



UFAL

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

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS PEPTIDOMIMÉTICOS
POTENCIALMENTE ATIVOS CONTRA O VÍRUS CHIKUNGUNYA**

Universidade Federal de Alagoas

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

ÉRICA ERLANNY DA SILVA RODRIGUES

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS
PEPTIDOMIMÉTICOS POTENCIALMENTE ATIVOS CONTRA O
VÍRUS CHIKUNGUNYA**

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

Orientador: Prof. Dr. João
Xavier de Araújo Júnior.

Coorientador: 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

- R696s Rodrigues, Érica Erlanny da Silva.
 Síntese e avaliação biológica de compostos peptidomiméticos
 potencialmente ativos contra o vírus chikungunya / Érica Erlanny da Silva
 Rodrigues. – 2024.
 99 f. : il., grafs., tabs. color. + material adicional (123 f.)
- Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.
 Co-orientador: Edeildo Ferreira da Silva Júnior.
 Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto
 de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Química e
 Biotecnologia. Maceió, 2024.
 Inclui material suplementar.
- Bibliografia: f. 74-86.
 Anexos: f. 87-99.
1. Proteases virais. 2. Doenças negligenciadas. 3. Antivirais. 4.
 Peptidomiméticos. 5. Vírus chikungunya. I. Título.

CDU: 663.15:578.833.2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb@iqb.ufal.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Érica Erlanny da Silva Rodrigues** intitulada: **“SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS PEPTIDOMIMÉTICOS POTENCIALMENTE ATIVOS CONTRA O VÍRUS CHIKUNGUNYA”**, apresentada, em sessão aberta, ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 31 de janeiro de 2024, às 13h, na sala de aula da Pós-graduação em Química e Biotecnologia do IQB.

Maceió, 31 de janeiro de 2024.

Comissão Examinadora:

Dr. ALEXANDRE URBAN BORBELY, UFAL
Examinador(a) Externo(a) ao Programa



Documento assinado digitalmente
ALEXANDRE URBAN BORBELY
Data: 02/02/2024 19:59:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO, UFAL
Examinador(a) Externo(a) ao Programa



Documento assinado digitalmente
LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO
Data: 01/02/2024 13:02:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. DIMAS JOSE DA PAZ LIMA, UFAL
Examinador(a) Interno(a)



Documento assinado digitalmente
DIMAS JOSE DA PAZ LIMA
Data: 01/02/2024 10:03:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. MARIO ROBERTO MENEGHETTI, UFAL
Examinador(a) Interno(a)



Documento assinado digitalmente
MARIO ROBERTO MENEGHETTI
Data: 01/02/2024 21:47:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. EDEILDO FERREIRA DA SILVA JUNIOR, UFAL
Coordenador



Documento assinado digitalmente
EDEILDO FERREIRA DA SILVA JUNIOR
Data: 02/02/2024 00:09:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. JOAO XAVIER DE ARAUJO JUNIOR, UFAL
Presidente



Documento assinado digitalmente
JOAO XAVIER DE ARAUJO JUNIOR
Data: 05/02/2024 09:59:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dedico esta tese ao meu pai
José Israel Rodrigues, em razão do seu amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha fortaleza e refúgio nos momentos de dificuldades. Por me conceder o dom da vida e traçar caminhos que julgava inimagináveis. Sou muito agradecida porque mesmo na minha pequenez, Ele nunca me desamparou.

Ao meu pai, meu anjo na terra. Sou eternamente grata por todo carinho, amor e apoio concedido em todos os meus dias. Todas minhas conquistas são atribuídas ao meu pai, José Israel Rodrigues.

A minha mãe, Josefa Maria e meu irmão, José Israel R. Júnior, por todo apoio.

Ao Professor Dr. João Xavier por me conceder a oportunidade de integrar o Laboratório de Química Medicinal desde a minha iniciação científica, pela orientação e ensinamentos transmitidos. Agradeço ainda pelos momentos de compreensão e oportunidades concedidas.

Ao professor Dr. Edeildo Ferreira da Silva-Júnior por me conceder a oportunidade de compor o CPQBioMol, pela paciência e ensinamentos transmitidos desde a minha graduação. Agradeço ainda pelo investimento de suas ideias e acreditar nos “PEPs”.

A minha querida amiga e companheira de trabalho Manuele Figueiredo, por ser meu apoio e “braço direito” na vida acadêmica. Por seu cuidado e atenção com a pesquisa e parceria diária.

Ao meu amigo Igor José dos Santos Nascimento, pela parceria e incentivo. Por acreditar no meu trabalho e por sua paciência típica para sanar minhas dúvidas.

Ao Núcleo de Análises de Produtos por Ressonância Magnética Nuclear – IQB/UFAL, liderado pelo Prof. Thiago Mendonça de Aquino pelas análises realizadas.

A equipe do IMUNOREG, liderada pelo professor Ênio José Bassi, pela parceria e realização dos testes biológicos mesmo diante de tantas dificuldades. Minha gratidão especial as alunas Grazielle Lobo Coelho e Stephannie Janaina pela disponibilidade e dedicação aos ensaios.

Ao pesquisador Andres Merits e sua equipe do instituto de tecnologia da universidade de Tartu-Estônia por seu comprometimento com a ciência e disponibilidade de colaboração com os testes enzimáticos.

Aos professores PPGQB por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos componentes da banca avaliadora pelo interesse, disponibilidade e avaliação desta tese.

À CAPES, CNPq e FAPEAL e demais órgãos pelo financiamento em toda minha trajetória acadêmica.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com minha trajetória.

RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é uma arbovirose do gênero *Alphavirus* transmitida por mosquitos dos gêneros *Aedes* sp. e *Culex* sp., responsável por causar a febre do Chikungunya (CHIKF) que conduz a grandes impactos econômicos e em saúde pública. Ao longo da história, verifica-se que as infecções por CHIKV estão principalmente associadas a países em desenvolvimento, sendo responsável por surtos endêmicos e recorrentes. Entretanto, nas últimas décadas, o CHIKV tem se espalhado globalmente. De modo geral, seu quadro de manifestações clínicas varia desde um estado febril autolimitado até poliartralgia debilitante, que tem sido responsável por significantes impactos na economia da região afeta, uma vez que, seus sintomas podem perdurar por meses ou anos. Neste cenário, os peptidomiméticos se destacam como uma classe química promissora no desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que estes têm sido reportados como inibidores de proteases virais, atuando em concentrações submicromolares. Diante do exposto, esta tese reporta o desenvolvimento de novos agentes antivirais contra CHIKV. Assim, três séries de tri-peptídeos formado pelos aminoácidos glicina (Gly) e leucina (Leu) em 3 diferentes combinações em P1, P2 e P3 foram desenvolvidas em fase sólida. Ao total, foram obtidos 18 tri-peptídeos, dos quais, 6 mostraram efeito contra o CHIKV (CE_{50} 2,2-38 μ M) com $CC_{50} > 200$ μ M. Assim, este trabalho resultou na descoberta dos peptidomiméticos PEP15 e PEP16 inéditos na literatura com o maior efeito antiviral em ensaios *in vitro*. Ainda, uma breve análise *in silico* mostrou que PEP16 é capaz de interagir com resíduos catalíticos da protease nsp2. Dessa forma, este trabalho relata informações importantes sobre o desenvolvimento de novos peptidomiméticos contra o vírus CHIKV, com valiosas informações sobre a relação estrutura atividade desta classe de substâncias.

Palavras-chaves: Proteases virais, doenças tropicais negligenciadas, antivirais, peptidomiméticos, CHIKV.

ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus of the Alphavirus genus transmitted by mosquitoes of the *Aedes* sp. and *Culex* sp., responsible for causing Chikungunya fever (CHIKF) which leads to major economic and public health impacts. Throughout history, it appears that CHIKV infections are mainly associated with developing countries, being responsible for endemic and recurrent outbreaks. However, in recent decades, CHIKV has spread globally. In general, its clinical manifestations range from a self-limiting febrile state to debilitating polyarthralgia, which has been responsible for significant impacts on the region's economy, since its symptoms can last for months or years. In this scenario, peptidomimetics stand out as a promising chemical class in the development of new drugs, since they have been reported as inhibitors of viral proteases, acting at submicromolar concentrations. Given the above, this work seeks to develop new antiviral agents against CHIKV, acting through the inhibition of essential viral proteins during the replication cycle. Thus, three series of tri-peptides formed by the amino acids glycine (Gly) and leucine (Leu) in 3 different combinations in P1, P2 and P3 were developed in solid phase. In total, 18 tri-peptides were obtained, of which 6 showed an effect against CHIKV (EC_{50} 2.2-38 μ M) with $CC_{50} > 200$ μ M. Thus, this work resulted in the discovery of the peptidomimetics PEP15 and PEP16, unpublished in the literature, with the greatest antiviral effect in *in vitro* assays. Furthermore, a brief *in silico* analysis showed that PEP16 is able to interact with catalytic residues of the nsp2 protease. Thus, this work reports important information on the development of new peptidomimetics against the CHIKV virus, with valuable information on the structure-activity relationship of this class of substances..

Keywords: Viral proteases, Neglected tropical diseases, Antivirals, Peptidomimetics, CHIKV

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Família <i>Togaviridae</i>	17
2.2 Gênero <i>Alphavirus</i>	17
2.3 O Vírus Chikungunya.....	17
2.4 Aspectos epidemiológicos: Surgimento e prevalência de CHIKV.....	19
2.5 Patogênese viral e Manifestações clínicas.....	21
2.6 Virologia do CHIKV:	22
2.7 Proteínas Estruturais do CHIKV:	24
2.7.1 Proteínas não-estruturais (nsPs) do CHIKV:.....	25
2.7.2 A proteína não-estrutural 2 (nsP2):	26
2.8 Avanços sobre a busca de antivirais contra CHIKV	28
2.8.1 A importância dos peptidomiméticos como antivirais e contra o CHIK.....	29
3 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	33
3.1 Objetivo geral:	33
3.2 Objetivos específicos:.....	33
4. SEÇÃO EXPERIMENTAL	35
4.1 Reagentes e solventes utilizados:	35
4.2 MÉTODOS:.....	35
4.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia líquida de Média pressão e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):.....	35
4.2.2 Ponto de Fusão:	35
4.2.3 Espectroscopias de RMN ¹ H e RMN ¹³ C:	35
4.2.4 Espectrometria de massas de alta resolução:	36
4.2.5 Procedimento reacional geral para a síntese dos tri-peptídeos:	36
4.3 Ancoragem molecular (Docking):	38
4.4 Avaliações biológicas:	38
4.4. 1 Ensaio de citotoxicidade:	38
4.4.2 Ensaio antiviral:	39
4.4.3 Citometria de fluxo:	40
4.5 Ensaio baseado em FRET direcionado à protease nsP2 de Chikungunya:.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO:	43
5.2 Obtenção dos tri-peptídeos:	44
5.2.1 Mecanismos reacionais propostos na formação dos peptidomiméticos:	44

5.2.2 Caracterização estrutural dos peptidomiméticos	47
5.3 Espectrometria de Massas	58
5.4 Avaliação biológica dos peptidomiméticos	59
5.4 Predição das propriedades físico-químicas do PEP15 e PEP16:.....	64
5.5 Docking molecular sob protease viral nsP2 do vírus CHIKV para PEP16.....	65
5.6 Avaliação do efeito antiviral por citometria de fluxo:.....	66
5.7 Ensaio de tempo de adição de drogas:.....	67
5.8 Ensaio de inibição da protease nsp2	68
ANEXO A- Produções científica publicadas e submetidas durante o doutorado.	87

LISTA DE ABREVIATURAS

Boc – *tert*-butiloxycarbonila
CCD- Cromatografias em camada delgada
CHIKV- vírus Chikungunya
CHIKF- Febre Chikungunya
 λ - Comprimento de onda
 δ – Deslocamento Químico
DIPEA – *N,N*-Diisopropiletilamina
DENV- Vírus da dengue
DMF – *N,N*-Dimetilformamida
ECDC- European Centre for Disease Prevention and Control
EEEV- Vírus da Encefalite Equina
Fmoc – Fluorenilmetiloxycarbonil
HBTU – [*benzotriazol-1-yloxy(dimethylamino)methylidene*]-dimethylazanium hexafluorophosphate
Hz- Hertz
HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)
MS – Espectrometria de Massa
nsPs- proteínas não-estruturais
ONNV -vírus O’Nyong–Nyong
ORFs- Open reading frames
Ppm- Partes por milhão
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
REA_ Relação estrutura-atividade
RRV -vírus Ross River
SINV- Vírus Sindbis
SFV- Vírus da Floresta de Semliki
TFA – Ácido Trifluoroacético
TIPS – Triisopropilsilano
VEEV- Vírus Encefalite Equina Venezuelana
WEEV -Vírus da Encefalite Equina Ocidental

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de transmissão de CHIKV.....	18
Figura 2: Distribuição espaço-temporal de CHIKV no Brasil entre 2013-2022.	20
Figura 3: Virologia do vírus CHIKV. A: partícula viral do vírus CHIKV, B: Representação das proteínas virais. C: Genoma viral.	22
Figura 4: Replicação do vírus CHIKV.	24
Figura 5: Representação protease nsp2 e seus bolsos de ligação.	27
Figura 6: Suposto mecanismo de catálise desenvolvida pela protease nsp2.	28
Figura 7: Fármacos peptidomiméticos inibidores de proteases virais.	29
Figura 8: Peptídeos inibidores da protease nsP2 de CHIKV.....	30
Figura 9: esquema geral da síntese dos peptidomiméticos.....	37
Figura 10: Esquematização da seleção dos peptidomiméticos desenvolvidos.	44
Figura 11: Proposta de mecanismo simplificado para remoção do grupamento protetor (Fmoc).	45
Figura 12: Proposta de mecanismo simplificado para o acoplamento entre aminoácidos usando TBTU.	46
Figura 13 Microscopia óptica da inibição do efeito citopático viral observada pós-tratamento com as maiores concentrações avaliadas de PEP15 e PEP16.	63
Figura 14: Principais informações de REA dos peptidomiméticos desenvolvidos.	64
Figura 15: Diagrama 2D para as principais interações entre o inibidor da nsP2 e PEP16.	65
Figura 16: Encaixe e interações do PEP16 no sítio ativo da nsp2 (PDB ID: 3TRK).....	66
Figura 17: Avaliação da atividade anti-CHIKV dos peptídeos através de citometria de fluxo.....	67
Figura 18: Ensaio de tempo de adição de droga.....	68
Figura 19: Inibição dos peptídomiméticos sob a protease nsP2.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização dos peptídeos por HPLC-ESI-HRMS	59
Tabela 2: Perfil citotóxico e antiviral <i>in vitro</i> dos peptidomiméticos da série I (Leu-Gly-Gly).....	60
Tabela 3: Perfil citotóxico e antiviral <i>in vitro</i> dos peptidomiméticos da série II (Gly-Gly-Leu) com substituintes aromáticos em C-terminal.....	61
Tabela 4: Perfil citotóxico e antiviral <i>in vitro</i> dos peptidomiméticos da série II (Gly-Gly-Leu) com substituintes derivados do ácido cinâmico em C-terminal.	62

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os Arbovírus (do *inglês*, *arthropod-borne virus*) são caracterizados por uma transmissão mediada por insetos hematófagos responsáveis por doenças de grande impacto na saúde pública mundial (Donalisio et al., 2017). A emergência e reemergência das arboviroses resultam em inúmeros surtos a nível global e desde o início do século XXI, infecções associadas aos vírus Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) têm mudado a epidemiologia associada às doenças virais (Huang et al., 2019; Liu et al., 2020).

Dentre os arbovírus causadores de doenças em humanos e animais, as famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Peribunyaviridae* e *Phenuiviridae* se destacam em razão da incidência e prevalência das infecções que causam. Neste contexto, o gênero *Aedes* está diretamente associado a transmissões urbanas de arboviroses (Halstead, 2018; Huang et al., 2019; Skalinski et al., 2022). De fato, os arbovírus Dengue (DENV), CHIKV e ZIKV exibem um ciclo que não depende exclusivamente de uma fase enzoótica e circulam com facilidade para produzir epidemias urbanas por intermédio do homem como hospedeiro vertebrado em resultado da extensa urbanização tropical (Donalisio et al., 2017; Weaver & Reisen, 2010).

Embora as infecções por CHIKV não estejam associadas a altos índices de mortalidade, cerca de 60% dos pacientes desenvolvem o quadro crônico caracterizado por poliartralgia e/ou poliartrite persistente. Este quadro clínico, por sua vez, pode culminar em limitações severas aos pacientes e, além disto, complicações neurológicas como a síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalite, encefalite e infecções congênitas também têm sido reportadas (Abdelnabi et al., 2017; Durães-Carvalho et al., 2018). Apesar do quadro epidemiológico significativo e dos esforços direcionados ao desenvolvimento de antivirais específicos, não há, até o presente momento, uma terapêutica eficaz e específica aprovada contra este vírus, sendo empregado apenas tratamentos voltados ao alívio dos sintomas (ABDELNABI et al. 2020; GHILDIYAL; GABRANI 2020; SILVA-JÚNIOR; ARAÚJO-JÚNIOR 2019; SILVA-JÚNIOR et al. 2017). Além disto, estratégias que objetivam combater os vetores vêm sendo amplamente estudadas e aplicadas para o controle da transmissão destas arboviroses (SILVA-JÚNIOR et al. 2017; SILVA-JÚNIOR; SCHIRMEISTER; ARAÚJO-JÚNIOR, 2018).

O estado da arte que reflete na busca terapêutica eficaz contra CHIKV envolve a exploração de diferentes estratégias, que vão desde a busca de pequenas moléculas

inibidoras de diferentes etapas da replicação viral (p. ex. proteínas estruturais e não estruturais do vírus), como estratégias de silenciamento gênico, reposicionamento de fármacos e anticorpos monoclonais (Silva-Júnior et al., 2017b; Ghildiyal & Gabrani, 2020a; Rodrigues et al., 2021; L. R. Silva et al., 2022).

Dentre as proteínas estruturais e não estruturais do CHIKV, a protease nsP2 representa a maior proteína não estrutural do vírus e apresenta um papel crucial no processo de replicação viral, uma vez que dentre suas funções, participa do processamento da poliproteína (P₁₋₄) viral que compõe o processo de replicação viral. Assim, sua função essencial para o ciclo de viral torna a nsP2 um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos.

Os compostos peptidomiméticos surgem como uma excelente alternativa na descoberta de fármacos com ação sobre proteases (Muri, 2014). É possível notar sua grande relevância estrutural sobre doenças virais com efeitos em doses micromolares e sub-micromolares, sobretudo contra ZIKV (Kuiper et al., 2017; Wint et al., 2018), DENV (Behnam et al. 2015; Silva-Júnior and de Araújo-Júnior 2019) e CHIKV (H. Singh et al., 2018).

Dessa forma, a presente tese de doutorado expõe os primeiros avanços em relação ao desenvolvimento de compostos peptidomiméticos sintéticos planejados contra protease de nsP2 de CHIKV. Assim, duas séries de tripeptídeos formados por combinações de aminoácidos Leu e Gly foram sintetizados e avaliados biologicamente em ensaios baseados em células (*in vitro*). Estes avanços nos permitiram identificar pequenos peptídeos sintéticos potentes contra CHIKV.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Família *Togaviridae*

Togavirus compreende uma família de pequenos vírus envelopados (cerca de 60-70 nm de diâmetro) que apresentam o genoma de RNA de fita dupla positiva. A família *Togaviridae* é representada por dois gêneros, denominados *Alphavirus* e *Rubivirus*, que apresentam transmissão mediada por insetos hematófagos ou por aerossóis, respectivamente (Baxter & Heise, 2018; Galán-Huerta et al., 2015).

O gênero *Rubivirus* é representado unicamente pelo vírus da rubéola, também denominado vírus do sarampo alemão. Em especial, o vírus da rubéola tem o potencial de causar efeitos congênitos graves em infecções durante a gestação (Baxter & Heise, 2018; Galán-Huerta et al., 2015).

2.2 Gênero *Alphavirus*

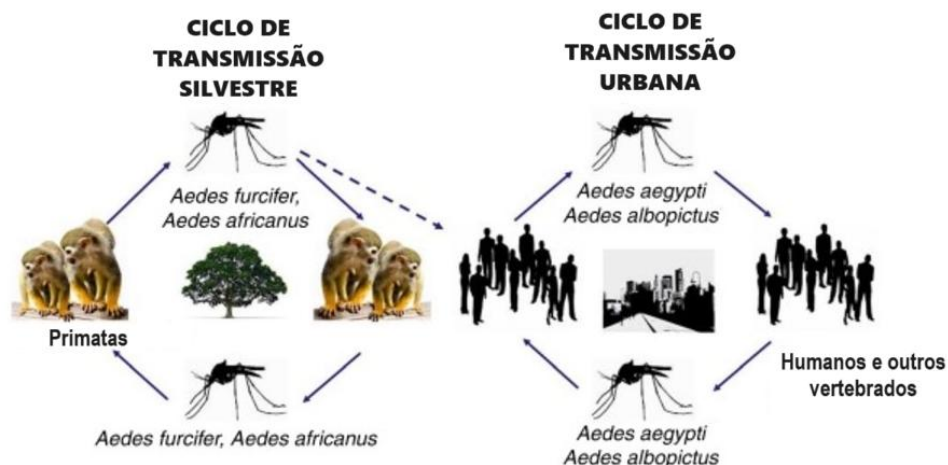
Os *Alphavirus* compreendem um gênero de vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus) e, de acordo com a região geográfica dos quais foram isolados, bem como, em relação à síndrome que manifestam em humanos, são classificados como viroses de “Velho Mundo” ou “Novo Mundo” (Baxter & Heise, 2018). As infecções causadas pelos vírus do “Velho Mundo” envolvem quadros clínicos que se manifestam por febre, erupção cutânea e doenças reumáticas como poliartralgia e poliartrite. Assim, dentre os *Alphavirus* do “Velho Mundo” estão o vírus Chikungunya (CHIKV), vírus Ross River (RRV), Vírus Sindbis (SINV), Vírus da Floresta de Semliki (SFV), vírus O’Nyong–Nyong (ONNV) (Levi & Vignuzzi, 2019). A circulação destes vírus já foi reportada na Europa, Ásia, África, Ásia e Américas (Baxter & Heise, 2018; Galán-Huerta et al., 2015).

Por outro lado, as infecções causadas por *Alphavirus* do “Novo Mundo” são representadas pelos Vírus da Encefalite Equina (EEEV), Vírus Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) e Vírus da Encefalite Equina Ocidental (WEEV), que de um modo geral, caracterizam-se sua capacidade de causar encefalites em humanos. Embora SFV e CHIKV também resultem em infecções que evoluam para encefalites (Ganesan et al., 2008; Willems et al., 1979). De um modo geral, estes *Alphavirus* são predominantemente encontrados nas Américas.

2.3 O Vírus Chikungunya

Com base no dialeto KimaKonde (ou Makonde), Chikungunya significa “*aquele que se dobra*” termo usado para descrever a postura encurvada desenvolvida em razão da inflamação articulares, um dos principais sintomas decorrentes da infecção por este vírus (Levi & Vignuzzi, 2019; Lumsden, 1955; Robinson, 1955). Assim, CHIKV é o agente etiológico da febre Chikungunya (CHIKF), uma doença transmitida por artrópodes (*arthropod-borne disease*) (Weaver, 2006). A transmissão do CHIKV é marcada por dois ciclos de vida (Figura 1): I) ciclo silvestre (animais-mosquito-homem), ocorrendo entre primatas não humanos como macacos e chimpanzés através de vetores *Aedes africanus*, *A. furcifer-taylori*, *A. dalzieli* e *Culex* sp., e II) ciclo urbano, transmitido entre humanos-mosquito-humanos através dos vetores *A. aegypti*, *A. Albopictus* e *Aedes furcifer* (Alonso-Palomares et al., 2018; Althouse et al., 2018; Barr & Vaidhyathan, 2019; Diallo et al., 2012; Tsetsarkin et al., 2016).

Figura 1: Ciclo de transmissão de CHIKV.



Fonte: Fernandez e Navarro, 2015

As evoluções dos estudos genômicos permitiram agrupar o nomear as cepas de CHIKV envolvidas em infecções em determinadas regiões geográficas (Silva et al., 2018a). Dessa forma, baseadas em sequências gênicas da proteína do envelope (E1), existem três principais genótipos identificados deste vírus, a saber: linhagem da Centro-Leste Sul Africana (*East-Central-Southern African- ECSA*), Asiática (*Asian*) (incluindo a linhagem do oceano Índico) e Oeste Africana (*WA*). Ainda, uma quarta linhagem semelhante à *ECSA*, denominada linhagem do oceano Índico foi reportada. Esta se refere

à ECSA com uma mutação A226V da glicoproteína de envelope E1 de CHIKV (Kumar et al., 2021; Powers et al., 2001; Volk et al., 2010; Wahid et al., 2017b).

2.4 Aspectos epidemiológicos: Surgimento e prevalência de CHIKV.

CHIKV foi isolado de um soro de paciente pela primeira vez no sul da Tanzânia, durante um surto semelhante à dengue, com dores que acometiam as articulações, entre 1952-1953 (Casals & Whitman, 1957; Johnson et al., 1977; Robinson, 1955). Logo em seguida à sua identificação na África, CHIKV foi detectado no Sul Ásia.

De fato, a partir do seu isolamento na África, o CHIKV foi transmitido globalmente. Atualmente, seus casos de infecções já foram documentados em diferentes países da Europa e Américas (Sharif et al., 2021). Durante as epidemias, sugere-se que as infecções podem ter sido documentadas de forma imprecisa, com subnotificações devido aos sintomas serem semelhantes aos causados pelo vírus da dengue (Brighton & Simson, 1984; Sharif et al., 2021; L. A. Silva & Dermody, 2017).

Antes dos anos 2000, o CHIKV circulava majoritariamente em países da África como Nigéria (Tomori et al., 1975), República Democrática do Congo (Muyembe-Tamfum et al., 2003), Angola (Filipe & Pinto, 1973) e Senegal (Saluzzo et al., 1983), bem como, no Sudeste Asiático, como no Vietnã (Vu-Qui-Dai & Kim-Thoa, 1967), Índia (Munasinghe et al., 1966; SHAH et al., 1964), Tailândia (Thaikruea et al., 1997), Indonésia (Porter et al., 2004) e Sri-Lanka (Munasinghe et al., 1966). Assim, o CHIKV permaneceu endêmico em diversos países do Sul da Ásia desde a década de 60 e cerca de 85% dos casos infecções por este Alphavírus ainda foram detectados após os anos 2000, dentre os quais, a Índia foi uns dois países mais afetados. No entanto, o surgimento e ressurgimento de CHIKV sempre foram associados e influenciados pela circulação do vírus na África.

