



UFAL

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

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIVIRAL DE POTENCIAIS INIBIDORES BASEADOS
EM FRAGMENTOS (FBDD) CONTRA OS VÍRUS DENGUE E ZIKA**

Universidade Federal de Alagoas

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

LEANDRO ROCHA SILVA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIVIRAL DE POTENCIAIS INIBIDORES BASEADOS
EM FRAGMENTOS (FBDD) CONTRA OS VÍRUS DENGUE E ZIKA**

Dissertação de Mestrado 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 a obtenção do grau de Mestre em Química.

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

Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a. Sílvia Helena Cardoso

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

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

S586s Silva, Leandro Rocha.

Síntese e avaliação antiviral de potenciais inibidores baseados em fragmentos (FBDD) contra o vírus dengue e Zika / Leandro Rocha Silva. – 2022.

185 f. : il color.

Orientador: Edeildo Ferreira da Silva-Júnior.

Coorientadora: Sílvia Helena Cardoso.

Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 89-100.

Anexos: f. 101-185.

1. Flavivirus. 2. Inibidores de enzimas. 3. Dengue. 4. Zika virus. 5. Compostos Bioativos Baseados em Fragmentos. 6. Inibidores de protease viral. I. Título.

CDU: 602.641



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.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação do mestrando **LEANDRO ROCHA SILVA** intitulada: **“Síntese e Avaliação Antiviral de Potenciais Inibidores Baseados em Fragmentos (FBDD) Contra os Vírus Dengue e Zika”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 24 de fevereiro de 2022, às 14h, por meio de videoconferência.

Maceió, 24 de fevereiro de 2022.

Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente
SAMUEL SILVA DA ROCHA PITA
Data: 24/02/2022 23:44:58-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. SAMUEL SILVA DA ROCHA PITA, UFBA
Examinador Externo à Instituição



Documento assinado digitalmente
SILVIA HELENA CARDOSO
Data: 02/03/2022 19:50:05-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dra. SILVIA HELENA CARDOSO, UFAL
Examinadora Externa ao Programa



Documento assinado digitalmente
Joao Xavier de Araujo Junior
Data: 26/02/2022 10:18:56-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. JOAO XAVIER DE ARAUJO JUNIOR, UFAL
Examinador Interno



Documento assinado digitalmente
Edeildo Ferreira da Silva Junior
Data: 24/02/2022 16:48:19-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. EDEILDO FERREIRA DA SILVA JUNIOR, UFAL
Presidente

AGRADECIMENTOS

À minha família, Pai (*in memoriam*), Mãe, irmãs e sobrinhos, por todos os momentos de apoio e companhia durante a execução do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva-Júnior pelo compromisso, responsabilidade e zelo na orientação desse trabalho e pelo incentivo e apoio em todas as etapas durante todo o mestrado.

À Prof.^a. Dr.^a. Silvia Helena Cardoso que sempre me incentivou a seguir na carreira acadêmica.

Aos meus amigos Rafael Antônio, Reinaldo Pereira e Tiago dos Santos, que me deram suporte durante a minha jornada no PPGQB.

Ao professor Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça-Júnior, da Universidade Federal da Paraíba, por ceder alguns indóis para o Laboratório de Química Medicinal da UFAL, permitindo enriquecer ainda mais esse trabalho.

À minha colega, Érica Erlanny da Silva Rodrigues pelo suporte no Laboratório de Química Medicinal desde o primeiro dia que entrei.

Às minhas amigas, Maria Lúcia Souza de Farias e Maria Izabel, por permitirem a conciliação do meu trabalho com o mestrado.

