protease NS2B/NS3 dos vírus DENV-2 e ZIKV.....	36
Figura 7	–	Trajetórias para A) RMSD, B) RMSF, e C) ligações de H obtidas por simulações de dinâmica molecular para 200 ns a 300K de protease NS2/NS3 livre e complexada com os inibidores LQM467 , 471 , 472 , e 474	39
Figura 8	–	O conjunto de inibidores colocados no sítio catalítico da protease NS2B/NS3 (A) e suas interações com resíduos de aminoácidos (B-E)	41
Figure 9	–	Avaliação in vitro da atividade antiviral de LQM467 , 471 e 472 em células Vero E6 infectadas com ZIKV.....	42
Figura 10	–	Resultado do perfil de toxicidade em explantes de placenta humana para o LQM471	43
Figura 11	–	Regiões de modificações estruturais planejadas para o LQM471	44
Figura 12	–	Rota de síntese otimizada para as modificações estruturais previstas.....	45
Figura 13	–	Estruturas das moléculas finais obtidas através das modificações previstas para o composto LQM471	46
Figura 14	–	Ensaio das propriedades físico-químicas e comportamento do WS73 no organismo humano.....	48
Figura 15	–	Ensaio das propriedades físico-químicas e comportamento do WS74 no organismo humano.....	48
Figura 16	–	Ensaio das propriedades físico-químicas e comportamento do WS75 no organismo humano.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	–	Número de casos graves, óbitos e o coeficiente de incidência de dengue das semanas epidemiológicas de 2023.....	18
Gráfico 2	–	Número de casos graves, óbitos e o coeficiente de incidência de dengue das semanas epidemiológicas de 2024.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Inibição de protease NS2B/NS3 de DENV-2 e ZIKV por α -cianoacrilatos e α -cianoacrilamidas.....	35
Tabela 2	–	Seletividade de inibição de protease de LQM467 , 471 , 472 e 474 em relação a outras proteases de serina e cisteína.....	37
Tabela 3	–	Diferentes termos MM/PBSA para a mudança relativa na entalpia do sítio catalítico NS2B/NS3 em complexo com os inibidores LQM467 , 471 , 472 , e 474 a 300K.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
COE	Centro de Operações de Emergências
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
DC	Dengue Clássica
DENV	Vírus dengue
DNTs	Doenças Tropicais Negligenciadas
ES	Enzima-substrato
ESI	Enzima-substrato-inibidor
ESOL	Log S
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
HPLC-DMD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção de Matriz de Diodos
MM/PBSA	Área Superficial Poisson-Boltzmann
MNTCs	Concentração Máxima Não Tóxica
MTT	-(4,5-Dimetil-2-Tiazolil)-2,5-Difenil-2H-Tetrazólio Brometo
ns	Nanosegundos
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PF	Ponto de Fusão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RTA-FTIR	Espectroscopia de Infravermelho Transformada por Refletância Total Atenuada
SCD	Síndrome do Choque de Dengue
SE	Semana Epidemiológica
ZIKV	Vírus Zika

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
α	Alfa
K	Kelvin
®	Marca registrada
°C	Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	Aspectos Históricos E Epidemiológicos Dos Vírus.....	16
2.1.1	Vírus Zika (ZIKV).....	16
2.1.2	Vírus Dengue (DENV).....	17
2.2	Morfologia Viral.....	19
2.3	Ciclo de Reprodução.....	19
2.4	Desenvolvimento de Compostos Antivirais.....	21
2.5	Inibição e Regulação Enzimática.....	21
2.5.1	Tipos de inibição enzimática.....	21
2.5.1.1	Inibição competitiva.....	22
2.5.1.2	Inibição incompetitiva.....	22
2.5.1.3	Inibição mista ou Não-competitiva.....	22
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Geral.....	23
3.2	Específicos.....	23
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	24
4.1	Reagentes e Solventes.....	24
4.2	Síntese dos Derivados.....	24
4.3	Caracterização Estrutural.....	25
4.3.1	Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C e ¹ H (RMN).....	25
4.3.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção de Matriz de Diodos (HPLC-DMD)	26
4.3.3	Determinação por Ponto de Fusão (PF)	26
4.3.4	Espectroscopia de Infravermelho Transformada por Refletância Total Atenuada (RTA-FTIR)	26
4.3.5	Espectrometria de Massa (CG-MS)	27
4.4	Ensaio de Inibição Enzimática.....	27
4.5	Avaliação Quanto ao Perfil Citotóxico.....	29
4.6	Avaliação Quanto ao Perfil Antiviral.....	30
4.7	Quantificação da Carga Viral por qPCR.....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32

5.1	Planejamento Racional Baseado em Fragmentos.....	32
5.2	Síntese dos Derivados Escolhidos	34
5.3	Ensaio de Inibição Enzimática Frente as Proteases dos Vírus DENV-2 e ZIKV.....	35
5.4	Relação Estrutura-Atividade (REA).....	37
5.5	Seletividade Fora do Alvo.....	37
5.6	Simulações de Dinâmica Molecular.....	38
5.7	Cálculos da Área Superficial de Poisson-Boltzmann (MM/PBSA)	40
5.8	Estudos de Docking Molecular.....	40
5.9	Avaliação da Citotoxicidade <i>in vitro</i> e Atividade Antiviral Contra o ZIKV	41
5.10	Ensaio em Explantes de Placenta Humana	43
5.11	Modificações Estruturais Prevista para o LQM471.....	44
5.12	Estudos das Propriedades Físico-Químicas dos Novos Derivados.....	46
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

As doenças zoonóticas são responsáveis por acometer bilhões de indivíduos, conduzindo a milhões de mortes todos os anos, constituindo um problema de saúde pública mundial (Silva-Júnior, 2019; Who, 2019). De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são denotadas como um grupo diversificado de condições mais comumente presentes em regiões de vulnerabilidade sociais, onde o saneamento básico, a segurança da água e o acesso aos cuidados de saúde são precários. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 1,7 bilhão de pessoas em todo o mundo estejam sob situação de risco, requerendo intervenções anuais planejadas em prol do desenvolvimento de atividades de prevenção e tratamento de pelo menos uma dessas doenças (Ministério da Saúde, 2024). O roteiro atual da OMS para as DNTs reconhece a complexidade inerente ao alcance do controle dessas doenças e enfatiza a necessidade de mudanças estratégicas, focadas em intervenções específicas para um conjunto de ações direcionadas.

Diante desse contexto, a febre do Zika é causada pelo vírus Zika (ZIKV), um flavivírus pertencente à família *Flaviviridae* (Da Silva-Júnior; De Araújo-Júnior, 2019). Embora o vírus ZIKV tenha sido descoberto há mais de 70 anos, a doença atingiu níveis globais na última década. O ZIKV é transmitido principalmente por mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*. Em contraste a outros arbovírus, o ZIKV pode ser transmitido de pessoa para pessoa por meio de fluidos corporais sexuais e não-sexuais. Ainda, a transmissão de mãe para filho é possível tanto no período pré-natal ou perinatal (durante o nascimento), quanto no pós-natal (durante a amamentação) (Casale *et al.*, 2018). No fim de 2016, um total de 1,3 milhões de indivíduos apresentaram sintomas de infecção por ZIKV no país. 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). Atualmente, o vírus Zika permanece sem alternativas terapêuticas para combatê-lo seletivamente.

Atualmente, os vírus DENV e ZIKV permanecem sem alternativas terapêuticas específicas para combatê-lo seletivamente (Mittal *et al.*, 2017), uma vez que os medicamentos utilizados são anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos utilizados no tratamento paliativo para alívio dos sintomas. Dessa forma, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou tais infecções como duas das principais Doenças Tropicais

Negligenciadas (DTN), devido seu impacto em saúde pública e à falta de medicamentos para seu tratamento focal. Assim, torna-se extremamente importante buscar e descobrir novos compostos com potencial atividade contra este vírus. Neste sentido, no ciclo PIBIC (2020-2021), nosso grupo de pesquisa foi capaz de identificar quatro novos inibidores da NS2B/NS3 (K_i entre 7 e 15 μM), pertencentes à classe das cianoacrilamidas, sendo os primeiros inibidores dessa classe capazes de atuar de modo competitivo sobre tal alvo. Todos os resultados foram compilados e submetidos ao New Journal of Chemistry (Qualis A2). Diante dos resultados obtidos, novas modificações estruturais foram planejadas para tais compostos com a finalidade de desenvolver inibidores ainda mais potentes no PIBIC ciclo 2022-2023. Uma vez que todos os inibidores são equipotentes, o composto **LQM471** foi utilizado como protótipo inicial por possuir mais regiões factíveis para realização de modificações estruturais. Dessa forma, três regiões da estrutura do **LQM471** foram selecionadas para tais modificações, sendo: região 1 – anel 3,4-diclorofenil; região 2 – ligação eno; e região 3 – anel da porção tiomorfolina (ver Figura 1). Todos os novos substituintes descritos nesta proposta foram identificados por dinâmica e docking molecular como sendo promissores para esta classe de compostos frente à NS2B/NS3. Para o presente trabalho, os novos compostos planejados foram sintetizados e caracterizados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas. Então, realizamos ensaios enzimáticos para se obter os valores de inibição dos mesmos. Por fim, técnicas *in silico* foram aplicadas para se entender o modo de ligação dos melhores compostos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos Históricos e Epidemiológicos dos Vírus

2.1.1 Vírus Zika (ZIKV)

O denominado Zika ou ZIKV é um vírus originado do continente africano, o qual possui como vetor principal de transmissão mosquitos por mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*. O vírus chegou ao Brasil entre os anos 2013 e 2014, resultando em um surto centralizado na região nordeste brasileira. Além de ser principalmente associado como causa da Febre Zika, o ZIKV também foi declarado como causador de diversos casos de microcefalia em recém-nascidos e com a síndrome de Guillain-Barré (Da Silva-Júnior; De Araújo-Júnior, 2019; Oliveira, 2017).

A partir do estudo de Haddow et al. (2012), afirma-se que o primeiro isolamento do ZIKV é datado em 1947, identificado em sangue de macaco da espécie rhesus e também, em mosquitos da espécie *Ae. africanus* (*Stegomyia*), ambos originários da floresta Zika, em Uganda, país pertencente à África Oriental. Na década de 1950, foram detectados três casos de infecções por Zika durante uma epidemia na Nigéria. Nos anos subsequentes, o vírus permaneceu em disseminação para outras regiões de países asiáticos, africanos e Ilhas do Pacífico (Faye *et al.*, 2014). Segundo Duffy et al. (2009), o vírus foi relatado fora da Ásia e África pela primeira em 2007, onde causou uma epidemia na Ilha de Yap, localizada na Micronésia. No Brasil, os casos da doença foram reportados no final de 2014, intensificando-se no início de 2015 com casos relatados no Rio Grande do Norte. Nesse mesmo período, foram detectados os primeiros casos de Zika em amostras de soro de pacientes na Bahia (Cardoso *et al.*, 2015; Zanluca *et al.*, 2015).

Segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2015), foram notificados casos e início de medidas para monitoramentos sobre os casos incidentes de infecção por Zika na região nordeste do país no começo de 2015. Nesse momento, todos os casos relatados em alguns estados da região apresentavam evolução benigna com regressão espontânea, mesmo sem intervenção clínica. Ainda que a primeira evidência em infecção humana tenha sido relatada em 1950, a comunidade internacional reconheceu o potencial epidêmico do ZIKV em 2005, em especial no período pós-surto na Oceania em 2007 (Oliveira, 2017).

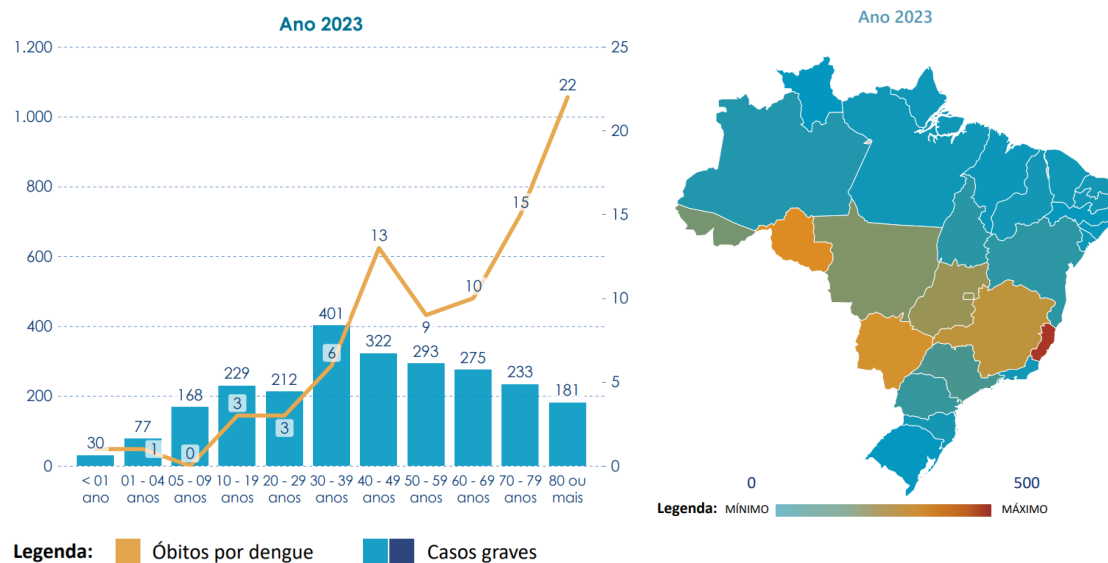
2.1.2 Vírus Dengue (DENV)

A Dengue é uma doença febril aguda, transmitida pela picada de mosquitos *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*, cujo agente etiológico é um vírus do gênero *Flavivírus* (Filha, *et al.*, 2019). Tal doença é de evolução benigna, apresentando três formas clínicas, denominadas Dengue Clássica (DC), Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome do Choque de Dengue (SCD). A incidência mundial de dengue ocorreu entre os anos de 1779 e 1780, na África, Ásia e Américas. Após as primeiras notificações, as ocorrências próximas de epidemias tiveram início no sudeste Asiático nas décadas de 1940 e 1950, durante e após a Segunda Guerra Mundial, onde se expandiram mundialmente nas décadas posteriores.

Inicialmente, a primeira epidemia de Febre Hemorrágica da Dengue ocorreu nos anos 1953 e 1954 em Manila, nas Filipinas. Nos próximos 20 anos seguintes a doença se espalhou de forma epidêmica no Sudeste Asiático, tornando-se uma das principais causas de hospitalização e morte de crianças na região (World Health Organization, 1986). Segundo os autores Blackburn e Rawal (1987), o primeiro surto de Dengue na África do Sul data em 1926 a 1927. Já na África Oriental os sorotipos do DENV têm causado surtos na região. Em agosto de 2010, membros do Centro do Governo Holandês para o Monitoramento de Vetores encontraram uma pequena colônia dos mosquitos em locais próximos a um depósito de pneus usados, e no início de setembro do mesmo ano, foi registrado o primeiro caso de Dengue na Europa.