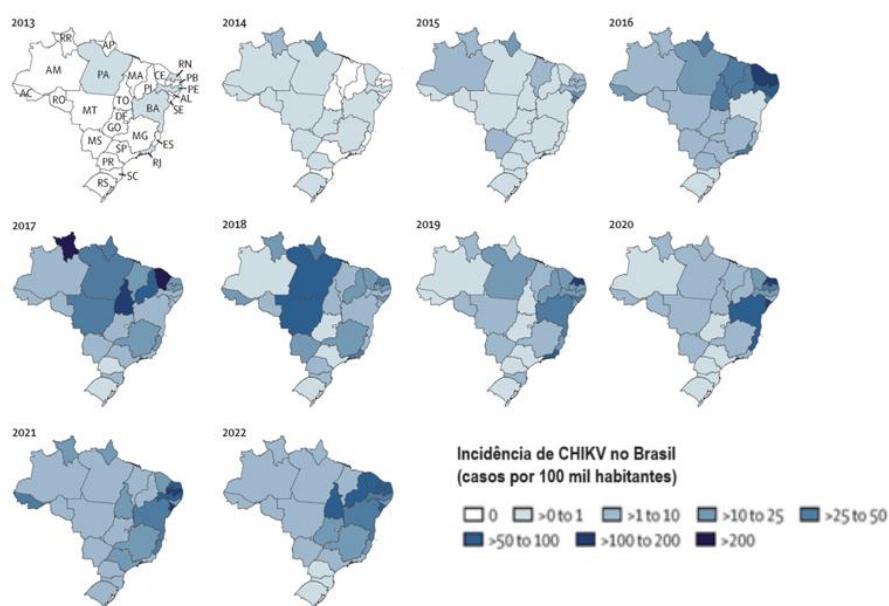
O primeiro surto de grandes proporções ocorreu em 2004 na costa do Quênia, que culminou na transmissão através das ilhas do oceano Índico. Na ocasião, foram documentados mais de 500 mil casos (1/3 da população) da Ilha de La Reunion. A primeira infecção na Europa ocorreu em 2007, na Itália, ao passo que a primeira transmissão autóctone nas Américas ocorreu em 2013, que logo se disseminou (Sambri et al., 2008). Embora, em 2015 o ECDC (Centro Europeu de Prevenção Controle de Doenças- do inglês, European Centre for Disease Prevention and Control) tenha reportado um declínio dos casos de CHIKV, nas Américas mais de 37 mil casos foram confirmados.

Em 2017, dos mais de 140 mil casos confirmados, junto com Colômbia e Bolívia, o Brasil notificou a maior parte dos casos (WHO, 2022).

A partir de 2020, surtos locais e autóctones foram relatados em cerca de 114 países e territórios com milhões de casos relatados em países da América latina como o Brasil, Cuba, Argentina, Equador, Peru e Bolívia. De fato, desde sua chegada nas américas, mais de 2 milhões de casos suspeitos foram atribuídos a cerca de 50 países deste continente (WHO, 2022).

No Brasil, verifica-se que os picos de casos de infecções ocorrem entre fevereiro e junho em concordância com o aumento de temperatura e estação chuvosa. Uma análise epidemiológica temporal entre 2013 e 2022, aponta mais de 250 mil casos (com incidência de 44 mil casos anuais) notificados ao ministério da saúde do Brasil após confirmação laboratorial. Com sete ondas epidêmicas bem caracterizadas, o nordeste brasileiro compreendeu a região mais afetada por CHIKV, dos quais, 63,5% dos casos notificados do território brasileiro foram atribuídos a esta região neste espaço de tempo. A figura 2 ilustra a evolução da incidência de casos no Brasil nos últimos 10 anos fornecendo um panorama geral da evolução dos aumentos de casos em todo território brasileiro ao decorrer dos anos e com concentração destacada na região Nordeste a partir de 2020 (Souza et al, 2023).

Figura 2: Distribuição espaço-temporal de CHIKV no Brasil entre 2013-2022.



Fonte: Souza et al, 2023.

2.5 Patogênese viral e Manifestações clínicas

Após a inoculação subcutânea de CHIKV durante a picada dos mosquitos infectados (hematófagos), precede-se um período de pré-incubação de 4-7 dias (Paul & Sadanand, 2018). Nesta condição, os vírus se disseminam pelos linfonodos, com auxílio das células de Langherans e na microvasculatura. A fase aguda da infecção envolve a replicação viral em conjunto uma resposta inflamatória mediada por macrófagos, linfócitos e outros leucócitos nos tecidos-alvos (Paul & Sadanand, 2018).

Embora as infecções por CHIKV possam ser assintomáticas em 5-15% dos casos (Galán-Huerta et al., 2015), 50-97% dos indivíduos infectados desenvolvem sintomas clínicos com a febre Chikungunya (CHIKF) ou artralgia (Ayu et al., 2010; Nakkhara et al., 2013; Staples et al., 2009). De modo geral, as manifestações clínicas associadas ao CHIKV se manifestam por sintomas agudos, crônicos e ainda atípicos (J. V. J. Silva et al., 2018b).

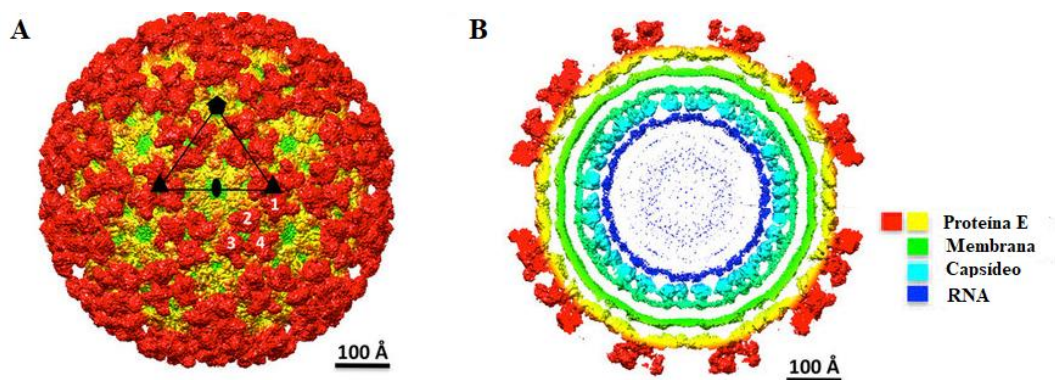
As manifestações agudas normalmente duram em torno de duas semanas e se associam a uma doença febril, mialgia, fadiga, cefaleia, manifestações cutâneas, astenia, artralgia e a poliartralgia dolorosa (Ziegler et al., 2008). Em menor prevalência, é possível ainda o aparecimento de astenia, eritema e conjuntivite. Os quadros crônicos são representados por poliartralgia e/ou poliartrite que afetam pequenas articulações como punhos e falanges, além de grandes articulações como tornozelos, ombros e joelhos. É digno de nota que, a poliartralgia tem caráter persistente e pode permanecer durante semanas, meses ou ainda anos nos indivíduos infectados. De fato, esta característica debilitante faz com que este vírus seja alvo de políticas públicas para o desenvolvimento de estratégias de controle e tratamento.

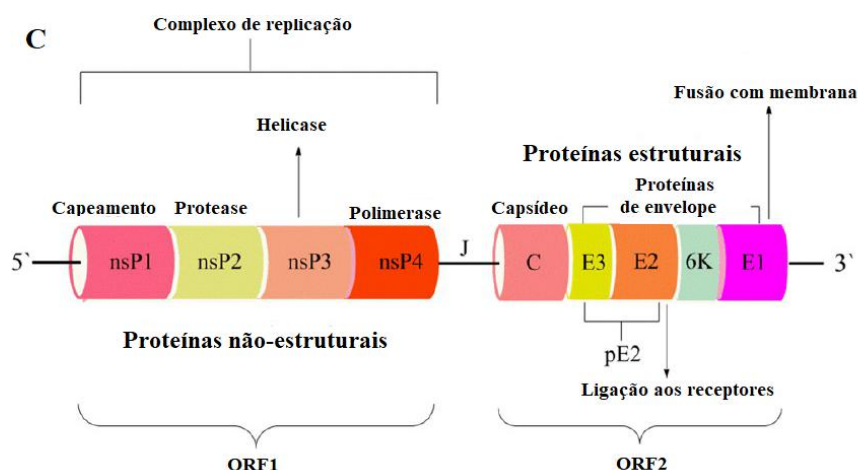
As manifestações atípicas das infecções por CHIKV incluem a síndrome de Guillain-Barré, uma polineuropatia desmielinizante inflamatória que está relacionada a outras infecções virais, como as causadas pelo vírus da dengue (DENV) e Zika (ZIKV). Além disto, distúrbios cardíacos, gastrointestinais, bem como apneia, edema cerebral, encefalite neuropatia periférica, mielopatia, mieloneuropatia e hemorragia são reportados (Daginawala et al., 2009). Infecções oculares também já foram reportadas (Nair et al., 2012).

2.6 Virologia do CHIKV:

O genoma do CHIKV compreende uma fita simples de RNA de sentido positivo ((+)ssRNA) com cerca de 11,8Kb (~11.805 nucleotídeos) de tamanho (Khan et al., 2002; S. K. Singh & Unni, 2011). Cerca de 240 cópias de proteínas do capsídeo (C) formam o núcleocapsídeo que envolve o genoma viral. O vírion maduro de CHIKV apresenta cerca de 70 nm de diâmetro e possui um envelope derivado de membrana da célula hospedeira ao qual estão fixadas trímeros compostos por heterodímeros de glicoproteínas de superfície E1 e E2 (Rashad et al., 2014; Sharma et al., 2018) (Figura 3A e 3B). Dessa forma, O RNA de CHIKV é composto por dois quadros de leituras abertos (*Open reading frames- (ORFs)*), que codificam as proteínas não-estruturais (nsP1-4) e as proteínas estruturais (C-E3-E2-6K/TF-E1), que são associados a tradução da região 5' ORF por um RNA genômico e da tradução da extremidade 3' do RNA subgenômico, respectivamente (Figura 3 C). Entre as duas ORFs se encontra uma região não traduzida (J) composta por 21 nucleotídeos que é responsável pela transcrição de mRNA subgenômico. O precursor nsP1-4 forma um complexo para síntese de RNA de fita negativa (Jose et al., 2017; Rashad & Keller, 2013).

Figura 3: Virologia do vírus CHIKV. A: partícula viral do vírus CHIKV, B: Representação das proteínas virais. C: Genoma viral.

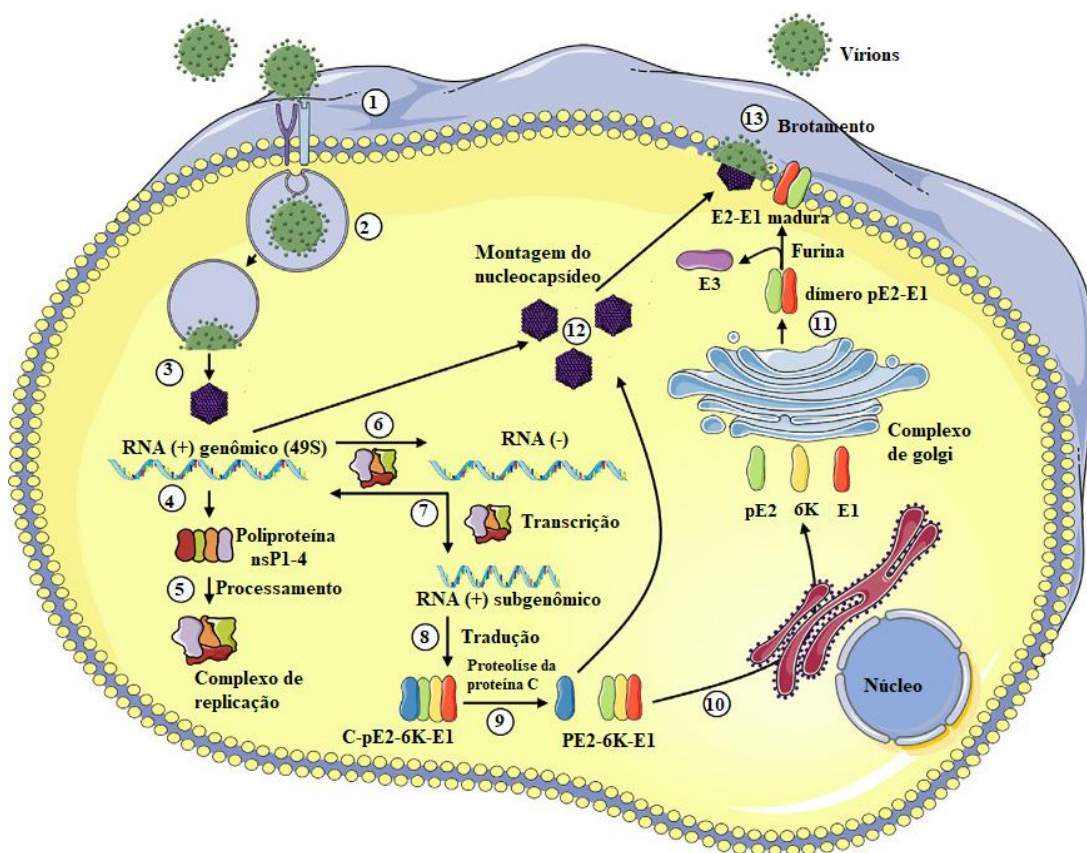




Fonte: Adaptado de Yap et al, 2017.

O CHIKV é capaz de infectar e replicar em células epiteliais, macrófagos, monócitos, células endoteliais e fibroblastos. Nestas, o processo de infecção (Figura 4) se inicia com a fixação das partículas virais na superfície de células hospedeiras que apresentam lectinas do tipo C, glicosaminoglicanos, MXRA8, DC-SIGN, L-SIGN, proibitina e receptores de fosfatidilserina. A interação da glicoproteína do envelope viral E2 com estes receptores permite a internalização viral por um processo de endocitose mediado por clatrina. No ambiente ácido no interior da vesícula endocítica induz dissociação do heterodímero da proteína de envelope E2-E1 e permite a fusão viral a membrana das células hospedeiras no processo mediada pela glicoproteína E1. Em seguida, o nucleocapsídeo viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira, desmontado e o RNA viral é liberado. O RNA genômico é então traduzido a uma poliproteína precursora das proteínas não estruturais (nsP1-nsP4). Estas proteínas formam o complexo de replicação viral que sintetizam o RNA de fita negativa. Quando os níveis de nsP1-nsP4 se elevam, são clivadas e formam o RNAs subgenômicos e genômicos. Então, na etapa subsequente, o RNA subgenômico é traduzido a uma poliproteína precursora das proteínas estruturais (C-pE2-6K-E1). A proteína do capsídeo C é clivada e pE2-6K-E1 é processado no retículo endoplasmático e pE2 e E1 migram para o aparelho de Golgi e, em seguida, para a membrana celular. Por fim, pE2 é clivado por proteases do tipo furina e E2 e E3 maduras são formadas. O nucleocapsídeo é formado e novas partículas virais brotam das células hospedeiras (Rodrigues et al., 2021).

Figura 4: Replicação do vírus CHIKV.



Fonte: Rodrigues et al., 2021. *Replicação de CHIKV nas células hospedeiras: 1-Ligação da proteína E2 à superfície das células hospedeiras através de receptores como glicosaminoglicanos; 2-entrada de CHIKV por endocitose mediada por clatrina; 3-acidificação do endossomo, fusão da proteína E1 a membrana endossomal e liberação do capsídeo no citosol; 4-liberação do RNA (+) genômico e tradução da poliproteína nsP1-4; 5-Clivagem da poliproteína e formação da replicase viral; 6-formação do RNA(-); 7-associação da nsp1-4 ao RNA (+) genômico para formação do RNA (-); 8-tradução do RNA(+) subgenômico para produção da poliproteína estrutural; 9-autoproteólise do capsídeo; 10- translocação das poliproteínas E2-6K-E1 para o retículo endoplasmático; 11- A proteína E2/E1 são modificadas e transitam para liberação; 12-O nucleocapsídeo se reúne á E2/E1 no complexo de golgi e, 13-brotamento dos vírions maduros.*

2.7 Proteínas Estruturais do CHIKV:

As proteínas estruturais de CHIKV são as proteínas que compõem o envelope, denominadas (E3-E2-E1), proteína do capsídeo (C) e as pequenas proteínas de clivagem

denominados E3 e 6K (Rashad & Keller, 2013; L. R. Silva et al., 2022). Essas proteínas formam a estrutura viral e são cruciais para os processos que envolvem o reconhecimento dos receptores celulares, entrada viral e fusão com a membrana das células hospedeiras, formação do nucleocapsídeo e brotamentos de vírions (Metz & Pijlman, 2016).

A proteína do capsídeo (C) é composta por dois domínios denominados *N*-terminal, que se liga ao RNA genômico, e *C*-terminal, que possui atividade proteolítica. Assim, esta proteína além de exercer efeitos sob a transcrição do hospedeiro, possui uma atividade autoproteolítica que a separa da poliproteína precursora (Aliperti & Schlesinger, 1978; LINGER et al., 2004; Sharma et al., 2018).

A glicoproteína E1 apresenta 3 domínios (I, II, III), dentre os quais o *loop* de fusão está localizado e, assim, está envolvida no processo de fusão de CHIKV a membrana da célula hospedeira. Assim como E1, a glicoproteína E2 apresenta 3 domínios (A, B, C) e tem como função principal de promover a ligação dos vírus a receptores celulares, mas também interagem com um domínio específico da proteína C para possibilitar a montagem da partícula viral (Abdelnabi et al., 2015; L. R. Silva et al., 2022; Voss et al., 2010). A pequena proteína E3 está envolvida na formação do heterodímero p62-E1, na manutenção do domínio A e B da glicoproteína E2 no processo de fusão viral durante a replicação de CHIKV, bem como para a translocação das poliproteínas E3-E2-6K-E1 ou E3-E2-TF do retículo endoplasmático para montagem das partículas virais (Rodrigues et al., 2021; L. R. Silva et al., 2022; Voss et al., 2010).

A proteína 6K (6000 Kb) está envolvida nos processos de permeabilidade a íons e cátions pela membrana celular da célula hospedeira, além de participar da translocação da glicoproteína E1 do retículo endoplasmático, nos processos de montagem e brotamento dos vírions (Gaedigk-Nitschko et al., 1990; Loewy et al., 1995; Melton et al., 2002; Sharma et al., 2018; Yao et al., 1996).

2.7.1 Proteínas não-estruturais (nsPs) do CHIKV:

As proteínas não-estruturais apresentam um papel crucial no processo de replicação viral, uma vez que a formação do complexo de replicação é formado por nsP1-nsP4 de CHIKV (da Silva-Júnior et al., 2017a; Rashad et al., 2014; Solignat et al., 2009a). A nsP1 (55 aminoácidos) apresenta funções de metiltransferase e guanililtransferase,

promovida pela região *N*-terminal. Desta forma, esta proteína participa do capeamento e metilação de RNA genômicos ou subgenômicos (Fros et al., 2010; Solignat et al., 2009b). A nsP3 (673 aminoácidos) apresenta 2 domínios e função de helicase, bem como, auxilia no processo de síntese de RNA viral (Rashad et al., 2014). Por fim, a RNA-dependente da RNA polimerase (nsP4) (Bhakat et al., 2014), que possui atividade de adenililtransferase.

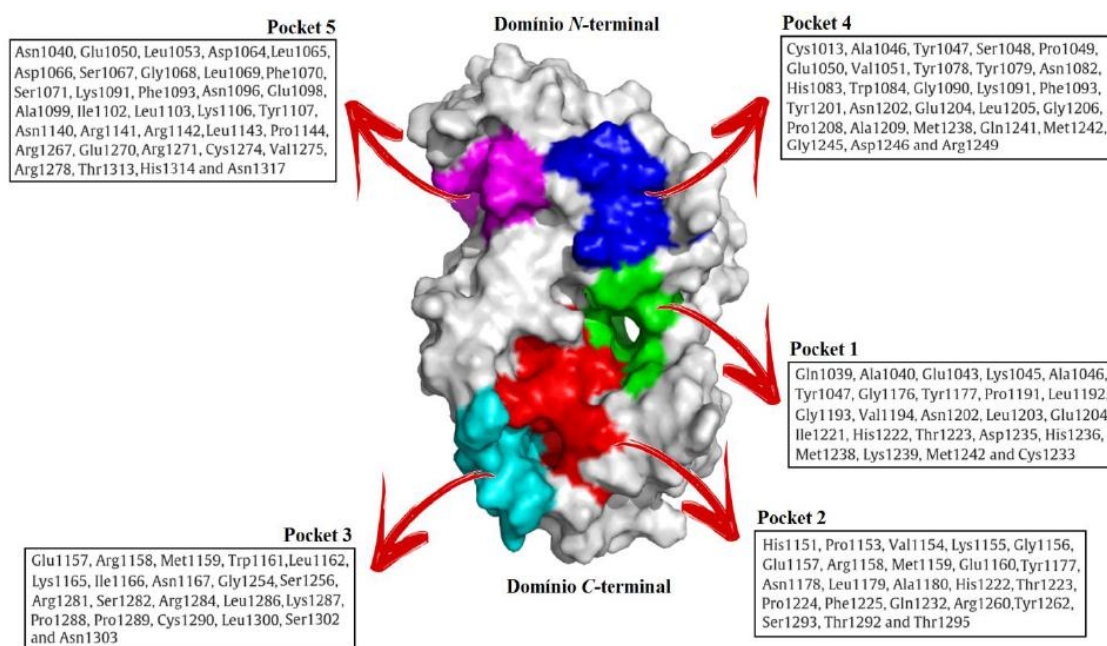
2.7.2 A proteína não-estrutural 2 (nsP2):

A proteína nsP2 é a maior proteína não-estrutural dos *Alphavírus*, que é uma enzima multifuncional (Khan et al., 2002; Pastorino et al., 2008). As funções de RNA helicase, 5'-trifosfatase dependente de RNA, nucleosídeo trifosfatase (GTPase e ATPase) são atribuídos ao domínio *N*-terminal desta proteína, ao passo que a função proteolítica (nsP2^{pro}) no processamento da poliproteína viral (P1234), síntese do RNA subgenômico, regulação da síntese de RNA de fita negativa são atribuídas ao domínio C-terminal (Gould et al., 2010; Pastorino et al., 2008). Estas atividades essenciais, tornam a nsP2 um alvo potencial para desenvolvimento de fármacos anti-CHIKV.

Com a identificação da estrutura cristalina de nsP2 (PDB ID: 3TRK), estudos computacionais puderam elucidar aspectos morfológicos desta importante proteína viral. Esta proteína apresenta cinco bolsos de ligação, sendo o bolso quatro o mais importante, uma vez que este é responsável pelo efeito proteolítico desta enzima e apresenta a díade catalítica Cys¹⁰¹³ e His¹⁰⁸³ (Nguyen et al., 2015) (Figura 5). Assim, estudos demonstraram que a função do processamento da poliproteína e a infectividade viral está associada à cisteína, de forma que uma mutação dentre resíduo por alanina é responsável por abolir completamente a atividade proteolítica da nsP2 e a replicação do RNA viral (Rausalu et al., 2016).

A nsP2^{pro} é capaz de clivar a poliproteína precursora, as proteínas não-estruturais nos sítios nsp3/nsp4, nsp1/nsp2 e nsp2/nsp3, nesta ordem de preferência. O sítio de clivagem entre nsP3/nsP4 é composto pelos resíduos ^{P4}RAGGY ^{P1'} e responsável pela atividade catalítica. Além disto, o resíduo de glicina na posição P2 tem sido sugerido como fundamental para o reconhecimento de substratos pela nsP2^{pro} (Dhindwal et al., 2017a; Lulla et al., 2006).

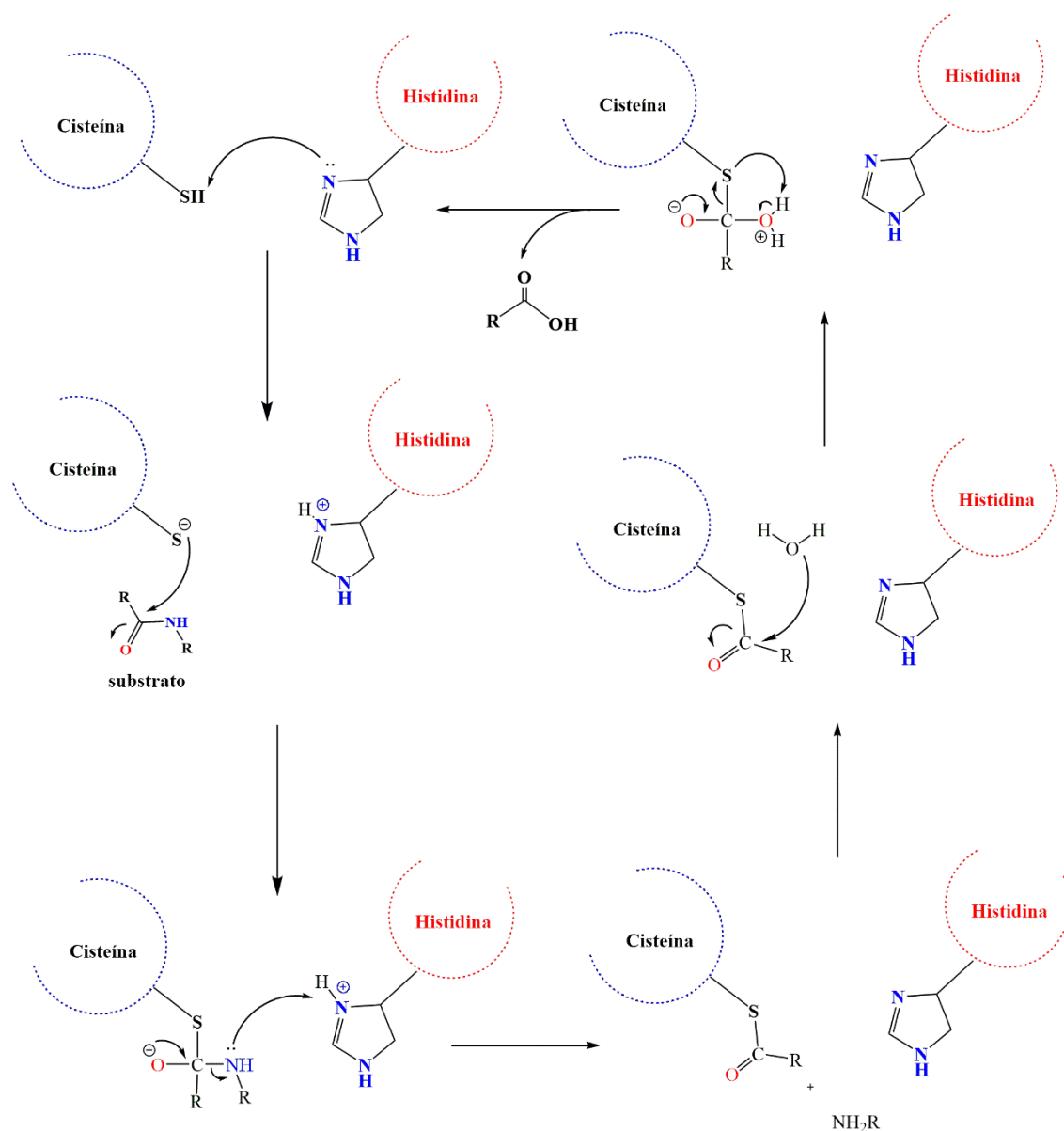
Figura 5: Representação protease nsp2 e seus bolsos de ligação.



Fonte: Silva-Júnior, 2019.

A função de cisteína protease que é responsável pela clivagem da poliproteína viral é uma etapa crucial para a replicação viral e envolve um mecanismo mostrado na figura 6. Incialmente, o grupo tiol da cisteína sofre uma desprotonação por intermédio da cadeia básica da histidina adjacente. Desprotonada, a cisteína promove um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do substrato, a histidina é restaurada ao estado não protonado, enquanto a parte *N*-terminal do substrato é clivada. O intermediário tioéster é hidrolisado e a cisteína é restaurada (Russo et al., 2010; Tomar & Aggarwal, 2017).

Figura 6: Suposto mecanismo de catálise desenvolvida pela protease nsp2.



Fonte: Autora, 2024.