RESUMO

Os Vírus Dengue (DENV) e Zika (ZIKV) pertencem à família *Flaviviridae* e são responsáveis por infectar mais de 300 milhões de pessoas anualmente. Esses vírus compartilham significativa semelhança genômica entre si, sendo possível o planejamento de moléculas com atividade inibitória contra ambos, simultaneamente. Considerando a proteína estrutural de envelope (E), fundamental para mediar a entrada/fusão do vírus na célula hospedeira; e o complexo de proteínas não estruturais NS2B-NS3, indispensável para o processamento da poliproteína viral durante o ciclo de replicação, bem como supressão da resposta imune do hospedeiro, novos agentes antivirais podem ser planejados visando tais macromoléculas. Almejando descobrir potenciais inibidores de tais alvos, buscou-se elaborar um protocolo de FBDD via docking molecular para triar os melhores fragmentos moleculares a partir de uma quimioteca *in-house*. Assim, 254 fragmentos foram desenhados e otimizados (AM1), seguido da realização do docking molecular (Gold[®]) e (AutoDock Vina[®]) frente às proteínas supracitadas. A partir do FBDD e adotando os valores de 30 (FitScore) e -3,0 kcal/mol (energia de afinidade), como critério de corte, 24 fragmentos promissores foram selecionados, compondo um conjunto, principalmente de aldeídos e aminas. Então, o aldeído mais promissor, indol-3-carboxaldeído, foi selecionado para a síntese de cianoacrilamidas e acrilatos, rendendo um conjunto de 128 novas moléculas. Desse modo, foram sintetizadas duas séries de moléculas e avaliadas frente a serino protease NS2B-NS3 do ZIKV e DENV, além de ensaios com células. Todos os compostos apresentaram um perfil não citotóxico e boa solubilidade em meio biológico. Em contrapartida, não apresentaram nenhuma atividade antiviral em ensaios com células infectadas. Por fim, percebe-se que são necessárias modificações estruturais adicionais para alcançar a atividade antiviral, bem como, para melhorar a inibição sobre a protease.

Palavras-chave: Flavivírus. Inibidores. Dengue. Zika. FBDD. NS2B-NS3.

ABSTRACT

Dengue Virus (DENV) and Zika (ZIKV) belong to *Flaviviridae* family and are responsible for infecting more than 300 million people annually. These viruses share a significant genomic similarity to each other, making it possible to plan dual inhibitors against both. The structural envelope protein (E) is critical to mediating virus entry/fusion into the host cell; and the complex non-structural proteins NS2B-NS3, indispensable for the processing of the viral polyprotein during the replication cycle, as well as suppression of the host's immune response, new antiviral agents can be designed for such macromolecules. Aiming at potential inhibitors of such targets, we sought to develop a FBDD protocol via molecular docking to screen the best molecular fragments from an in-house library. Thus, 254 fragments were designed and optimized (AM1), followed by molecular docking (Gold®) and (AutoDock Vina®) against the aforementioned proteins. From the FBDD and adopting the values of 30 (FitScore) and -3.0 kcal/mol (affinity energy) as cutting criteria, 24 promising fragments were selected, composing a set of aldehydes and amines. Then, the most promising aldehyde, indole-3-carboxaldehyde, was selected for the synthesis of cyanoacrylamides and acrylates, yielding a set of 128 new molecules. Thus, two series of molecules were synthesized and evaluated against the serine protease NS2B-NS3 of ZIKV and DENV, in addition to cell assays. All compounds showed a non-cytotoxic profile and good solubility in biological media. In contrast, they did not show any antiviral activity in assays with infected cells. Finally, it is clear that structural modifications are needed to achieve antiviral activity, as well as to improve protease inhibition.