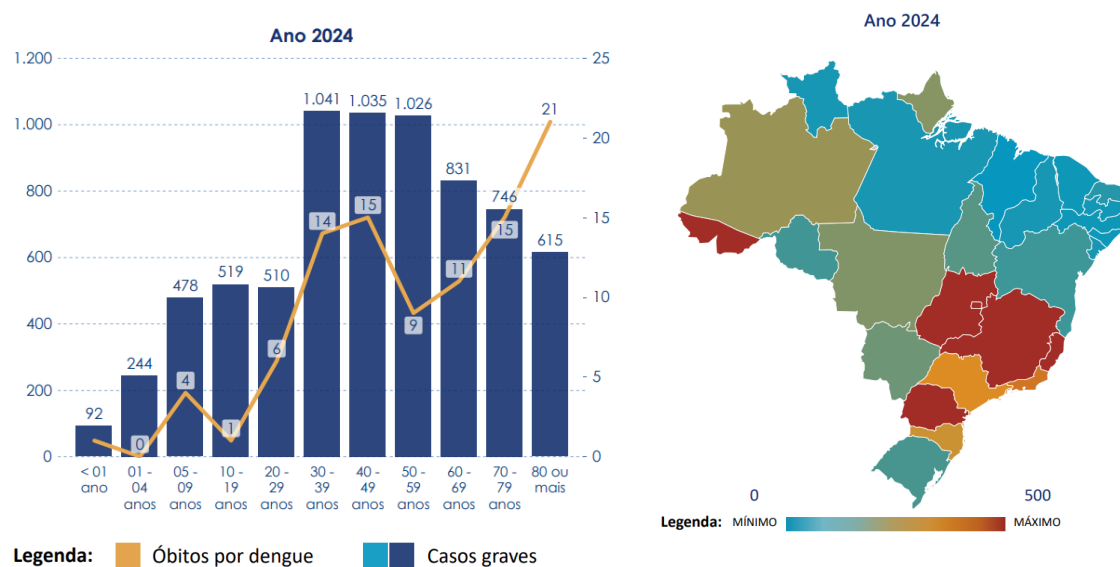
Nas Américas, a história do Dengue é marcada pela reemergência em situação endêmica nos anos 60 e nos últimos 20 anos. No Brasil, existem indícios de prováveis epidemias de dengue no início do século 20, na região Sudeste do país. Contudo, a primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente ocorreu no ano 1982, em Roraima. Nos anos 2000 foram registrados cerca de 230.910 casos da doença em todo o Brasil, onde 51 destes foram diagnósticos de Febre Hemorrágica do Dengue (Ministério da Saúde, 1996). Atualmente, os casos continuam apresentando elevada incidência e gravidade das doenças ocasionadas pelos vetores DENV. Em julho de 2024, o Centro de Operações de Emergências (COE) disponibilizou dados referentes ao período entre as Semanas Epidemiológicas (SE). Nos gráficos 1 e 2, listados abaixo, os gráficos apresentam os números de casos graves e com sinais de alarme de dengue, além dos óbitos confirmados por faixa etária, considerando as cinco primeiras semanas de 2023 e 2024 (COE, 2024).

Gráfico 1. Número de casos graves, óbitos e o coeficiente de incidência de dengue das semanas epidemiológicas de 2023.



Fonte: SINAN, 2024.

Gráfico 2. Número de casos graves, óbitos e o coeficiente de incidência de dengue das semanas epidemiológicas de 2024.

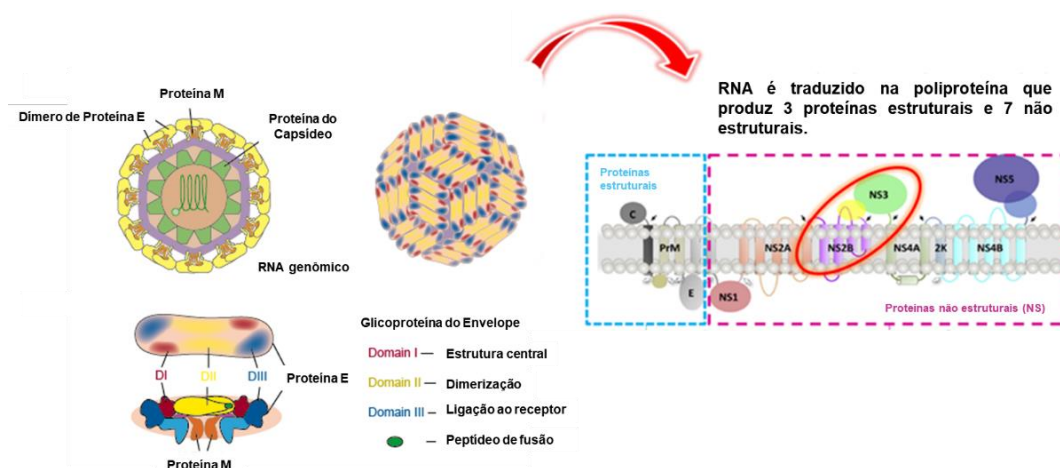


Fonte: SINAN, 2024.

2.2. Morfologia Viral

Estruturalmente, o vírus da Dengue (DENV) é composto por um genoma RNA positivo de fita simples, contendo três proteínas estruturais: proteína C (capsídeo), proteína prM (membrana) e a glicoproteína E (envelope); e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5. Além disso, o vírus DENV apresenta partícula viral esférica, envelopada, com diâmetro de 50 nm. A superfície do vírus madura é lisa e acompanha as proteínas do envelope alinhadas em pares paralelos à superfície. A glicoproteína E é responsável por modular a adesão celular e fusão do vírus na célula hospedeira, além de ser o principal alvo de anticorpos protetores. Ela é dividida em três domínios estruturais e funcionais: domínio central; domínio de dimerização que apresenta um peptídeo de fusão, e o domínio de ligação ao receptor (Figura 1) (Melino, 2007; Whitehead, 2007).

Figura 1. Morfologia dos flavivírus DENV e ZIKV.



Fonte: ADAPTADO de Silva-Júnior, 2019; IDWeek, 2024.

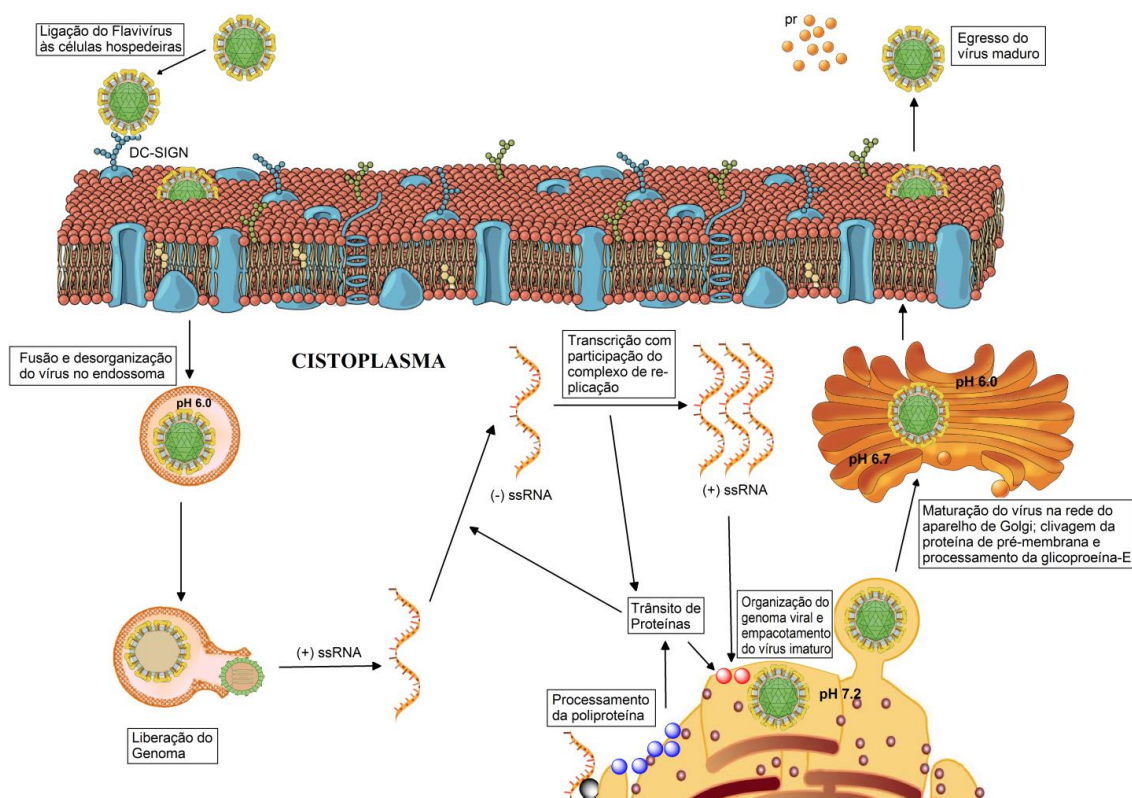
2.3. Ciclo de reprodução

A ligação da proteína E, responsável pela entrada viral, com o receptor da célula alvo do hospedeiro consiste na primeira etapa do processo de infecção. Com isso, o baixo pH do endossomo provoca mudanças conformacionais na proteína do envelope, passando de dímero para um trímero, permitindo que o peptídeo de fusão seja exposto. O peptídeo possui função principal na fusão do envelope viral com a membrana do endossomo, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma. Em decorrência disso, a proteína C se dissocia

do RNA viral, o qual é traduzido em uma poliproteína em ribossomos associados às membranas do RE. Essa poliproteína é processada por proteases celulares e virais, produzindo proteínas estruturais e não estruturais (Figura 1) (Rodrigues, 2010).

Diante da completa tradução do mRNA, a replicação viral é iniciada a partir da síntese de fitas complementares negativas, usadas como moldes para a produção de fitas positivas adicionais. Tais fitas positivas são de elevada importância para a reprodução do vírus, pois podem servir de meio para o desenvolvimento das proteínas estruturais e não estruturais, além da síntese de fitas negativas ou encapsidadas, levando à formação do vírus. Em adição, as partículas virais imaturas são formadas no lúmen do RE, onde ganham um envelope que passa por um processo de morfogênese no complexo de Golgi e, posteriormente, liberadas por exocitose (Figura 2) (Lindenbach et al., 2007; Rodrigues, 2010).

Figura 2. Visão geral do ciclo de infecção do flavivírus em nível celular.



Fonte: Silva-Júnior, 2019.

2.4. Desenvolvimento de Compostos Antivirais

As doenças virais epidêmicas são responsáveis por muitas mortes no passado e nos dias atuais, com a falta de tratamento específico, continuam causando mortalidade. Os vírus pertencem a uma classe de patógenos intracelulares obrigatórios, dependendo da célula hospedeira para a sua replicação. Diante disso, para um dado vírus se replicar é necessária a entrada viral pela transposição de uma barreira denominada como membrana celular. Após a entrada do vírus na célula, o vírus precisa replicar seu ácido nucléico e as proteínas virais são transportadas na célula para locais de montagem para a formação de nova progênie de partículas virais infectantes, as quais são liberadas para fora da célula. Assim como os vírus se replicam em determinada célula hospedeira e são totalmente dependentes destas para a evolução de suas funções, grande parte dos agentes antivirais efetivos devem adentrar na célula e prevenir a replicação viral (Simoni, 2003).

As medidas sanitárias adotadas afetam diretamente o controle das doenças através de vacinas, contudo, quando o organismo apresenta infecção, são necessárias medidas para seu tratamento. Nos últimos anos, devido à falta de métodos eficientes para evitar as doenças transmitidas por vírus, os avanços na química sintética estão vinculados ao desenvolvimento de compostos que apresentam atividade antiviral. Para que um agente antiviral seja considerado ideal, deve apresentar um mínimo de toxicidade para a célula hospedeira, não suprimindo o processo normal do desenvolvimento da imunidade ativa do indivíduo. Também, antivirais não podem ser suscetíveis ao desenvolvimento de resistência para as variantes virais, problema normalmente encontrado em tratamentos para infecções bacterianas através do uso de antibióticos (Simoni, 2003; Souza, 2005).

2.5. Inibição e Regulação Enzimática

2.5.1. Tipos de inibição enzimática

As enzimas são proteínas capazes de fornecer o controle de velocidade, regulação e especificidade de diversas reações nos organismos animais. A inibição enzimática se baseia no princípio de que qualquer molécula que se ligue à cadeia polipeptídica de uma enzima, diminuindo a velocidade da reação, é considerada um inibidor enzimático. Com base nisso, a inibição enzimática é dividida em dois tipos: irreversível e reversível, onde o parâmetro de classificação se baseia na natureza química da ligação entre o inibidor e

enzima. Na inibição irreversível, o inibidor se liga através da ligação covalente ao sítio ativo da enzima, impedindo assim, a ligação do substrato. Já na inibição reversível, o inibidor se liga ao sítio ativo ou a outra parte da cadeia da enzima, resultando no impedimento da transformação do substrato em produto. Essa ligação ocorre através de uma ou mais interações químicas como: ligação iônica, interação hidrofóbica, pontes de hidrogênio, dipolo-dipolo, van der Waals. A inibição reversível é dividida em três tipos: Competitiva, Incompetitiva e Mista (Lieberman, 2009).

2.5.1.1. Inibição competitiva

A inibição competitiva ocorre quando a estrutura química de um inibidor competitivo se assemelha com a estrutura do substrato. Nesta, o inibidor competitivo se liga ao sítio ativo da enzima, impedindo a ligação do substrato. Esse tipo de inibição pode ser reversível através do aumento da concentração do substrato, tornando possível uma competição com o inibidor pelo sítio ativo enzimático.

2.5.1.2. Inibição incompetitiva

A inibição incompetitiva é caracterizada pela ligação do inibidor ao complexo enzima-substrato (ES), originando assim, um complexo enzima-substrato-inibidor (ESI). Nesse tipo de inibição, o inibidor se liga a um sítio que não o ativo, onde seu efeito somente é percebido quando se tem uma maior concentração do substrato.

2.5.1.3. Inibição mista ou Não-competitiva

Para a inibição mista o inibidor se liga a uma região da enzima, diferente do sítio ativo, não interferindo na ligação do substrato ao sítio catalítico. Como exemplo, os inibidores não-competitivos, os quais se ligam a um sítio que não o ativo, mas formam ligação diretamente com a enzima ou com o complexo enzima-substrato. Diferente da inibição competitiva, na não-competitiva uma maior concentração do substrato não reverte a inibição.

3 OBJETIVOS

3.1. Geral

Desenvolver novos compostos ativos contra o vírus Zika.

3.2. Específicos

- I. Realizar revisão da literatura constante para manter-se atualizado quanto ao estado da arte do projeto;
- II. Sintetizar e caracterizar novos derivados baseados no planejamento racional a partir dos inibidores identificados nos ciclos PIBIC anteriores;
- III. Avaliar o perfil citotóxico dos novos compostos antivirais por ensaios de MTT em células Vero E6, atividade inibitória dos novos compostos em ensaios de inibição enzimática frente à protease NS2B/NS3, bem como, atividade antiviral frente a células Vero E6 infectadas com o ZIKV;
- IV. Realizar estudos *in silico* para entender os modos de ligação dos compostos mais ativos, bem como, as principais interações envolvidas em seus complexos com o alvo;
- V. Compilar todos os dados obtidos após a execução do projeto e organizá-lo em modelo de artigo para submissão em periódico internacional de alto fator de impacto.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e Solventes

Todos os solventes e reagentes iniciais foram adquiridos da Merck/Sigma-Aldrich® Company (St. Louis, MO, USA), os quais eram suprimentos comerciais de alta pureza (> 98%), bom como, os solventes deuterados utilizados para as análises de RMN. Para as rotas sintéticas e cromatografia em coluna, todos os solventes foram submetidos à destilação antes do uso para remoção de possíveis impurezas. Além disso, todas as execuções de HPLC foram realizadas utilizando metanol grau HPLC da Tedia® Company (Fairfield, OH, USA) como eluente.