2.8 Avanços sobre a busca de antivirais contra CHIKV

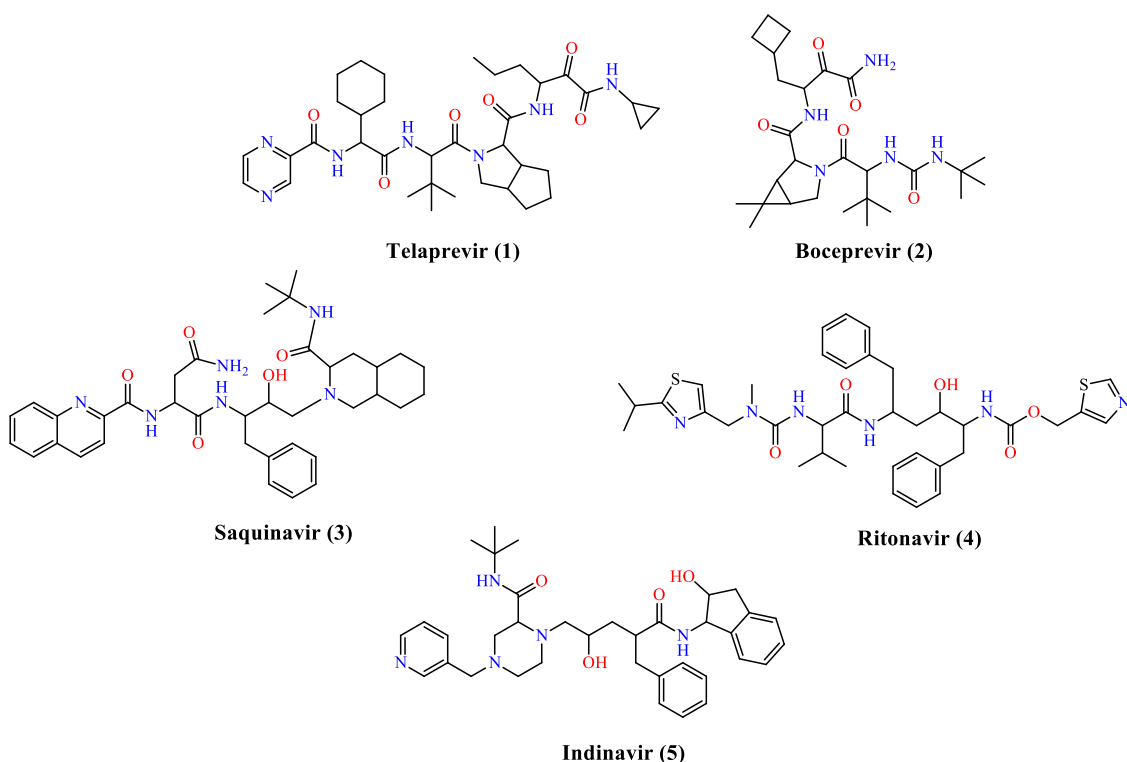
Apesar dos avanços na busca de novos agentes antivirais específicos contra CHIKV, incluindo estratégias imunológicas como vacinas, os tratamentos atuais são inespecíficos e focados no alívio dos sintomas (DA SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2017; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015; WAHID *et al.*, 2017; ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2017; DURÃES-CARVALHO *et al.*, 2018). Diferentes abordagens têm sido utilizadas nos processos de descoberta e desenvolvimento de compostos anti-CHIKV, tais

como reposicionamento de fármacos, anticorpos monoclonais, silenciamento de genes e inibidores que visam diferentes estruturas do ciclo viral (Ghildiyal & Gabrani, 2020b; Levi & Vignuzzi, 2019).

2.8.1 A importância dos peptidomiméticos como antivirais e contra o CHIK

Os peptidomiméticos, cuja estrutura essencial consiste em ligações peptídicas, representam um grupo de substâncias importantes no desenvolvimento de fármacos, sobretudo infecções virais (Muri, 2014; Vagner et al., 2008). Alguns fármacos peptidomiméticos como o Telaprevir (1) e Boceprevir (2) utilizados em infecções pelo vírus da Hepatite C e os fármacos Saquinavir (3), Ritonavir (4) e Indinavir (5) inibidores de protease do vírus HIV já se encontram disponíveis comercialmente (Muri, 2014) (Figura 7). Assim, os peptidomiméticos surgem como uma excelente alternativa para descoberta de fármacos com ação importante sobre proteases (Muri, 2014), sobretudo contra ZIKV (WINT *et al.*, 2018), DENV (Behnam et al., 2015) e CHIKV (H. Singh et al., 2018).

Figura 7: Fármacos peptidomiméticos inibidores de proteases virais.

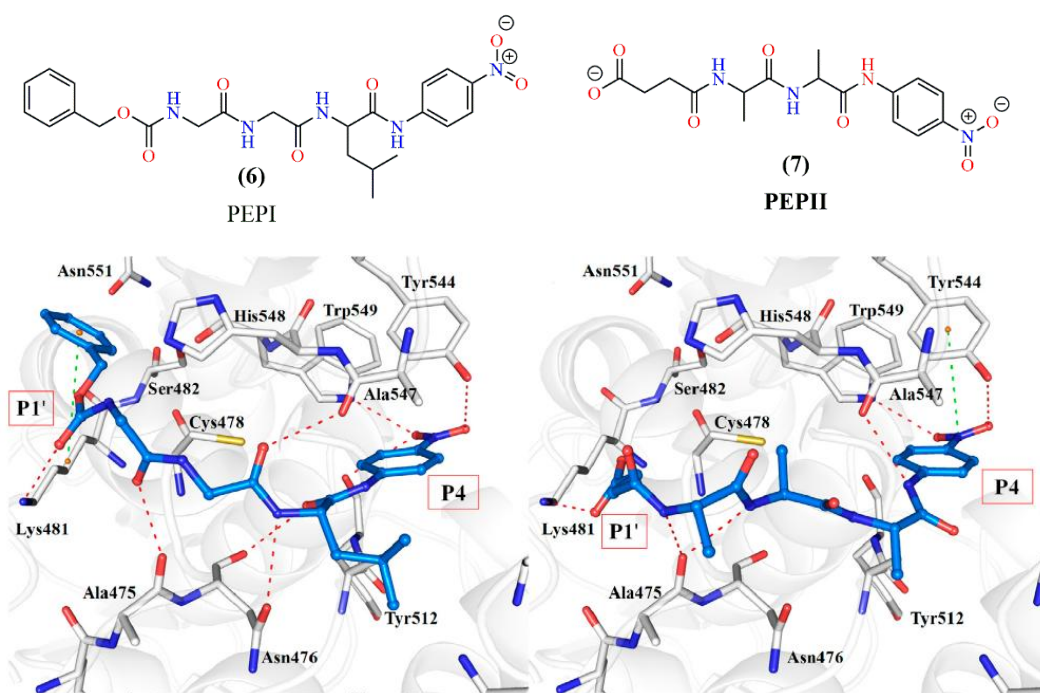


Fonte: Autora, 2024.

Apesar da importância epidemiológica, dos efeitos do CHIKV sobre a saúde pública e a importância de peptídeos ou peptidomiméticos como fármacos, ainda são escassos os estudos que buscam desenvolver compostos peptidomiméticos voltados para este vírus. Em parte, isto pode ser atribuído ao fato de o CHIKV se caracterizar como uma doença negligenciada. Ainda assim, os estudos associados a esta classe de compostos e o CHIKV serão discutidos adiante.

Dhindwal *et al.* (2016) projetaram novos peptidomiméticos com o objetivo de bloquear a interação entre o substrato sob o sítio ativo da nsP2^{pro}. Neste estudo, os resíduos dos aminoácidos da junção de clivagem da poliproteína foram usados para projetar compostos peptidomiméticos que foram investigados juntamente com peptídeos de uma base de dados que apresentava características farmacofóricas derivadas da interação com nsP2. Para isto, uma abordagem *in silico* sobre duas estruturas cristalográficas da nsP2 disponíveis (PDB ID: 3TRK and 4ZTB) foi empregada. As diversas técnicas conduziram à identificação de dois peptidomiméticos PEPI (MMs03131094) (6) e PEPII (MMs03927237) (7) com interações promissoras e estáveis no sítio ativo de nsP2^{pro}. PEPI (6) exibiu interações Trp⁵⁴⁹, Lys⁴⁸¹, Ala⁴⁷⁵, Asn⁴⁷⁶ e Ala⁵⁴⁷ e PEP II (7) interagiu com os resíduos Lys⁴⁸¹, Tyr⁵⁴⁴, Trp⁵⁴⁹, Ala⁴⁷⁵ e Ala⁵⁴⁷ (Dhindwal *et al.*, 2017a) (Figura 8).

Figura 8: Peptídeos inibidores da protease nsP2 de CHIKV.



Fonte: Adaptado de Dhindwal *et al.*, 2017.

Em posse destas informações, estudos posteriores desenvolvidos por Singh *et al* (2018), avaliaram o perfil antiviral de PEPI (6) e PEPII (7) sob a protease nsP2^{pro} de CHIKV e exibiram os valores de IC₅₀ = ~34 µM e ~42 µM, respectivamente; e constantes de inibição (K_i) $33,34 \pm 2,53$ µM e $45,89 \pm 4,38$ µM, respectivamente. Em células BHK-21, PEPI (6) apresentou a dose máxima não tóxica de 50 µM, ao passo que PEPII (7) não exibiu efeitos tóxicos até a concentração de 1 mM. De forma semelhante, a concentração de 5 e 100 µM destes peptídeos reduziram o título viral em 1.000 e 80 vezes, respectivamente. Ainda, PEPI exibiu um perfil de inibição não-competitivo, enquanto PEPII foi identificado como um inibidor competitivo (Singh et al., 2018).

Até o momento, estes são os únicos trabalhos reportados que associam estruturas baseadas em peptídeos como inibidores das proteases virais de CHIKV. Dada a relevância dos peptídeos como inibidores de proteases virais, esta tese tem como intuito desenvolver novos peptidomiméticos ativos contra CHIKV que possam auxiliar na compreensão da relação estrutura-atividade (REA) de inibidores da nsP2^{pro}, além de fortalecer as pesquisas nacionais no cenário de desenvolvimento de fármacos contra doenças virais.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo geral:

- Desenvolver novos compostos peptidomiméticos potencialmente ativos sobre o vírus Chikungunya.

3.2 Objetivos específicos:

- Sintetizar os compostos peptidomiméticos por meio de metodologias em fase sólida;
- Determinar as propriedades físico-químicas dos peptidomiméticos, tais como ponto de fusão (P.F.), tempo de retenção (R_T) e grau de pureza (%) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Investigar o perfil citotóxico dos peptidomiméticos;
- Investigar o efeito antiviral dos peptidomiméticos *in vitro* em células *Vero E6* infectadas por CHIKV;
- Investigar a infecção celular por CHIKV através da citometria de fluxo;
- Avaliar o efeito dos peptidomiméticos sobre a nsP2 do CHIKV em ensaios enzimáticos;
- Realizar estudo de relação estrutura-atividade dos peptidomiméticos sintetizados;
- Aplicar técnicas computacionais para avaliar interações com o alvo proposto.

SEÇÃO EXPERIMENTAL

4. SEÇÃO EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e solventes utilizados:

Todos os reagentes e solventes de partida foram adquiridos da Merck/Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA), e eram produtos comerciais de alta pureza (> 98%).

4.2 METÓDOS:

4.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia líquida de Média pressão e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de Sílica Gel 60 F254 (MERCK[®]) de 0,25 mm de espessura. As leituras das placas foram realizadas através de radiação ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 254 nm.

A determinação do grau de pureza dos respectivos compostos foi realizada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Pressão acoplado ao detector ultravioleta no comprimento de onda (λ) de 254 nm (CLAE/HPLC-DAD), utilizando o equipamento Shimadzu[®], modelo SIL-20AHT, além de coluna C-18 Supelco Discovery[®], 25 cm x 4.6 mm, 5 μ M. Foi utilizado como fases móvel metanol 100%. O volume de injeção da amostra foi de 5 μ L e o fluxo de injeção 1mL/min. As amostras analisadas em corridas de 10 minutos.

4.2.2 Ponto de Fusão:

Os pontos de fusão foram mensurados no equipamento MSTecnopon[®] PFMII Digital. (Piracicaba, Brasil), com temperatura máxima de 330 °C, utilizando capilares de vidro contendo pequenas amostras dos peptidomiméticos. Inicialmente, 40 °C foi admitido como temperatura inicial e então foi permitido um aumento de temperatura de 1 °C/min.

4.2.3 Espectroscopias de RMN¹H e RMN¹³C:

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram obtidos através do equipamento Brüker[®], modelo Avance DRX 600 MHz – UltraShield[®], do Núcleo de Análises de Produtos por

Ressonância Magnética Nuclear – IQB/UFAL, liderado pelo Prof. Thiago mendonça de Aquino. Para solubilização dos peptidomiméticos foi utilizado DMSO- d_6 como solvente analítico. Referente aos espectros, os deslocamentos químicos (δ) foram computados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento foram reportadas em Hertz (Hz). Foi empregado tetrametilsilano (TMS) ou DMSO- d_6 como referência interna (Babij et al., 2016). As multiplicidades dos sinais foram indicadas da seguinte forma: simpleto (s), simpleto largo (sl), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), quinteto (qi), sexteto (sex), septeto (sep) duplo tripleto (dt). Por fim, todos os espectros de RMN foram tratados e analisados usando o software de licença acadêmica Bruker TopSpin.

4.2.4 Espectrometria de massas de alta resolução:

As análises foram desenvolvidas em HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) acoplado a um MicroTOF II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) com fonte de íons de eletrospray (ESI). As amostras dos peptídeos foram eluídas em modo isocrático utilizando água ultrapura acidificada com ácido fórmico (0,01%) e MeOH, na proporção de 50:50 v/v. Os parâmetros foram: capilar 4,5 kV, ESI em modo negativo, placa 500 V, nebulizador 40 psi, gás seco (N_2) com vazão de 8 mL/min e temperatura de 200 °C. Os espectros de massa (m/z 50–1000) foram registrados a cada 2s, conforme relatado anteriormente por Dantas et al; 2021.

4.2.5 Procedimento reacional geral para a síntese dos tri-peptídeos:

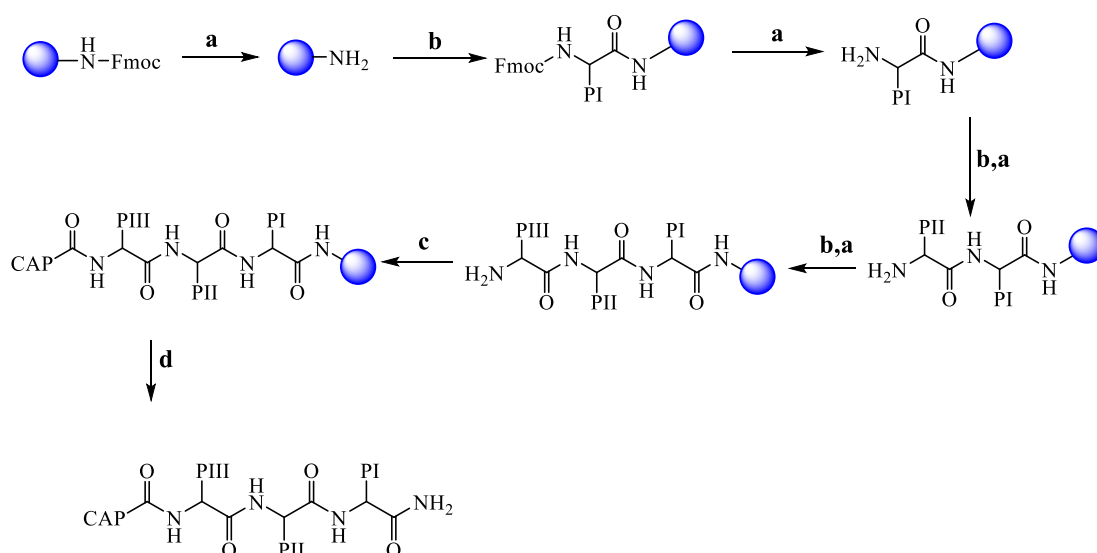
Para o desenvolvimento dos peptídeos formados pela sequência Leu-Gly-Gly (série I), Gly-Gly-Leu (série II) e Gly-Leu-Gly (série III) foi aplicada a metodologia de síntese em fase sólida em resina *Rink amide*[®] usando a estratégia Fmoc padrão seguindo metodologia adaptada de Behnam et al., (2015) (Figura 9). Para isto, todas as etapas de síntese foram desenvolvidas à temperatura ambiente em seringas plásticas de 10 mL adaptadas com um filtro para possibilitar o acondicionamento da resina em todas as etapas reacionais. Dessa forma, a etapa inicial consistiu na preparação da resina com a reação de desproteção do grupo Fmoc realizada com uma solução de pirrolidina, piperidina ou 1-metil-piperazina (20% em DMF).

Uma vez preparada, o acoplamento do primeiro aminoácido para compor a posição I (PI) carboxiterminal para formação da sequência peptídica requerida (Cap-PIII-PII-PI-NH₂) foi realizado. Nesta etapa, uma solução de acoplamento composta pelo aminoácido protegido por N α -Fmoc, TBTU e DIPEA em DMF é formada. Assim, esta

solução foi adicionada a seringa que continha a resina e permaneceu em agitação durante 120 min. Em seguida, a resina foi submetida a lavagens com DMF e DCM para remoção da mistura reacional remanescente. Assim, a etapa subsequente realizada foi a remoção do grupamento protetor pela metodologia já descrita.

Desse modo, a formação do peptídeo requerido (Cap-PIII-PII-PI-NH₂) ocorre por etapas subsequentes de acoplamento do aminoácido requerido seguido da remoção do grupamento protetor. Por método semelhante, os respectivos ácidos carboxílicos e ácidos cinâmicos selecionados que foram acoplados a região *N*-terminal (CAPs ou substituintes) de cada peptídeo seguiu metodologia semelhante à condição reacional aplicada para formação da ligação peptídica. O peptídeo formado (Cap-PIII-PII-PI-NH₂) foi clivado da resina com uma solução de TFA/triisopropilsilano (TIPS)/água. Ao final, a solução de clivagem foi removida da seringa e adicionada a éter gelado. Em seguida, a adição da mistura reacional à éter resultou em um precipitado contendo os peptídeos, posteriormente filtrados para remoção da solução de clivagem. Com exceção dos PEP05, PEP06 e PEP07, que foram purificados através de cromatografia líquida usando solução de hexano/acetato de etila (1:1), os demais peptidomiméticos obtidos foram filtrados em éter etílico gelado ou acetona. Ao final, os peptídeos foram armazenados sob a temperatura de 7-10 °C.

Figura 9: esquema geral da síntese dos peptidomiméticos.



Condições reacionais: a) piperidina, DMF; b) Aminoácidos (Leu ou Gly), TBTU, DIPEA, DMF, r.t; c) Ar-COOH ou ácidos cinâmicos, TBTU, DIPEA, DMF; d) TFA, H₂O, TIPS (95:4:1 v/v, 2h, r.t) *P1, P2 e P3= Leu ou Gly.

4.3 Ancoragem molecular (Docking):

Todos os peptidomiméticos foram desenhados no *software* ChemDraw® v. 12., convertidos em estruturas tridimensionais em *software* ChemDraw® 3D e, em seguida, minimizados energeticamente através da aplicação do método semi-empírico Austin Model 1 (AM1), utilizando-se o *software* ARGUSLAB® v. 4.0.1 (<http://www.arguslab.com>). O arquivo contendo a estrutura tridimensional da enzima nsP2 do CHIKV foi obtido na base de dados *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank - RCSB PDB*, sob o código PDB ID: 3TRK (<https://www.rcsb.org/structure/3TRK>). A ancoragem molecular foi desenvolvida no *software* GOLD v.5.4.0 (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>). Todas as moléculas cocrystalizadas à estrutura da protease nsP2 foram removidas, incluindo as moléculas de água e íons. Em seguida, as coordenadas referentes à díade catalítica foram localizadas por meio de inspeção visual. Todos os inibidores foram admitidos como capazes de detectar cavidades na superfície da enzima. Então, a função de pontuação Chemical Piecewise Linear Potential (CHEMPLP) foi aplicada. Este método foi escolhido por ser um protocolo já validado para triagens realizadas pelo grupo de pesquisa em química medicinal e pode ser visto no trabalho de Passos *et al* (2019). Por fim, o valor de FitScore da sequência peptídica foi obtida como parâmetro para seleção das sequências peptídicas a serem sintetizadas. As ilustrações foram visualizadas no usando o *software* PyMol® e Discovery Studio.

4.4 Avaliações biológicas:

A avaliação biológica dos peptidomiméticos foi desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa em Regulação da Resposta Imune (IMUNOREG) do Laboratório de Pesquisa em Virologia e Imunologia (LAPEVI), localizado no Instituto de Ciências da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). As pesquisas foram lideradas pelo Prof. Dr. Ênio José Bassi, coordenador do referido grupo de pesquisa.

4.4. 1 Ensaios de citotoxicidade:

O ensaio de citotoxicidade foram desenvolvidos em células *Vero E6* (rim de macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops* (*African green monkey*)) através do ensaio colorimétrico do MTT ((3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio Brometo), conforme protocolo adaptado de Mosmann, 1993 e Sieuwerts *et al.*, 1995. O MTT compreende um sal hidrossolúvel que é reduzido a cristais de formazan em células com

mitocôndrias funcionais, indicando a viabilidade das células testadas. Assim, em células viáveis o sal de formazan fica armazenado no citoplasma e pode ser solubilizado por DMSO. A intensidade da coloração é mensurada por espectrofotômetro.

Para o ensaio de citotoxicidade, monocamadas confluentes de células *Vero E6* em placas de 96 poços foram tratadas em triplicata com os peptidomiméticos nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 µM por 72h a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. Após 72h, o sobrenadante foi descartado e 20 µL da solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço contendo os peptidomiméticos. Após 3h de incubação, o sobrenadante foi removido e adicionado 150 µL de DMSO em cada poço e a placa foi incubada na estufa durante 15 minutos. Por fim, a determinação absorbância (Abs) de cada poço contendo os peptidomiméticos foi mensurada com auxílio de espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm.

A porcentagem de viabilidade celular foi determinada usando os valores de absorbância (Abs) de cada triplicata com auxílio da fórmula abaixo:

$$Viab.Cel.(%) = \frac{Abs.da amostra - Média Abs.controle branco}{Média Abs.do controle celular - Média Abs.do controle branco}$$

A concentração máxima não tóxica (CMNT) foi determinada para análises do ensaio antiviral. Por fim, a concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi obtida através de análise de regressão não linear para construção de uma curva sigmoideal dose-resposta variável no software GraphPah Prism 6.

4.4.2 Ensaio antiviral:

A avaliação antiviral dos peptidomiméticos seguiu um ensaio pós-tratamento, ou seja, após a adsorção viral. Para isto, as células *Vero E6* foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2 x 10⁴/poço. Assim, as monocamadas confluentes foram infectadas por CHIKV isolado em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa IMUNOREG. Após 2h, tempo necessário para a adsorção viral, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) e as monocamadas foram tratadas em triplicata com 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 µM dos peptidomiméticos e incubadas por 72h a 37 °C em 5% de CO₂. A determinação da viabilidade celular foi determinada usando a metodologia de MTT, sendo a porcentagem de inibição calculada conforme equação abaixo:

$$Inibição\ viral\ (\%) = \frac{Abs. Amostra - Média\ Abs. Controle\ Viral\ (CV)}{Média\ Abs. Controle\ Celular - Média\ Abs. CV}$$

As concentrações que inibiram 50% da replicação viral (CE₅₀) foram calculadas por regressão não linear e a construção da curva sigmoidal pela análise da curva log de inibição *versus* resposta normalizada variável no software GraphPah Prism 6.

4.4.3 Citometria de fluxo:

A detecção da porcentagem de células infectadas pelo CHIKV foi realizada por coloração por citometria de fluxo intracelular. Células Vero E6 (2 x 10⁴ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e após 24h foram inoculadas com CHIKV na MOI (multiplicidade de infecção) 0,01 no período de 2h com homogeneizações a cada 15 minutos. Ao fim desse período, o inóculo viral foi removido, as monocamadas lavadas com PBS e então foi adicionado meio de cultivo (DMEM *Low glucose* 2% SFB e 1% PSA) com PEP 15 e PEP16 (80 µM) e incubado por 48h (37 °C e 5% de CO₂). Após a incubação as células foram obtidas da placa, fixadas e permeabilizadas com tampão BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, EUA) conforme recomendações do fabricante. Foi utilizado anticorpo monoclonal anti-CHIKV A54Q (Invitrogen) para marcação intracelular (1:50) no período de 1h a 4 °C seguido de lavagem com tampão Perm/Wash (BD Biosciences, EUA). Por fim foi realizada marcação secundária com anticorpo conjugado a fluorocromo AlexaFluor 488 (1:200) pelo mesmo período. Ao fim da marcação as células foram lavadas com tampão Perm/Wash e suspendidas em tampão FACS para posterior aquisição no citômetro de fluxo BD FACSVia.

4.4.4 Ensaio de tempo de adição de drogas:

Com o objetivo de avaliar possíveis mecanismos de ação do peptídeo PEP16, o ensaio de tempo de adição de droga foi realizado com células Vero E6 semeadas em placas de 96 poços (2 x 10⁶ células/poço) conforme previamente descrito avaliando as seguintes variáveis:

- - 2h: Correspondente ao pré-tratamento, as células foram tratadas com composto em meio de cultivo por 2h previamente à adsorção viral, após adsorção o inóculo viral foi removido e a monocamada recebeu apenas meio de cultivo com veículo (DMSO);

- 0h: Correspondente a adição simultânea do inóculo viral com tratamento que permaneceu durante o período de adsorção viral (2h). Ao fim, foi adicionado apenas meio de cultivo com veículo;
- 2h: Ensaio de pós-tratamento no qual o composto em meio de cultura foi adicionado logo após a adsorção viral;
- 4h e 6h: Logo após a adsorção foi adicionado apenas meio de cultivo, sendo o composto acrescido ao meio a cada 2h após este período.

Em todas as etapas antes e após a adsorção viral e/ou tratamento as monocamadas foram lavadas com PBS para remoção de partículas virais não ligantes e/ou composto. A placa foi incubada por 48h e as viabilidades e inibição viral avaliadas por ensaio de MTT.