Keywords: Flavivirus. Inhibitors. Dengue. Zika. FBDD. NS2B-NS3.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1	Flavivírus	13
2.1.1	Dados epidemiológicos para os principais flavivírus	13
2.1.2	DENV	15
2.1.3	ZIKV	16
2.1.4	Ciclo de infecção para os arbovírus e ciclo de replicação para os flavivírus	17
2.1.5	Proteínas estruturais e não estruturais	20
2.2	Estrutura e Função da Proteína E	22
2.2.1	Inibidores da proteína E	25
2.3	Estrutura e Função da Protease NS2B/NS3	26
2.3.1	NS2B/NS3 do DENV e ZIKV	31
2.4	Planejamento de Compostos Bioativos Baseados em Fragmentos (FBDD)	35
3	OBJETIVOS.....	39
3.1	Objetivo Geral	39
3.2	Objetivos Específicos	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	Cromatografias	40
4.1.1	Cromatografias em camada delgada (CCD)	40
4.1.2	Cromatografia em coluna	40
4.1.3	Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	40
4.2	Pontos de Fusão (PF)	41
4.3	Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio (¹ H) e Carbono Treze (¹³ C)	41
4.4	Planejamento Racional.....	41
4.4.1	Planejamento racional de inibidores baseados em fragmentos (FBDD) ...	41
4.5	Viabilidade Celular, Ensaio Antiviral e Anti-NS2B/NS3	43
4.5.1	Viabilidade celular	43
4.5.2	Ensaio antiviral	44

4.5.3	Ensaio anti-NS2B/NS3	44
4.5.3.1	Preparação da proteína NS2B/NS3	44
4.5.3.2	Ensaio fluorimétrico	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
5.1	Planejamento dos Inibidores por FBDD	46
5.1.1	Síntese dos indol-3-cianoacrilatos LRS (01-04)	52
5.1.2	Síntese dos análogos indol-3-cianoacrilamidas LRS (05-08, 17,18, 20-23)	54
5.1.3	Mecanismos de reações propostos para a síntese das moléculas planejadas racionalmente	63
5.2	Rendimento dos Compostos Sintetizados	64
5.3	Caracterização Estrutural dos Compostos Sintetizados	65
5.4	Docking Molecular	65
5.5	Resultados para a Proteína E	66
5.5.1	Docking na proteína E	66
5.6	Avaliação Citotóxica e Antiviral dos Compostos Sintetizados	71
5.6.1	Avaliação citotóxica pelo método MTT	71
5.6.2	Avaliação da atividade antiviral frente ao ZIKV	72
5.7	Resultados para a Protease NS2B/NS3	73
5.7.1	Docking na protease NS2B/NS3	73
5.7.2	Avaliação da atividade biológica dos análogos frente à protease NS2B/NS3 dos vírus Zika e Dengue	84
5.7.3	Determinação de parâmetros físico-químicos	86
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	89
	Referências	90
	Anexo A – Caracterização estrutural dos compostos sintetizados	102
	Anexo B – Artigos publicados e/ou aceitos	181

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os flavivírus são responsáveis pela infecção de milhões de pessoas a cada ano em várias partes do planeta. Dentre os mais de 70 vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*, merecem destaque os vírus da Dengue (DENV), Nilo Ocidental (WNV), Encefalite Japonesa (JEV), Febre Amarela (YFV), Zika (ZIKV) e Encefalite Transmitida por Carrapato (TBEV), os quais são categorizados como patógenos emergentes ou re-emergentes (CANNALIRE et al., 2019a; ISHIKAWA; YAMANAKA; KONISHI, 2014).

Embora o isolamento de boa parte desses patógenos tenha ocorrido nos anos 1910-1940 e, mesmo com o crescente número de surtos causados por flavivírus, ainda não existem vacinas disponíveis para a maioria deles. Há vacinas disponíveis apenas para YFV, JEV, TBEV e mais recentemente para o DENV, a Dengvaxia®. Esta última, no entanto, não fornece proteção efetiva contra os 5 sorotipos do vírus (CANNALIRE et al., 2019a; HAMMAMI; BEN HASSINE, 2019; VASILENKO et al., 2019).

Os flavivírus são transmitidos aos seres humanos e para alguns animais por meio de artrópodes hematófagos que estão amplamente distribuídos em todos os continentes, afetando mais de 125 países, principalmente nos trópicos onde as condições para manutenção do ciclo de vida dos vírus são favoráveis. Em adição, as mudanças climáticas, as viagens globais, a migração de pássaros e os projetos de irrigação têm contribuído para a expansão geográfica dos arbovírus (LI; ZHANG; LI, 2017; MESSINA et al., 2019; PACCA, 2013; SOLOMON; MALLEWA, 2005).