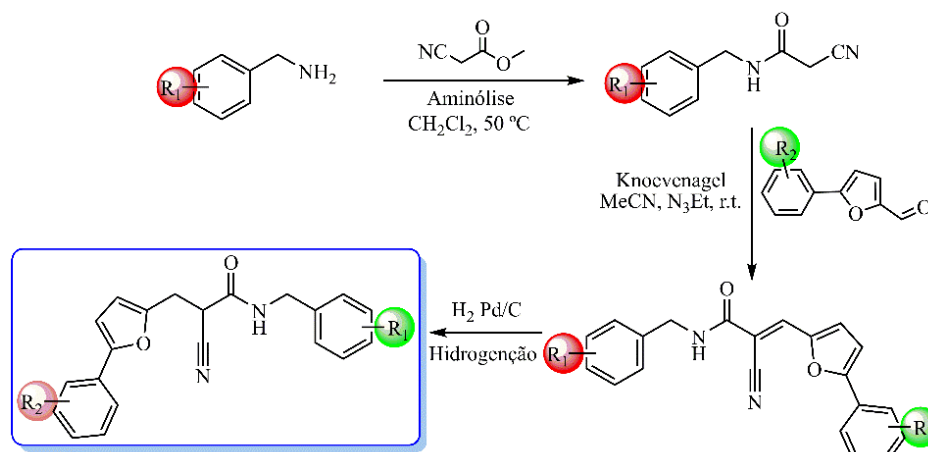
4.2. Síntese dos derivados

Inicialmente, para o preparo das alfa-cianoacrilamidas, os intermediários de cianoamina foram sintetizados reagindo com cianoacetato de etila e aminas primárias ou secundárias por aminólise de ésteres em condições de solvente livre. Assim, 100 mg de cianoacetato de etila e 1,1 eq. das aminas foram adicionados a um balão de fundo redondo. A mistura reacional preparada foi agitada à temperatura ambiente durante 48 horas. (Sabot, 2007; Wang, 2009). A conclusão da reação foi identificada por meio de acompanhamento de placas CCD (Cromatografia em Camada Delgada) e HPLC, detectando o comprimento de onda de cerca de 200 nm para todas as moléculas. Em seguida, os intermediários cianoamida foram utilizados diretamente na próxima etapa da rota de síntese, visando um maior rendimento final. Por fim, as alfa-cianoacrilamidas foram obtidas pela reação dos intermediários cianoamidas com 1 eq. de aldeídos correspondentes na presença de 1,1 eq. da base catalisadora trietilamina, via condensação de Knoevenagel.

Diante de otimizações da rota sintética empregada para a obtenção dos derivados, utilizamos o éster cianoacetato de metila (Fórmula linear: $\text{NCCH}_2\text{COOCH}_3$) em diclorometano (DCM) visando uma maior facilidade de precipitação para intermediário previsto. Posteriormente, a utilização do éster cianoacetato de metila foi mantida, contudo, novas medidas de equivalência foram adaptadas para otimizar a reação e diminuir a formação impurezas. Nesse contexto, as reações foram lançadas com 1 eq. do substituinte amina e 0,95 eq. do cianoacetato de metila. Ademais, a última etapa a combinação entre aldeídos, nitrilas e aminas por reação de Knoevenagel, foi realizada

com 1 equivalente do intermediário amida e 0,9 eq. do substituinte aldeído, catalisada por 1,1 eq. de trietilamina (Fórmula linear: $(C_2H_5)_3N$). Essas mudanças apresentaram uma melhoria no rendimento das reações propostas. A rota de síntese para a obtenção dos derivados por ser visualizada na Figura 3.

Figura 3. Rota sintética para obtenção de derivados 2-ciano-3-propanamidas *N*-substituídas.



Fonte: SILVA-JÚNIOR, 2022.

4.3. Caracterização Estrutural

4.3.1. Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C e 1H (RMN)

Todos os compostos finais obtidos através da rota sintética planejada foram devidamente caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C e 1H (ver espectros em Anexos). O estudo dos núcleos de carbono por meio da espectroscopia de RMN é uma técnica crucial para determinar as estruturas de moléculas orgânicas. Para isso, são utilizados espectros de carbono para determinar o número de carbonos não equivalentes e para identificar os tipos de átomos presentes em um dado composto (metileno, aromático, metila, carbonila e outros) (Pavia *et al.*, 2010). Para a obtenção dos espectros, foi utilizado um equipamento Bruker® (Billerica, EUA), modelo UltraShield 600 MHz. Além disso, os solventes dimetilsulfóxido deuterado ($DMSO-d_6$) e clorofórmio ($CDCl_3$) foram empregados para a solubilização das amostras. Também, para os núcleos de hidrogênio e carbono foi utilizado um total de 16 e 2.048 varreduras, respectivamente. Assim, os deslocamentos químicos (δ) foram registrados por partes por milhão (ppm). Ademais, as constantes de acoplamento (J) para os sinais 1H foram calculados em hertz

(Hz). Para os espectros, as multiplicidades de sinal foram atribuídas como singlete (*s*), singlete largo (*br s*), dupletos (*d*), dupletos duplos (*dd*), tripleto (*t*), quarteto (*q*), quinteto (*qi*), septeto (*sep*), e multiplete (*m*). Com isso, todos os espectros de RMN foram tratados e analisados mediante o software Bruker TopSpin[®] com licença acadêmica, com a versão 4.0.8, 2019 (Vilela *et al.*, 2022) (<https://www.bruker.com/de/products-and-solutions/mr/nmr-software/topspin.html>).

4.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção de Matriz de Diodos (HPLC-DMD)

Para a determinação do tempo de retenção (RT) e o grau de pureza (%), foi utilizado um equipamento de LC Shimadzu[®] (Kyoto, Japan), modelo SIL-20AHT, com coluna Luna[®] 5 μ m C18(2) 100 Å column (250 $\times$ 4.6 mm), usado em comprimentos de onda (λ) de 254 nm. Como fase móvel, o grau de HPLC de metanol ($\geq 99\%$) foi usado em todas as execuções de HPLC-DAD. Diante disso, foi assumida uma parametrização específica para as análises, sendo (a) 1 mg/mL para a concentração da amostra; (b) 1 mL/min para a vazão; (c) tempo total de 10 minutos; (d) 5 μ L para o volume injetado. Por fim, todos os valores do tempo de retenção de HPLC foram computados em minutos, enquanto a absorbância foi computada como unidades de miliabsorbância (mAU).

4.3.3. Determinação por Ponto de Fusão (PF)

Para a determinação do Ponto de Fusão (PF) das moléculas finais, foi utilizado um equipamento MSTecnopon[®] (Piracicaba, Brasil), modelo PFMII Digital. Todas as medições foram realizadas utilizando capilares de vidro contendo as amostras. Para a temperatura inicial foi admitido 30 °C e, em seguida, um aumento de temperatura de 1 °C/min. Além disso, todos os pontos de fusão não foram corrigidos e assumimos um intervalo de 1-2 °C.

4.3.4. Espectroscopia de Infravermelho Transformada por Refletância Total Atenuada (RTA-FTIR)

Todos os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando um espectrofotômetro da marca Shimadzu[®] (Kyoto, Japan), modelo IRPrestige-21,

empregando a técnica de refletância total atenuada (RTA), na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . Todos os espectros foram tratados usando Shimadzu IRsolution[®] software, versão 1.50, 2008. Todos os alongamentos de ligação (ν) e deformações angulares (δ) para o principal grupo funcional dos compostos finais foram computados em transmitância (T%) e número de onda (cm^{-1}).

4.3.5. Espectrometria de Massa (CG-MS)

Em continuidade, todas as amostras foram dissolvidas em metanol grau HPLC (1 mg/mL), em um frasco de vidro, e posteriormente, analisadas em cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de espectrômetro de massas GC/MS-GCMS-QP2010CN Ultra (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipamento com injetor *split/splitless* (250 °C), utilizando proporção de split 1:10. Em seguida, foi utilizado um volume de injeção de 1 μL para todas as análises. Foi usada uma coluna capilar SH-RXI-5Ms (Shimadzu, Kyoto, Japan) com fase estacionária composta por (5%-fenil)-metilpolissiloxano, 30 m de comprimento, 0.25 mm de diâmetro interno, e 0.25 μm de espessura. A temperatura programada foi de 40 a 150 °C, aumentando em 15 °C/min. Posteriormente, a temperatura foi elevada para 300 °C, no período de 20 min. As temperaturas da câmara de ionização e da interface foram estabelecidas em 280 °C. O He como gás de arraste (145,2 kPa), fluxo de 2.67 mL/min. O espectrômetro de massas operou com energia de ionização de 70 eV no modo *Full Scan*, utilizando o método de ionização eletrônica (ionização por impacto de elétrons). Finalmente, todos os dados obtidos foram analisados utilizando o software Lab Solution (Shimadzu, Kyoto, Japan), no qual todos os valores de tempo de retenção (T_R) do GC foram registrados em minutos (min). Os procedimentos e métodos foram adaptados de Santos-Júnior *et al.* (2021).

4.4. Ensaio de Inibição Enzimática

Para determinar a atividade inibitória enzimática dos compostos contra as proteases dos vírus DENV-2 e ZIKV, foi realizado um ensaio baseado no substrato fluorogênico Boc-Gly-Arg-Arg-AMC (Bachem, Bubendorf, Switzerland). Os compostos e substratos testados foram preparados como soluções de estoque de DMSO. Em seguida, esses compostos passaram por um processo de plaqueamento em placas de microtitulação brancas de fundo plano com 96 poços, sendo 90 μL de tampão, 2,5 μL de solução

enzimática, 5 µL de inibidor em DMSO (ou DMSO puro como controle), e 2,5 µL de solução do substrato correspondente, totalizando 100 µL por poço. Todos os valores de fluorescência foram medidos utilizando um leitor de placas Tecan Infinite F2000 PRO. No geral, todos os resultados foram obtidos e analisados a partir de triplicatas técnicas. Uma concentração de 20 µM dos inibidores foi escolhida para a triagem inicial. Ademais, os valores de IC₅₀ foram determinados com série de diluições variando de 0,01 a 100 µM. A fluorescência foi medida a cada 30 segundos durante 10 min a 25 °C com 380 nm para excitação e 460 nm como comprimento de onda de emissão. Os valores de IC₅₀ foram calculados usando GraFit® v. 6.0.12 (Erithacus Software Limited, East Grinstead, West Sussex, Reino Unido) ajustando a atividade enzimática restante de quatro parâmetros à equação 1:

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

Equação 1.

onde Y [$\Delta F/\text{min}$] é a taxa de hidrólise do substrato, Y_{max} representa o valor máximo da curva dose-resposta, medido em concentrações de inibidor de $[I] = 0$ µM, Y_{min} é o valor mínimo, obtido em altas concentrações de inibidor, e s representando o coeficiente de Hill (Ludewing *et al.*, 2010). Além disso, para elucidar se os compostos analisados são competitivos ou não competitivos, foram realizadas medições de IC₅₀ de **LQM467** na presença de diversas concentrações de substratos (50, 100, 150, and 200 µM), gerando o gráfico de Dixon. Também, comparamos o K_i obtido a partir do ponto de dissecção do gráfico de Dixon com valor de K_i determinado pela equação de Cheng-Prusoff (Equação 2) ($K_M(\text{Boc-Gly-Arg-Arg-AMC}) = 74,8$ µM); onde K_i é a constante de inibição, K_m é a constante de Michaelis-Menten para o substrato, e $[S]$ representa a concentração do substrato. Em adição, seu valor IC₅₀ contra o mutante DENV T122C foi avaliado antes e depois do bloqueio com *N*-benzylmaleimida (BMI).

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

Equação 2.

Para a seletividade fora do alvo, foram aplicadas abordagens semelhantes para determinar a potência inibitória a 20 μM . No caso do SARS-CoV-2 Mpro, foi aplicado um substrato à base de FRET.

Tampões e Substratos: SARS-CoV-2 M^{pro} (enzima 125 nM, Tris 20 mM pH 7.5, EDTA 0.1 mM, NaCl 200 mM, DTT 1 mM, Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans) 50 μM , DENV-2 NS2B/NS3 (enzima 250 nM) and ZIKV NS2B/NS3 (enzima 50 nM) (Tris 50 mM pH 9.0, glicerol 20% (v/v), Chaps 1 mM, Boc-Gly-Arg-Arg-AMC) 100 μM , uPA (enzima 2.5 U, Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 50 mM, EDTA 0.5 mM, Z-Gly-Gly-Arg-AMC) 240 μM , tripsina (enzima 250 ng/mL, Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, Z-Phe-Arg-AMC) 40 μM , MT2 (enzima 1.25 nM, Tris 25 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, Triton-X100 0.01%, Boc-Leu-Arg-Arg-AMC) 100 μM , e catepsina-L (enzima 220 ng/mL, Tris 50 mM pH 6.5, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, DTT 2 mM, Z-Phe-Arg-AMC) 6.25 μM , e SARS-CoV-2-PL^{pro} (enzima 75 nM, Tris 20 mM pH 7.5, EDTA 0.1 mM, NaCl 200 mM, DTT 1 mM, Z-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly-AMC) 50 μM .

4.5. Avaliação Quanto ao Perfil Citotóxico

Para a avaliação quanto ao perfil citotóxico dos compostos, células Vero E6 foram semeadas a 2×10^4 células/poço de placas de 96 poços e mantidas a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂. Após atingir ~80-90% de confluência e, para encontrar as concentrações máximas não tóxicas (MNTCs), as monocamadas foram tratadas com cada um dos compostos (**LQM467**, **471**, **472**, e **474**) em concentrações de 25 a 200 μM em DMEM baixo – meios de cultura de glicose (Sigma-Aldrich) suplementados com soro fetal bovino a 2% (Gibco), e solução antibiótica antimicótica a 1% (Gibco) por 52 horas. A viabilidade celular foi então avaliada pelo ensaio de citotoxicidade de MTT (3-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) (Sigma-Aldrich) adicionando solução de MTT a uma concentração final de 0,5 mg/mL, seguido de incubação por 3 horas. O sobrenadante foi removido e então 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados e incubados por 15 min. A absorbância de cada poço foi medida utilizando ThermoPlate TP-READER no comprimento de onda de 492 nm e a porcentagem de viabilidade celular foi calculada conforme detalhado anteriormente. O valor de absorbância do controle (apenas meio de cultura) foi subtraído dos valores de absorbância obtidos para todas as amostras (Vilela *et al.*, 2022).