4.5 Ensaio baseado em FRET direcionado à protease nsP2 de Chikungunya:

A protease nsP2 recombinante de CHIKV foi utilizada. O substrato proteico recombinante continha 15 resíduos de aminoácidos correspondentes aos resíduos P10 a P'5 do local de clivagem da nsP2 localizado entre as regiões nsP1 e nsP2 de P1234, que foi colocado entre a proteína fluorescente. As proteínas recombinantes foram expressas e purificadas, conforme descrito detalhadamente anteriormente. O ensaio de inibição de protease foi realizado a 30 °C por 1,5 h em volume de 10 µL em tampão de ensaio de protease (HEPES 20 mM [pH 7,2] e DTT 2 mM). A concentração final do CHIKV nsP2 foi de 150 µM, a concentração final do substrato de protease foi de 15 µM, a concentração final do inibidor foi de 1 mM e 10% de DMSO foi usado como controle de solvente. Como controle positivo foi utilizado composto C10 publicado em trabalhos anteriores. Cada reação foi definida em duplicata e a porcentagem de inibição de nsP2 foi calculada para selecionar os melhores compostos inibidores de todos. As leituras de fluorescência foram calculadas em comprimentos de onda de excitação e emissão de 360 e 460 nm. O aumento nas leituras de fluorescência devido à clivagem do substrato peptídico catalisada por nsP2, levando à dissociação do par FRET e à diminuição na transferência de energia na presença dos inibidores, foi monitorado por 20 min. A porcentagem de inibição versus concentração traçada foi usada para quantificar o potencial inibitório dos peptidomiméticos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

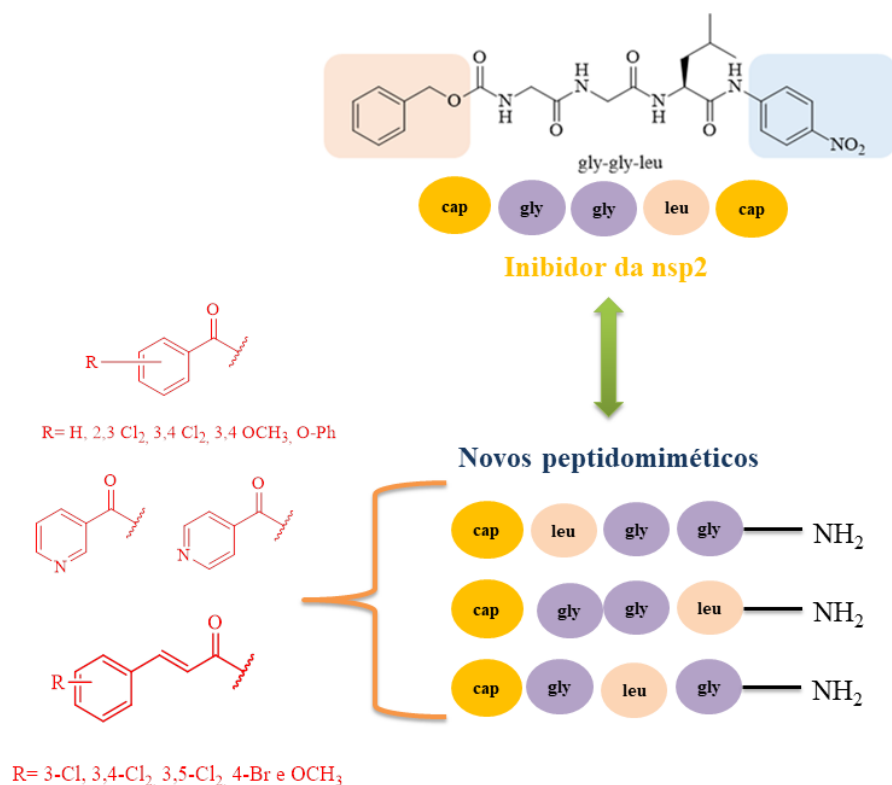
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1 Planejamento dos tri-peptídeos anti-CHIKV:

Em virtude da escassez de trabalhos que reportam síntese de peptídeos anti-CHIKV, a abordagem inicial do planejamento em torno da seleção da sequência peptídica envolveu uma inspeção computacional a fim de selecionar sequências peptídicas que apresentassem um valor FitScore superior ao inibidor da nsP2 de CHIKV, reportado na literatura, com bons parâmetros farmacocinéticos (Figura 10). Nessa abordagem, 64 peptídeos inspirados no inibidor (**6**) de nsP2 e com alterações por resíduos básicos como Arg e Lys foram utilizados, contudo, a metodologia pareceu pouco segura para seleção de novos inibidores, uma vez que a maioria dos peptídeos desenhados não atendia a regra dos 5 de Lipinski, pois peptídeos com maior FitScore estavam entre sequências com mais de um resíduo básico ou ainda de cadeia maiores, ou seja, tetrapeptídeos. Assim, observando que as sequências contendo aminoácidos neutros como Leu e Gly demonstraram valores de FitScore semelhantes, optamos por desenvolver análogos peptídicos inspirados no inibidor de nsP2 já reportado.

Dessa forma, três séries de tripeptídeos formados pelos resíduos de aminoácidos glicina (Gly) e leucina (Leu) em 3 diferentes combinações em P1, P2 e P3 foram selecionadas e desenvolvidas. A série I compreende a sequência composta por Leu-Gly-Gly, a série II é composta por Gly-Gly-Leu e a série III é composta por Gly-Leu-Gly, sendo todas estas substituídas por grupamentos aromáticos em *N*-terminal. Como substituintes (Caps) foram selecionados derivados de ácidos benzoicos contendo grupamentos elétron-doadores e elétron-retiradores. Além disto, também foram selecionados ácidos cinâmicos que foram associados ao perfil anti-CHIKV em trabalhos do grupo de pesquisa em química medicinal recentemente publicados em trabalhos de Passos *et al.*, 2019 (Figura 10).

Figura 10: Esquemática da seleção dos peptidomiméticos desenvolvidos.



Fonte: Autora, 2024.

5.2 Obtenção dos tri-peptídeos:

Todos os peptidomiméticos foram obtidos através da síntese em fase sólida como descrito anteriormente. De modo geral, todos apresentaram rendimentos entre 40-80%, com alto grau de pureza. Até o desenvolvimento atual deste trabalho, ainda não foram obtidos derivados de piridina (série II) e os análogos não substituídos, pois, mesmo com diversas tentativas de síntese, as análises de elucidação estrutural demonstram uma clivagem da sequência peptídica, possivelmente associada à temperatura empregada durante a purificação dos mesmos.

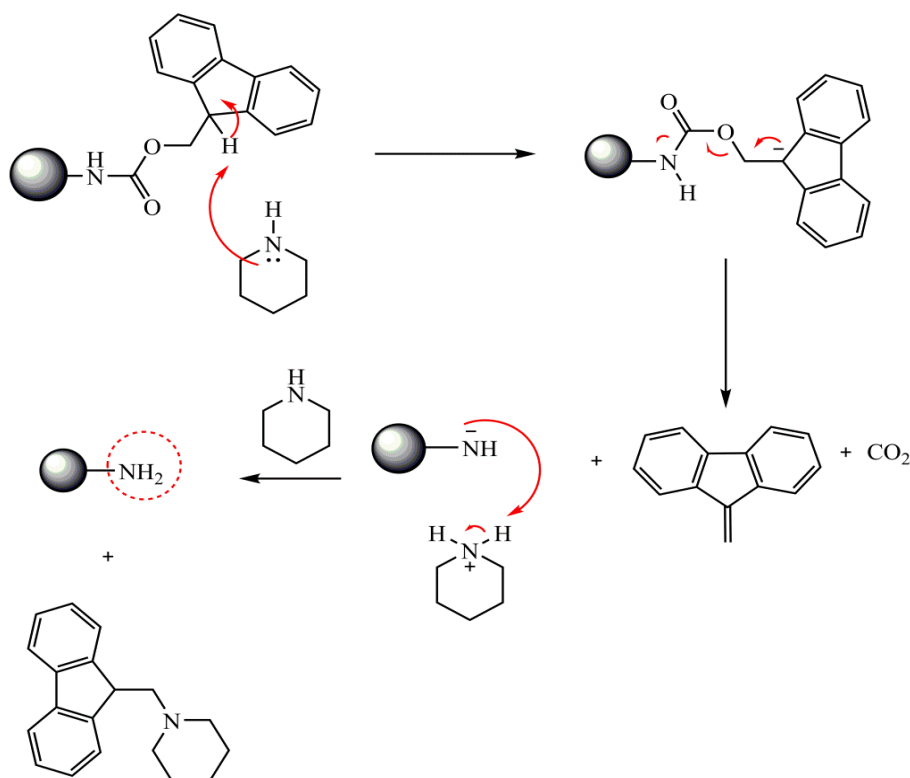
5.2.1 Mecanismos reacionais propostos na formação dos peptidomiméticos:

Em síntese de peptídeos, a formação do grupamento amida (ligação peptídica) entre dois aminoácidos ou fragmentos peptídicos é chamada de *acoplamento*. No geral,

empregam-se reagentes químicos ativadores de ácidos carboxílicos de um N- α -acil aminoácido, o qual sofre ataque nucleofílico do grupo α -amino de outro aminoácido C α -protegidos. Neste trabalho, tetrafluoroborato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (TBTU) foi utilizado como reagente ativador da carbonila dos aminoácidos utilizados. Ao passo que Fmoc foi o grupamento protetor de N α -aminoácidos (Liang et al., 2017; Rahimi, 2016).

De maneira simplificada, a formação da cadeia peptídica requerida consistia na remoção do grupamento protetor Fmoc, através da solução (20% em DMF) de bases como piperidina, pirrolidina ou 1-metil-piperazina (Liang et al., 2017; Luna et al., 2016) com subsequente acoplamento entre os aminoácidos em solução contendo TBTU e DIPEA. O mecanismo de remoção do grupamento Fmoc das aminas primárias da resina e dos aminoácidos é demonstrado na figura 9. O mecanismo reacional se baseia em duas etapas reacionais: I) remoção do próton ácido na posição 9 do anel fluoreno pelas bases citadas, exemplificada pela piperidina e, II) eliminação, produzindo o intermediário dibenzofulveno (DBF), rapidamente capturado pela amina secundária utilizada (Figura 11) (Luna et al., 2016).

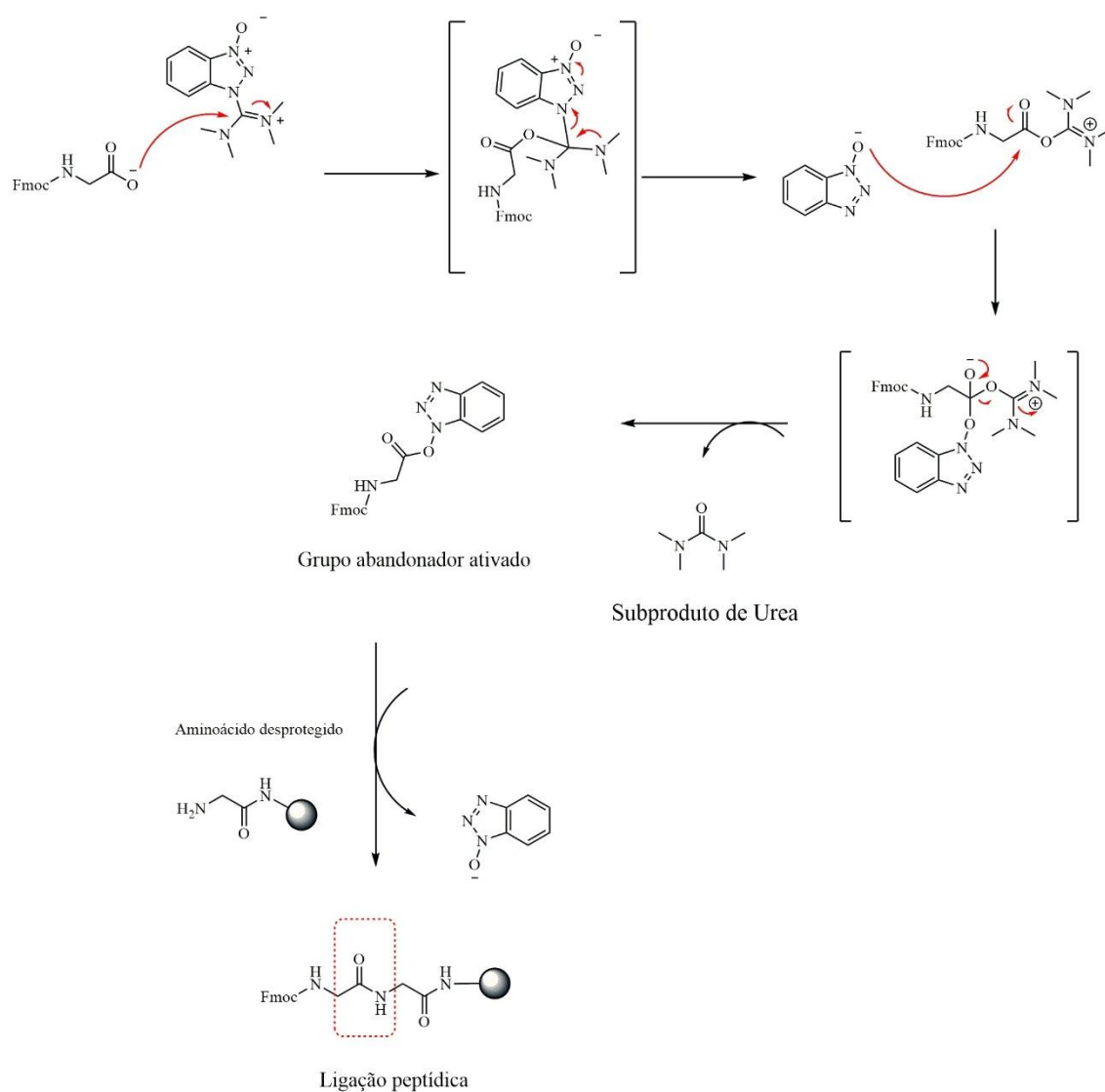
Figura 11: Proposta de mecanismo simplificado para remoção do grupamento protetor (Fmoc).



Fonte: Autora, 2024.

Após o acoplamento do primeiro aminoácido ao suporte polimérico (Resina Rink amide®), a alongamento da cadeia peptídica é possibilitado. Assim, o mecanismo de acoplamento se inicia através do ataque do íon carboxilato do aminoácido ao carbono polarizado positivamente do cátion urônio-TBTU, liberando o HOBt, formando um éster (Figura 12). Em seguida, o *N*-óxido do benzotriazol ataca o ácido carbonil, resultando na liberação de ureia e o éster ativado. Por fim, a aminólise do éster ativado libera amida requerida formando a ligação peptídica entre os aminoácidos.

Figura 12: Proposta de mecanismo simplificado para o acoplamento entre aminoácidos usando TBTU.



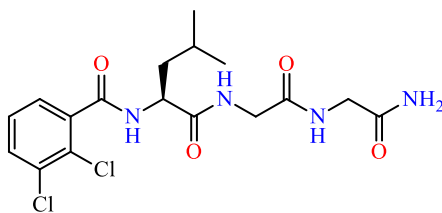
Fonte: Autora, 2024.

5.2.2 Caracterização estrutural dos peptidomiméticos

De um modo geral, a ressonância magnética nuclear (RMN) demonstrou os sinais com deslocamentos químicos característicos que indicam a formação correta da sequência planejada. Neste contexto, podemos citar os sinais característicos da Leucina como dubleto (~0,82 ppm), tripleto (~1,49 ppm), septeto (~1,57 ppm) e como quarteto para o carbono assimétrico (~4,20 ppm). Os sinais da Glicina foram característicos como duplo-dubleto ou dubletos entre 3-4 ppm. Além disto, os sinais (NH) das ligações peptídicas foram verificados em deslocamentos entre 7-9 ppm e puderam ser distinguidos entre as ligações CHAr com auxílio de técnicas bidimensionais. Ainda, os sinais de todos substituintes ligados a extremidade carboxiterminal foram verificados na região característica em torno de 6,5-8 ppm. Vale destacar que os sinais característicos dos substituintes derivados do ácido cinâmico foram identificados em torno de 6-7 ppm como dubletos com constante de acoplamento (J) variando de 15,8 a 16,1 Hz, confirmando a configuração (E) destes substituintes.

5.2.2.1 Dados de síntese e caracterização química da série de tri-peptídeos com sequência Leu-Gly-Gly-NH₂ (série I).

Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 02 (PEP02)

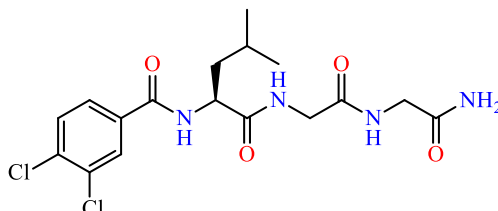


Nome químico: (S)-N-(1-((2-((2-amino-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)-2,3- diclorobenzamida. Fórmula molecular: C₁₇H₂₂Cl₂N₄O₄. Rendimento: 20%; Aspecto: pó bege amorfo; Massa molar: 417.29 g/mol, Rt: 2,77 min; Grau de pureza: 98%, ponto de fusão: 150-151 °C. **RMN ¹H** (600 MHz, DMSO-d₆) δ 0,89 (d, 3H, J =2,0 Hz, CH₃), 0,91 (d, 3H, J =2,0 Hz, CH₃), 1,50-1,60 (m, 2H, CH₂), 1,69-1,71 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,63 (d, 2H, J =5,8 CH₂(C=O), 3,76 (dd, 2H, J =3,7 e 5,5 Hz e CH₂(C=O), 4,43-4,47 (m, 1H, CH*), 7,11 (s, 1H, NH₂), 7,25 (s, 1H, NH₂), 7,40-7,44 (m, 2H, CH_{Ar}), 7,40 (dd, 1H, J =2,3 e 7,2 Hz, CH_{Ar}), 8,04 (t, 1H, J =5,8, NH), 8,24 (t, 1H, J =5,6 Hz, NH), 8,80 (d, 1H, J =7,7 Hz, NH). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-d₆) δ 20,80 (CH₃), 22,53 (CH₃),

23,69 ($\underline{\text{CH}}_2$), 39,69 ($\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)$), 41,30 ($\underline{\text{CH}}_2(\text{C}=\text{O})$), 41,70 ($\underline{\text{CH}}_2(\text{C}=\text{O})$), 51,21 ($\underline{\text{CH}}^*$), 126,94 (CAr), 127,56 (CAr), 127,84 (CAr), 130,51 (CAr), 131,40 (CAr), 138,38 (CAr), 165,30 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 168,35 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 170,24 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 171,55 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$).

APÊNDICE A

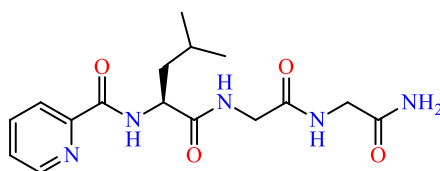
Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 04 (**PEP04**)



Nome químico: (S)-N-(1-((2-((2-amino-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)-3,4-diclorobenzamida. Fórmula molecular: $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4$ Rendimento: 82%; Aspecto: pó bege amorfo; Massa molar: 417.29 g/mol, R_t : 2,95 min; Grau de pureza: 100%, ponto de fusão: 155-156 °C **RMN ^1H** (600 MHz, DMSO-d_6) δ 0,86 (d, 3H, $J=6,3$ Hz, CH_3), 0,90 (d, 3H, $J=6,3$ Hz, CH_3), 1,55-1,59 (m, 2H, CH_2), 1,62-1,71 (m, 1H, $\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$), 3,63 (d, 2H, $J=6,1$ $\underline{\text{CH}}_2(\text{C}=\text{O})$), 3,71 (d, 2H, $J=6,2$ Hz e $\underline{\text{CH}}_2(\text{C}=\text{O})$), 4,45-4,49 (m, 1H, CH^*), 7,10 (s, 1H, NH_2), 7,22 (s, 1H, NH_2), 7,75 (d, 1H, $J=8,3\text{Hz}$, CH_{Ar}), 7,86 (dd, 1H, $J=2,0$ e 8,4 Hz, CH_{Ar}), 7,99 (t, 1H, $J=5,8$, NH), 8.16 (d, 1H, $J=2,0$ Hz, CH), 8.35 (t, 1H, $J=5,7$ Hz, NH). 8,77 (d, 1H, $J=7,7\text{Hz}$, NH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO-d_6) δ 21,83 ($\underline{\text{CH}}_3$), 23,50 ($\underline{\text{CH}}_3$), 24,82 ($\underline{\text{CH}}_2$), 42,30 ($\underline{\text{CH}}_2(\text{C}=\text{O})$), 42,72 ($\underline{\text{CH}}_2(\text{C}=\text{O})$), 52,68 ($\underline{\text{CH}}^*$), 128,44 (CAr), 130,00 (CAr), 131,04 (CAr), 131,60 (CAr), 131,62 (CAr), 134,75 (CAr), 164,91 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 169,45 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 171,30 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 172,98 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$).

APÊNDICE B

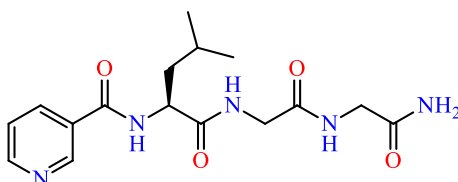
Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 05 (**PEP05**)



Nome químico: (S)-N-(1-((2-((2-amino-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)picolinamida. Fórmula molecular: $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_4$. Rendimento: 61%; Aspecto: pó branco cristalino, Massa molar: 349.38 g/mol, R_t : 2,74 min; Grau de pureza: 98%, ponto

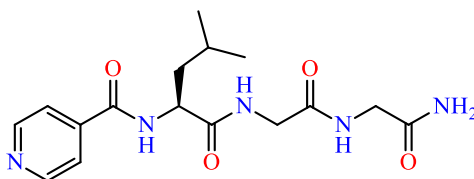
de fusão: 60-62 °C. RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ 0,89 (d, 6H, $J=5,8$ Hz, CH_3), 1,58-1,64 (m, 2H, CH_2), 1,66-1,71 (m, 1H, (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,61-3,63 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})$), 3,69 (dd, 1H, $J=5,5$ e 16,6 Hz, $\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})$), 3,77 (dd, 1H, $J=5,8$ e 16,6 Hz), 4,58-4,62 (m, 1H, CH^*), 7,08 (s, 1H, NH), 7,21 (s, 1H, NH), 7,63 (t, 1H, $J=6,1$ Hz, CHAr), 8,01 (t, 1H, $J=7,4$ Hz, CHAr), 8,04-8,05 (m, 1H, CHAr), 8,07 (t, 1H, $J=5,8$ Hz, NH), 8,43 (t, 1H, $J=5,6$ Hz, NH), 8,67 (d, 1H, $J=4,3$ Hz, CHAr), 8,71 (d, 1H, $J=8,7$ Hz, NH). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 22,18 (CH_3), 23,54 (CH_3), 24,87(CH_2), 41,80 ($\text{CH}(\text{CH}_3)$), 42,30($\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})$), 42,70($\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})$), 51,69 (CH^*), 122,45 (CAr), 127,22 (CAr), 138,38 (CAr), 148,95 (CAr), 149,90 (CAr), 163,95($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 169,34($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 171,28($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 172,63($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$). APÊNDICE C

Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 06 (PEP06)



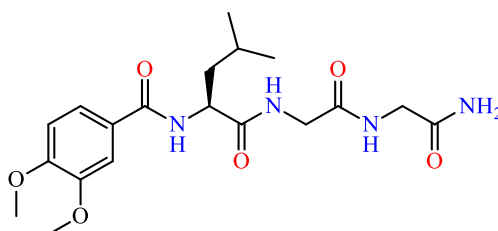
Nome químico: (S)-N-(1-((2-((2-amino-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)nicotinamida. Fórmula molecular: $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_4$. Rendimento: 50%; Aspecto: pó marron-amarelado amorfo; Massa molar: 349.38 g/mol, R_t : 2,72 min; Grau de pureza: 100%, ponto de fusão: $<40^\circ\text{C}$. RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ 0,89 (d, 3H, $J=6,3$ Hz, CH_3), 0,92 (d, 3H, $J=6,3$ Hz, CH_3), 1,57-1,62 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,65-1,73(m, 2H, CH_2), 3,64 (dd, 2H, $J=1,5$ e 5,8 Hz, $\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})$), 3,73 (d, 2H, $J=5,8$ Hz, $\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})$), 4,50-4,54 (m, 1H, CH^*), 7,10 (s, 1H, NH), 7,22 (s, 1H, NH), 7,62-7,64 (m, 1H, CHAr), 8,01 (t, 1H, $J=5,8$ Hz, NH), 8,35-8,39 (m, 2H, CHAr), 8,78 (d, 1H, $J=1,3$ e 4,9 Hz, CHAr), 8,87 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, NH), 9,10 (s, 1H, CHAr). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 21,89 (CH_3), 23,51 (CH_3), 24,85 (CH_2), 42,32 ($\text{CH}(\text{CH}_3)$), 42,74 ($\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})$), 52,56 (CH^*), 124,31 (CAr), 130,46 (CAr), 137,13 (CAr), 148,19 (CAr), 151,26 (CAr), 169,29($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 169,42($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 171,26($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 172,93($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$). APÊNDICE D

Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 07 (**PEP07**)



Nome químico: (S)-N-(1-((2-((2-amino-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)isonicotinamida. Fórmula molecular: $C_{16}H_{23}N_5O_4$. Rendimento: 50%; Aspecto: líquido marron-amarelado; Massa molar: 349.38 g/mol, R_T: 2,74 min; Grau de pureza: 100%. RMN 1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ 0,88 (d, 3H, $J=6,2$ Hz, CH_3), 0,91 (d, 3H, 3H, CH_3), 1,58-1,62 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 1,64-1,73 (m, 1H, CH_2), 3,64 (d, 2H, $J=5,7$ Hz, $CH_2(C=O)$), 3,73 (d, 2H, $J=5,7$ Hz, $CH_2(C=O)$), 4,50-4,54 (m, 1H, CH^*), 7,08 (s, 1H, NH), 7,22 (s, 1H, NH), 7,93 (d, 2H, $J=7,93$ Hz, $CHAr$), 7,99 (t, 1H, $J=5,7$ Hz, NH), 8,37 (t, 1H, $J=5,6$ Hz, NH), 8,81 (d, 2H, $J=5,3$ Hz, $CHAr$), 8,89 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, NH). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 21,86(\underline{CH}_3), 23,49(\underline{CH}_3), 24,86 (\underline{CH}_2), 42,32 ($\underline{CH}(CH_3)$), 42, ($\underline{CH}_2(C=O)$), 52,62 (\underline{CH}^*), 122,73 (C_{Ar}), 142,95 (C_{Ar}), 149,20 (C_{Ar}), 165,13($C=O(NH)$), 169,39($C=O(NH)$), 171,26($C=O(NH)$), 172,71($C=O(NH)$). APÊNDICE E

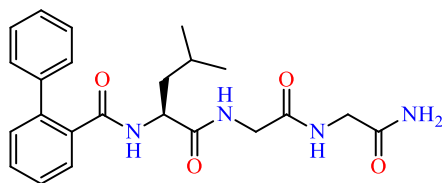
Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 09 (**PEP09**)



Nome químico: (S)-N-(1-((2-((2-amino-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)-3,4-dimetoxibenzamida. Fórmula molecular: $C_{19}H_{28}N_4O_6$. Rendimento: 40%; Aspecto: pó branco amorfo; Massa molar: 408.45 g/mol, R_T: 1,88 min; Grau de pureza: 99%, ponto de fusão: 202-203 °C. RMN 1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ 0,87 (d, 3H, $J=6,2$ Hz, CH_3), 0,91 (d, 3H, $J=6,2$ Hz, CH_3), 1,55 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 1,63-1,72 (m, 2H, CH_2), 3,36-3,64 (m, 2H, $CH_2(C=O)$), 3,72 (t, 2H, $J=6,5$ Hz, $CH_2(C=O)$), 3,80 (s, 6H, OCH_3), 4,44-4,47 (m, 1H, CH^*), 7,01 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, $CHAr$), 7,10 (s, 1H, NH), 7,19 (s, 1H, NH), 7,46 (s, 1H, $CHAr$), 7,54 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, $CHAr$), 8,06 (t, 1H, $J=5,8$ Hz, NH), 8,32

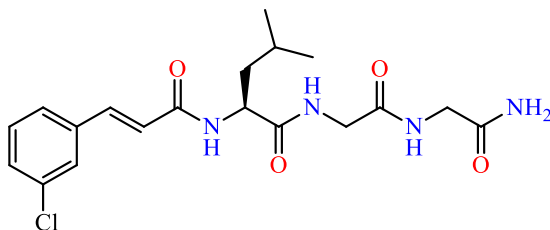
(t, 1H, $J=5,6$ Hz, NH), 8,46 (d, 1H, $J=7,4$ Hz, NH). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 21,03 ($\underline{\text{CH}_3}$), 22,49 ($\underline{\text{CH}_3}$), 23,87 ($\underline{\text{CH}_2}$), 41,36 ($\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)$), 41,78 ($\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)$), 51,62 ($\underline{\text{CH}^*}$), 55,07 (OCH₃), 55,11 (OCH₃), 110,25 (CAr), 110,53(CAr), 120,40 (CAr), 125,64 (CAr), 147,66 (CAr), 150,93 (CAr), 165,74 (C=O(NH)), 165,51 (C=O(NH)), 170,33 (C=O(NH)), 172,51 (C=O(NH)). APÊNDICE F

Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 10 (**PEP10**)



Nome químico: (S)-N-(1-((2-((2-amino-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)-[1,1'-bifenil]-2-carboxamida. Fórmula molecular: $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4$. Rendimento: 80%; Aspecto: pó branco amorfo; Massa molar: 424,49 g/mol, R_T : 2,8 min; Grau de pureza: 100%, %, ponto de fusão: 222-223 °C. RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ 0,74 (d, 3H, $J=6,1$ Hz, CH₃), 0,78 (d, 3H, $J=6,1$ Hz, CH₃), 1,31-1,37 (m, 2H, CH₂), 1,41-1,16 (m, 1H, $\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$), 3,53 (dd, 1H, $J=8,8$ e 16,8 Hz, CH₂(C=O)), 3,59-3,63 (m, 1H, CH₂(C=O)), 3,71 (d, 2H, $J=5,6$ Hz, CH₂(C=O)), 4,19-4,22 (m, 1H, CH*), 7,10 (sl, 1H, NH), 7,21 (s, 1H, NH), 7,30-7,38 (m, 3H, CHAr), 7,41-7,42 (m, 3H, CHAr), 7,43-7,46 (m, 1H, CHAr), 7,46-7,49 (m, 1H, CHAr), 7,49-7,52 (m, 1H, CHAr), 7,99 (t, 1H, $J=5,7$ Hz, NH), 8,03 (t, 1H, $J=5,7$ Hz, NH), 8,42 (d, 1H, $J=7,4$ Hz, NH). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 21,85 ($\underline{\text{CH}_3}$), 23,58 ($\underline{\text{CH}_3}$), 24,41 ($\underline{\text{CH}_2}$), 42,24 ($\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)$), 42,31 ($\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)$), 52,31 ($\underline{\text{CH}^*}$), 127,42 (CAr), 127,56(CAr), 128,44 (CAr), 128,60 (CAr), 129,95 (CAr), 130,26 (CAr), 137,07 (CAr), 139,77 (CAr), 140,65 (CHAr), 169,37 (C=O(NH)), 169,94 (C=O(NH)), 171,28 (C=O(NH)), 172,96 (C=O(NH)) APÊNDICE G.