Com exceção do DENV, que é um patógeno estritamente humano, a maioria dos flavivírus está presente em ciclos de transmissão simples silvestre e, ocasionalmente, são transmitidos aos seres humanos, quando esses adentram em áreas enzoóticas, como consequência da ocupação e crescimento desordenados de áreas urbanas (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; PAYNE, 2017).

A infecção por flavivírus, bem como, a sobrevivência e replicação do patógeno no organismo do hospedeiro dependem do bom funcionamento de suas proteínas estruturais (capsídeo (C), membrana(M), envelope (E)) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5); além de condições biológicas ideais para iniciar o ciclo de infecção, como o baixo pH endossomal (LI; ZHANG; LI, 2017; PAYNE, 2017).

Dentre esse conjunto de proteínas, a proteína estrutural E e a protease NS3 são, particularmente, alvos atrativos para o planejamento de fármacos. A proteína E está associada aos eventos iniciais que desencadeiam a infecção por esses patógenos, de modo que pequenas moléculas que se ligam em sítios importantes na superfície dessa proteína têm potencial para bloquear a entrada viral, evitando a continuação do seu ciclo de replicação (DE WISPELAERE et al., 2018; PITTS et al., 2019a).

No ZIKV e DENV, a replicação viral depende da proteína não-estrutural 3 (NS3^{pro}), que age em associação à NS2B, aumentando a eficiência da atividade enzimática, de modo que a interrupção da atividade do complexo NS2B-NS3 conduz à morte viral (CHAPPELL et al., 2008).

Diante do exposto acima é notável a importância do desenvolvimento de pesquisas voltadas para o planejamento de novas moléculas bioativas com potencial para inibir a atividade de proteínas flavivirais. Assim, o presente trabalho buscou planejar de forma racional, baseada em técnicas computacionais de docking molecular, um conjunto de moléculas bioativas potencialmente inibidoras das proteínas E e NS2B-NS3 flavivirais.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os arbovírus, que são vírus transmitidos por artrópodes hematófagos tais como mosquitos e carrapatos, são frequentemente associados a surtos em série e, portanto, são classificados de forma epidemiológica, representando um problema sério de saúde pública global. Em muitos casos, são doenças zoonóticas ou antropozoonóticas, definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como qualquer doença naturalmente transmissível de animais vertebrados para humanos ou de humanos para animais (OTTE; PICA-CIAMARRA, 2021). Contudo, uma vez que não há obrigatoriamente animais intermediando a infecção humana, alguns autores as consideram como doenças virais não zoonóticas (KHEIRALLAH et al., 2021). Tais patógenos estão distribuídos em todos os continentes com predominância nas regiões tropicais, devido às condições adequadas para a manutenção do ciclo de vida dos vetores (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; REY et al., 2018).

De acordo com a OMS, as doenças negligenciadas são enfermidades, geralmente transmissíveis, com maior incidência em países em desenvolvimento. Além disso, apresentam como características comuns a alta endemicidade em regiões mais pobres e menos desenvolvidas, incluindo áreas rurais e urbanas (GARCIA et al., 2011). Como consequência da baixa prevalência e pelo fato de atingir populações em regiões mais pobres, as doenças negligenciadas não são atrativos econômicos para o desenvolvimento de fármacos. Nesse contexto, as febres do DENV e ZIKV são duas doenças classificadas como negligenciadas pela OMS, mesmo considerando seus impactos econômicos e na saúde da população mundial (GARCIA et al., 2011).

Ainda nesse âmbito, os vírus re-emergentes negligenciados, dentre os quais estão incluídos os flavivírus, vêm sendo responsáveis pelo adoecimento de milhões de pessoas todos os anos ao redor do mundo. Estes causam sérias manifestações, tais como encefalite, febre (hemorrágica ou não), necrose miocárdica, encefalomielite, artralgia, síndrome de Guillain-Barré em adultos, rash cutâneo, mialgia, microcefalia em neonatos, hepatoesplenomegalia, e distúrbios gastrointestinais (CHEN; HAMER, 2016; MACLACHLAN et al., 2017).