4.6. Avaliação Quanto ao Perfil Antiviral

Primeiramente, foi realizada uma diluição seriada do estoque de ZIKV e a diluição viral que reduziu a viabilidade celular em pelo menos 50% após 52 horas foi utilizada em ensaios antivirais. Para tanto, as células Vero E6 foram submetidas à adsorção do vírus por incubação com ZIKV na proporção de 1:7,5 por 90 minutos, com homogeneização a cada 15 minutos. Em seguida, o inóculo viral foi removido e as monocamadas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato seguida de tratamento com diversas concentrações começando no MNTC de cada compostos (**LQM467** de 50 a 6,25 μM ; **LQM471** de 100 a 12,5 μM ; **LQM472** de 25 a 3,125 μM). A viabilidade celular foi avaliada após 52 horas pelo ensaio MTT e a porcentagem de inibição viral foi calculada conforme descrito anteriormente.

4.7. Quantificação da Carga Viral por qPCR

O RNA viral (vRNA) foi isolado do sobrenadante celular usando *ReliaPrep™ Viral TNA Miniprep System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Além disso, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado com 2 μL de vRNA e 1 μM de primer reverso específico para o genoma do ZIKV (5'-CCAGTGCTTCTTTGTTGTTCC) com um kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (*Applied Biosystems*), de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. O cDNA obtido foi diluído a 1:5 em água isenta de nuclease. Uma curva padrão foi preparada usando um amplicon de cDNA de 94 pb do genoma ZIKV (iniciador direto: 5'-TTGGTTCACAAGGAGTGGTTC e iniciador reverso: 5'-CCAGTGCTTCTTTGTTGTTCC) obtido por uma reação de PCR *GoTaq Master Mix* (Promega). O amplicon foi purificado a partir de gel de agarose a 2% com *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), conforme as instruções recomendadas pelo fabricante. A concentração do amplicon purificado foi quantificada Qubit™ 4 (Invitrogen) usando o kit *Qubit™ dsDNA BR Assay* (Invitrogen). A conversão do peso molecular do ácido nucléico (PM) foi obtida através da fórmula $\text{PM do dsDNA} = (\# \text{ nucleotídeos} \times 607,4) + 157,9$ (de acordo com as instruções da Thermo Fisher Scientific), resultando no número de cópias do dsDNA usado para ser diluído em série obtendo os sete pontos de curva padrão (de $7,5 \times 10^8$ cópias/ μL para $7,5 \times 10^2$ cópias/ μL). Além disso, o ensaio qPCR para a quantificação absoluta foi realizado em uma mistura de reação de 10 μL contendo 5 μL de *Power SYBR™ Green PCR Master Mix* (Applied

Biosystems), 2,5 μL de primers forward and reverse (0,8 μM cada), e 2,5 μL de primers diluídos de amostra cDNA ou pontos de curva padrão. O qPCR foi executado no sistema QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Todos os dados foram analisados no software Thermo Fisher Connect software (Applied Biosystems) no modo de curva padrão, convertendo os valores do limite do ciclo (Ct) em números de cópias de vRNA. A eficiência da curva padrão qPCR apresentou inclinação de -3,4 e coeficiente de correlação de 0,987%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

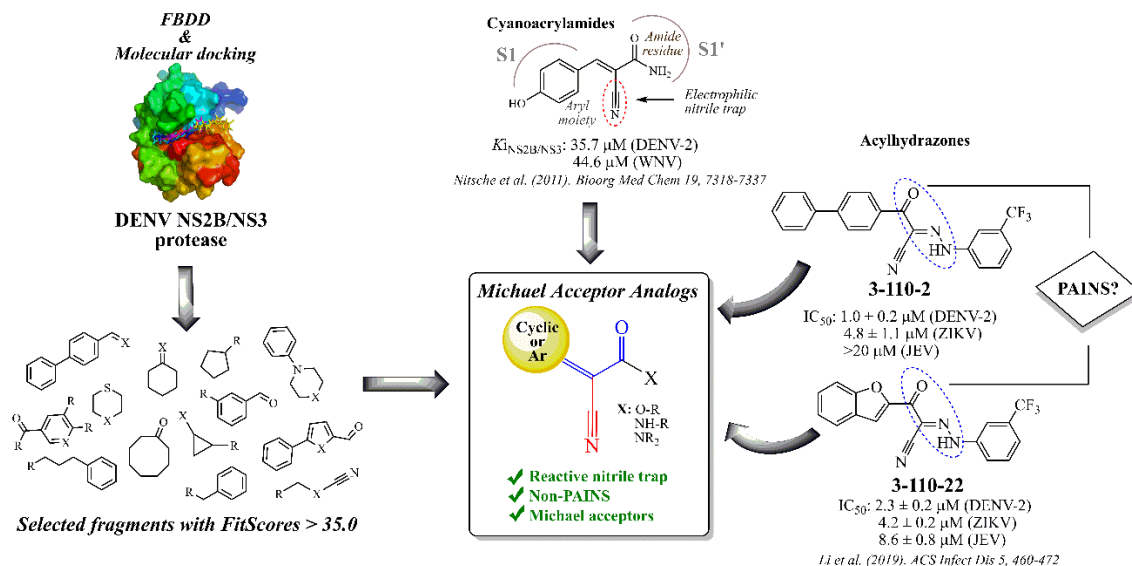
5.1. Planejamento Racional Baseado em Fragmentos.

O planejamento de medicamentos baseado em medicamentos (do inglês fragment-based drug design (FBDD)) tem sido utilizado para a descoberta de novos inibidores contra o DENV-2 NS5 e também, ZIKV e DENV-2 NS2B/NS3. Para o presente trabalho, decidimos utilizar esta estratégia para identificar pequenos fragmentos químicos que poderiam se tornar possíveis inibidores de NS2B/NS3. Primeiramente, uma biblioteca virtual interna de 340 fragmentos químicos foi selecionada por simulações de acoplamento molecular para a protease em questão. Esses fragmentos apresentaram valores de FitScore variando de 14,0 (menor afinidade) a 53,9 (maior afinidade). Para isso, diferentes ácidos, cianoésteres, aldeídos, aminas primárias e secundárias foram recuperados como fragmentos promissores. Como o FBDD é uma técnica baseada na identificação de pequenos fragmentos químicos que normalmente se ligam com fraca afinidade ao alvo macromolecular e que são posteriormente usados para gerar moléculas com afinidades mais elevadas do que o seu precursor, decidimos realizar uma abordagem de crescimento de fragmentos para combiná-los com valores de FitScore superiores a 35,0 para a obtenção de moléculas com FitScore superiores a 65,0. Possuindo assim, uma maior afinidade.

Em estudos anteriores, grupos ciano atuando como grupos ligantes foram relatados como fragmentos químicos interessantes contra DENV-2 e WNV (vírus do Nilo Ocidental – do inglês West Nile virus). Considerando que as serino proteases podem ser alvo de diferentes ogivas eletrofílicas, levando a modos de ligação covalente-reversível ou covalente-irreversível, os eletrófilos prometem ser estruturas promissoras. Além disso, sua reatividade pode ser ajustada para atender aos requisitos de um alvo específico, mantendo sua seletividade e estabilidade (Nitsche *et al.*, 2011). Diante desse fato, as alfa-cetoamidas foram descritas como compostos ativos contra proteases NS2B/NS3 de DENV-2 e WNV, além de serem eficazes em culturas de células infectadas com DENV (C. Steuer *et al.*, 2011). Uma porção cinamil foi identificada como um fragmento promissor, fornecendo inibidores potentes de NS2B/NS3 quando ligada a grupos eletrofílicos. Nesse contexto, o grupo nitrila pode ser um candidato importante para melhorar a atividade antiviral da porção cinamil, pois este pode atuar como uma armadilha eletrofílica para o Ser135 catalítico nucleofílico, realizando interações dipolo-

dipolo ou até mesmo permitir um modo de ligação covalente reversível entre o inibidor e as proteases (Y. Tanaka et al., 1994). Em adição, os grupos cianohidrazona em derivados de bifenil e benzofurano demonstraram atividade *in vivo* de amplo espectro contra DENV, ZIKV e JEV. (Li et al., 2019). Contudo, as porções hidrazona estão associadas com andaimes de interferência pan-ensaio (PAINS) (D. Lagorce et al., 2017). Partindo dos dados encontrados na literatura, decidimos desenvolver cianoacrilatos e cianoacrilamidas como aceptores de Michael, evitando uma porção hidrazona realizando retroisosterismo. Esta abordagem se baseia na inversão de um determinado grupo funcional presente na estrutura do composto ativo, produzindo um novo isómero com a mesma função e atividades semelhantes (Ali *et al.*, 2014; Lima; Barreiro, 2005). Tais compostos exibiram valores de FitScore superiores a 65. Desse modo, as moléculas mais promissoras foram selecionadas para a síntese e avaliação biológica. Na Figura 4, uma visão geral do fluxo de trabalho e estudo para projetar novos compostos direcionados ao DENV NS2B/NS3 é disponibilizada.

Figura 4. Visão geral do planejamento dos compostos direcionados a protease NS2B/NS3 do DENV.

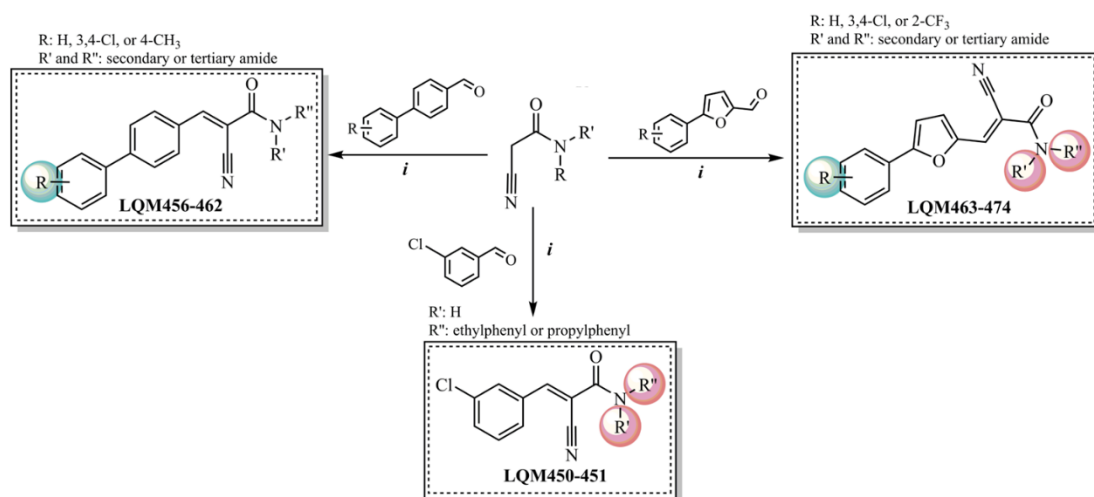


Fonte: Vilela *et al.* 2022.

5.2. Síntese dos Derivados Escolhidos

Visando a aplicação dos conhecimentos obtidos a partir da literatura, bem como, os resultados promissores voltados aos valores de FitScore dos fragmentos analisados, a síntese das moléculas foi iniciada. Para o preparo das alfa-cianoacrilamidas, os intermediários de cianoamina foram sintetizados reagindo com cianoacetato de etila e aminas primárias ou secundárias por aminólise de ésteres em condições de solvente livre. Em seguida, essas amidas foram utilizadas sem purificação adicional para obter os compostos **LQM450**, **451** e **456-474**, os quais foram submetidos a reação final via condensação de Knoevenagel, reagindo com 3-clorocarboxaldeído (72-85%), bifenil-4-carboxaldeído (24-85%) e fenil-5-furfural (29-89%), respectivamente. Em algumas das moléculas finais obtidas, os aldeídos bifenílicos foram preparados através da reação de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura (Martin *et al.*, 2008; Len *et al.*, 2017; Buskes; Blanco, 2020) envolvendo ácidos borônicos específicos. A conclusão da reação foi verificada por meio do acompanhamento de placas CCD (Cromatografia em Camada Delgada) e HPLC, detectando o comprimento de onda de cerca de 200 nm para todas as moléculas. As rotas de síntese são apresentadas na Figura 5.

Figura 5. Rotas sintéticas utilizadas neste estudo para obter os compostos alvo.

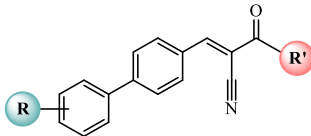
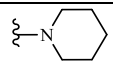
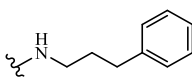
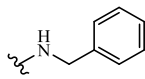
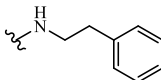
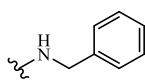
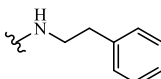
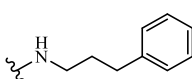
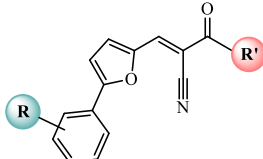


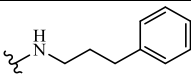
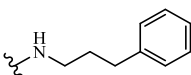
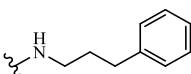
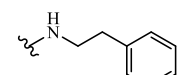
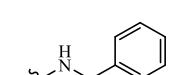
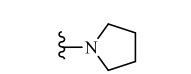
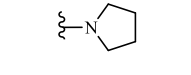
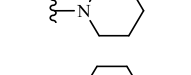
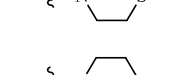
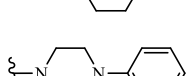
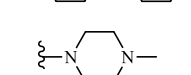
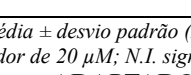
Fonte: ADAPTADO de Vilela *et al.*, 2022.

5.3. Ensaios de inibição enzimática frente as proteases dos vírus DENV-2 e ZIKV

Após a síntese de todos os compostos racionalmente projetados, estes foram selecionados contra proteases NS2B/NS3 de DENV-2 e ZIKV na concentração de 20 μM . A concentração inibitória média (IC_{50}) foi determinada para os compostos que exibiram pelo menos 40% de inibição a 20 μM . Os resultados nos diferentes alvos são mostrados na Tabela 1, bem como, as curvas de determinação de IC_{50} são mostradas na Figura 6. Também, os valores de K_i foram calculados a partir da equação de Cheng Prusoff.

Tabela 1. Inibição de proteases NS2B/NS3 de DENV-2 e ZIKV por α -cianoacrilatos e α -cianoacrilamidas.

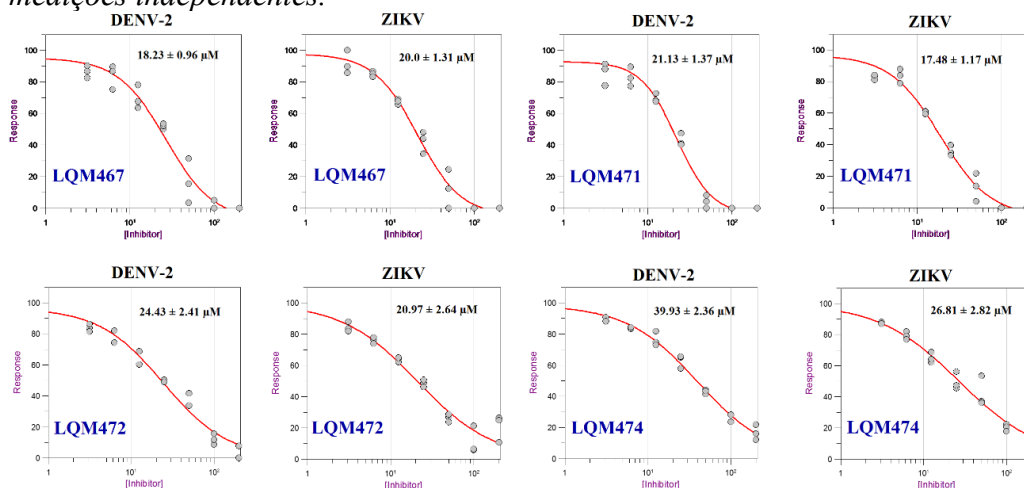
				
Code	R	R'	ZIKV IC_{50} (μM)/%inh. $\pm$ SD ^a / $K_i \pm$ SD (μM) ^a	DENV-2 IC_{50} (μM)/%inh. $\pm$ SD ^a / $K_i \pm$ SD (μM) ^a
LQM456	H		N.I.	N.I.
LQM457	H		N.I.	N.I.
LQM458	3,4-di-Cl		15 $\pm$ 11%	N.I.
LQM459	3,4-di-Cl		N.I.	N.I.
LQM460	4-CH ₃		N.I.	N.I.
LQM461	4-CH ₃		11 $\pm$ 8%	N.I.
LQM462	4-CH ₃		N.I.	N.I.
				