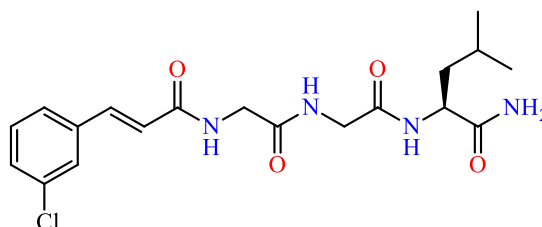
Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 13 (**PEP13**)



Nome químico: (S,E)-N-(2-((2-amino-2-oxoethyl)amino)-2-oxoethyl)-2-(3-(3-chlorophenyl)acrylamido)-4-methylpentanamide. Formula molecular: $C_{19}H_{25}ClN_4O_4$
 Rendimento: 40%; Aspecto: pó branco amorfo; Massa molar: 408,88 g/mol, R_T : 2,88 min; Grau de pureza: 100%, ponto de fusão: 202-204 °C **RMN 1H** (600 MHz, DMSO- d_6) δ 0,15 (d, 3H, $J=6,5$ Hz, CH_3), 0,19 (d, 3H, $J=6,5$ Hz, CH_3), 0,87 (d, 2H, $J=7,3$, CH_2), 0,93 (sept, 1H, $J=6,6$ $CH(CH_3)_2$); 3,03 (dd, 2H, $J=6$; 16,0 Hz, $CH_2(C=O)$), 3,10 (d, 2H, $J=15,0$ Hz, $CH_2(C=O)$), 3,13 (d, 2H, $J=14,9$ Hz, $CH_2(C=O)$), 3,61 (t, 1H, $J=7,5$, CH^*), 5,90 (d, 1H, $J=15,8$ Hz, $Ar-HC=CH(C=O)$), 6,56 (d, 1H, $J=1,0$ Hz, CH_{Ar}), 6,57 (sl, 1H, CH_{Ar}), 6,69 (d, 1H, $J=15,8$ Hz, $Ar-HC=CH(C=O)$), 6,78 (s, 1H, CH_{Ar}). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 24,59 (CH_3), 25,84 (CH_3), 28,51 (CH_2), 44,02 ($CH(CH_3)$), 45,68 ($CH_2(C=O)$), 46,46 ($CH_2(C=O)$), 56,77 (CH^*), 125,41 ($Ar-HC=CH(C=O)$), 129,90 (C_{Ar}), 131,06 (C_{Ar}), 134,02 (C_{Ar}), 138,48 (C_{Ar}), 140,90, 143,49 ($Ar-HC=CH(C=O)$), 171,17 ($C=O(NH)$), 174,60 ($C=O(NH)$), 176,83 ($C=O(NH)$), 178,47 ($C=O(NH)$).
 APÊNDICE I

5.2.2.2 Dados de síntese e caracterização química da série de tri-peptídeos com sequência Gly-Gly-Leu-NH₂ (série II)

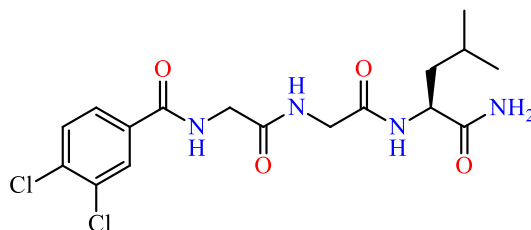
Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 12 (**PEP12**)



Nome químico: (S,E)-2-(2-(2-(3-(3-clorofenil)acrilamido)acetamido)acetamido)-4-metilpentanamida. Fórmula molecular: $C_{19}H_{28}N_4O_6$. Rendimento: 70%; Aspecto: pó bege amorfo; Massa molar: 408,44 g/mol, R_T : 2,85 min; Grau de pureza: 100%. ponto de fusão: 205-206 °C. **RMN 1H** (600 MHz, DMSO- d_6) δ 0,10 (d, 3H, $J=6,3$ Hz, CH_3), 0,14 (d, 3H, $J=6,2$ Hz, CH_3), 0,82-0,86 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 0,87-0,94 (m, 1H, CH_2); 3,07 (dd, 2H, $J=5,0$; 16,8 Hz, $CH_2(C=O)$), 3,12 (dd, 2H, $J=4,6$ e 16,8 Hz, $CH_2(C=O)$), 3,17-3,18 (m, 2H, $CH_2(C=O)$), 4,21 (m, 1H, CH^*), 5,90 (d, 1H, $J=15,8$ Hz, $Ar-HC=CH(C=O)$), 6,56-6,57 (m, 2H, CH_{Ar}), 6,67-6,88 (m, 1H, CH_{Ar}), 6,70 (d, 1H, $J=15,8$ Hz, $Ar-HC=CH(C=O)$), 6,78 (s, 1H, CH_{Ar}), 7,24 (d, 2H, $J=8,0$, NH_2), 7,68 (t, 1H, $J=5,6$ Hz, NH), 7,82 (t, 1H, $J=5,3$ Hz, NH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 11,65 (CH_3), 13,57 (CH_3), 15,93 (CH_2),

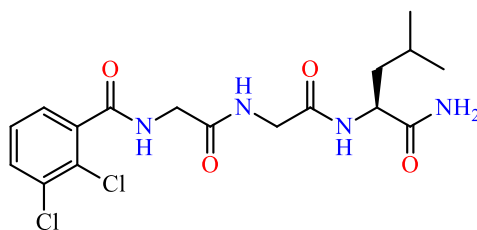
31,74 ($\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)$), 33,71 ($\underline{\text{CH}}_2(\text{C}=\text{O})$), 34,36 ($\underline{\text{CH}}_2(\text{C}=\text{O})$), 43,09 (CH^*), 112,97 ($\text{Ar}-\text{HC}=\underline{\text{CH}}(\text{C}=\text{O})$), 117,97 (CAr), 118,50 (CAr), 120,73 (CAr), 121,50 (CAr), 130,87 (CAr), 158,94 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 161,70 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 162,63 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 167,68 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$). APÊNDICE H.

Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 15 (**PEP15**)



Nome químico: (S)-N-(2-((2-((1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)-3,4- diclorobenzamida. Formula molecular: $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4$. Rendimento: 30%; Aspecto: pó bege amorfo; Massa molar: 416,10 g/mol, R_T : 2,90 min; Grau de pureza: 98,5%, ponto de fusão: 234-235. **RMN ^1H** (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 0,82 (d, 3H, $J=6,5$ Hz, CH_3), 0,86 (d, 3H, $J=6,5$ Hz, CH_3), 1,49 (t, 2H, $J=7,3$ Hz; CH_2), 1,54-1,59 (m, 1H, $\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$), 3,69 (dd, 2H, $J=5,6$; 16,6 Hz, $\underline{\text{CH}}_2(\text{C}=\text{O})$), 3,78 (dd, 2H, $J=5,9$ e 16,6 Hz e $\underline{\text{CH}}_2(\text{C}=\text{O})$), 3,88 (d, 2H, $J=5,6$ Hz $\underline{\text{CH}}_2(\text{C}=\text{O})$), 4,19 (d, 1H, $J=7,8$ Hz, CH^*), 6,98 (s, 1H, NH_2), 7,21 (s, 1H, NH_2), 7,77 (t, 1H, $J=4,2$ Hz, CH_{Ar}), 7,79 (s, 1H, NH), 7,85 (dd, 1H, $J=1,9$ e 8,4 Hz, CH_{Ar}), 8,12 (d, 1H, $J=2,0$ Hz, CH_{Ar}), 8,28 (t, 1H, $J=5,7$ Hz, NH), 9,11 (t, 1H, $J=5,5$ Hz, NH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 21,92 ($\underline{\text{CH}}_3$), 23,50 ($\underline{\text{CH}}_3$), 24,68 ($\underline{\text{CH}}_2$), 41,19 ($\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)$), 42,65 ($\underline{\text{CH}}_2(\text{C}=\text{O})$), 43,56 ($\underline{\text{CH}}_2(\text{C}=\text{O})$), 51,34 ($\underline{\text{CH}}^*$), 128,14 (CAr), 129,92 (CAr), 131,15 (CAr), 131,70 (CAr), 134,68 (CAr), 134,68 (CAr), 165,17 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 168,17 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 169,67 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$), 174,50 ($\text{C}=\text{O}(\text{NH})$). APÊNDICE J.

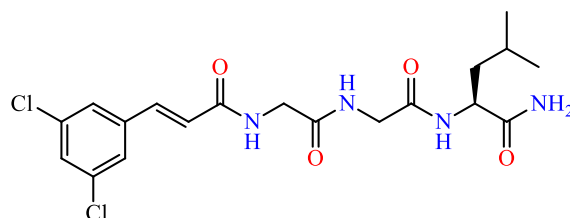
Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 16 (**PEP16**)



Nome químico: (S)-N-(2-((2-((1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)-2,3- diclorobenzamida. Fórmula molecular: $C_{17}H_{22}Cl_2N_4O_4$. Rendimento: 50%; Aspecto: bege branco amorfo; Massa molar: 408.45 g/mol, R_T : 2,74 min; Grau de pureza: 94,9%, ponto de fusão: 220-225. **RMN 1H** (600 MHz, DMSO- d_6) δ 0,82 (d, 3H, $J=6,5$ Hz, CH_3), 0,86 (d, 3H, $J=6,5$ Hz, CH_3), 1,46 (t, 2H, $J=6,8$ Hz; CH_2), 1,54-1,59 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 3,75 (dd, 2H, $J=5,4$; 16,6 Hz, $CH_2(C=O)$), 3,81 (dd, 2H, $J=5,5$ e 16,6 Hz e $CH_2(C=O)$), 3,89 (d, 2H, $J=5,7$ Hz $CH_2(C=O)$), 4,22 (q, 1H, $J=7,7$ Hz, CH^*), 6,99 (s, 1H, NH_2), 7,27 (s, 1H, NH_2), 7,43 (t, 1H, $J=7,7$ Hz, CH_{Ar}), 7,46-7,47 (m, 1H, NH), 7,71 (dd, 1H, $J=1,3$ e 7,8 Hz, CH_{Ar}), 7,89 (d, 1H, $J=8,3$ Hz, CH_{Ar}), 8,12 (t, 1H, $J=5,2$ Hz, NH), 8,85 (t, 1H, $J=5,5$ Hz, NH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 21,95 (CH_3), 23,48 (CH_3), 24,69 (CH_2), 41,24 ($CH(CH_3)$), 42,62 ($CH_2(C=O)$), 43,03 ($CH_2(C=O)$), 51,34 (CH^*), 128,05 (CAr), 128,70 (CAr), 128,83 (CAr), 131,68 (CAr), 132,54 (CAr), 139,16 (CAr), 166,64 (C=O(NH)), 168,89 (C=O(NH)), 169,21 (C=O(NH)), 174,49 (C=O(NH)).

APÊNDICE K.

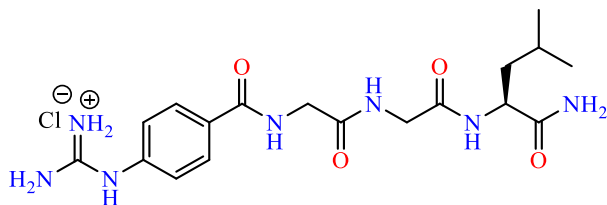
Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 18 (**PEP18**)



Nome químico: (S,E)-2-(2-(2-(3-(3,5-diclorofenil)acrilamido)acetamido)acetamido)-4-metilpentanamida. Fórmula molecular: $C_{19}H_{24}Cl_2N_4O_4$. Rendimento: 40%; Aspecto: pó branco amorfo; Massa molar: 442.11 g/mol, R_T : 3,04 min; Grau de pureza: 100%. ponto de fusão: 230-233 °C **RMN 1H** (600 MHz, DMSO- d_6) δ 0,82 (d, 3H, $J=6,5$ Hz, CH_3), 0,87 (d, 3H, $J=6,5$ Hz, CH_3), 1,48 (t, 2H, $J=7,2$ Hz; CH_2), 1,54-1,59 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 3,71 (dd, 2H, $J=5,5$; 16,6 Hz, $CH_2(C=O)$), 3,78 (dd, 2H, $J=5,8$ e 16,6 Hz e $CH_2(C=O)$), 3,86 (d, 2H, $J=5,3$ Hz $CH_2(C=O)$), 4,21 (qa, 1H, $J=7,7$ Hz, CH^*), 6,87(d, 1H, $J=15,8$ Hz), Ar- $HC=CH(C=O)$), 6,99-7,00 (m, 1H, CH_{Ar}), 7,23 (s, 1H, CH_{Ar}), 7,39 (d, 1H, $J=15,8$ Hz, Ar- $HC=CH(C=O)$), 7,61 (s, 1H, CH_{Ar}), 7,65 (d 2H, NH_2), 7,86 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, NH), 8,22(t, 1H, $J=5,5$ Hz, NH), 8,39 (t, 1H, $J=5,5$ Hz, NH). **RMN ^{13}C** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 21,94 (CH_3), 23,53 (CH_3), 24,69 (CH_2), 41,24 ($CH(CH_3)$), 42,5 ($CH_2(C=O)$), 42,97 ($CH_2(C=O)$),

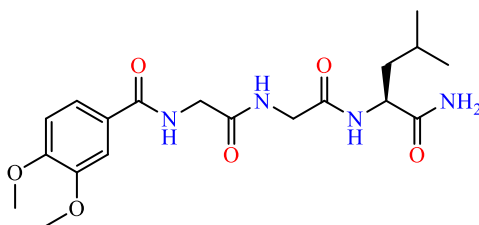
51,33 (CH*), 125,62 (CAr), 126,51 (CAr), 128,99 (CAr), 136,08 (CAr), 136,60 (CAr), 165,33 (C=O(NH)), 168,95 (C=O(NH)), 169,62 (C=O(NH)). APÊNDICE L.

Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 19 (**PEP19**)



Nome químico: Cloridrato de (S)-amino((4-((2-((2-((1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)carbamoil)fenil)amino)metanimínio. Fórmula molecular: C₁₈H₂₈N₇O₄Cl. Rendimento: 40%; Aspecto: pó branco amorfo; Massa molar: 406,45 g/mol, R_T: 2,71 min; Grau de pureza: 98%. ponto de fusão: 200-203 °C **RMN ¹H** (600 MHz, DMSO-d₆) δ 0,81-0,82 (m, 3H, CH₃), 0,85-0,87 (m, 3H, CH₃), 1,45-1,52 (m, 2H, CH₂), 1,55-1,59 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,70 (dd, 2H, J=5,8; 16,7 Hz, CH₂(C=O)), 3,78 (dd, 2H, J=5,8 e 16, Hz e CH₂(C=O)), 3,88-3,90 (m, 2H, CH₂(C=O)), 4,19 (sept, 1H, J=4,62 Hz, CH*), 6,99 (s, 1H, NH₂), 7,24 (s, 1H, NH₂), 7,32 (d, 1H, J=8,6 Hz, CH_{Ar}), 7,62 (sl, 2H, CH_{Ar} e NH*), 7,87 (d, 1H, J=8,4 Hz, CH_{Ar}), 7,94 (d, 1H, J=8,6Hz, CH_{Ar}), 8.23-8,26 (m, 1H, NH), 8,92-8,94 (t, 1H, J=5,7 Hz, NH), 10,07 (sl, 1H, NH_{guanidina}). APÊNDICE M.

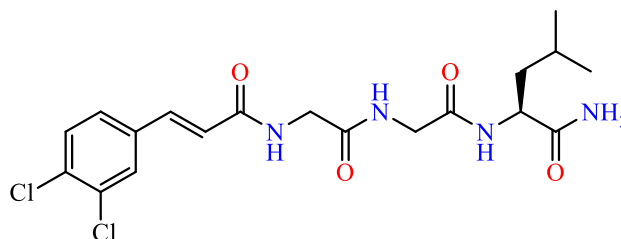
Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 21 (**PEP21**)



Nome químico: (S)-N-(2-((2-((2-((1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)-3,4- dimetoxibenzamida. Fórmula molecular: C₁₉H₂₈N₄O₆. Rendimento: 70%; Aspecto: pó branco amorfo; Massa molar: 408,44 g/mol, R_T: 1,88 min; Grau de pureza: 99%. ponto de fusão: 248-250 °C **RMN ¹H** (600 MHz, DMSO-d₆) δ 0,82 (d, 3H, J=6,4 Hz, CH₃), 0,86 (d, 3H, J=6,5 Hz, CH₃), 1,48-1,55 (m, 2H, CH₂), 1,56-1,60

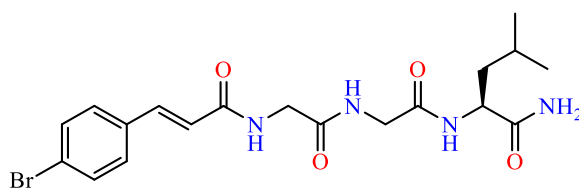
(m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,68 (dd, 1H, CH₂(C=O)), 3,76 (d, 1H, *J*=6,0 Hz, CH₂(C=O)), 3,79 (sl, 3H, OCH₃), 3,84-3,86 (m, 2H, CH₂(C=O)) 3,80 (sl, 3H, OCH₃), 4,18 (sex, 1H, *J*=4,7Hz CH*), 7,00 (sl, 1H, NH), 7,03 (sl, 1H, NH), 7,04 (sl, 1H, NH), 7,17 (sl, 1H, NH), 7,47 (d, 1H, *J*=2,0Hz CHAr), 7,51 (dd, 1H, *J*=2,0 e 8,4 Hz, CHAr), 7,82 (d, 1H, *J*=8,4 Hz CHAr) 8,27 (t, 1H, *J*=5,7 Hz, NH), 8,82 (t, 1H, *J*=5,6 Hz, NH). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 21,03 (CH₃), 22,49(CH₃), 23,87 (CH₂), 41,36 (CH(CH₃), 41,78 (CH(CH₃), 51,62 (CH*), 55,07 (OCH₃), 55,11 (OCH₃), 110,25 (CAr), 110,53(CAr), 120,40 (CAr), 125,64 (CAr), 147,66 (CAr), 150,93 (CAr), 165,74 (C=O(NH)), 165,51 (C=O(NH)), 170,33 (C=O(NH)), 172,51 (C=O(NH)). APÊNDICE N.

Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 25 (PEP25)



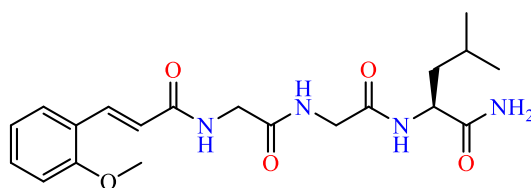
Nome químico: (*S,E*)-2-(2-(2-(3-(3,4-diclorofenil)acrilamido)acetamido)acetamido)-4-metilpentanamida Fórmula molecular: C₁₉H₂₄Cl₂N₄O₄. Rendimento: 40%; Aspecto: pó branco amorfo; Massa molar: 442.11 g/mol, R_T: não mensurado; Grau de pureza: não mensurado. ponto de fusão: 230-233 °C RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ 0,82 (d, 3H, *J*=6,3 Hz, CH₃), 0,87 (d, 3H, *J*=6,4 Hz, CH₃), 1,48 (t, 2H, *J*=7,1 Hz; CH₂), 1,54-1,59 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,70 (dd, 2H, *J*=5,5; 16,5 Hz, CH₂(C=O), 3,78 (dd, 2H, *J*=5,8 e 16,5 Hz e CH₂(C=O), 3,86 (d, 2H, *J*=5,6 Hz CH₂(C=O)), 4,21 (qa, 1H, *J*=7,7 Hz, CH*), 6,82 (d, 1H, *J*=15,8Hz), Ar-HC=CH(C=O)), 7,00 (sl, 1H, NH), 7,24 (sl, 1H, NH), 7,41 (d, 1H, *J*=15,6 Hz, Ar-HC=CH(C=O)), 7,57 (dd, 1H, *J*=1,9 e 8,4 Hz CHAr), 7,68 (d, 1H, *J*=8,4 Hz CHAr), 7,86 (d, 1H, *J*=1,7 Hz, CHAr), 8,22 (t, 1H, *J*=5,7 Hz, NH), 8,45 (t, 1H, *J*=5,7 Hz, NH). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 21,90 (CH₃), 23,54 (CH₃), 24,67 (CH₂), 41,10 (CH(CH₃), 42,54 (CH₂(C=O)), 42,97 (CH₂(C=O), 51,29 (CH*), 124,57 (CAr), 127,78 (CAr), 129,92 (CAr), 131,16 (CAr), 136,23 (CAr), 165,52 (C=O(NH)), 168,97 (C=O(NH)), 169,70 (C=O(NH)), 174,56 (C=O(NH)). APÊNDICE O

Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 27 (**PEP27**)



Nome químico: (S,E)-2-(2-(2-(3-(4-bromofenil)acrilamido)acetamido)acetamido)-4-metilpentanamida. Fórmula molecular: C₁₉H₂₅BrN₄O₄. Rendimento: 40%; Aspecto: pó branco amorfo; Massa molar: 452,11g/mol, R_T: não mensurado; Grau de pureza: não mensurado, ponto de fusão: 165-170 °C. **RMN ¹H** (600 MHz, DMSO-_d₆) δ 0,81 (d, 3H, J=6,4 Hz, CH₃), 0,86 (d, 3H, J=5,7 Hz, CH₃), 1,48 (t, 2H, J=6,7 Hz; CH₂), 1,56-1,58 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,7 (dd, 2H, J=4,6; 16,6 Hz, CH₂(C=O)), 3,77 (dd, 2H, J=5,2 e 16,6 Hz e CH₂(C=O)), 3,84-3,87 (m, 2H, CH₂(C=O)), 4,17-4,21 (m, 1H, CH*), 6,76 (d, 1H, J=15,8Hz, Ar-HC=CH(C=O)), 7,01 (s, 1H, NH), 7,22 (d, 1H, J=14,1Hz, NH), 7,40 (d, 1H, J=15,8Hz, Ar-HC=CH(C=O)), 7,51 (d, 2H, J=7,2Hz, CH_{Ar}), 7,62 (d, 2H, J=7,7Hz, CH_{Ar}), 7,85 (d, J=8,2, 2H, NH), 8,25 (d, 1H, NH), 8,52 (sl, 1H, NH). **RMN ¹³C** (100 MHz, DMSO-_d₆) δ 21,90 (CH₃), 23,53 (CH₃), 24,68 (CH₂), 41,13 (CH(CH₃)), 42,60 (CH₂(C=O)), 43,04 (CH₂(C=O)), 51,36 (CH*), 123,15 (Ar-HC=CH(C=O)), 123,17 (CAr), 129,97 (CAr), 132,40 (CAr), 134,29 (CAr), 138,29 (CAr), 165,69 (C=O(NH)), 169,01 (C=O(NH)), 169,83 (C=O(NH)), 174,57 (C=O(NH)). APÊNDICE Q

Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 28 (**PEP28**)

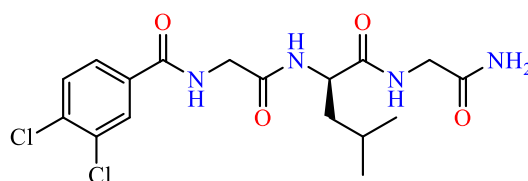


Nome químico: (S,E)-2-(2-(2-(3-(2-metoxifenil)acrilamido)acetamido)acetamido)-4-metilpentanamida. Fórmula molecular: C₂₀H₂₈N₄O₅. Rendimento: 40%; Aspecto: pó branco amorfo; Massa molar: 404,21 g/mol, R_T: não mensurado; Grau de pureza: não mensurado. ponto de fusão: 175-178 °C. **RMN ¹H** (600 MHz, DMSO-_d₆) δ 0,82 (d, 3H, J=5,1 Hz, CH₃), 0,87 (d, 3H, J=5,1 Hz, CH₃), 1,48-1,50 (m, 2H, CH₂), 1,55-1,58 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,68 (m, 1H, CH₂(C=O)), 3,75-3,78 (m, 1H, CH₂(C=O)), 3,83-3,84 (m, 2H, CH₂(C=O)), 3,84 (sl. 3H, OCH₃), 4,18 (m, 1H, CH*), 6,74 (d, 1H, J=15,0Hz, Ar-

HC=CH(C=O)), 6,99-7,00 (m, 2H, CH_{Ar} e NH). 7,07 (d, 1H, $J=8,2\text{Hz}$, CH_{Ar}), 7,20 (sl, 1H, NH), 7,37 (t, 1H, $J=7,6\text{ Hz}$, CH_{Ar}), 7,52 (d, 1H, $J=7,4\text{Hz}$, CH_{Ar}), 7,68 (d, 1H, $J=15,0\text{ Hz}$, Ar-HC=CH(C=O)), 7,86 (d, $J=7,9$, 1H, NH), 8,26 (sl, 1H, NH), 8,52(sl, 1H, NH). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 21,90 (CH₃), 23,53 (CH₃), 24,68 (CH₂), 41,13 (CH(CH₃)), 42,60 (CH₂(C=O)), 43,04 (CH₂(C=O)), 51,36 (CH*), 123,15 (Ar-HC=CH(C=O)), 123,17 (CAr), 129,97 (CAr), 132,40 (CAr), 134,29 (CAr), 138,29 (CAr), 165,69 (C=O(NH)), 169,01 (C=O(NH)), 169,83 (C=O(NH)), 174,57 (C=O(NH)). APÊNDICE R.

5.2.2.3 Dados de síntese e caracterização química da série de tri-peptídeos com sequência Gly -Leu-Gly -NH₂ (série III)

Dados físico-químicos e elucidação estrutural do peptídeo 26 (PEP26)



Nome químico: (S)-N-(2-((2-((1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)-3,4- diclorobenzamida. Formula molecular: C₁₇H₂₂Cl₂N₄O₄. Rendimento: 30%; Aspecto: pó bege amorfo; Massa molar: 416,10 g/mol, R_r: não mensurado; Grau de pureza: não mensurado%, ponto de fusão: 234-235. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ 0,83 (d, 3H, $J=6,5\text{ Hz}$, CH₃), 0,87 (d, 3H, $J=6,5\text{ Hz}$, CH₃), 1,44-1,53 (m, 2H, CH₂), 1,60 (sept, 1H, $J=6,6\text{ Hz}$, CH(CH₃)₂), 3,90-3,92 (m, 2H, CH₂(C=O)), 4,26 (q, 1H, $J=7,5\text{ Hz}$, CH*), 7,06 (sl, 1H, NH₂), 7,12 (sl, 1H, NH₂), 7,77 (d, 1H, $J=8,4\text{ Hz}$ CH_{Ar}), 7,84 (dd, 1H, $J=2,0$ e $8,5\text{ Hz}$, CH_{Ar}), 8,10 (d, 1H, $J=2,0\text{ Hz}$ CH_{Ar}) 8,15 (t, 1H, $J=6,0$, NH), 8,21 (t, 1H, $J=7,6\text{ Hz}$, NH), 8,99 (t, 1H, $J=5,6\text{ Hz}$, NH). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 21,88 (CH₃), 23,50 (CH₃), 24,69 (CH₂), 41,06 (CH₂(C=O)), 42,65 (CH₂(C=O)), 56,03 (CH*), 112,21 (CAr), 121,18 (CAr), 122,50 (Ar-HC=CH(C=O)), 123,67 (CAr), 128,30 (CAr), 131,41 (CAr), 134,69, Ar-HC=CH(C=O) (C=O(NH)), 166,58 (C=O(NH)), 169,05 (C=O(NH)), 170,05 (C=O(NH)), 174, 59 (C=O(NH)). APÊNDICE P.