Em sua maioria, os flavivírus são mantidos na natureza em ciclos silvestres, circulando entre vetores e hospedeiros primatas não humanos. Contudo, devido aos grandes avanços dos centros urbanos, mudanças climáticas, comportamento humano

e os desmatamentos, o contato vetor-humano tem sido cada vez mais frequente, contribuindo para a disseminação desses vírus. Associado a esses fatores estão as viagens para áreas endêmicas, permitindo que esses patógenos atinjam outras regiões do planeta, uma vez que o hospedeiro humano infectado pode servir como reservatório para os vírus (GUARNER; HALE, 2019; HAMMAMI; BEN HASSINE, 2019; ISHIKAWA; YAMANAKA; KONISHI, 2014; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

Os flavivírus se configuram como os vírus que mais infectam pessoas, contudo, também acometam animais domésticos (RYU, 2017). Embora sejam encontrados em mais de 100 países, até o momento não existe nenhuma terapia antiviral aprovada para o seu eficaz tratamento (CHINTHAKINDI et al., 2021; MESSINA et al., 2019; ONO et al., 2003; RYU, 2017; SADEGHIEH et al., 2021). Algumas vacinas foram desenvolvidas e estão disponíveis para os vírus da febre amarela (YFV), encefalite japonesa (JEV), encefalite transmitida por carrapatos (TBEV) e, recentemente, vírus dengue (DENV) (Dengvaxia®). Esta, contudo, apresenta eficácia de aproximadamente 65% contra o sorotipo DENV-2, sendo recomendada para indivíduos entre 9 e 45 anos, num esquema de 3 doses com intervalo de 6 meses entre cada aplicação. Além disso, a Dengvaxia® não fornece proteção efetiva contra todos os sorotipos de DENV. Ainda, em 2017, o fabricante da vacina, o laboratório Sanofi-Aventis, anunciou que a vacina poderia aumentar a gravidade de uma segunda reinfecção por DENV (ISLAM et al., 2020; PRETO et al., 2021).

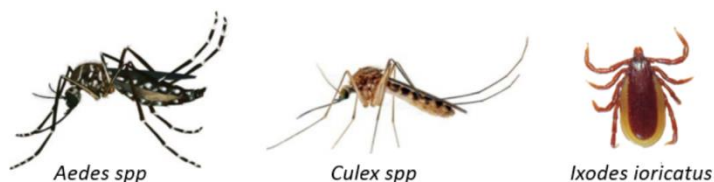
2.1 Flavivírus

2.1.1 Dados epidemiológicos para os principais flavivírus

Os *Flavivirus* são vírus envelopados com fita simples de RNA positivo ((+)ssRNA) com um genoma de aproximadamente 11 kilobases (kb) de comprimento (SHAH et al., 2018a). Compreendem mais de 70 membros diferentes e pertencem à família *Flaviviridae*, assim como os gêneros *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus* (HAMMAMI; BEN HASSINE, 2019). A maioria desses flavivírus são transmitidos pela picada de artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos do gênero *Aedes* sp. e

Culex sp., bem como, carrapatos do gênero *Ixodes* sp. (Figura 1) (ISHIKAWA; YAMANAKA; KONISHI, 2014; QI et al., 2020; RYU, 2017).

Figura 1 – Principais vetores de flavivírus.



Fonte: Autor, 2022.

Dentre todos os flavivírus, os membros de maior importância, por serem responsáveis pela maioria dos casos de infecções em humanos, são os vírus JEV, Encefalite Saint Louis (SLEV), Nilo Ocidental (WNV), YFV e, principalmente, DENV 1-5 e Zika (ZIKV) (CANNALIRE et al., 2019a; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; MUSTAFA et al., 2015). O DENV-5 foi identificado primeiramente em 2007 no Estado de Sarawak, na Malásia. Sendo apenas um único surto relatado, acredita-se que se trata de um sorotipo de baixa taxa de transmissão (MUSTAFA et al., 2015).