LQM463	H		17 ± 9%	N.I.
LQM464	2-CF ₃		N.I.	N.I.
LQM465	3,4-di-Cl		N.I.	N.I.
LQM466	3,4-di-Cl		N.I.	N.I.
LQM467	3,4-di-Cl		20.0 ± 1.31 µM / 15.1 ± 0.06 µM	18.2 ± 0.96 µM / 7.8 ± 0.09 µM
LQM468	2-CF ₃		17 ± 2%	N.I.
LQM469	3,4-di-Cl		36 ± 2%	30 ± 4%
LQM470	3,4-di-Cl		32 ± 6%	N.I.
LQM471	3,4-di-Cl		17.4 ± 1.17 µM / 13.2 ± 0.05 µM	21.1 ± 1.37 µM / 9.0 ± 0.15 µM
LQM472	3,4-di-Cl		20.9 ± 2.64 µM / 15.8 ± 0.13 µM	24.4 ± 2.41 µM / 10.4 ± 0.30 µM
LQM473	3,4-di-Cl		26 ± 2%	11 ± 3%
LQM474	3,4-di-Cl		26.8 ± 2.82 µM / 20.3 ± 0.17 µM	39.9 ± 2.36 µM / 17.0 ± 0.44 µM

^a: Os valores de IC₅₀ são indicados pela média ± desvio padrão (DP) de três medições independentes. A porcentagem de inibição foi determinada a uma concentração de inibidor de 20 µM; N.I. significa nenhuma inibição.

Fonte: ADAPTADO de Vilela *et al.*, 2022.

Figura 6. Curvas de determinação da concentração inibitória média (IC₅₀) para os compostos **LQM467**, **471**, **472**, e **474** frente a protease NS2B/NS3 dos vírus DENV-2 e ZIKV. Os valores de IC₅₀ são indicados pela média ± desvio padrão (DP) de três medições independentes.



Fonte: Vilela *et al.*, 2022.

5.4. Relação Estrutura-Atividade (REA)

Os derivados de cianocinnamil revelaram ter ações semelhantes em relação à protease NS2B/NS3 do vírus ZIKV, uma vez que as proteases do DENV-2 e ZIKV compartilham 43,24% de identidade de sequência. Através de estudos voltados a análise da relação estrutura-atividade (REA), descobriu-se que quando o grupo N-metilpiperazina (presente em outros compostos analisados – **LQM473** e **474**) é substituído por uma tiomorfolina, obtém-se um composto ainda mais ativo (**LQM471**), exibindo valores de IC_{50} de $17,48 \pm 1,17 \mu M$ e $21,13 \pm 1,37 \mu M$ para proteases NS2B/NS3 do ZIKV e DENV-2, respectivamente. O anel tiomorfolina é colocado próximo aos resíduos Asp75 e His51, realizando interações hidrofóbicas, enquanto seu anel furano é encontrado próximo ao resíduo Ser135. Portanto, foi possível demonstrar que os substituintes de aminas cíclicas não aromáticas são fragmentos promissores para o desenho de inibidores de proteases NS2B/NS3 (Vilela *et al.*, 2022).

5.5. Seletividade Fora do Alvo

Em sequência, visando investigar como os inibidores de fenil-5-furano afetam a atividade de outras proteases de serina e cisteína, um painel de seletividade foi construído envolvendo os inibidores **LQM467**, **471**, **472** e **474** com seis proteases diferentes, nomeadamente as serina proteases tripsina, ativador de plasminogênio uroquinase (uPA), matriptase humana (MT) e as cisteína proteases catepsina-L, SARS-CoV-2 Mpro e PLpro. A protease NS2B/NS3 é semelhante à tripsina, apresentando relação estrutural à tripsina, contudo, esta não possui o cofator NS2B e, portanto, não apresenta uma bolsa de ligação alostérica (H. Maus *et al.*, 2021). Diante desse fato, explica-se a atividade de todos esses análogos de acrilamida sobre tripsina, uma vez que podem abordar o sítio proativo NS3 (Phoo *et al.*, 2020). Por fim, todos os resultados associados à seletividade de inibição de protease estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Seletividade de inibição de protease de **LQM467**, **471**, **472** e **474** em relação a outras proteases de serina e cisteína.

Protease	% de Inibição a 20 μM / $IC_{50} \pm SD (\mu M)^a$ / $K_i \pm SD (\mu M)^a$			
	LQM467	LQM471	LQM472	LQM474
Tripsina	80% / 12.1 $\pm$ 0.90 / 7.8 $\pm$ 0.09	54% / 30.2 $\pm$ 3.34 / 19.5 $\pm$ 0.70	67% / 22.7 $\pm$ 2.23 / 14.6 $\pm$ 0.37	74% / 27.3 $\pm$ 3.14 / 17.6 $\pm$ 0.61
uPA	31%	27%	48% / 23.8 $\pm$ 1.96 / 13.1 $\pm$ 0.08	68% / 22.1 $\pm$ 2.87 / 12.2 $\pm$ 0.11

MT	31%	33%	24%	23%
Catepsina-L	33%	57% / 24.5 ± 2.28 / 12.4 ± 1.50	29%	32%
SARS-CoV-2 M^{pro}	N.I.	N.I.	7%	8%
SARS-CoV-2 PL^{pro}	24%	29%	26%	38%

^a: Os valores de inibição enzimática em concentrações de composto de 20 µM são indicados pela média ± desvio padrão de três medições independentes. Os valores de IC₅₀ foram determinados apenas quando o composto apresentou % de inibição ≥ 40. A atividade enzimática é expressa em relação ao controle DMSO em [%]. N.I. significa nenhuma inibição.

Fonte: Vilela *et al.*, 2022.

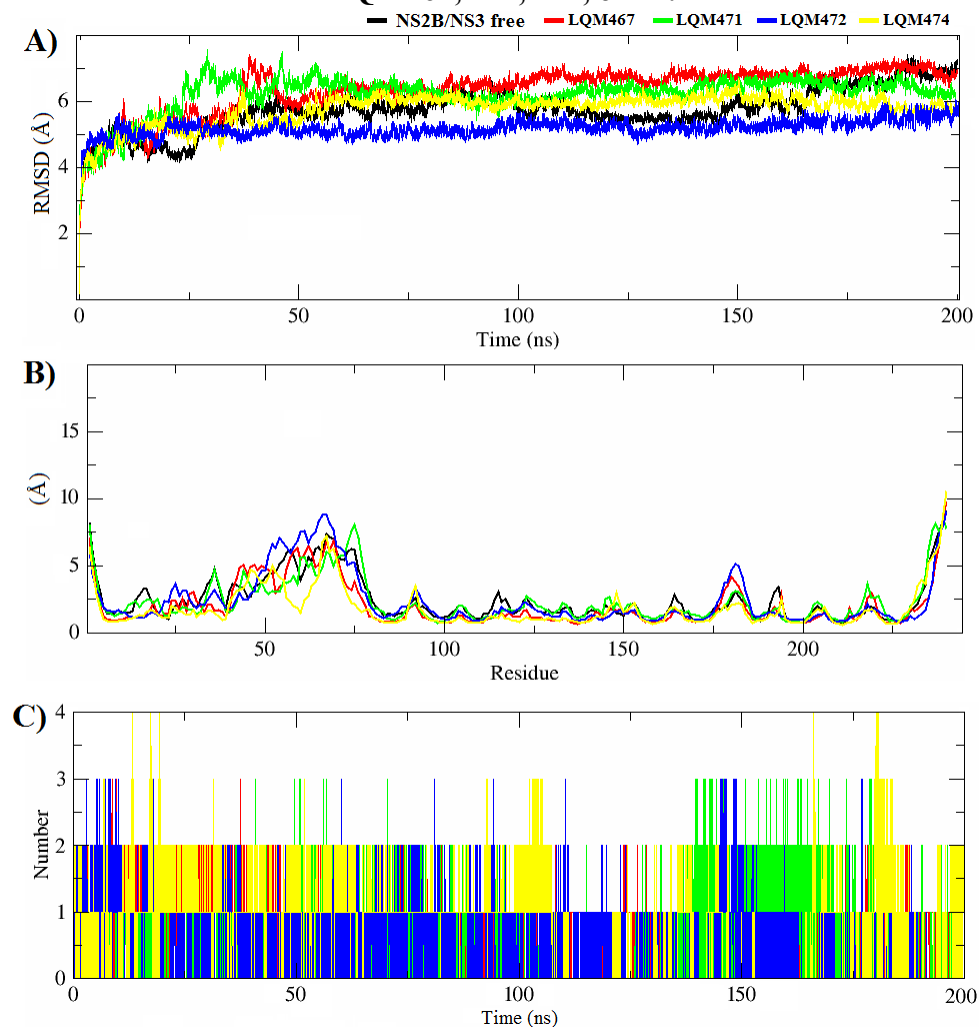
5.6. Simulações de Dinâmica Molecular

As simulações de dinâmica molecular (DM) podem ser usadas para estudar a interação dependente do tempo e o comportamento de pequenas moléculas com o alvo (Nutho; Rungrotmongkol, 2015). Diante disso, essa abordagem tem sido frequentemente aplicada em estudos envolvendo aspectos estruturais e compostos ativos para a protease NS2B/NS3. Nesse contexto, considerando que os compostos **LQM467**, **471**, **472**, e **474** são inibidores competitivos, investigamos suas interações com o sítio catalítico da protease NS2B/NS3 do DENV-2 na conformação fechada (PDB:2M9P). Para todas as simulações DM, os complexos foram inicialmente aquecidos de 0 K até 300 K por 2 ns. Em seguida, os complexos foram equilibrados a pressão constante de 1 atm. Ademais, simulações DM de 200 ns para todos os inibidores em complexo com NS2B/NS3 foram realizadas para investigar sua estabilidade através do desvio quadrático médio (RMSD). Gráficos de Ramachandran também foram gerados para verificar a qualidade estereoquímica desses complexos. Para tanto, a flutuação quadrática média (RMSF) foi calculada para obter insights sobre mudanças na estabilidade estrutural dos complexos a 300 K.

Em geral, uma vez que todos os inibidores de acrilamida exibiram um modo de ligação competitivo, como observado pelas abordagens experimentais, os seus resultados em relação ao 2M9P serão explicados detalhadamente. Para o complexo 2M9P-LQM467, o gráfico de Ramachandran revelou que a estrutura NS2B/NS3 possui 85,8% de seus aminoácidos nas regiões mais favorecidas, enquanto 12,6% são encontrados em regiões adicionais permitidas. Resultados semelhantes foram obtidos para o complexo 2M9P-LQM471, o qual apresentou 87,9% dos seus aminoácidos nas regiões mais favorecidas, enquanto 11,1% e 1,1% são encontrados nas regiões adicionais permitidas e generosamente permitidas, respectivamente. Para o complexo 2M9P-LQM472 foram apresentados 88,9% dos seus aminoácidos nas regiões mais favorecidas, enquanto os 10,5% restantes são encontrados em regiões adicionais permitidas. O complexo 2M9P-

LQM474 apresentou 80% dos seus aminoácidos colados nas regiões mais favorecidas e 17,9% nas regiões adicionais permitidas. Portanto, nenhum dos inibidores complexados apresentou resíduos encontrados em regiões não permitidas (outliers), o que sugere que o campo de força utilizado foi eficiente para simular o ambiente nativo. Em adição, os complexos 2M9P-**LQM467** e 2M9P-**LQM471** apresentaram um perfil de estabilidade correspondente durante todo o tempo de simulação (variação de ~ 1.5 Å). A maior estabilidade observada para o inibidor complexado **LQM471** foi de 75 a 180 ns, já para o **LQM467**, 100 a 175 ns. Todos esses dados podem ser observados na Figura 7.

Figura 7. Trajetórias para A) RMSD, B) RMSF, e C) ligações de H obtidas por simulações de dinâmica molecular para 200 ns a 300K de protease NS2/NS3 livre e complexada com os inibidores **LQM467**, **471**, **472**, e **474**.



Fonte: Vilela *et al.*, 2022.

5.7. Cálculos da Área Superficial de Poisson-Boltzmann (MM/PBSA)

Os cálculos de área superficial de Poisson-Boltzmann (MM/PBSA) combinam três termos energéticos para obter alterações na energia livre de ligação. O primeiro termo está associado a uma mudança na energia potencial no vácuo, incluindo termos ligados (ligações, energias de torção, angulação) e não ligados (interações eletrostáticas e van der Waals); o segundo termo energético se relaciona à dessolvatação de espécies químicas, que quantifica a soma de dois termos energéticos, por fim, o terceiro termo é capaz de obter a energia de entropia configuracional relacionado à formação de complexos na fase gasosa (Kumari *et al.*, 2014). Com isso, as mudanças nas energias de ligação ou afinidades de ligação são usadas para determinar moléculas potenciais, prevendo inibidores potenciais com base em sua força de ligação com o alvo. Nesse sentido, os cálculos de MM/PBSA revelaram que os derivados alfa-acrilamida apresentam afinidade semelhante pelo sítio catalítico da protease NS2B/NS3, considerando todos os termos calculados neste estudo. Em resumo, com relação ao termo de energia de van der Waals (ΔE_{vdW}), o **LQM472** apresenta interações hidrofóbicas favoráveis com o sítio catalítico da protease NS2B/NS3 entre os demais análogos, mesmo possuindo um volume hidrofóbico diferente do **LQM467** (Vilela *et al.*, 2022). Na Tabela 3, diferentes termos MM/PBSA são disponibilizados.

Tabela 3. Diferentes termos MM/PBSA para a mudança relativa na entalpia do sítio catalítico NS2B/NS3 em complexo com os inibidores **LQM467**, **471**, **472**, e **474** a 300K.