5.3 Espectrometria de Massas

Para corroborar com a elucidação estrutural, todos os peptidomiméticos foram caracterizados por espectrometria de massas de alta resolução. A Tabela 1 demonstra os

principais resultados. Nota-se que estes apresentaram razão massa/carga compatível com o cálculo teórico das estruturas e com erro menor que 6 ppm, como reportado em estudos anteriores de Dantas et. al, 2021.

Tabela 1: Caracterização dos peptídeos por HPLC-ESI-HRMS

Código	Massa Molar (g/mol)	m/z (M-H)	Fórmula molecular	Erro (ppm)
Pep-02	417.29	415.0934	C ₁₇ H ₂₂ Cl ₂ N ₄ O ₄	2.8
Pep-04	417.29	415.0730	C ₁₇ H ₂₂ Cl ₂ N ₄ O ₄	-4.4
Pep-05	349.38	348.1676	C ₁₆ H ₂₃ N ₅ O ₄	0.4
Pep-06	349.38	348.1692	C ₁₆ H ₂₃ N ₅ O ₄	-4.2
Pep-07	349.38	348.1680	C ₁₆ H ₂₃ N ₅ O ₄	0.7
Pep-09	408.45	407.1927	C ₁₉ H ₂₈ N ₄ O ₆	2.3
Pep-10	424.49	423.2047	C ₂₃ H ₂₈ N ₄ O ₄	-2.3
Pep-12	408.88	**	C ₁₉ H ₂₈ N ₄ O ₆	-
Pep-13	408.88	407.1496	C ₁₉ H ₂₅ ClN ₄ O ₄	-1.1
Pep-15	416,10	415.0945	C ₁₇ H ₂₂ Cl ₂ N ₄ O ₄	-4.8
Pep-16	416,10	415.0948	C ₁₇ H ₂₂ Cl ₂ N ₄ O ₄	0.5
Pep-18	442,11	**	C ₁₉ H ₂₄ Cl ₂ N ₄ O ₄	-
Pep-19	441,18	440.1908	C ₁₈ H ₂₈ ClN ₇ O ₄	-1.9
Pep-21	408,20	407.1947	C ₁₉ H ₂₈ N ₄ O ₆	-2.7
Pep-25	442,11	441.1092	C ₁₉ H ₂₄ Cl ₂ N ₄ O ₄	2.2
Pep-26	416,10	415.0936	C ₁₇ H ₂₂ Cl ₂ N ₄ O ₄	2.2
Pep-27	452,11	451.0983	C ₁₉ H ₂ BrN ₄ O ₄	0.8
Pep-28	404,21	403.2014	C ₂₀ H ₂₈ N ₄ O ₅	-6.6

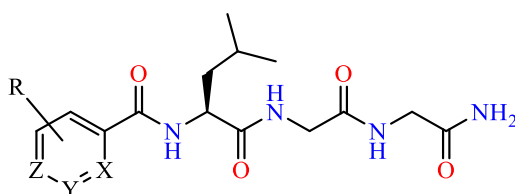
Fonte: Autora, 2024. ** massa não identificada

5.4 Avaliação biológica dos peptidomiméticos:

A citotoxicidade *in vitro* dos peptidomiméticos da série I (Leu-Gly-Gly-NH₂) foi avaliada na concentração de 20 µM (**PEP06**, **PEP07**, **PEP10** e **PEP13**) e a 50, 100 e 200 µM para os demais peptídeos desta série. O ensaio de MTT utilizado para avaliar a viabilidade celular das células *Vero E6* evidenciou que os peptidomiméticos foram bem

tolerados e não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas após 48h de cultivo celular. Desse modo, os cálculos de concentração citotóxica em 50% das células (CC₅₀) foram determinados como superior à 200 µM para os peptidomiméticos (**PEP02**, **PEP04**, **PEP05**, **PEP09** e **PEP13**) (TABELA 2). Portanto, a triagem da atividade antiviral contra CHIKV foi realizada com todos os peptidomiméticos.

Tabela 2: Perfil citotóxico e antiviral *in vitro* dos peptidomiméticos da série I (Leu-Gly-Gly).



Cód.	R	X	Y	Z	CC ₅₀ (µM)	Inibição (%) ± DP**
PEP02	-2,3 di-Cl	C	C	C	> 200	40,0 ± 9,638
PEP04	-3,4 di-Cl	C	C	C	> 200	55,0 ± 0,3819
PEP05	-H	N	C	C	> 200	31,3 ± 6,028
PEP06	-H	C	N	C	*	**
PEP07	-H	C	C	N	*	**
PEP09	-3,4 OCH ₃	C	C	C	> 200	30,0 ± 11,43
PEP10	2-Ph	C	C	C	*	**
PEP13	3-Cl	C	C	C	*	**

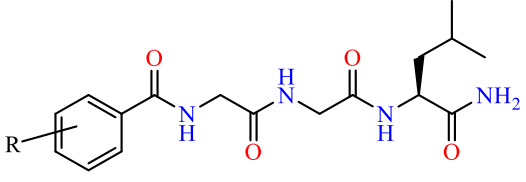
*A citotoxicidade foi realizada na concentração de 20 µM. **Inibição viral na concentração de 80µM dos peptidomiméticos. A viabilidade celular foi avaliada após 48h e a inibição viral (%) foi determinada para cada composto. Os valores expressos resultam da média ± DP das triplicatas. Como controles foram usados: CHIKV=células não tratadas infectadas com CHIKV e CC = controle celular não infectado. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ versus CHIKV. ND: Não determinado.

O perfil antiviral dos tripeptídeos **PEP06**, **PEP07**, **PEP10** e **PEP13** foi avaliado na concentração de 20 µM, após a adsorção viral nas células *Vero E6*. Como resultado, não foram observadas inibições significativas na concentração testada. Por outro lado, os ensaios em seis concentrações distintas (2,5; 5; 10; 20; 40; e 80 µM) para **PEP02**, **PEP04**, **PEP05** e **PEP09** demonstram uma baixa inibição dos peptídeos na maior concentração

testada, evidenciando um baixo perfil antiviral da série formada por Leu-Gly-Gly. É importante mencionar que serão necessárias novas análises antivirais com os peptídeos avaliados em única concentração para melhores conclusões do perfil antiviral. Contudo, até o presente momento, pode-se sugerir que os substituintes derivados de piridina e com grupamentos metoxila não apresentam grande influência sob o perfil antiviral. Sugere-se ainda que os substituintes (Caps ligados à extremidade carboxiterminal), que apresentam o anel aromático com cloro 2,3- ou 3,4-substituídos tiveram maior relevância no perfil antiviral, embora o derivado de ácido cinâmico não tenha sido promissor.

Os tri-peptídeos estruturalmente compostos por resíduos de gly-gly-Leu (série II) foram desenvolvidos com substituintes aromáticos e derivados de ácidos cinâmicos ligados à extremidade carboxiterminal do tripeptídeos. A citotoxicidade destes peptidomiméticos foi avaliada por ensaio colorimétrico MTT em células *Vero E6*, nas concentrações de 50, 100 e 200 μM . Após 48h de tratamento, a viabilidade das células *Vero E6* foram determinadas. De modo semelhante, os tripeptídeos da série II demonstrou excelente perfil sob a viabilidade celular, exibindo $\text{CC}_{50} > 200 \mu\text{M}$ (TABELAS 3 e 4). É importante salientar que apenas o **PEP18** exibiu alterações morfológicas nas células em concentração de 200 μM . Portanto, a triagem antiviral *in vitro* dos peptidomiméticos foi realizada.

Tabela 3: Perfil citotóxico e antiviral *in vitro* dos peptidomiméticos da série II (Gly-Gly-Leu) com substituintes aromáticos em C-terminal.

						
Cód.	R	$\text{CC}_{50} (\mu\text{M})$	Inibição (%) \pm DP*	$\text{CE}_{50} (\mu\text{M})$	SI	
PEP15	3,4-di-Cl	> 200	59,36 \pm 4,967	5,49	> 36,42	
PEP16	2,3-di-Cl	> 200	65,02 \pm 3,577	2,12	> 89,68	
PEP19	-NHC(NH ₂)NH ₂	> 200	34,94 \pm 6,924	21,31	> 9,38	
PEP21	3,4-di-OCH ₃	>200	34,28 \pm 6,596	37,7	> 5,36	

*Inibição viral na concentração de 10 μ M dos peptidomiméticos. A viabilidade celular foi avaliada após 48h e a inibição viral (%) foi determinada para cada composto. Os valores expressos resultam da média \pm DP das triplicatas. Como controles foram usados: CHIKV=células não tratadas infectadas com CHIKV e CC = controle celular não infectado. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ versus CHIKV.

Tabela 4: Perfil citotóxico e antiviral *in vitro* dos peptidomiméticos da série II (Gly-Gly-Leu) com substituintes derivados do ácido cinâmico em C-terminal.

Cód.	R	CC ₅₀	Inibição (%)	CE ₅₀	SI
PEP12	-3 Cl	>200 μ M	73,06 (\pm 4,038)	33,37 μ M	> 5,99
PEP18	3,5 Cl ₂	>200 μ M	74,79 (\pm 4,751)	11,62 μ M	> 17,21
PEP25	3,4 Cl ₂	>200 μ M	49,83 (\pm 7,747)	ND	ND
PEP27	4-Br	>200 μ M	47,00 (\pm 14,77)	ND	ND
PEP28	2-OCH ₃	>200 μ M	70,00 (\pm 6,002)	38,84 μ M	> 5,14

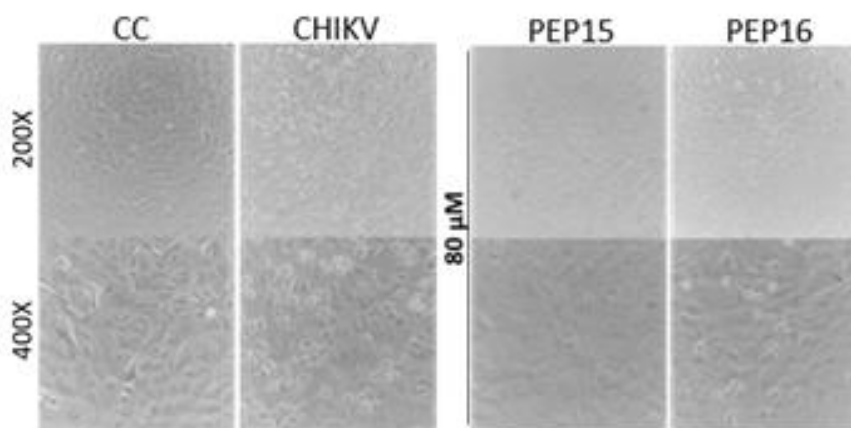
*Inibição viral na concentração de 80 μ M dos peptidomiméticos. A viabilidade celular foi avaliada após 48h e a inibição viral (%) foi determinada para cada composto. Os valores expressos resultam da média \pm DP das triplicatas. Como controles foram usados: CHIKV=células não tratadas infectadas com CHIKV e CC = controle celular não infectado. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ versus CHIKV. ND=Não determinado.

De maneira geral, o perfil antiviral dos tripeptídeos formados por Gly-Gly-Leu (série II) apresentou maior relevância em comparação com a série I. De fato, a sequência peptídica da série II demonstrou ser o melhor scaffold anti-CHIKV, dados estes em concordância com os trabalhos anteriormente publicados (Dhindwal et al., 2017b; H. Singh et al., 2018). Nossos dados demostraram que os substituintes derivados de ácidos cinâmicos são inibidores fracos quando comparados aos análogos com substituintes aromáticos em C-terminal. Ainda assim, nota-se que os melhores inibidores deste perfil apresentavam substituinte cloro na posição 3 (**PEP12** e **PEP18**).

Surpreendentemente, o melhor perfil antiviral dos peptidomiméticos foi evidenciado com análogos **PEP15** e **PEP16** exibindo CE_{50} inferiores a 5 μ M com bom perfil de seletividade (TABELA 3). De fato, nossas pesquisas revelaram novos peptídeos potentes com efeito anti-CHIKV avaliado *in vitro*. Destaca-se que os únicos peptidomiméticos reportados na literatura apresentaram concentrações inibitórias superiores a 34 μ M sob o alvo nsP2, sem concentração inibitória determinada sob células (Dhindwal et al., 2017b; H. Singh et al., 2018).

Em adição, os tripeptídeos **PEP15** e **PEP16** apresentam uma característica particular de inibição do efeito citopático viral pós-tratamento, conforme observados nas imagens de microscopia dos respectivos experimentos conforme figura 13.

Figura 13. Microscopia óptica da inibição do efeito citopático viral observada pós-tratamento com as maiores concentrações avaliadas de PEP15 e PEP16.



Fonte: Autora, 2024.

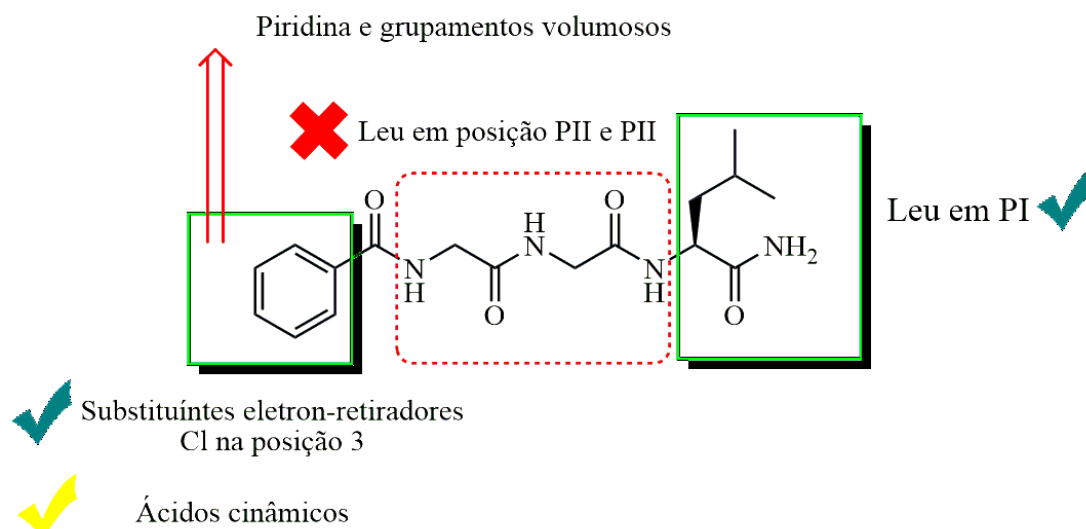
A fim de analisar a influência do resíduo de Leucina na posição 2 dos peptídeos, sintetizou-se um análogo apenas para compor a série III dos compostos desenvolvidos neste trabalho. Assim o **PEP26** (Gly-Leu-Gly), substituído com 3,4-di-Ph exibiu CC_{50} superior a 200 μ M, mas baixo perfil antiviral (%inibição = $47 \pm 14,7$ a 80 μ M). Este resultado sugere que o resíduo de Glicina na posição II parece desempenhar um papel importante no efeito anti-CHIKV (Dhindwal et al., 2017b).

Estes dados permitem propor uma breve relação estrutura-atividade, na qual pode-se destacar:

1- A sequência de aminoácidos Gly-Gly-Leu é crucial para o efeito biológico contra CHIKV, sendo sua sequência inversa (Leu-Gly-Gly) pouco ativa.

- 2- O resíduo de Leucina na posição P1 se mostrou importante para o efeito antiviral,
- 3- Grupamentos elétron-retiradores parecem contribuir com os efeitos anti-CHIKV. Sendo o átomo de Cloro (Cl) o mais relevante para o efeito inibitório;
- 4- O átomo de Cloro (Cl) na posição 3 contribuem para o efeito inibitório, corroborando com estudos anteriores do grupo de pesquisa;

Figura 14. Principais informações de REA dos peptidomiméticos desenvolvidos.



Fonte: Autora, 2024. Principais informações de Relação estrutura-atividade baseada nos ensaios celulares dos peptidomiméticos desenvolvidos. Em verde: Substituições favoráveis para o efeito biológico; vermelho: alterações estruturais desfavoráveis para o efeito biológico; Amarelo: substituições relativamente importantes em associação com a sequência peptídica em que Leu está em PI.

5.4 Predição das propriedades físico-químicas do PEP15 e PEP16:

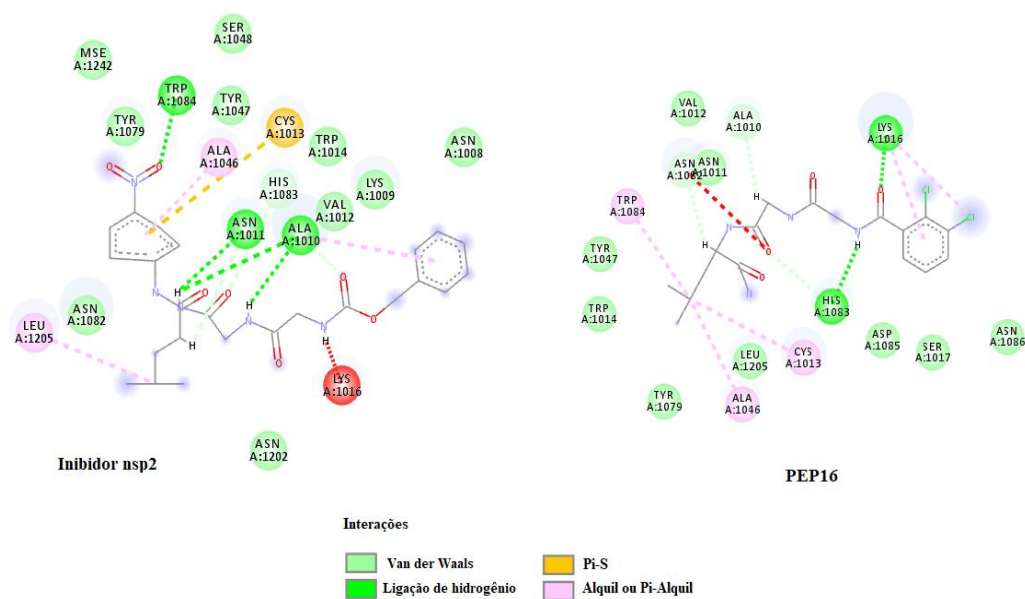
Destaca-se ainda que os peptidomiméticos obtidos neste trabalho apresentam uma ampla vantagem em comparação com os peptidomiméticos reportados na literatura atual, uma vez que estes são compostos por aminoácidos neutros o que pode implicar melhores características farmacocinéticas em comparação aos peptídeos formados por aminoácidos polares carregados. É importante salientar que os peptidomiméticos mais ativos (**PEP15** e **PEP16**) apresentam bom perfil farmacocinético, uma vez que atendem a regra de Lipinski, apresentam bom coeficiente de partição (Log P= 1,54 e 1,69, respectivamente) e apresentam boa probabilidade de absorção oral. De acordo com simulações feitas no SWISS ADME (<http://www.swissadme.ch/>). Tais propriedades são importantes, uma vez que diversos peptídeos com efeitos antivirais potentes em alvos enzimáticos apresentam

limitações farmacocinéticas em ensaios celulares (Behnam et al., 2015; Kühl et al., 2020; Silva-Júnior & Araújo-Júnior, 2019).

5.5 Docking molecular sob protease viral nsP2 do vírus CHIKV para PEP16.

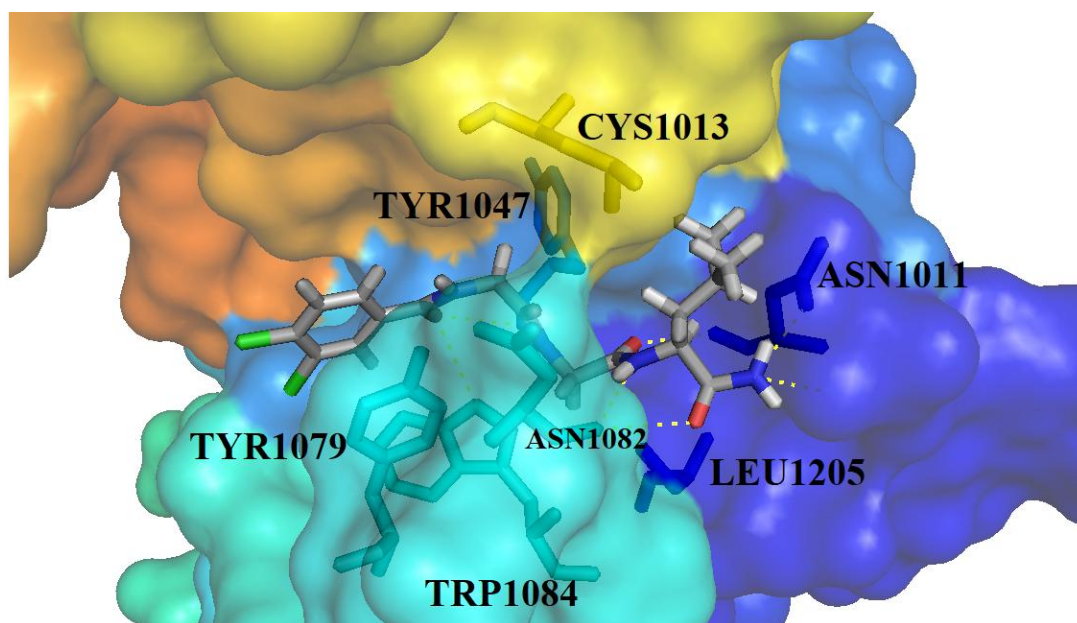
Após os excelentes resultados antivirais, selecionou-se o peptidomimético mais ativo nos ensaios celulares para averiguação das possíveis interações no alvo de interesse neste trabalho, a protease nsP2 (PDB ID: 3TRK). Como resultado, comparou-se o perfil de interação entre o **PEP16** e o peptídeo já reportado como inibidor (**6**) da nsp2 de CHIKV (H. Singh et al., 2018). Observou-se que o **PEP16**, estabelece interações semelhantes ao peptídeo inibidor da nsP2, ambos desempenhando interações com os resíduos catalíticos Cys¹⁰¹³ e His¹⁰⁸³ (Figura 15). Ainda, nota-se que o **PEP16** parece se encaixar no bolso 4 na protease de maneira adequada, fazendo contatos com resíduos como Tyr¹⁰⁴⁷ e Asn¹⁰⁸², como o peptídeo inibidor da nsp2 (Figura 16).

Figura 15: Diagrama 2D para as principais interações entre o inibidor da nsP2 e PEP16.



Fonte: Autora, 2024. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* Discovery studio.

Figura 16: Encaixe e interações do PEP16 no sítio ativo da nsp2 (PDB ID: 3TRK).



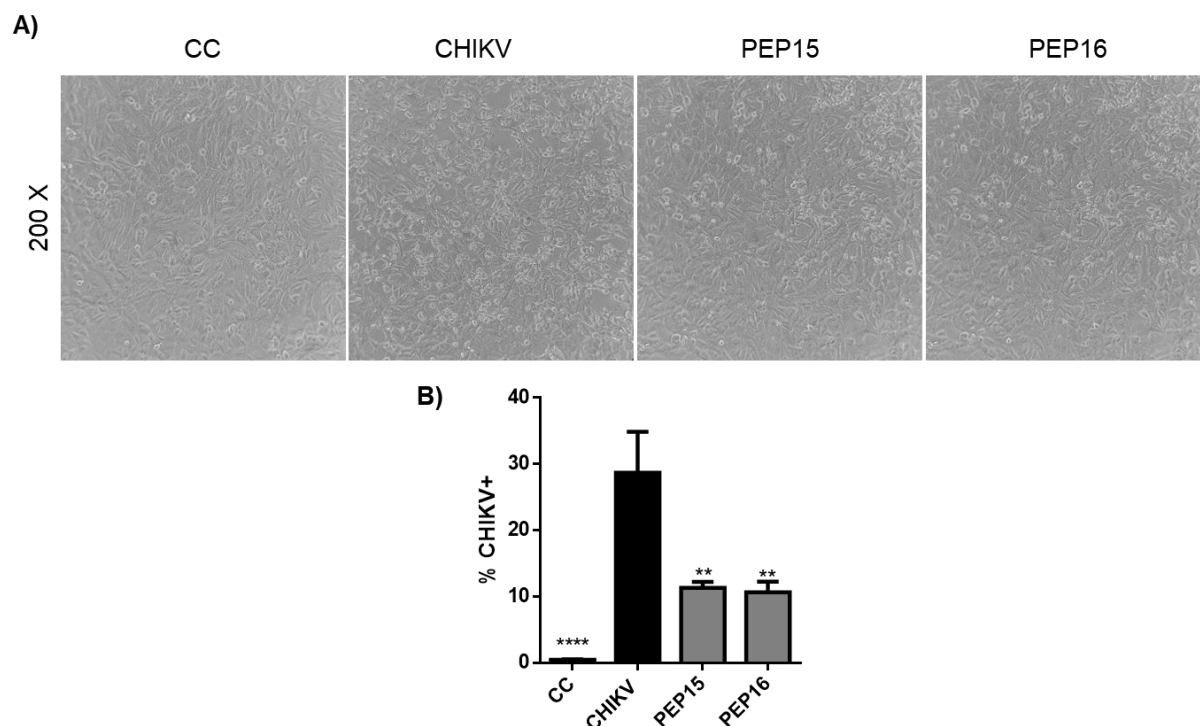
Fonte: Autora, 2024. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* PyMOL® v. 0.99.

5.6 Avaliação do efeito antiviral por citometria de fluxo:

Considerando o efeito antiviral demonstrado através do ensaio com MTT dos compostos PEP 15 e PEP16, ensaios adicionais foram realizados. O efeito anti-CHIKV destes compostos em uma concentração de 80µM foi mensurada após 48 h de tratamento. Dessa forma, a marcação das células positivas para CHIKV após tratamento com PEP 15 e PEP16 foi detectada por citometria de fluxo.

A figura 17 mostra o efeito antiviral destes compostos. Nota-se que os peptídeos exibiram um efeito equipotente capaz de reduzir o efeito citopático induzido por este alfavírus. Ainda, é possível evidenciar uma redução razoável do número de células positivas para CHIKV em comparação com o controle positivo.

Figura 17: Avaliação da atividade anti-CHIKV dos peptídeos através de citometria de fluxo.