Estima-se que mais de 2 bilhões de pessoas correm o risco de infecção pelo JEV com casos anuais estimados entre 50 e 175 mil, principalmente em 24 países do Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental. Destes, cerca de 30% resultam em casos fatais, e que mais de 30% dos sobreviventes permanecem com sequelas neurológicas permanentes (HAN et al., 2020; ZHOU et al., 2021).

A última epidemia notificada causada por SLEV data de 1933, ocasião na qual 1.095 casos e 201 mortes foram notificadas (HOSSAIN et al., 2021).

Em 2018, a Europa experimentou uma epidemia de WNV, que resultou na infecção de 2.000 pessoas. Posteriormente, em 2020, os Estados Membros da União Europeia relatou 316 casos e 37 mortes, enquanto que os Estados Unidos registram uma estimativa de mais de 24 mil casos e 2.300 mortes desde 1999 causados pelo WNV (ASSAID et al., 2021; MODY et al., 2021; PAPA et al., 2021).

No Brasil, de acordo com a Fundação Oswaldo Cruz, entre 2014 e 2020, dez casos de WNV foram confirmados, todos no Estado do Piauí (AZEVEDO COSTA et al., 2021).

O YFV geralmente é endêmico na Amazônia e partes do Peru, Guiana Francesa, Venezuela, Suriname, República Cooperativa da Guiana, Colômbia e Brasil. No Brasil, o último surto epidêmico de YFV urbano ocorreu nos anos 1930, mas entre 2017 e 2018 foram confirmados 1.257 casos e 394 mortes, principalmente em áreas rurais, onde o ciclo silvestre é difícil de ser interrompido (SADEGHIEH et al., 2021).

2.1.2 DENV

Isolado em 1943, O DENV ocorre como 5 sorotipos filo e antígenicamente distintos (DENV1-5), transmitidos principalmente por mosquitos do gênero *Aedes* sp. (MUSTAFA et al., 2015). Considerado pela OMS como uma das maiores ameaças à saúde humana, o DENV é endêmico no Brasil e, dentre os flavivírus, é o responsável pelo maior número de casos globais de infecções em humanos. Estima-se que mais de 3,5 bilhões de pessoas estão em risco de infecção pelo DENV, enquanto que anualmente mais de 300 milhões de casos são confirmados em mais de 128 países. Dentre todos os casos confirmados, aproximadamente 96 milhões são assintomáticos e 2 milhões desenvolvem quadros graves, como a síndrome do choque e febre hemorrágica do Dengue. Além disso, os casos fatais ultrapassam 21 mil notificações (EDGERTON et al., 2021; MESSINA et al., 2019; MURUGESAN; MANOHARAN, 2019). Entre 2008 e 2015 os casos saltaram de 1,2 para 3,2 milhões no Sudeste da Ásia, Américas e Pacífico Ocidental, passando para 5,2 milhões em 2019, mesmo ano em que o Brasil ocupou a segunda posição mundial no número de casos, ficando o Afeganistão em primeiro (RAI et al., 2021).

Em 2020, no Brasil, foram confirmados mais de 900 mil casos de dengue. Já em 2021, os casos ultrapassaram 975 mil notificações, com a maior incidência no Centro-Oeste do país, seguido das regiões Norte, Sul, Sudeste e Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; PAHO/WHO, 2022; SILVA; MAGALHÃES; PENA, 2021).

Milhares de casos de DENV têm sido relatados pela Organização Pan Americana de Saúde (PAHO). Em 2021 foram mais de 1,2 milhões de casos, dos quais 3.200 apresentaram o quadro grave da doença e cerca de 428 foram fatais (JAMAL SABIR; AL-SAUD; HASSAN, 2021; PAHO/WHO, 2022).