Termo energético	LQM467 (kcal/mol) $\pm$ DS	LQM471 (kcal/mol) $\pm$ DS	LQM472 (kcal/mol) $\pm$ DS	LQM474 (kcal/mol) $\pm$ DS
ΔE_{vdW}	-28.96 ± 1.64	-36.81 ± 1.58	-39.62 ± 2.25	-34.52 ± 1.58
ΔE_{elec}	-3.26 ± 1.01	-13.80 ± 1.83	-13.90 ± 3.47	-14.65 ± 3.11
$\Delta G_{solv}^{non-polar}$	-21.68 ± 0.50	-19.52 ± 0.44	-20.82 ± 0.50	-22.86 ± 0.47
ΔG_{solv}^{polar}	2188.61 ± 37.17	2576.40 ± 43.74	2444.60 ± 42.24	1564.89 ± 37.65
ΔG_{solv}	2210.29 ± 37.67	2595.92 ± 44.18	2465.43 ± 42.74	1587.75 ± 38.15
ΔE_{MM}	-42.23 ± 1.53	-52.96 ± 2.99	-53.53 ± 4.34	-49.53 ± 2.63

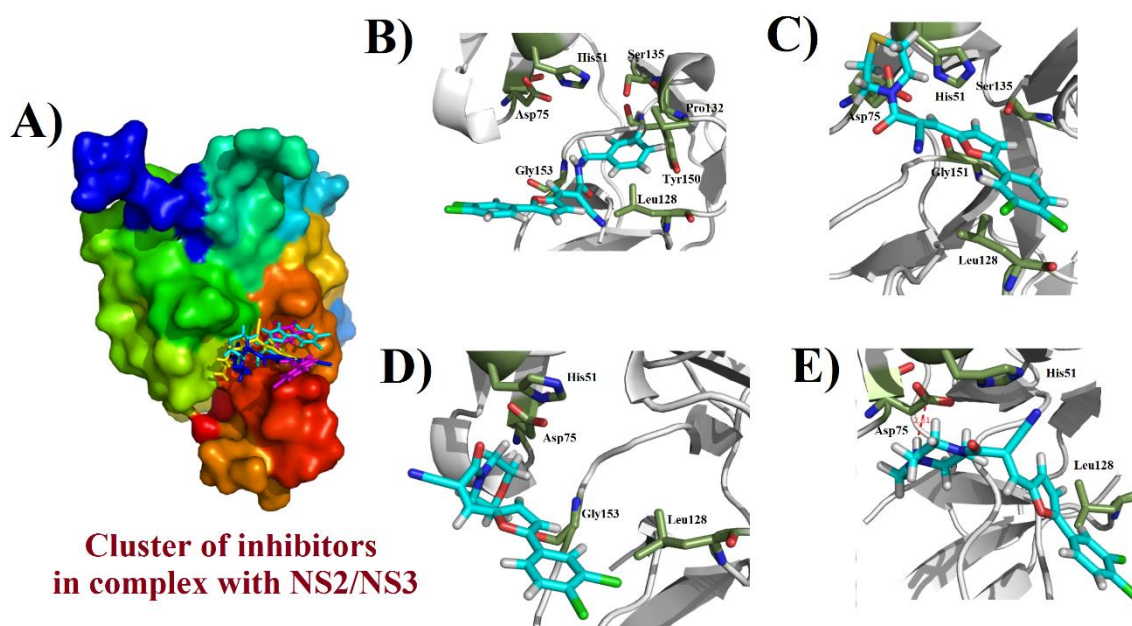
Sítio Catalítico: 2M9P; vdW: van der Waals; Elec: eletrostática; DS: Desvio padrão. Os valores de ΔG_{solv} foram determinados pela equação $\Delta G_{solv} = (\Delta G_{solv}^{polar} + \Delta G_{solv}^{non-polar})$, G_{polar} e $G_{non-polar}$ são as contribuições eletrostáticas e não eletrostáticas à energia livre de solvatação respectivamente, de acordo com Kumari *et al.*²⁸

5.8. Estudos de Docking Molecular

Os estudos de docking molecular são considerados uma ferramenta poderosa e essencial para o projeto e descoberta de medicamentos, resultando em inibidores promissores direcionados a proteínas de interesse medicinal (Meng *et al.*, 2011). Seu objetivo é prever as poses de ligação predominantes de um ligante em uma dada proteína.

Diante desse fato, os complexos ligante-NS2B/NS3 mais estáveis obtidos após as simulações dinâmicas foram assumidos como pontos de partida de docking. Ademais, a análise de agrupamento revelou que todos os inibidores de acrilamida apresentam uma posição de ligação semelhante no sítio catalítico da protease NS2B/NS3, exceto o **LQM467**, que é colocado em uma orientação diferente. Ainda, o **LQM471** e **474** possuem um modo de ligação semelhante, o que provavelmente pode estar ligado a seus valores de IC_{50} semelhantes. Em geral, todos os inibidores interagem hidrofobicamente com o resíduo Leu128, o qual está envolvido em interações com inibidores NS2B/NS3 promissores (Qamar *et al.*, 2016). Além disso, relatamos interações com Gly151, Gly153 e Pro132 nas interações de inibidores com essa protease (Figura 8).

Figura 8. O conjunto de inibidores colocados no sítio catalítico da protease NS2B/NS3 (A) e suas interações com resíduos de aminoácidos (B-E).



A estrutura da protease é representada utilizando o modelo de superfície colorida em estilo arco-íris. Em (A): LQM467 (magenta), LQM471 (ciano), LQM472 (azul), e LQM474 (amarelo). Em (B): interações LQM467s; Em (C): interações LQM471; Em (D): interações LQM472; Em (E): interações LQM474. A interação eletrostática é representada como uma linha tracejada vermelha, com distância calculada em Ångström (Å). Ilustração elaborada usando PyMol® v.0.99

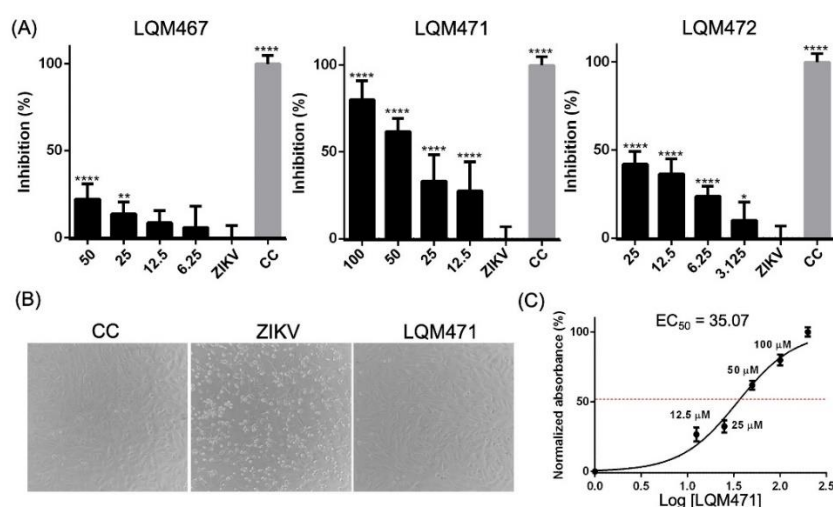
Fonte: Vilela *et al.*, 2022.

5.9. Avaliação da Citotoxicidade *in vitro* e Atividade Antiviral Contra o ZIKV

A avaliação da citotoxicidade de **LQM467**, **471**, **472** e **474** foi realizada em células Vero E6 nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 μ M visando encontrar as concentrações máximas não tóxicas (MNTCs) destes compostos. A partir desse ensaio,

descobriu-se que os MNTCs para **LQM467**, **471** e **472** eram 50, 100 e 25 μM , respectivamente. O composto **LQM474** foi significativamente citotóxico na concentração mais baixa testada (25 μM) e dificuldade de solubilização, o que resultou na não continuidade desse composto nos demais testes. Com isso, descobrimos que a concentração citotóxica de 50% (CC50) era $> 200 \mu\text{M}$ para **LQM467** e $> 100 \mu\text{M}$ para **LQM471** e **472** (Figura 9A). Para os ensaios antivirais baseados em células infectadas pelo ZIKV, a adsorção do vírus foi realizada em células Vero E6 seguida pelo tratamento com os compostos em diversas concentrações a partir de seus MNTCs correspondentes, onde sua porcentagem de inibição viral foi avaliada após 52 horas. O composto **LQM471** reduziu notavelmente o efeito citopatogênico induzido por ZIKV quando comparado às células não tratadas (Figura 9B). Em continuidade, o valor de EC50 (concentração do composto que promove 50% de inibição viral) foi de 35,07 μM (Figura 9C). Para confirmar a atividade anti-ZIKV do **LQM471**, a carga viral foi quantificada nos sobrenadantes de células Vero E6 infectadas com ZIKV tratadas e não tratadas por qPCR. Como resultado, as células infectadas com o vírus Zika não tratadas mostraram uma concentração de RNA viral (vRNA) de $3,9 \times 10^4$ cópias/ μL na reação de qPCR. Em contrapartida, o tratamento com **LQM471** reduziu notavelmente a carga viral sob o ponto mais baixo da curva padrão (inferior a $7,5 \times 10^2$ cópias/ μL). Portanto, o mecanismo de ação do composto **LQM471** pode ser determinado como inibição da replicação viral (Vilela *et al.*, 2022).

Figure 9. Avaliação in vitro da atividade antiviral de **LQM467**, **471** e **472** em células Vero E6 infectadas com ZIKV.

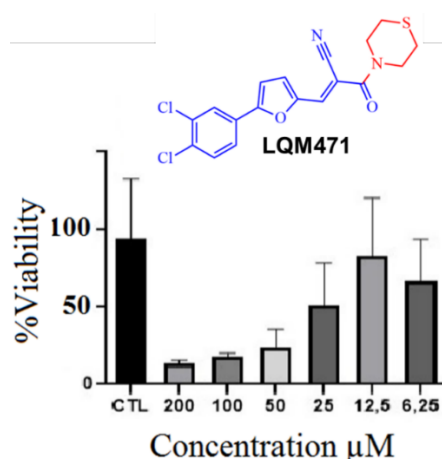


Fonte: Vilela *et al.*, 2022.

5.10. Ensaios em Explantes de Placenta Humana

A placenta é um órgão dividido em duas estruturas diferentes: o córion viloso (parte fetal) e a decídua basal (parte materna). Esta é responsável pelo metabolismo fetal, secreção endócrina e transporte de gases e nutrientes (Molás, 2020; Borbely, 2009). Sabe-se que a transmissão do ZIKV da mãe para o filho é possível tanto durante o pré-natal ou perinatal (durante o nascimento), quanto no pós-natal (durante a amamentação) (Casale *et al.*, 2018). Diante desse fato, uma das possibilidades onde o mecanismo pelo qual o vírus alcança o embrião/feto de gestantes infectadas se dá pela passagem do vírus por espaços criados por lesões e/ou inflamação que podem quebrar a barreira placentária. Outra hipótese se dá pelo alcance do vírus através da infecção de células que formam a barreira placentária (Torres, 2018). A partir desses fatos, pode-se observar a importância de estudos que abordem a interação do ZIKV com explantes de placenta humana. Nesse contexto, em parceria com o Prof. Alexandre Urban Borbely, o qual coordena o Laboratório de Biologia Celular (LBC-UFAL), foram realizados ensaios de toxicidade em explantes de placenta humana utilizando as alfa-cianoacrilamidas identificadas como inibidores da NS2B/NS3 do ZIKV e DENV. A partir dessa análise, revelou-se que o **LQM471** possui boa viabilidade na concentração de 12,5 μM (ver Figura 10). Posteriormente, espera-se que a análise antiviral em explantes de placenta humana seja promissora.

Figura 10. Resultado do perfil de toxicidade em explantes de placenta humana para o **LQM471**.

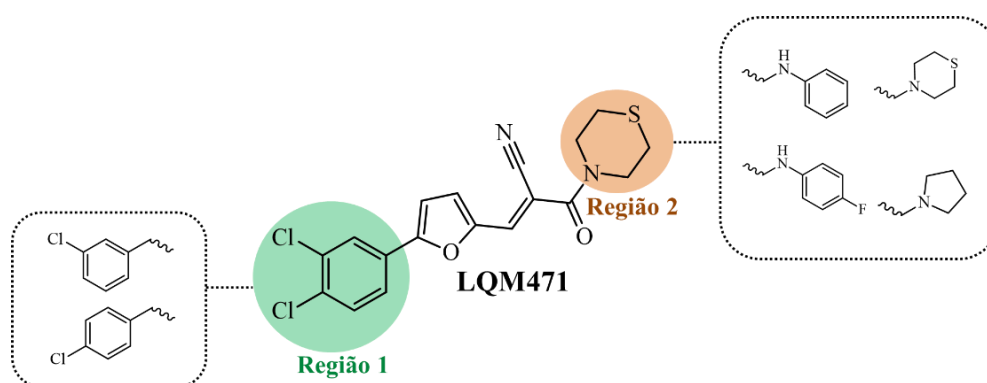


Fonte: Borbely (LBC-UFAL), 2024.

5.11. Modificações Estruturais Previstas para o LQM471

Considerando a identificação de quatro inibidores de NS2B/NS3 do DENV-2 e ZIKV, novas modificações estruturais foram planejadas para tais compostos com a finalidade de desenvolver inibidores ainda mais potentes. Ainda, a necessidade de se obter compostos com uma melhor solubilidade também foi alvo de tais mudanças. Uma vez que todos os inibidores são equipotentes, o composto **LQM471** foi utilizado como protótipo inicial por possuir mais regiões factíveis para realização de modificações estruturais, bem como, apresentar resultados promissores em estudos de avaliação citotóxica e atividade antiviral em células. Dessa forma, três regiões da estrutura do **LQM471** foram selecionadas para tais modificações, sendo: região 1 – anel 3,4-diclorofenil; região 2 – ligação eno; e região 3 – anel da porção tiomorfolina (ver Figura 11). Dentre as regiões de modificações, apenas duas destas foram usadas para a primeira etapa da síntese dos derivados (região 1 e região 3), visto que novas rotas estão sendo pesquisadas e testadas para a obtenção das moléculas finais com modificações na ligação eno (região 2). Todos os novos substituintes descritos nesta proposta foram identificados por dinâmica e docking molecular como sendo promissores para esta classe de compostos frente à NS2B/NS3. Para o presente trabalho, os novos compostos planejados foram sintetizados e caracterizados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

Figura 11. Regiões de modificações estruturais planejadas para o **LQM471**.

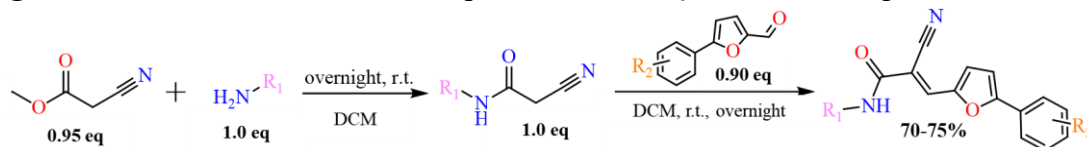


Fonte: Autor, 2022.