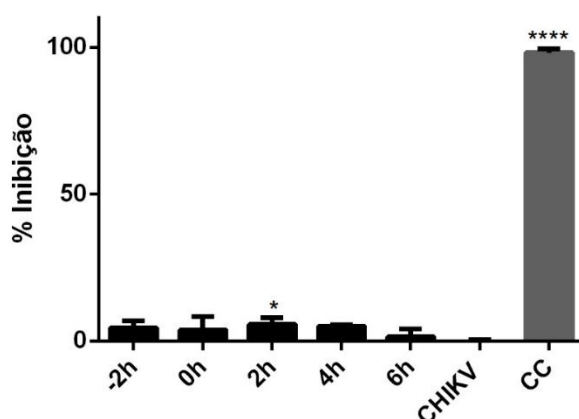


Fonte: Autora, 2024. Células Vero E6 foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^4 células/poço) e inoculadas com CHIKV (MOI 0,01) por 2h de adsorção, ao fim do período o inóculo foi removido e as monocamadas tratadas com compostos (80 μ M) e controles CC e CHIKV (meio com veículo) por 48h. A) Microscopia óptica demonstrando redução no efeito citopático viral pós-tratamento. B) Gráfico da porcentagem de células positivas para CHIKV detectadas por citometria de fluxo, de dois experimentos independentes. Teste *one way* ANOVA múltiplas comparações, média \pm desvio padrão (p ** $\leq 0,01$, **** $\leq 0,0001$, quando comparados ao controle CHIKV).

5.7 Ensaio de tempo de adição de drogas:

A fim de propor em qual etapa do ciclo viral o PEP16 estava atuando, um ensaio antiviral ao qual as células infectadas por CHIKV eram tratadas com o peptídeo sintetizado antes da adsorção e após a adsorção viral foi realizado. No entanto, nos ensaios de tempo de adição de droga realizados não foi possível avaliar uma expressiva inibição viral tendo em vista que nos experimentos independentes realizados houve morte celular acima de 90% inviabilizando assim uma análise mais acurada e representativa como nos ensaios prévios (Figura 18).

Figura 18: Ensaio de tempo de adição de droga.



Fonte: Autora, 2024. Gráfico representativo da análise estatística do ensaio de dois experimentos independentes. (Teste ANOVA, pós-teste Dunnett; $p \leq 0,0001 = ****$, $p \leq 0,05 = *$ quando comparados ao controle viral).

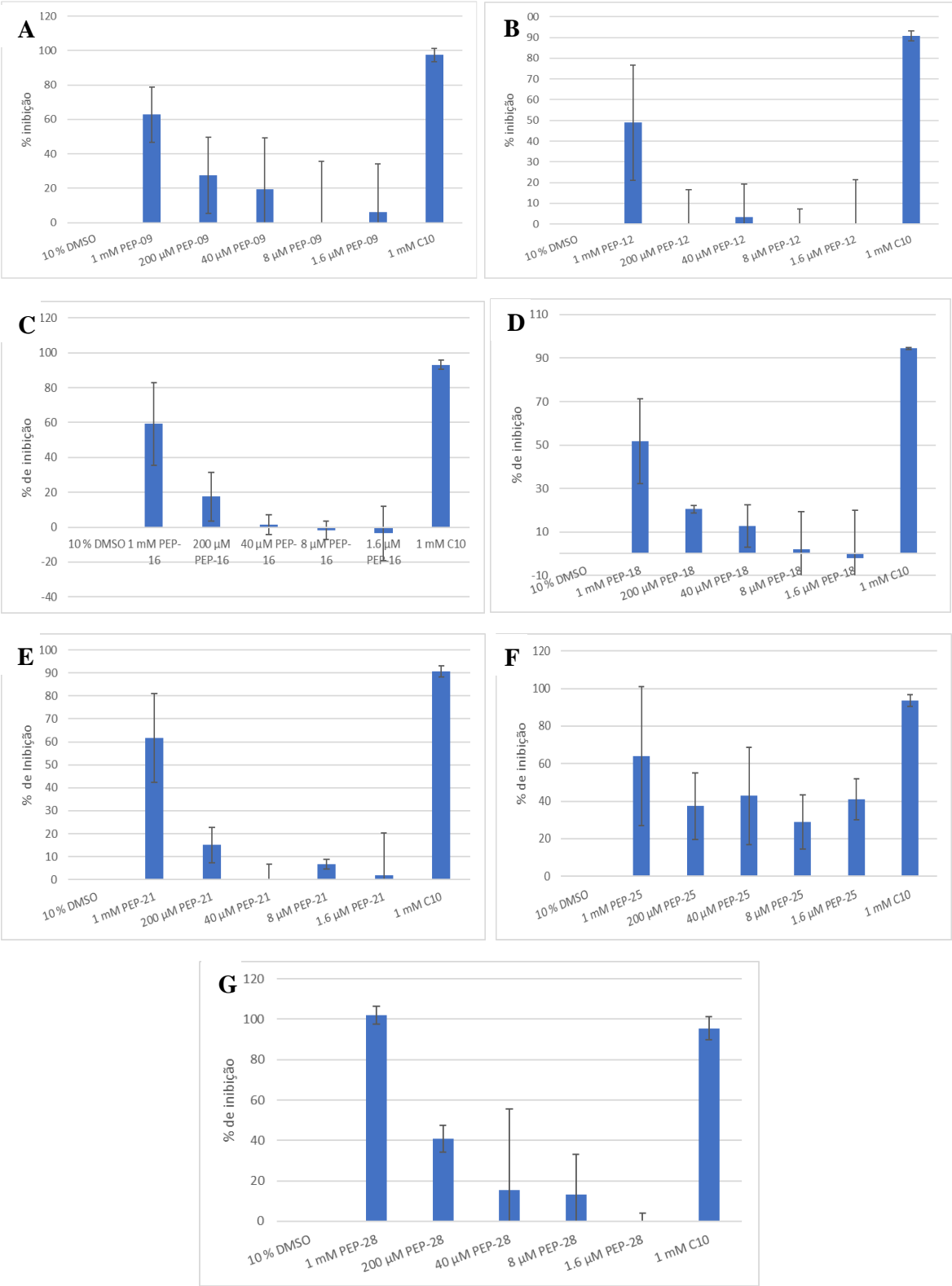
5.8 Ensaio de inibição da protease nsp2

Em virtude da atividade antiviral promissora nos ensaios baseados em células dos peptídeos da série II, os compostos PEP 16, PEP 18, PEP 21, PEP 25 e PEP18 foram selecionados para avaliação do efeito inibitório sobre a protease nsp2. Ainda, como representante da série I composto PEP09 foi selecionado dado a relevância nos ensaios de triagem com o intuito de avaliar a presença do resíduo de Leucina em PIII. A capacidade de inibir a atividade da protease nsP2 recombinante de CHIKV foi analisada utilizando o ensaio de transferência de energia de ressonância de fluorescência- FRET (do inglês- Fluorescence Resonance Energy Transfer).

Como protocolo interno do grupo de pesquisa da Universidade da Estônia, foi utilizado o composto C10 na concentração de 1mM como controle positivo. Embora esta substância não seja um peptidomimético, trabalhos anteriores o validaram como inibidor da protease viral. A figura 19 mostra a porcentagem de inibição dos peptídeos sob a protease nsp2. De um modo geral, é possível notar que os peptídeos das série I (Fig. 19-A) e II (Fig. 19 B-G)- tiveram inibição semelhantes (~60%) na concentração máxima testada (1mM). Contudo, mesmo para sequência da série II que exibiu resultados mais potentes nos ensaios baseados em células o efeito inibitório sob a protease foi limitado à concentração de 1mM. No entanto, o PEP 25 foi o peptídeo mais promissor como inibidor da nsP2 viral, uma vez que exibiu efeitos 40% de inibição na menor concentração testada.

Embora o efeito inibitório tenha sido limitado principalmente à concentração de 1mM, vale ressaltar que estes resultados foram comparáveis ao inibidor previamente descrito. Tais dados sugerem, a primeiro momento, que a nsP2 pode ser um dos mecanismos envolvidos no efeito anti-CHIKV destes compostos.

Figura 19: Inibição dos peptídomiméticos sob a protease nsP2.



Fonte: Autora, 2024.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

Dentre os inibidores virais reportados, os peptidomiméticos têm representado uma classe promissora sob as proteínas virais. Em virtude da demanda farmacológica não atendida para o tratamento de infecções por CHIKV, esse trabalho desenvolveu 18 tripeptídeos formados por resíduos dos aminoácidos Glicina e Leucina.

A síntese desenvolvida em resina Rink amide®, demonstrou ser um método eficaz para a síntese dos peptidomiméticos, os quais foram obtidos em rendimentos variando entre 30-80%, com pureza > 95% e com valores de ponto de fusão superiores a 100 °C (com exceção de **PEP05-PEP07**), o que se correlaciona com a pureza e indica que estes peptídeos possuem estabilidade em temperaturas elevadas. A elucidação estrutural até o presente momento foi realizada através de RMN de ¹H e ¹³C, e foi possível verificar a presença de sinais característicos da estrutura peptídica.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* revelaram que os peptídeos obtidos não exibem um perfil tóxico até a concentração máxima testada (200 µM). Além disso, não houve indução de efeito citopático nas células *Vero E6*, com exceção do **PEP18**. Os ensaios antivirais identificaram seis inibidores promissores, todos com a sequência peptídica formada por Gly-Gly-Leu. Os peptídeos mais potentes, **PEP 15** e **PEP16**, exibiram CE₅₀ menor que 5 µM (CC₅₀ > 200 µM) sendo, portanto, os peptídeos relevantes no estado da arte na busca de fármacos anti-CHIKV. Ainda, estudos *in silico*, mostraram que **PEP 16** interage com a nsP2 de CHIKV de maneira semelhante ao inibidor reportado na literatura. Os ensaios enzimáticos demonstraram uma inibição da nsP2 em concentrações de 1mM, porém comparáveis ao controle utilizado. Assim, nota-se que o PEP 16, em especial, é mais eficaz nos ensaios baseados em células. Tais avanços sugerem que a nsP2 não é o único alvo envolvido no mecanismo inibitório destes compostos.

Tais resultados são entusiasmantes e nos induzem a avanços que se tornam perspectivas para próximos trabalhos do grupo de pesquisa. Deste os quais podemos mencionar a avaliação do efeito antiviral *in vivo* e investigação do perfil antiviral em modelos que investiguem a inflamação articular induzida por CHIKV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnabi, R., Jacobs, S., Delang, L., & Neyts, J. (2020). Antiviral drug discovery against arthritogenic alphaviruses: Tools and molecular targets. *Biochemical Pharmacology*, 174(November 2019). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113777>
- Abdelnabi, R., Neyts, J., & Delang, L. (2015). Towards antivirals against chikungunya virus. *Antiviral Research*, 121, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.017>
- Abdelnabi, R., Neyts, J., & Delang, L. (2017). Chikungunya virus infections: time to act, time to treat Transmission and prevalence. *Current Opinion in Virology*, 24, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.016>
- Aliperti, G., & Schlesinger, M. J. (1978). Evidence for an autoprotease activity of sindbis virus capsid protein. *Virology*, 90(2), 366–369. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90321-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90321-5)
- Alonso-Palomares, L. A., Moreno-García, M., Lanz-Mendoza, H., & Salazar, M. I. (2018). Molecular Basis for Arbovirus Transmission by Aedes aegypti Mosquitoes. *Intervirology*, 61(6), 255–264. <https://doi.org/10.1159/000499128>
- Althouse, B. M., Guerbois, M., Cummings, D. A. T., Diop, O. M., Faye, O., Faye, A., Diallo, D., Sadio, B. D., Sow, A., Faye, O., Sall, A. A., Diallo, M., Benefit, B., Simons, E., Watts, D. M., Weaver, S. C., & Hanley, K. A. (2018). Role of monkeys in the sylvatic cycle of chikungunya virus in Senegal. *Nature Communications*, 9(1), 1046. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03332-7>
- Ayu, S. M., Lai, L. R., Chan, Y. F., Hatim, A., Hairi, N. N., Ayob, A., & Sam, I.-C. (2010). Seroprevalence survey of Chikungunya virus in Bagan Panchor, Malaysia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(6), 1245–1248. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0279>
- Babij, N. R., McCusker, E. O., Whiteker, G. T., Canturk, B., Choy, N., Creemer, L. C., Amicis, C. V. De, Hewlett, N. M., Johnson, P. L., Knobelsdorf, J. A., Li, F., Lorschach, B. A., Nugent, B. M., Ryan, S. J., Smith, M. R., & Yang, Q. (2016). NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Industrially Preferred Solvents Used in Process and Green Chemistry. *Organic Process Research & Development*, 20(3), 661–667. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.5b00417>

- Barr, K., & Vaidhyathan, V. (2019). Chikungunya in Infants and Children: Is Pathogenesis Increasing? *Viruses*, 11(3), 294. <https://doi.org/10.3390/v11030294>
- Baxter, V. K., & Heise, M. T. (2018). Genetic control of alphavirus pathogenesis. *Mammalian Genome*, 29(7–8), 408–424. <https://doi.org/10.1007/s00335-018-9776-1>
- Behnam, M. A. M., Graf, D., Bartenschlager, R., Zlotos, D. P., & Klein, C. D. (2015). Discovery of Nanomolar Dengue and West Nile Virus Protease Inhibitors Containing a 4-Benzyloxyphenylglycine Residue. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(23), 9354–9370. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01441>
- Bhakat, S., Karubiu, W., Jayaprakash, V., & Soliman, M. E. S. (2014). A perspective on targeting non-structural proteins to combat neglected tropical diseases: Dengue, West Nile and Chikungunya viruses. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 87, 677–702. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.010>
- Brighton, S. W., & Simson, I. W. (1984). A destructive arthropathy following Chikungunya virus arthritis — a possible association. *Clinical Rheumatology*, 3(2), 253–258. <https://doi.org/10.1007/BF02030766>
- Casals, J., & Whitman, L. (1957). Mayaro Virus: A New Human Disease Agent. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6(6), 1004–1011. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1957.6.1004>
- da Silva-Júnior, E. F., & de Araújo-Júnior, J. X. (2019). Peptide derivatives as inhibitors of NS2B-NS3 protease from Dengue, West Nile, and Zika flaviviruses. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 27(18), 3963–3978. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.038>
- da Silva-Júnior, E. F., Leoncini, G. O., Rodrigues, É. E. S., Aquino, T. M., & Araújo-Júnior, J. X. (2017a). The medicinal chemistry of Chikungunya virus. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 25(16). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.049>
- da Silva-Júnior, E. F., Leoncini, G. O., Rodrigues, É. E. S., Aquino, T. M., & Araújo-Júnior, J. X. (2017b). The medicinal chemistry of Chikungunya virus. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 25(16), 4219–4244. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.049>

- Daginawala, H., Chandak, N., Kashyap, R., Kabra, D., Karandikar, P., Saha, S., Morey, S., Purohit, H., & Taori, G. (2009). Neurological complications of Chikungunya virus infection. *Neurology India*, 57(2), 177. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.51289>
- Dhindwal, S., Kesari, P., Singh, H., Kumar, P., & Tomar, S. (2017a). Conformer and pharmacophore based identification of peptidomimetic inhibitors of Chikungunya virus NSP2 protease. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(16), 3522–3539. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1261046>
- Dhindwal, S., Kesari, P., Singh, H., Kumar, P., & Tomar, S. (2017b). Conformer and pharmacophore based identification of peptidomimetic inhibitors of chikungunya virus nsP2 protease. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(16), 3522–3539. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1261046>
- Diallo, D., Sall, A. A., Buenemann, M., Chen, R., Faye, O., Diagne, C. T., Faye, O., Ba, Y., Dia, I., Watts, D., Weaver, S. C., Hanley, K. A., & Diallo, M. (2012). Landscape ecology of sylvatic chikungunya virus and mosquito vectors in southeastern senegal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(6), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001649>
- Donalisio, M. R., Freitas, A. R. R., & Zuben, A. P. B. Von. (2017). Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. *Revista de Saúde Pública*, 51. <https://doi.org/10.1590/s1518-8787.2017051006889>
- Durães-Carvalho, R., Oliveira-Filho, E. F. de, Silva, J. V. J., Lopes, T. R. R., Oliveira, R. A. S., Silva, D. E. A., Ludwig-Begall, L. F., & Gil, L. H. V. G. (2018). A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. *Acta Tropica*, 188(July), 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.003>
- Filipe, A. F., & Pinto, M. R. (1973). Arbovirus studies in Luanda, Angola. 2. Virological and serological studies during an outbreak of dengue-like disease caused by the Chikungunya virus. *Bulletin of the World Health Organization*, 49(1), 37–40.
- Fros, J. J., Liu, W. J., Prow, N. A., Geertsema, C., Ligtenberg, M., Vanlandingham, D. L., Schnettler, E., Vlak, J. M., Suhrbier, A., Khromykh, A. A., & Pijlman, G. P.

- (2010). Chikungunya Virus Nonstructural Protein 2 Inhibits Type I/II Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling. *Journal of Virology*, 84(20), 10877–10887. <https://doi.org/10.1128/JVI.00949-10>
- Gaedigk-Nitschko, K., Ding, M., Levy, M. A., & Schlesinger, M. J. (1990). Site-directed mutations in the sindbis virus 6K protein reveal sites for fatty acylation and the underacylated protein affects virus release and virion structure. *Virology*, 175(1), 282–291. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90210-I](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90210-I)
- Galán-Huerta, K. A., Rivas-Estilla, A. M., Fernández-Salas, I., Farfan-Ale, J. A., & Ramos-Jiménez, J. (2015). Chikungunya virus: A general overview. *Medicina Universitaria*, 17(68), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.rmu.2015.06.001>
- Ganesan, K., Diwan, A., Shankar, S. K., Desai, S. B., Sainani, G. S., & Katrak, S. M. (2008). Encefalomieleradiculite por Chikungunya: Relato de 2 Casos com Neuroimagem e 1 Caso com Achados de Autópsia. *American Journal of Neuroradiology*, 29(9), 1636–1637. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A1133>
- Ghildiyal, R., & Gabrani, R. (2020a). Antiviral therapeutics for chikungunya virus. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30(6), 467–480. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1751817>
- Ghildiyal, R., & Gabrani, R. (2020b). Antiviral therapeutics for chikungunya virus. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30(6), 467–480. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1751817>
- Gould, E. A., Coutard, B., Malet, H., Morin, B., Jamal, S., Weaver, S., Gorbalenya, A., Moureau, G., Baronti, C., Delogu, I., Forrester, N., Khasnatinov, M., Gritsun, T., de Lamballerie, X., & Canard, B. (2010). Understanding the alphaviruses: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. *Antiviral Research*, 87(2), 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.07.007>
- Halstead, S. B. (2018). Chikungunya and Zika Disease. In *Chikungunya and Zika Viruses* (pp. 69–85). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811865-8.00003-9>
- Huang, Y.-J. S., Higgs, S., & Vanlandingham, D. L. (2019). Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. *Current Opinion in Virology*, 34, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.01.001>

- Johnson, B. K., Chanas, A. C., Shockley, P., Squires, E. J., Gardner, P., Wallace, C., Simpson, D. I. H., Bowen, E. T. W., Platt, G. S., Way, H., Parsons, J., & Grainger, W. E. (1977). Arbovirus isolations from, and serological studies on, wild and domestic vertebrates from Kano Plain, Kenya. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(6), 512–517. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(77\)90146-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(77)90146-8)
- Jose, J., Taylor, A. B., & Kuhn, R. J. (2017). Spatial and Temporal Analysis of Alphavirus Replication and Assembly in Mammalian and Mosquito Cells. *MBio*, 8(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02294-16>
- Khan, A. H., Morita, K., Parquet, M. del C., Hasebe, F., Mathenge, E. G. M., & Igarashi, A. (2002). Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *Journal of General Virology*, 83(12), 3075–3084. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3075>
- Kühl, N., Graf, D., Bock, J., Behnam, M. A. M., Leuthold, M. M., & Klein, C. D. (2020). A New Class of Dengue and West Nile Virus Protease Inhibitors with Submicromolar Activity in Reporter Gene DENV-2 Protease and Viral Replication Assays. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(15), 8179–8197. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00413>
- Kuiper, B. D., Slater, K., Spellmon, N., Holcomb, J., Medapureddy, P., Muzzarelli, K. M., Yang, Z., Ovadia, R., Amblard, F., Kovari, I. A., Schinazi, R. F., & Kovari, L. C. (2017). Increased activity of unlinked Zika virus NS2B / NS3 protease compared to linked Zika virus protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 492(4), 668–673. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.108>
- Kumar, R., Ahmed, S., Parray, H. A., & Das, S. (2021). Chikungunya and arthritis: An overview. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 44, 102168. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2021.102168>
- Levi, L. I., & Vignuzzi, M. (2019). Arthritogenic Alphaviruses: A Worldwide Emerging Threat? *Microorganisms*, 7(5), 133. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050133>
- Liang, C., Behnam, M. A. M., Sundermann, T. R., & Klein, C. D. (2017). Phenylglycine racemization in Fmoc-based solid-phase peptide synthesis:

- Stereochemical stability is achieved by choice of reaction conditions. *Tetrahedron Letters*, 58(24), 2325–2329.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.04.047>
- LINGER, B. R., KUNOVSKA, L., KUHN, R. J., & GOLDEN, B. L. (2004). Sindbis virus nucleocapsid assembly: RNA folding promotes capsid protein dimerization. *RNA*, 10(1), 128–138. <https://doi.org/10.1261/rna.5127104>
- Liu, Y., Lillepold, K., Semenza, J. C., Tozan, Y., Quam, M. B. M., & Rocklöv, J. (2020). Reviewing estimates of the basic reproduction number for dengue, Zika and chikungunya across global climate zones. *Environmental Research*, 182(September 2019), 109114. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109114>
- Loewy, A., Smyth, J., von Bonsdorff, C. H., Liljeström, P., & Schlesinger, M. J. (1995). The 6-kilodalton membrane protein of Semliki Forest virus is involved in the budding process. *Journal of Virology*, 69(1), 469–475.
<https://doi.org/10.1128/jvi.69.1.469-475.1995>
- Lulla, A., Lulla, V., Tints, K., Ahola, T., & Merits, A. (2006). Molecular Determinants of Substrate Specificity for Semliki Forest Virus Nonstructural Protease. *Journal of Virology*, 80(11), 5413–5422. <https://doi.org/10.1128/JVI.00229-06>
- Lumsden, W. H. . (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(1), 33–57.
[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(55\)90081-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(55)90081-X)
- Luna, O. F., Gomez, J., Cárdenas, C., Albericio, F., Marshall, S. H., & Guzmán, F. (2016). Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine? *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(11).
<https://doi.org/10.3390/molecules21111542>
- Melton, J. V., Ewart, G. D., Weir, R. C., Board, P. G., Lee, E., & Gage, P. W. (2002). Alphavirus 6K proteins form ion channels. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M207847200>
- Metz, S. W., & Pijlman, G. P. (2016). Function of Chikungunya Virus Structural Proteins. In *Chikungunya Virus* (pp. 63–74). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-42958-8_5

- Munasinghe, D. R., Amarasekera, P. J., & Fernando, C. F. (1966). An epidemic of dengue-like fever in Ceylon (chikungunya--a clinical and haematological study. *The Ceylon Medical Journal*, 11(4), 129–142.
- Muri, E. M. F. (2014). Proteases virais: Importantes alvos terapêuticos de compostos peptideomiméticos. *Quimica Nova*, 37(2), 308–316. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140052>
- Muyembe-Tamfum, J. J., Peyrefitte, C. N., Yogolelo, R., Mathina Basisya, E., Koyange, D., Pukuta, E., Mashako, M., Tolou, H., & Durand, J. P. (2003). [Epidemic of Chikungunya virus in 1999 and 200 in the Democratic Republic of the Congo]. In *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial* (Vol. 63, Issue 6, pp. 637–638).
- Nair, A. G., Biswas, J., & Bhende, M. P. (2012). A case of bilateral Chikungunya neuroretinitis. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, 2(1), 39–40. <https://doi.org/10.1007/s12348-011-0038-6>
- Nakkhara, P., Chongsuvivatwong, V., & Thammapalo, S. (2013). Risk factors for symptomatic and asymptomatic chikungunya infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(12), 789–796. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trt083>
- Nguyen, P. T. V., Yu, H., & Keller, P. A. (2015). Identification of chikungunya virus nsP2 protease inhibitors using structure-base approaches. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 57, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2015.01.001>
- Pastorino, B. A. M., Peyrefitte, C. N., Almeras, L., Grandadam, M., Rolland, D., Tolou, H. J., & Bessaud, M. (2008). Expression and biochemical characterization of nsP2 cysteine protease of Chikungunya virus. *Virus Research*, 131(2), 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.09.009>
- Paul, B. J., & Sadanand, S. (2018). Chikungunya Infection: A Re-emerging Epidemic. *Rheumatology and Therapy*, 5(2), 317–326. <https://doi.org/10.1007/s40744-018-0121-7>
- Porter, K. R., Tan, R., Istary, Y., Suharyono, W., Sutaryo, Widjaja, S., Ma’Roef, C., Listiyaningsih, E., Kosasih, H., Hueston, L., McArdle, J., & Juffrie, M. (2004). A serological study of Chikungunya virus transmission in Yogyakarta, Indonesia:

- evidence for the first outbreak since 1982. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35(2), 408–415.
- Powers, A. M., Brault, A. C., Shirako, Y., Strauss, E. G., Kang, W., Strauss, J. H., & Weaver, S. C. (2001). *Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses*. 75(21), 10118–10131. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.21.10118>
- Rahimi, R. et al. (2016). Solid-Phase Peptide Synthesis of Dipeptide (Histidine- β -Alanine) as a Chelating Agent by Using Trityl Chloride Resin, for Removal of Al^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} : Experimental and Theoretical Study. *Journal of the Brazilian Chemical Society [Online]*, v. 27(n. 10), 1814–1819. <https://doi.org/https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160064>.
- Rashad, A. A., & Keller, P. A. (2013). Structure based design towards the identification of novel binding sites and inhibitors for the chikungunya virus envelope proteins. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 44, 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2013.07.001>
- Rashad, A. A., Mahalingam, S., & Keller, P. A. (2014). Chikungunya virus: Emerging targets and new opportunities for medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(4), 1147–1166. <https://doi.org/10.1021/jm400460d>
- Rausalu, K., Utt, A., Quirin, T., Varghese, F. S., Žusinaite, E., Das, P. K., Ahola, T., & Merits, A. (2016). Chikungunya virus infectivity, RNA replication and non-structural polyprotein processing depend on the nsP2 protease's active site cysteine residue. *Scientific Reports*, 6(1), 37124. <https://doi.org/10.1038/srep37124>
- Robinson, M. C. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(1), 28–32. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(55\)90080-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(55)90080-8)
- Rodrigues, É. E. S., Araújo-Júnior, J. X., Anderson, L., Bassi, E. ., & da Silva-Júnior, E. F. (2021). *The role of natural and nature-based compounds against Chikungunya and Mayaro alphaviruses and their vectors* (pp. 459–497). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819485-0.00006-2>
- Russo, A. T., Malmstrom, R. D., White, M. A., & Watowich, S. J. (2010). Structural basis for substrate specificity of alphavirus nsP2 proteases. *Journal of Molecular*

- Graphics and Modelling*, 29(1), 46–53.
<https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2010.04.005>
- Saluzzo, J. F., Cornet, M., & Digoutte, J. P. (1983). [Outbreak of a Chikungunya virus epidemic in western Senegal in 1982]. *Dakar medical*, 28(3), 497–500.
- Sambri, V., Cavrini, F., Rossini, G., Pierro, A., & Landini, M. P. (2008). The 2007 epidemic outbreak of Chikungunya virus infection in the Romagna region of Italy: a new perspective for the possible diffusion of tropical diseases in temperate areas? In *The new microbiologica* (Vol. 31, Issue 3, pp. 303–304).
- SHAH, K. V, GIBBS, C. J. J., & BANERJEE, G. (1964). VIROLOGICAL INVESTIGATION OF THE EPIDEMIC OF HAEMORRHAGIC FEVER IN CALCUTTA: ISOLATION OF THREE STRAINS OF CHIKUNGUNYA VIRUS. *The Indian Journal of Medical Research*, 52, 676–683.
- Sharif, N., Sarkar, M. K., Ferdous, R. N., Ahmed, S. N., Billah, M. B., Talukder, A. A., Zhang, M., & Dey, S. K. (2021). Molecular Epidemiology, Evolution and Reemergence of Chikungunya Virus in South Asia. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.689979>
- Sharma, R., Kesari, P., Kumar, P., & Tomar, S. (2018). Structure-function insights into chikungunya virus capsid protein: Small molecules targeting capsid hydrophobic pocket. *Virology*, 515, 223–234. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.020>
- Silva-Júnior, E. F., & Araújo-Júnior, J. X. (2019). Peptide derivatives as inhibitors of NS2B-NS3 protease from Dengue, West Nile, and Zika flaviviruses. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 27(18), 3963–3978. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.038>
- Silva, J. V. J., Ludwig-Begall, L. F., Oliveira-Filho, E. F. de, Oliveira, R. A. S., Durães-Carvalho, R., Lopes, T. R. R., Silva, D. E. A., & Gil, L. H. V. G. (2018a). A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. *Acta Tropica*, 188, 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.003>
- Silva, J. V. J., Ludwig-Begall, L. F., Oliveira-Filho, E. F. de, Oliveira, R. A. S., Durães-Carvalho, R., Lopes, T. R. R., Silva, D. E. A., & Gil, L. H. V. G. (2018b). A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical

- characteristics, viral co-circulation complications, and control. *Acta Tropica*, 188, 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.003>
- Silva, L. A., & Dermody, T. S. (2017). Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *Journal of Clinical Investigation*, 127(3), 737–749. <https://doi.org/10.1172/JCI84417>
- Silva, L. R., Rodrigues, É. E. S., Taniele-Silva, J., Anderson, L., Araújo-Júnior, J. X. de, Bassi, Ê. J., & Silva-Júnior, E. F. da. (2022). Targeting Chikungunya Virus Entry: Alternatives for New Inhibitors in Drug Discovery. *Current Medicinal Chemistry*, 29(4), 612–634. <https://doi.org/10.2174/0929867328666210623165005>
- Singh, H., Mudgal, R., Narwal, M., Kaur, R., Singh, V. A., Malik, A., Chaudhary, M., & Tomar, S. (2018). Chikungunya virus inhibition by peptidomimetic inhibitors targeting virus-specific cysteine protease. *Biochimie*, 149, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.04.004>
- Singh, S. K., & Unni, S. K. (2011). Chikungunya virus: host pathogen interaction. *Reviews in Medical Virology*, 21(2), 78–88. <https://doi.org/10.1002/rmv.681>
- Skalinski, L. M., Dalvi, A. P. R., Natividade, M., Braga, J. U., Nascimento Costa, M. da C., Santana, E. B., de Jesus Silva, N. S., Witworth, J., & Teixeira, M. G. (2022). The triple epidemics of arboviruses in Feira de Santana, Brazilian Northeast: Epidemiological characteristics and diffusion patterns. *Epidemics*, 38, 100541. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2022.100541>
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., & Devaux, C. (2009a). Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology*, 393(2), 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.024>
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., & Devaux, C. (2009b). Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. In *Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.024>
- Staples, J. E., Breiman, R. F., & Powers, A. M. (2009). Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 49(6), 942–948. <https://doi.org/10.1086/605496>
- Thaikruea, L., Charearnsook, O., Reanphumkarnkit, S., Dissomboon, P., Phonjan, R.,

- Ratchbud, S., Kounsang, Y., & Buranapiyawong, D. (1997). Chikungunya in Thailand: a re-emerging disease? *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 28(2), 359–364.
- Tomar, S., & Aggarwal, M. (2017). Structure and Function of Alphavirus Proteases. In *Viral Proteases and Their Inhibitors* (pp. 105–135). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809712-0.00005-8>
- Tomori, O., Fagbami, A., & Fabiyi, A. (1975). The 1974 epidemic of Chikungunya fever in children in Ibadan. *Tropical and Geographical Medicine*, 27(4), 413–417.
- Tsetsarkin, K. A., Chen, R., & Weaver, S. C. (2016). Interspecies transmission and chikungunya virus emergence. In *Current Opinion in Virology*.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.02.007>
- Vagner, J., Qu, H., & Hruby, V. J. (2008). Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(3), 292–296.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.03.009>
- Volk, S. M., Chen, R., Tsetsarkin, K. A., Adams, A. P., Garcia, T. I., Sall, A. A., Nasar, F., Schuh, A. J., Holmes, E. C., Higgs, S., Maharaj, P. D., Brault, A. C., & Weaver, S. C. (2010). Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates. *Journal of Virology*, 84(13), 6497–6504. <https://doi.org/10.1128/JVI.01603-09>
- Voss, J. E., Vaney, M.-C., Duquerroy, S., Vonnrhein, C., Girard-Blanc, C., Crublet, E., Thompson, A., Bricogne, G., & Rey, F. A. (2010). Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature*, 468(7324), 709–712. <https://doi.org/10.1038/nature09555>
- Vu-Qui-Dai, & Kim-Thoa, N. T. (1967). Hemorrhagic fever in vietnam in 1964 1965 serologic study with brief clinical and epidemiologic thoughts human dengue virus chikungunya virus arbovirus. *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique*, 60(1), 21–33.
- Wahid, B., Ali, A., Rafique, S., & Idrees, M. (2017a). Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *International Journal of Infectious Diseases*, 58, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.03.006> LK -
http://sfx.hul.harvard.edu/sfx_local?sid=EMBASE&issn=18783511&id=doi:10.10

- 16%2Fj.ijid.2017.03.006&atitle=Global+expansion+of+chikungunya+virus%3A+mapping+the+64-year+history&stitle=Int.+J.+Infect.+Dis.&title=International+Journal+of+Infectious+Diseases&volume=58&issue=&spage=69&epage=76&aualast=Wahid&aufirst=Bairaira&aunit=B.&aufull=Wahid+B.&coden=IJIDF&isbn=&pages=69-76&date=2017&aunit1=B&aunitm=
- Wahid, B., Ali, A., Rafique, S., & Idrees, M. (2017b). Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *International Journal of Infectious Diseases*, 58, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.03.006>
- WHO, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/chikungunya>, acessado em 20 de novembro de 2023
- Weaver, S. C. (2006). *Evolutionary Influences in Arboviral Disease* (pp. 285–314). https://doi.org/10.1007/3-540-26397-7_10
- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85(2), 328–345. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>
- Willems, W. R., Kaluza, G., Boschek, C. B., Bauer, H., Hager, H., Schütz, H.-J., & Feistner, H. (1979). Semliki Forest Virus: Cause of a Fatal Case of Human Encephalitis. *Science*, 203(4385), 1127–1129. <https://doi.org/10.1126/science.424742>
- Wint, W., Zhang, Z., Wirawan, M., Jun, E., Chew, C., Bing, A., Chew, L., Kouretova, J., Steinmetzer, T., & Luo, D. (2018). Structures of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with peptidomimetic inhibitors. *Antiviral Research*, 160(August), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.10.006>
- Yao, J. S., Strauss, E. G., & Strauss, J. H. (1996). Interactions between PE2, E1, and 6K required for assembly of alphaviruses studied with chimeric viruses. *Journal of Virology*, 70(11), 7910–7920. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.11.7910-7920.1996>
- Yap ML, Klose T, Urakami A, Hasan SS, Akahata W, Rossmann MG. Structural studies of Chikungunya virus maturation. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2017 Dec 26;114(52):13703–7. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1713166114>

Ziegler, S. A., Lu, L., Travassos Da Rosa, A. P. A., Xiao, S. Y., & Tesh, R. B. (2008).
An animal model for studying the pathogenesis of chikungunya virus infection.
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 79(1), 133–139.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.133>

ANEXO A- Produções científica publicadas e submetidas durante o doutorado.

Med Chem. 2021 Feb 16. doi: 10.2174/1573406417666210216154428. Online ahead of print.

Synthesis, Antileishmanial Activity and in silico Studies of Aminoguanidine Hydrazones (AGH) and Thiosemicarbazones (TSC) Against *Leishmania chagasi* Amastigotes

Thiago M de Aquino ¹, Paulo H B França ¹, Érica E E S Rodrigues ¹, Igor J S Nascimento ¹, Paulo F S Santos-Júnior ¹, Pedro G V Aquino ², Mariana S Santos ², Aline C Queiroz ³, Morgana V Araújo ³, Magna S Alexandre-Moreira ³, Raiza R L Rodrigues ⁴, Klinger A F Rodrigues ⁴, Johnnatan D Freitas ⁵, Jacques Bricard ⁶, Mario R Meneghetti ⁷, Jean-Jacques Bourguignon ⁶, Martine Schmitt ⁶, Edeildo F da Silva-Júnior ¹, João X de Araújo-Júnior ¹

Affiliations

PMID: 33593264 DOI: 10.2174/1573406417666210216154428

Free article

Abstract

Background: Leishmaniasis is a worldwide health problem, highly endemic in developing countries. Among the four main clinical forms of the disease, visceral leishmaniasis is the most severe, fatal in 95% of cases. The undesired side-effects from first-line chemotherapy and the reported drug resistance search for effective drugs that can replace or supplement those currently used an urgent need. Aminoguanidine hydrazones (AGH's) have been explored for exhibiting a diverse spectrum of biological activities, in particular the antileishmanial activity of MGBG. The bioisosteres thiosemicarbazones (TSC's) offer a similar biological activity diversity, including antiprotozoal effects against *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*.

Objective: Considering the impact of leishmaniasis worldwide, this work aimed to design, synthesize, and perform a screening upon *L. chagasi* amastigotes and for the cytotoxicity of the small "in-house" library of both AGH and TSC derivatives and their structurally-related compounds.

Method: A set of AGH's (3-7), TSC's (9, 10), and semicarbazones (11) were initially synthesized. Subsequently, different semi-constrained analogs were designed and also prepared, including thiazolidines (12), dihydrothiazines (13), imidazolines (15), pyrimidines (16, 18) azines (19, 20), and benzotriazepinones (23-25). All intermediates and target compounds were obtained with satisfactory yields and exhibited spectral data consistent with their structures. All final compounds were evaluated against *L. chagasi* amastigotes and J774.A1 cell line. Molecular docking was performed towards trypanothione reductase using GOLD® software.

Result: The AGH's 3i, 4a, and 5d, and the TSC's 9i, 9k, and 9o were selected as valuable hits. These compounds presented antileishmanial activity compared with pentamidine, showing IC₅₀ values ranged from 0.6 to 7.27 μ M, maximal effects up to 55.3%, and satisfactory SI values (ranged from 11 to 87). On the other hand, most of the resulting semi-constrained analogs were found cytotoxic or presented reduced antileishmanial activity. In general, TSC class is more promising than its isosteric

Targeting Chikungunya Virus Entry: alternatives for new inhibitors in drug discovery

Leandro Rocha Silva ¹, Érica Erlanny da Silva Rodrigues ¹, Jamile Taniele-Silva ², Leticia Anderson ², João Xavier de Araújo-Júnior ¹, Ênio José Bassi ², Edeildo F da Silva-Júnior ¹

Affiliations

PMID: 34165405 DOI: 10.2174/0929867328666210623165005

Abstract

Chikungunya virus (CHIKV) is an Alphavirus (Togaviridae) responsible for Chikungunya fever (CHIKF) that is mainly characterized by a severe polyarthralgia, in which it is transmitted by the bite of infected *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes. Nowadays, there no licensed vaccines or approved drugs to specifically treat this viral disease. Structural viral proteins participate in key steps of its replication cycle, such as viral entry, membrane fusion, nucleocapsid assembly, and virus budding. In this context, envelope E3-E2-E1 glycoproteins complex could be targeted for designing new drug candidates. In this review, aspects of the CHIKV entry process are discussed to provide insights to assist the drug discovery process. Moreover, several natural, nature-based and synthetic compounds, as well as repurposed drugs and virtual screening, are also explored as alternatives for developing CHIKV entry inhibitors. Finally, we provided a complimentary analysis of studies involving inhibitors that were not explored by in silico methods. Based on this, Phe118, Val179, and Lys181 were found to be the most frequent residues, being present in 89.6, 82.7, and 93.1% of complexes, respectively. Lastly, some chemical aspects associated with interactions of these inhibitors and mature envelope E3-E2-E1 glycoproteins' complex were discussed to provide data for scientists worldwide, supporting their search for new inhibitors against this emerging arbovirus.

Keywords: chikungunya virus; drug design; entry inhibitors; frequency residues; medicinal chemistry; molecular docking; natural products; repurposing; synthetic; virtual screening.

Copyright© Bentham Science Publishers; For any queries, please email at epub@benthamscience.net.

Electrochemical Evaluation of Aminoguanidine Hydrazone Derivative with Potential Anticancer Activity: Studies of Glassy Carbon/CNT and Gold Electrodes Both Modified with PAMAM

Marilya Palmeira Galdino da Silva¹, Ygor Mendes de Oliveira¹, Anna Caroline Lima Candido¹, João Xavier de Araújo-Júnior^{1,2}, **Érica Erianny da Silva Rodrigues¹**, Kadja Luana Chagas Monteiro², Thiago Mendonça de Aquino¹, Fabiane Caxico de Abreu^{1*}

¹Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil

²Institute of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil

Email: *caxico.fabiane@gmail.com

How to cite this paper: da Silva, M.P.G., de Oliveira, Y.M., Candido, A.C.L., de Araújo-Júnior, J.X., da Silva Rodrigues, É.E., Monteiro, K.L.C., de Aquino, T.M. and de Abreu, F.C. (2020) Electrochemical Evaluation of Aminoguanidine Hydrazone Derivative with Potential Anticancer Activity: Studies of Glassy Carbon/CNT and Gold Electrodes Both Modified with PAMAM. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 11, 33-48.
<https://doi.org/10.4236/jbmb.2020.111002>

Received: November 1, 2019

Accepted: December 2, 2019

Published: December 5, 2019

Copyright © 2020 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Abstract

Aminoguanidine hydrazones (AGHs) are a class of compounds that have interesting pharmacological activities. They are derived from the same chemical group as aminoguanidine, so it has mixed properties (receptor and donor) in the formation of hydrogen bonds. Its anticancer agent properties were recently highlighted, but the molecules of this class have solubility in aqueous solutions that can be considered low. The identification of this class, by a simple, sensitive and low-cost technique, such as electrochemistry, which also allows the evaluation of its solubilization process through agents such as PAMAM dendrimer is the main objective of the work described here. The electrochemical response of the LQM10 (AGH derivative) was evaluated, as well as its behavior in different electrochemical sensors. Electrochemical experiments were performed in buffered (phosphate at pH 7.02 and acetate at 4.5). LQM10 has a reversible oxidation peak with a potential of +0.22 V. It was efficiently detected in different electrodes tested (glass carbon/CNT, glass carbon/CNT/PAMAM), which proves the viability of the electrodes for various analyses and has the determination of the apparent constant association, indicating its interaction with the analysis that is higher in the presence of the PAMAM encapsulating agent. This was corroborated by the results for the modified gold electrode with MUA and PAMAM. The sum of the results shows the possibility of electrochemically evaluating the Aminoguanidine hydrazone derivative, the viability of electrodes employed and the greater so-

The role of natural and nature-based compounds against Chikungunya and Mayaro alphaviruses and their vectors

Érica Erlanny da Silva Rodrigues^a, João Xavier de Araújo-Júnior^a, Leticia Anderson^b, Enio José Bassi^c, and Edeildo Ferreira da Silva-Júnior^{a,*}

^aLaboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil

^bCESMAC University Center, Maceió, Brazil

^cIMUNOREG—Immunoregulation Research Group, Laboratory of Research in Virology and Immunology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil

*Corresponding author: e-mail: edeildo.junior@uef.br

Chapter Outline

Introduction	459	Natural inhibitors from natural sources against CHIKV	467
Chikungunya virus (CHIKV)	461	Natural inhibitors from natural sources against MAYV	472
CHIKV structure	461	Natural and nature-based inhibitors against <i>Ae. aegypti</i> and <i>Ae. albopictus</i> vectors	477
Replication cycle of CHIKV	462	Final considerations	485
Main targets of CHIKV for antiviral research	464	Acknowledgments	486
Mayaro virus (MAYV)	465	Competing interests disclosure	486
MAYV structure and replication cycle	466	References	486
Medicinal chemistry of CHIKV and MAYV	467		

Introduction

Parallel to human evolution, various diseases evolved along with modern society. In this sense, emergence and reemergence of new- and old-diseases represent a significant challenge for humankind, which is not prepared for it

The Medicinal Chemistry of Zika Virus



Érica Erlanny da Silva Rodrigues, Hannah Maus,
Stefan Josef Hammerschmidt, Alessia Ruggieri,
Elane Conceição dos Santos, Ênio José Bassi, Leticia Anderson,
Pedro Gregório Vieira Aquino, João Xavier de Araújo-Júnior,
Fenju Wei, Xinyong Liu, Peng Zhan, Tanja Schirmeister,
and Edeildo Ferreira da Silva-Júnior

Abstract Arthropod-borne viruses, also known as arboviruses, are transmitted by bites of infected mosquito or tick vectors. In this context, the *Flavivirus* genus is mainly transmitted by mosquitoes from the *Aedes* genus, being the *Ae. africanus*, *Ae. aegypti*, and *Ae. Albopictus* species are responsible for transmitting the Zika virus (ZIKV). It is a lipid-enveloped virus constitute of an RNA genome, which is translated into a polyprotein encoding three structural proteins [(capsid (C), membrane (M), and envelope (E)) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5). Several biological targets have been identified for developing antiviral agents against ZIKV, which could prevent virus

É. Erlanny da S. Rodrigues · J. X. de Araújo-Júnior · E. F. da Silva-Júnior (✉)
Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Campus A.C.
Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil
e-mail: edeildo.junior@iqb.ufal.br

H. Maus · S. J. Hammerschmidt · T. Schirmeister
Institute of Pharmaceutical and Biomedical Science, Johannes Gutenberg-University Mainz,
Staudingerweg 5, 55128 Mainz, Germany

A. Ruggieri
Department of Infectious Diseases, Molecular Virology, Center for Integrative Infectious
Disease Research, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 344, 69120 Heidelberg,
Germany

E. C. dos Santos · Ê. J. Bassi
IMUNOREG – Immunoregulation Research Group, Laboratory of Research in Virology and
Immunology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas,
Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil

L. Anderson
CESMAC University Center, Cônego Machado Street, Maceió 57051-160, Brazil

P. G. V. Aquino
Environment Laboratory, Federal University of Agreste From Pernambuco, Bom Pastor
Avenue, Boa Vista, Garanhuns 55292-270, Brazil

F. Wei · X. Liu · P. Zhan
Department of Medicinal Chemistry, Key Laboratory of Chemical Biology, Ministry of
Education, School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Ji'nan 250012, China

© The Author(s), under exclusive license to Springer Nature Switzerland AG 2021 233
S. I. Ahmad (ed.), *Human Viruses: Diseases, Treatments
and Vaccines*, https://doi.org/10.1007/978-3-030-71165-8_13



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 018217 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Derivados aminoguanidínicos com atividade antibacteriana

Resumo: A presente patente trata da atividade antibacteriana de quatro substâncias da classe das aminoguanidinas frente a cepas de importância clínica, como as Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e as Gram negativas, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* e *Shigella flexneri*, que estão em forma de sal, podendo ser usadas como princípios ativos com aplicação na área farmacêutica.

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2022 011385 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de ATIVIDADE ANTITUMORAL DE DERIVADOS DE

Utilidade (54): GUANILIDRAZONAS

Resumo: Trata-se de compostos guanilidrazônicos derivados sintetizados do protótipo LQM 14, os quais apresentaram atividade antitumoral individualmente. As guanilidrazonas são importantes, visto seu potencial antitumoral já conhecido na literatura, além de sua facilidade e baixo custo de síntese. Poucos estudos compreendem a atividade desses derivados voltados a linhagem de glioblastoma humano. Dentro desse contexto, a produção das mesmas se torna possível, além da possibilidade de diversas modificações estruturais, permitindo a sua ação voltada a diversas atividades farmacológicas. Os derivados guanilidrazônicos utilizados na atividade antitumoral foram: LQM 239 (Cloridrato de (E) -2- (4- (fenilamino) benzilideno) hidrazinacarboximidamida); LQM 240 (Cloridrato de (E) -2- (4- (pirrolidin-1-il) benzilideno) hidrazinacarboximidamida); LQM 241 (Cloridrato de (E) -2- (4- (4-fenilpiperazin-1- il) benzilideno) hidrazinacarboximidamida); LQM 243 (Cloridrato de (E) -2- (4- (difetilamino) benzilideno) hidrazinacarboximidamida) e LQM 245 (Cloridrato de (E) -2- (4- (quinolin-3- ilamino) benzilideno) hidrazinacarboximidamida). Todos os compostos sintéticos apresentaram atividade antitumoral frente linhagem de GBM02 humano, podendo ser utilizados no desenvolvimento de produtos antitumorais.

Figura a publicar: 1

Nome: EDEILDO FERREIRA DA SILVA JÚNIOR

CPF: 08258742469

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Avenida Menino Marcelo, Conjunto Residencial Tabuleiro do Martins,
1391, Apt 02, Bloc 24.

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57073-460

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: edeildo.junior@iqb.ufal.br

Inventor 6 de 6

Nome: ERICA ERLANNY DA SILVA RODRIGUES

CPF: 09061492408

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua São Florisval, N° 242

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57062-485

País: BRASIL

Telefone: (82) 996 655347

Fax:

Email: ericaerlanny@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Compr 29409161949872539 ok.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf
Reivindicação	REIVINDICAÇÕES.pdf
Desenho	DESENHOS.pdf
Resumo	RESUMO.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 09/06/2022 às 16:41, Petição 870220050889

A new furin-based peptidomimetic as an inhibitor of NS2B-NS3 protease from Zika virus (ZIKV)

Erica Erianny da Silva Rodrigues (https://sciprofiles.com/profile/author/d21ib1iIMUhbOEdCdEMwdWFqZWpoeTJZMFVtbHQybG9Ubzhob0tFcFJUz0=)

¹, Hannah Maus (https://sciprofiles.com/profile/author/OUd5eDFXMMWVnQV5a21INkx2YINhNVINMXowQWEoOWx3QzZaNsrtTjdmZz0=) ²,

Stefan Josef Hammerschmidt (https://sciprofiles.com/profile/author/YkZtNohMUWpJSTdNa0wxaBwNUNpcnVNmcmwvRkdKZ0hr109CSXIMdWNCbz0=)

², João Xavier de Araújo-Júnior (https://sciprofiles.com/profile/author/WGtwU2NHdVpuei9aKzNIOEN6MDFVQIZGZzVhNVQNCtucmJnWWJHNUU2cz0=)

¹, Tanja Schirmeister (https://sciprofiles.com/profile/69658) ², Edeildo Ferreira da Silva-Júnior (https://sciprofiles.com/profile/1110926) ^{*1}

¹ Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Campus AC. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, 57072-970 Maceió, Brazil

² Institute of pharmaceutical and Biomedical Science, Johannes Gutenberg-University Mainz, Staudingerweg 5, D-55128 Mainz, Germany

Academic Editor: Jean Jacques Vanden Eynde

Published: 02 November 2021 by MDPI in 7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry

(https://sciforum.net/event/ECMC2021) session Round table on Infectious diseases (https://sciforum.net/event/ECMC2021#sections)

https://doi.org/10.3390/ECMC2021-11431 (https://doi.org/10.3390/ECMC2021-11431)

Abstract:

The first report of Zika virus (ZIKV) outbreak was from the Yap Island (Micronesia) in 2007 then spreading across the world, being responsible for neurotropic Guillain-Barré syndrome, neonatal microcephaly, and death cases. Currently, there are no licensed vaccines or even specific approved drugs to treat ZIKV infections. Thus, developing novel antiviral agents is crucial. The replication of this flavivirus depends on NS2B-NS3 protease complex, which represents a promising target for searching new drug candidates. Herein, we describe the solid-phase synthesis of a new furin-based peptidomimetic (ArC=CCO-Arg-Leu-Lys-Arg-NH₂), biological screening and *in silico* studies, involving docking using ChemPLP algorithm, molecular dynamics (MD), and DFT/B3LYP calculations. Fluorometric assays revealed the selective inhibition of ZIKV NS2B-NS3 (IC₅₀: 31.5±1.9 μM), when compared to other serine and cysteine proteases. Moreover, docking analyses displayed that the best binding conformation (FitScore: 83.36) interacts with 12 amino acid residues, including Asn¹⁵² (hydrophobic) and Ser¹³⁵ (H-bond) from the catalytic triad. Regarding MD simulations, we verified that the ligand-target complex remains stable from 50 to 200 ns. After the clusters' evaluation, the most stable complex conformation was retrieved (at ~150 ns) for determining the Gibbs free-energy value by DFT calculations. Finally, we verified that our inhibitor exhibits a ΔG value of -67.42 kcal/mol, suggesting it has an efficient binding mode at the catalytic site of ZIKV NS2B-NS3 protease.

Keywords: Antiviral; inhibitor; *in silico*; NS2B-NS3; peptidomimetic; selectivity; Zika

View presentation (/manuscripts/11431/slides.pdf)

View video presentation

DOI See at publisher website (https://dx.doi.org/10.3390/ECMC2021-11431)

Bookmark

Cite

Additional options (mailto:?&subject=Shared%20from%20Sciforum%3A%20A%20new%20furin-based%20peptidomimetic%20as%20NS3%20protease%20from%20Zika%20virus%20%28ZIKV%29&body=https%3A%2F%2Fsciforum.net%2Fpaper%2F11431)



781 Reads

0 Recommendations

based+peptidomimetic+as+an+inhibitor+of+NSB2-

Antiviral agents against flaviviruses

Érica Erlanny S. Rodrigues^{1,2}, Ana Beatriz Souza Floru dos Santos², Manuele Figueiredo da Silva², João Xavier de Araújo-Júnior^{1,2} and Edeildo Ferreira da Silva-Júnior¹

¹Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil

²Institute of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil






16.1 Introduction

Infectious diseases include a group of pathologies, caused by microorganisms such as fungi, protozoa, bacteria, and viruses, of which 73% are responsible for emerging zoonotic infections. These can cause acute or chronic conditions, which can lead to lethal cases. These agents are more prevalent in underdeveloped countries, where there are low incentives to health policies and unsatisfactory sanitization conditions [1]. Among these pathogenic agents, viruses have been perpetuated in society since antiquity. Regarding the risk of viral infections and their set of symptoms, these depend on viral characteristics and host innate and acquired resistance [2]. In this context, human immunodeficiency virus, SARS-CoV-2 (also known as COVID-19), Ebola, Chikungunya (CHIKV), Dengue (DENV), Zika (ZIKV), and Yellow Fever (YFV) are examples of viruses responsible for causing high social and public health damages. Among these, DENV, ZIKV, and YFV belong to Flaviviridae family, and these are capable of generating high rates of morbidity and mortality, especially DENV, which is endemic in more than 100 countries, according to the WHO [3,4]. However, there are no specific drugs to treat these infections. Thus, constant investments in drug development are needed to overcome this issue.

In addition, DENV, ZIKV, YFV, West Nile (WNV), and Japanese encephalitis (JEV) viruses belong to the Flaviviridae family, and represent a major threat to human health, causing global impacts, with up to 400 million people infected annually [5,6]. Besides generating high morbidity and mortality rates, such as DENV, being endemic in more than 100 countries, according to the WHO [3,4]. Flaviviruses infect arthropods and mammals, causing human diseases. They are mainly distributed in tropical areas with high population density, which reflects in the number of people susceptible to infections by such viruses. These viruses can

Review Article

Advances in Computational Methods to Discover New NS2B-NS3 Inhibitors Useful Against Dengue and Zika Viruses

Author(s): Igor José dos Santos Nascimento* , Érica Erlanny da Silva Rodrigues , Manuele Figueiredo da Silva , João Xavier de Araújo-Júnior  and Ricardo Olimpio de Moura 

Volume 22, Issue 29, 2022

Published on: 05 December, 2022

Page: [2435 - 2462]

Pages: 28

DOI: [10.2174/1568026623666221122121330](https://doi.org/10.2174/1568026623666221122121330)