2.1.3 ZIKV

Assim como o DENV, o ZIKV foi listado pela OMS como uma das 10 maiores ameaças à saúde global. Primeiramente, isolado de humanos em 1954, o ZIKV tornou-se um patógeno clinicamente significativo após os surtos na Ilha Yap na Micronésia, em 2007, onde quase 75% da população foi infectada (LI et al., 2018; SILVA-JÚNIOR, 2019). Posteriormente, casos de ZIKV foram reportados na Polinésia Francesa em 2013, bem como nas Américas do Sul e Central entre os anos de 2015 e 2016, afetando mais de 69 países e sendo responsável por mais de 1,5 milhão de infecções.

Até o final de julho de 2019, cerca de 87 países já haviam reportado casos de ZIKV, em regiões tão diversas como: África, América, Sudeste Asiático e no Pacífico Ocidental (BHARDWAJ et al., 2021)

Apenas no Brasil, até o final de 2016 foram confirmados 273.904 casos de ZIKV (BALTINA et al., 2021; PAHO/OMS, 2022). Nesse mesmo período, como consequência de mães infectadas por ZIKV durante a gestação mais de 8 mil neonatos apresentaram microcefalia - uma redução na circunferência do crânio (< 34 cm) - e/ou desordens neurológicas graves. Tais efeitos neurológicos estão associados ao tropismo do ZIKV por células progenitoras neuronais, neurônios maduros e astrócitos (EL COSTA et al., 2016; SILVA-JÚNIOR, 2019). Em 2020, 18.941 casos de infecção por ZIKV e 3.474 casos de microcefalia foram registrados no Brasil e no ano seguinte mais de 17 mil casos foram relatados (BALTINA et al., 2021; BHARDWAJ et al., 2021; CHEN et al., 2017; FELICETTI et al., 2021; IANI et al., 2021; LI et al., 2018; PAHO/OMS, 2022; SILVA; MAGALHÃES; PENA, 2021).

Até o presente momento são conhecidas duas linhagens do ZIKV (Africana e Asiática). Contudo, seus genomas virais mantêm mais de 95% de similaridade e, diferentemente do DENV, o ZIKV é classificado como um único sorotipo (SILVA-JÚNIOR, 2019).

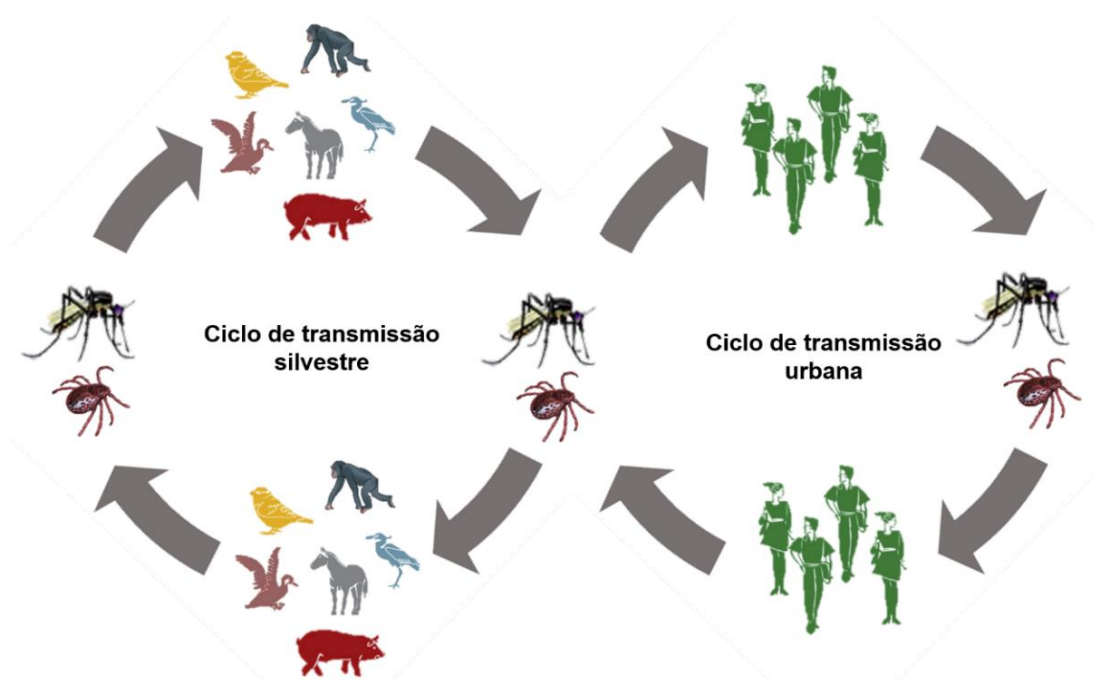
Estima-se que aproximadamente 80% das pessoas infectadas com ZIKV sejam assintomáticas, e que 20% destas apresentem sintomas menos severos dos que os casos de dengue, tais como febre baixa/moderada, rash cutâneo, dor de cabeça e conjuntivite. Porém, problemas neurológicos, tais como microcefalia em neonatos, danos nos testículos, dano ocular, hipertonia/espasticidade, convulsão e síndrome de