Em continuidade, com as regiões de modificações definidas para a síntese dos novos derivados planejados, o desenvolvimento do projeto em questão foi focado nos compostos que apresentaram reagentes suficientes para serem obtidos. Partindo disso, todas as moléculas finais foram obtidas por meio da reação de Aminólise, a qual converte

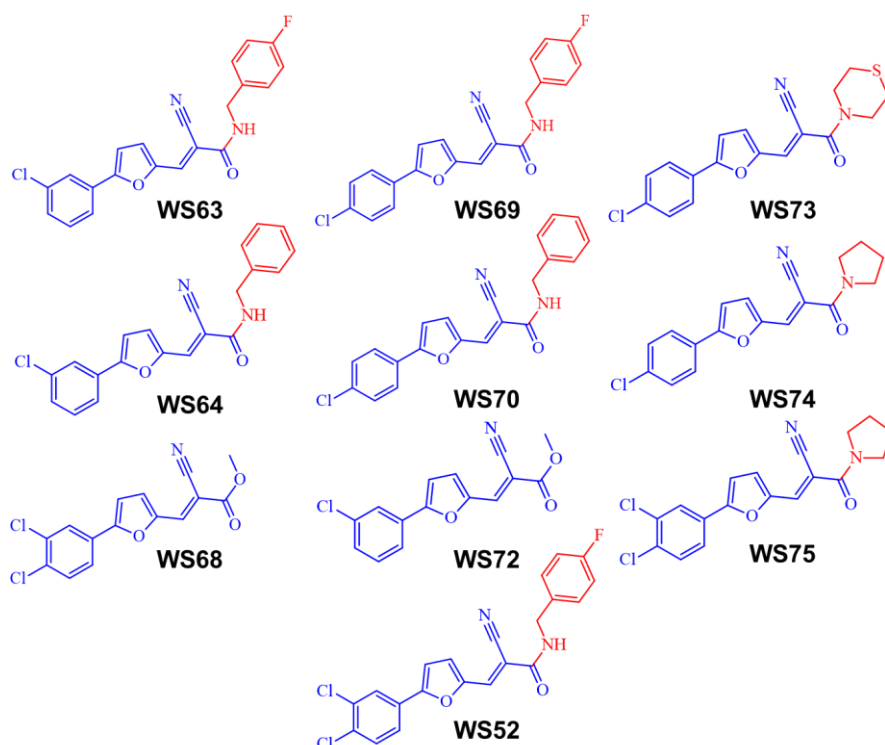
ésteres e aminas no intermediário amida esperado e, ainda, para obtenção dos compostos finais, a condensação de Knoevenagel. No ciclo PIBIC 2022-2023, utilizamos o éster ciano acetato de metila (Fórmula linear: $\text{NCCH}_2\text{COOCH}_3$) em diclorometano (DCM) visando uma maior facilidade de precipitação para intermediário previsto. Para o ciclo 2023-2024, a utilização do éster ciano acetato de metila foi mantida, contudo, novas medidas de equivalência foram adaptadas para otimizar a reação e diminuir a formação impurezas. Diante disso, as reações foram lançadas com 1 equivalente do substituinte amina e 0,95 equivalente do ciano acetato de metila. Ademais, a última etapa a combinação entre aldeídos, nitrilas e aminas por reação de Knoevenagel, foi realizada com 1 equivalente do intermediário amida e 0,9 equivalente do substituinte aldeído, catalisada por 1,1 equivalente de trietilamina (Fórmula linear: $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$). Na Figura 12, uma visão geral da rota de síntese otimizada para as modificações estruturais é ofertada. Essas mudanças apresentaram melhores rendimentos para as reações realizadas. Após a obtenção dos produtos finais (ver Figura 13), percebemos a melhora na solubilidade de todos os novos compostos, ainda mantendo sua fluorescência. Com isso, podemos afirmar que um dos objetivos previstos para as modificações estruturais do composto **LQM471** foi obtido com sucesso, visto que a melhoria da solubilidade, quando comparada ao composto original, foi comprovada.

Figura 12. Rota de síntese otimizada para as modificações estruturais previstas.



Fonte: Autor, 2024

Figura 13. Estruturas das moléculas finais obtidas através das modificações previstas para o composto **LQM471**.



Fonte: Autor, 2024.

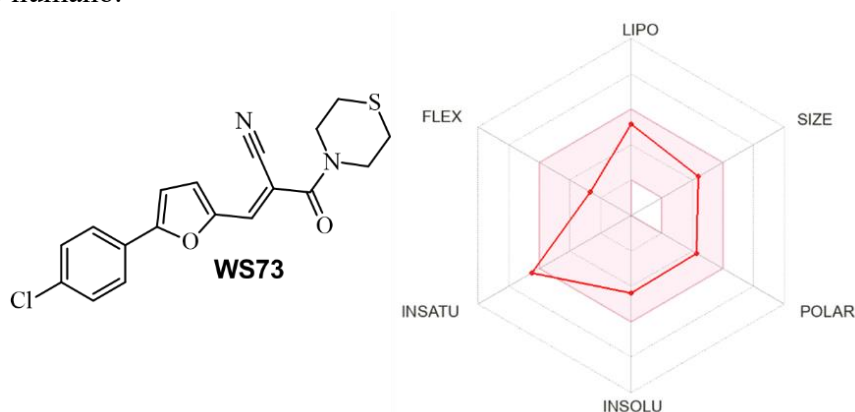
5.12. Estudos Das Propriedades Físico-Químicas Dos Novos Derivados

Após finalizar a síntese das moléculas propostas, diante da necessidade do conhecimento estrutural dos compostos sintetizados, além da busca voltada ao conhecimento das propriedades físico-químicas para uma melhor abordagem dos dados gerais obtidos, foram realizados estudos utilizando o site Swiss Institute of Bioinformatics (Swiss ADME) como base, visando uma gama de conhecimentos específicos e a melhor compreensão das propriedades voltadas à atuação desses compostos no organismo humano, além da probabilidade destes se tornarem possíveis fármacos. Para esse ensaio, os compostos **WS73**, **WS74** e **WS75** apresentaram os melhores resultados (ver Figuras 14, 15 e 16). O radar de disponibilidade permite a semelhança com um medicamento, avaliando qualitativamente a chance de uma molécula se tornar um fármaco. Diante desse fato, podemos afirmar que os compostos **WS73**, **WS74** e **WS75** apresentam um perfil farmacocinético aceitável. A área rosa do radar de biodisponibilidade representa o intervalo ideal para cada propriedade.

Para o composto **WS73** o valor de lipofilicidade (coeficiente de partição entre *n*-octanol e água) igual a 3,32. O valor de Log S (ESOL) encontrado foi de -4,38, solubilidade de $1,51 \times 10^{-2}$ mg/mL e $4,20 \times 10^{-5}$ mol/L, sendo esse, moderadamente solúvel em água. A absorção do trato gastrointestinal para esse composto é alta. O composto não apresentou permeabilidade da barreira hematoencefálica. Podemos afirmar que a não permeabilidade é um bom resultado, visto que o transporte da barreira hematoencefálica no tecido cerebral é crucial na compreensão dos distúrbios cerebrais e no desenvolvimento de estratégias sistêmicas e não sistêmicas de administração de medicamentos ao cérebro (Bingmei; *et al.*, 2022). Por fim, afirma-se que esse composto tem potencial para se tornar fármaco, visto que não viola os parâmetros da regra dos cinco de Lipinski. Essa regra estabelece que para uma molécula ser um bom fármaco deve apresentar valores para 4 parâmetros múltiplos de 5: log P maior ou igual a 5, Massa Molecular menor ou igual a 500, aceptores de ligação de Hidrogênio menor ou igual a 10 e doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5. Portanto, estas regras permitem uma boa previsão do perfil de biodisponibilidade oral para moléculas novas (Duarte; *et al.*, 2013).

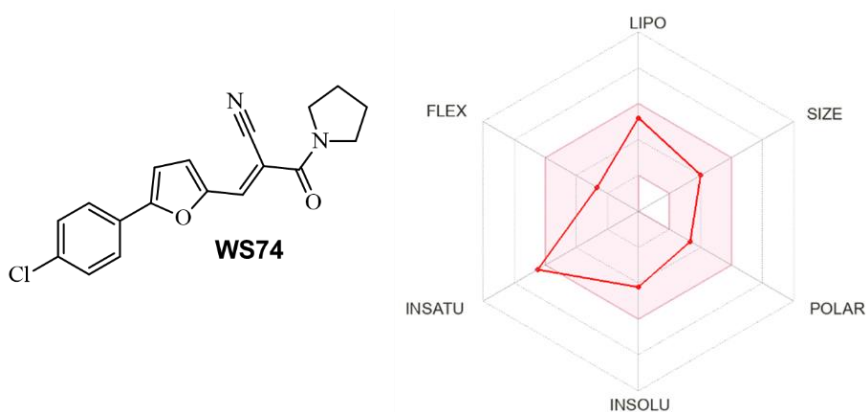
Em continuidade, para o composto **WS74** o valor de lipofilicidade (coeficiente de partição entre *n*-octanol e água) igual a 3,29. O valor de Log S (ESOL) encontrado foi de -4,23, solubilidade de $1,92 \times 10^{-2}$ mg/mL e $5,89 \times 10^{-5}$ mol/L, sendo esse, moderadamente solúvel em água. A absorção do trato gastrointestinal para esse composto é alta. Nesse caso, o composto apresentou permeabilidade da barreira hematoencefálica. Por fim, afirma-se que esse composto tem potencial para se tornar fármaco, visto que não viola os parâmetros da regra dos cinco de Lipinski. Finalmente, para o composto **WS75** o valor de lipofilicidade (coeficiente de partição entre *n*-octanol e água) igual a 3,82. O valor de Log S (ESOL) encontrado foi de -4,83, solubilidade de $5,38 \times 10^{-3}$ mg/mL e $1,49 \times 10^{-5}$ mol/L, sendo esse, moderadamente solúvel em água. A absorção do trato gastrointestinal para esse composto é alta. Ao contrário do composto **WS73**, o composto **WS75** apresentou permeabilidade da barreira hematoencefálica. Por fim, a análise mostrou que o composto obtido não viola os parâmetros da regra dos cinco de Lipinski.

Figura 14. Ensaio das propriedades físico-químicas e comportamento do **WS73** no organismo humano.



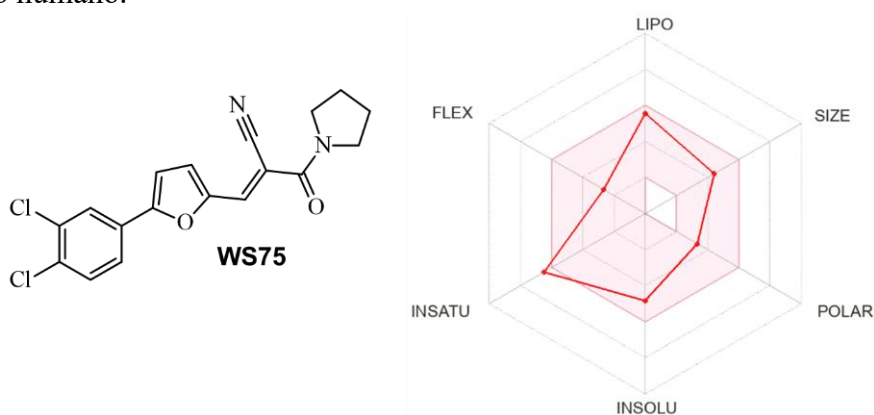
Fonte: Swiss ADME, 2024.

Figura 15. Ensaio das propriedades físico-químicas e comportamento do **WS74** no organismo humano.



Fonte: Swiss ADME, 2024.

Figura 16. Ensaio das propriedades físico-químicas e comportamento do **WS75** no organismo humano.



Fonte: Swiss ADME, 2024.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio da pesquisa voltada ao desenvolvimento de novos fármacos direcionadas às arboviroses tão incidentes no Brasil e no mundo, podemos afirmar que o trabalho em questão apresenta resultados promissores. Diante do exposto, a síntese dos derivados iniciais, providos a partir do desenho de fragmentos, foi eficaz e apresentou ótimos rendimentos. Também, os ensaios de inibição enzimática mostraram que quatro dos compostos submetidos a testes apresentaram atividade. A relação estrutura-atividade demonstrou que os substituintes de aminas cíclicas não aromáticas são fragmentos promissores para o desenho de inibidores de proteases NS2B/NS3. Ainda, identificamos seletividade de inibição de protease para os compostos **LQM467**, **471**, **472** e **474** em relação a outras proteases de serina e cisteína. A partir das simulações de dinâmica molecular, nenhum dos inibidores complexados apresentou resíduos encontrados em regiões não permitidas (outliers), o que sugere que o campo de força utilizado foi eficiente para simular o ambiente nativo. Quanto a avaliação citotóxica e antiviral em células, o composto **LQM471** (MNTCs 100 μ M) reduziu notavelmente o efeito citopatogênico induzido por ZIKV quando comparado às células não tratadas.

Com base na síntese dos novos derivados 2-ciano-3-oxiranocarboxamidas N-substituídas, as modificações estruturais apresentaram melhorias consideráveis na solubilidade dos compostos quando comparados às moléculas originais. Também, a otimização das reações proporcionadas pela mudança dos equivalentes foi eficaz, visto que as reações mostraram melhoras quanto ao rendimento e ausência de formação de subprodutos, além da redução de impurezas no intermediário amida. Ademais, os estudos utilizando o site Swiss ADME como base, visando a melhor compreensão das propriedades voltadas à atuação desses compostos no organismo e as propriedades destes se tornarem possíveis fármacos mostraram que o composto **WS73** possui grande possibilidade de se tornar um fármaco.

Por fim, o estudo em questão apresenta uma alternativa interessante para projetar novos compostos de ataque contra as proteases DENV-2 e ZIKV NS2B/NS3, que podem ser otimizados para melhorar suas atividades inibitórias, aumentando o potencial arsenal terapêutico contra esses flavivírus no futuro.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados promissores obtidos, as perspectivas futuras para a continuação da pesquisa em questão estão direcionadas à síntese de reposição dos compostos que mostraram um resultado eficiente. Ademais, ensaios de atividade antiviral em explantes de placenta humana serão realizados para o composto **LQM471** em parceria com o Prof. Alexandre Urban Borbely, o qual coordena o Laboratório de Biologia Celular (LBC-UFAL). Posteriormente, o composto **LQM471** e os melhores compostos modificados estruturalmente serão submetidos a ensaios de toxicidade aguda e crônica em ratos, realizados em parceria com a Prof^a Vanda Lúcia dos Santos, da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB.

Em paralelo, os novos compostos serão avaliados frente à serino protease NS2B/NS3 do ZIKV, em parceria com o grupo da Prof^a Rafaela Salgado Ferreira, da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Em seguida, os modos de ação das melhores 2-ciano-3-oxiranocarboxamidas *N*-substituídas serão avaliadas em ensaios de inibição competitiva. Ensaios de embriotoxicidade e teratogenia em zebrafish serão realizados com colaborador Prof. Rafael Freitas da Universidade de Pernambuco (UPE-Garanhuns). Em continuidade, serão realizados testes de citotoxicidade em células *Vero E6* e ensaios *in vitro* para os compostos finais obtidos no ciclo atual. Além disso, iremos prosseguir com as modificações estruturais focadas na melhoria da atividade, solubilidade e diminuição da fluorescência dos compostos finais. Para as reações de hidrogenação e epoxidação, será realizada uma pesquisa voltada à uma metodologia eficaz para a modificação das estruturas químicas já obtidas nos ciclos anteriores. Além disso, outros derivados tiomorfolina serão adicionados à estrutura prevendo uma melhora da atividade do composto, visando a continuidade dos ensaios. Por fim, os ensaios de toxicidade em explantes de placenta humana continuarão sendo realizados com os novos derivados 2-ciano-3-oxiranocarboxamidas *N*-substituídas e 2-ciano-3-propanamidas *N*-substituídas.

REFERÊNCIAS

1. A. Tiwari and S. Singh, in *Bioinformatics*, Elsevier, 2022, pp. 207–217.
2. BLACKBURN, N. K; RAWAL, R. Dengue fever imported from India. A report of 3 cases. *S. Afr. Med*, v. 24, p. 287-386, 1987.
3. B. D. Lindenbach and C. M. Rice, in *Advances in Virus Research*, 2003, vol. 59, pp. 23–61.
4. Binmei M. Fu; et al. Transport Across the Blood-Brain Barrier. **Molecular, Cellular, and Tissue Engineering of the Vascular System** (pp.235-259).
5. B. Millies, F. von Hammerstein, F. Barthels, U. Goppel, U. A. Hellmich and T. Schirmeister, in *20. JungChemikerForum Frühjahrssymposium*, Konstanz, 2018.
6. B. Nutho and T. Rungrotmongkol, *J. Mol. Graph. Model.*, 2019, **92**, 227–235.
7. BORBELY, A. Urban. Expressão de pequenos proteoglicanos ricos em leucemia: decorim e biglicam, em placentas humanas a termo normais e com alterações da invasividade trofoblástica. Dissertação: mestrado. Biologia Celular e Tecidual, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo – USP, 2009.
8. Cardoso, C.W. et al. Outbreak of exanthematous illness associated with zika, chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brazil. *Emerging Infectious Disease*, v. 21, n. 12, p. 2274-6. 2015.
9. 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, fev. 2018.
10. CHAN, J. F. W. et al. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *Journal of Infection*, v. 72, n. 5, p. 507–524, maio 2016.
11. C. Len, S. Bruniaux, F. Delbecq and V. Parmar, *Catalysts*, 2017, **7**, 146.
12. C. Nitsche, C. Steuer and C. D. Klein, *Bioorganic Med. Chem.*, 2011, **19**, 7318–7337.
13. C. Sabot, K. A. Kumar, S. Meunier and C. Mioskowski, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 3863–3866.
14. C. Steuer, C. Gege, W. Fischl, K. H. Heinonen, R. Bartenschlager and C. D. Klein, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 4067–4074.
15. DA SILVA-JÚNIOR, E. F.; DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. Peptide derivatives as inhibitors of NS2B-NS3 protease from Dengue, West Nile, and Zika flaviviruses. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 27, n. 18, p. 3963–3978, set. 2019.
16. D. Aguilera-Pesantes and M. a Méndez, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017, **492**,

- 659–667.
17. DE SOUZA, M. V. Fármacos Inibidores de Fusão: uma Nova Estratégia no Combate à Replicação do vírus VIH. Fundação Oswaldo Cruz. 2005.
 18. D. Lagorce, N. Oliveira, M. A. Miteva and B. O. Villoutreix, *Drug Discov. Today*, 2017, **22**, 1131–1133.
 19. D. Lu, J. Liu, Y. Zhang, F. Liu, L. Zeng, R. Peng, L. Yang, H. Ying, W. Tang, W. Chen, J. Zuo, X. Tong, T. Liu and Y. Hu, *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, **145**, 328–337.
 20. Donald L. Pavia; Gary M. Lampman; George S. Kriz; James R. Vyvyan. **Introdução à Espectroscopia**. Editora Norte-Americana, 2010.
 21. DUARTE, Rafaela Ribeiro; et al. **Previsão *in silico* de propriedades farmacocinéticas de novos híbridos moleculares de hidantoína e ibuprofeno. D. Ciências de Saúde, farmácia, 2013.**
 22. E. F. Silva-Júnior, T. Schirmeister and J. X. Araújo-Júnior, in *Vector-Borne Diseases & Treatment*, Open Access eBooks, Las Vegas, 1st edn., 2018, pp. 1–25.
 23. F. Barthels, Eberhard Karls Universität Tübingen, 2018.
 24. FILHA, Lindomar G. F; SOUZA, Adriana M. P. Evolução da Dengue no mundo. Gestão e Tecnologia. Faculdade Delta. v. 1. 2019.
 25. GARCIA, Leila P. Epidemia do vírus Zika e microcefalia no Brasil: emergência, evolução e enfrentamento. IPEA, 2018.
 26. G. Ali, F. Subhan, N. U. Islam, I. Khan, K. Rauf, Samiullah, M. Abbas and A. Rauf, *J. Chem. Soc. Pakistan*, 2014, **36**, 150–169.
 27. G. M. Morris and M. Lim-Wilby, in *Molecular Modeling of Proteins. Methods Molecular Biology*, ed. A. Kukol, Humana Press Inc., 2008, pp. 365–382.
 28. G1-ALAGOAS. **Alagoas tem 32 casos confirmados de zika em grávidas em 2019.** Disponível em: <<https://g1.globo.com/al/alagoas/noticia/2019/09/12/alagoas-tem-32-casos-confirmados-de-zika-em-gravidas-em-2019.ghtml>>. Acesso em: 10 maio 2022.
 29. G1. **Zika vírus pode estar a um passo de novo surto global.** Disponível em: <https://g1.globo.com/saude/noticia/2022/04/13/zika-virus-pode-estar-a-um-passo-de-novo-surto-global.ghtml>>. Acesso em: 10 maio 2022.
 30. Haddow, A.D. et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Neglected Tropical Disease*, v. 6, n. 2, e1477. 2012.
 31. H. Feinberg, D. A. Mitchell, K. Drickamer and W. I. Weis, *Science (80-.)*, 2001, **294**,

- 2163–2166.
32. H. Maus, F. Barthels, S. J. Hammerschmidt, K. Kopp, B. Millies, A. Gellert, A. Ruggieri and T. Schirmeister, *Bioorg. Med. Chem.*, 2021, **47**, 116392.
 33. H. Xu, B. Di, Y. Pan, L. Qiu, Y. Wang, W. Hao, L. He, K. Yuen and X. Che, *J. Clin. Microbiol.*, 2006, **44**, 2872–2878.
 34. I. A. Rodenhuis-Zybert, J. Wilschut and J. M. Smit, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2010, **67**, 2773–2786.
 35. I. A. Zybert, H. van der Ende-Metselaar, J. Wilschut and J. M. Smit, *J. Gen. Virol.*, 2008, **89**, 3047–3051.
 36. Informe Semanal. Centro de Operações de Emergência. Ed. 02.2024.
 37. INIBIÇÃO e Regulação Enzimática. Disponível em:<
https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalogo/11284016022012bioquimica_aula_11.pdf>. Acesso em: 07 de ago. de 2024.
 38. J. Deng, N. Li, H. Liu, Z. Zuo, O. W. Liew, W. Xu, G. Chen, X. Tong, W. Tang, J. Zhu, J. Zuo, H. Jiang, C. G. Yang, J. Li and W. Zhu, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 6278–6293.
 39. J. D. Martinez, J. A. C. de la Garza and A. Cuellar-Barboza, *Dermatol. Clin.*, 2019, **37**, 95–105.
 40. J. Mlakar, M. Korva, N. Tul, M. Popović, M. Poljšak-Prijatelj, J. Mraz, M. Kolenc, K. Resman Rus, T. Vesnaver Vipotnik, V. Fabjan Vodusek, A. Vizjak, J. Pižem, M. Petrovec and T. Avšič Županc, *N. Engl. J. Med.*, 2016, **374**, 951–958.
 41. K. G. Byler, I. V. Ogungbe and W. N. Setzer, *J. Mol. Graph. Model.*, 2016, **69**, 78–91.
 42. K. Wang, K. Nguyen, Y. Huang and A. Dömling, *J. Comb. Chem.*, 2009, **11**, 920–927.
 43. Lieberman, M., Marks, A.D., Smith, C.M., 2009. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach, 3rd ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
 44. L. De La Cruz, T. H. D. Nguyen, K. Ozawa, J. Shin, B. Graham, T. Huber and G. Otting, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 19205–19215.
 45. L. Lima and E. Barreiro, *Curr. Med. Chem.*, 2005, **12**, 23–49.
 46. LINDENBACH, B.D. & RICE, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. IN: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.). **Virology**. Philadelphia: LippincottRaven Publishers, p. 991-1041, 2007.

47. LI, P.-C. et al. Small Molecules Targeting the Flavivirus E Protein with Broad-Spectrum Activity and Antiviral Efficacy in Vivo. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, p. 460–472, 8 mar. 2019.
48. M. Chhabra, V. Mittal, D. Bhattacharya, U. Rana and S. Lal, *Indian J. Med. Microbiol.*, 2008, **26**, 5–12.
49. MELINO, S.; PACI, M. Progress for dengue virus diseases. Towards the NS2BNS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. **FEBS Journal**, 2007, 274, 2986-3002.
50. M. Govindarajan and G. Benelli, *J. Asia. Pac. Entomol.*, 2016, **19**, 377–385.
51. MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 10, p. 951–958, 10 mar. 2016.
52. MILLIES, B. et al. Proline-Based Allosteric Inhibitors of Zika and Dengue Virus NS2B/NS3 Proteases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 24, p. 11359–11382, 26 dez. 2019.
53. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Dengue - Vigilância Epidemiológica e Atenção ao Doente. 2º edição - Brasília:DEOPE, 1996.
54. M. J. Buskes and M.-J. Blanco, *Molecules*, 2020, **25**, 3493.
55. M. J. Sabir, N. B. S. Al-Saud and S. M. Hassan, *Saudi J. Biol. Sci.*, 2021, 28, 5074–5080.
56. MOLÁS, Rafaela Batista; et al. The involvement of annexin A1 in human placental response to maternal Zika virus infection. **Antiviral Research**, v. 179, p. 104809, jul 2020.
57. M. Perera-lecoin, L. Meertens, X. Carnec and A. Amara, 2014, 69–88.
58. MITTAL, R. et al. Zika Virus: An Emerging Global Health Threat. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, p. 1–19, 8 dez. 2017.
59. M. T. ul Qamar, S. Kiran, U. A. Ashfaq, M. R. Javed, F. Anwar, M. A. Ali and A. ul H. Gilani, *Int. J. Pharmacol.*, 2016, **12**, 621–632.
60. O. Choksupmanee, K. Hodge, G. Katzenmeier and S. Chimnaronk, *Biochemistry*, 2012, **51**, 2840–2851.
61. OLIVEIRA, Wender Antônio de. Zika Vírus: histórico, epidemiologia e possibilidades no Brasil. *Revista de Medicina e Saúde de Brasília*. 2017.
62. P.-C. Li, J. Jang, C.-Y. Hsia, P. V. Groomes, W. Lian, M. de Wispelaere, J. D. Pitts, J. Wang, N. Kwiatkowski, N. S. Gray and P. L. Yang, *ACS Infect. Dis.*, 2019, **5**, 460–472.

63. P. F. da S. Santos-Junior, I. J. dos S. Nascimento, E. C. D. da Silva, K. L. C. Monteiro, J. D. de Freitas, S. de Lima Lins, T. M. S. Maciel, B. C. Cavalcanti, J. de B. V. Neto, F. C. de Abreu, I. M. Figueiredo, J. Carinhonha C. Santos, C. do Ó. Pessoa, E. F. da Silva-Júnior, J. X. de Araújo-Júnior and T. M. de Aquino, *New J. Chem.*, 2021, **45**, 13847–13859.
64. P. Gérardin, G. Barau, A. Michault, M. Bintner, H. Randrianaivo, G. Choker, Y. Lenglet, Y. Touret, A. Bouveret, P. Grivard, K. Le Roux, S. Blanc, I. Schuffenecker, T. Couderc, F. Arenzana-Seisdedos, M. Lecuit and P. Y. Robillard, *PLoS Med.*, 2008, **5**, 0413–0423.
65. PRICE, A. J.; HOWARD, S.; CONS, B. D. Fragment-based drug discovery and its application to challenging drug targets. *Essays in Biochemistry*, v. 61, n. 5, p. 475–484, 8 nov. 2017.
66. R. Martin and S. L. Buchwald, *Acc. Chem. Res.*, 2008, **41**, 1461–1473.
67. R. Kumari, R. Kumar and A. Lynn, *J. Chem. Inf. Model.*, 2014, **54**, 1951–1962.
68. RODRIGUES, Gisele Olinto Libanio. Reatividade Cruzada entre Dengue vírus e outros vírus do gênero *flavivirus*. 2010.
69. S. Bala Murugan and R. Sathishkumar, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2016, **9**, 933–937.
70. Seema and S. K. Jain, *Indian J. Clin. Biochem.*, 2005, **20**, 92–103.
71. SILVA-JÚNIOR, E. F. Synthesis and Biological Evaluation of Dual Compounds Against the NS2B-NS3 Enzyme from Dengue and Zika Viruses and nsP2 from Chikungunya Virus. [s.l.] Federal University of Alagoas, 2019.
72. SIMONI, Isabela C. Tratamentos Antivirais. Instituto Biológico. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal. São Paulo, v.65, n.1/2, p.41-44. 2003.
73. S. Ludewig, M. Kossner, M. Schiller, K. Baumann and T. Schirmeister, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2010, **10**, 368–382.
74. S. Mukhopadhyay, R. J. Kuhn and M. G. Rossmann, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, **3**, 13–22.
75. T. B. Casale, M. N. Teng, J. P. Morano, T. Unnasch and C. J. Lockwood, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, **141**, 482–490.
76. TORRES, Luana Ribas. Infecção pelo vírus Zika de cultura de explantes e células primárias de placenta humana associada a terapia antiviral. **Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2018.
77. U. Bhardwaj, N. Pandey, M. Rastogi and S. K. Singh, *Virology*, 2021, **560**, 86–95.

78. U. S. F. Tambunan, I. Kurniawan and A. A. Parikesit, *African J. Biotechnol.*, 2013, **12**, 4419–4431.
79. VILELA, G. G. et al. Fragment-based design of α -cyanoacrylates and α -cyanoacrylamides targeting Dengue and Zika NS2B/NS3 proteases. **New Journal of Chemistry**. 2022.
80. WANG, L. et al. Development of Small-Molecule Inhibitors Against Zika Virus Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–21, 6 dez. 2019. WHO. Dengue and severe dengue. Disponível em: . Acesso em: 6 jun. 2019.
81. WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews – Microbiology**, 2007, **5**, 518-528.
82. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue hemorrhagic fever, diagnosis, treatment and control. Geneva, Switzerland, 1986.
83. World Health Organization. Neglected tropical diseases. World Health Organization. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases>.
84. W. W. Phoo, A. El Sahili, Z. Zhang, M. W. Chen, C. W. Liew, J. Lescar, S. G. Vasudevan and D. Luo, *Antiviral Res.*, 2020, **182**, 104900.
85. YOON, J. et al. Design, Synthesis, and Anti-RNA Virus Activity of 6'-Fluorinated-Aristeromycin Analogues. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 13, p. 6346–6362, 11 jul. 2019.
86. Y. Tanaka, S. Niwa, H. Nishioka, T. Yamanaka, M. Torizuka, K. Yoshinaga, N. Kobayashi, Y. Ikeda and H. Arai, *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 2071–2078.
87. X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei and M. Cui, *Curr. Comput. Aided. Drug Des.*, 2011, **7**, 146–157.
88. Zanluca, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 4, p. 569–72. 2015.
89. Z. Weng, X. Shao, D. Graf, C. Wang, C. D. Klein, J. Wang and G.-C. Zhou, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **125**, 751–759.