Guillain-Barré em adultos, tornam o ZIKV uma doença preocupante e extremamente impactante para a sociedade moderna (RASSIAS et al., 2019; THARAPPEL et al., 2020).

2.1.4 Ciclo de infecção para os arbovírus e ciclo de replicação para os Flavivírus

No ciclo de transmissão silvestre (Figura 2) os vetores, mosquitos e/ou carrapatos, infectam hospedeiros vertebrados através da picada durante o seu repasto sanguíneo. Entretanto, a transmissão entre os vetores artrópodes de maneira vertical transovariana (vírus dentro do ovo) ou transovo (vírus na superfície do ovo) (CARVALHO; LONG, 2021). O segundo ciclo de transmissão envolve o contato dos humanos com os artrópodes (Figura 2) devido a entrada desses em ambientes silvestres, ou como consequência do crescimento desordenado das cidades, o que contribui para o surgimento de criadouros para muitos vetores (GUARNER; HALE, 2019).

Figura 2 – Ciclos de transmissão dos arbovírus.



Fonte: Autor, 2017. (EDITADO)

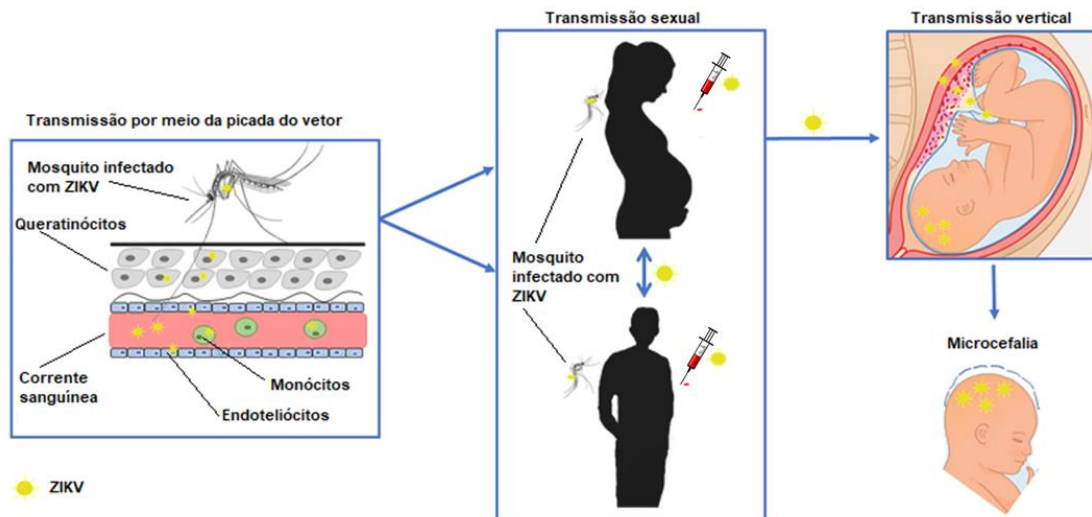
Além disso, considerando, carrapatos como vetores de JEV, o ser humano pode ser infectado a partir do consumo de leite contaminado, como consequência do animal parasitado por carrapatos infectados (MACLACHLAN et al., 2017).

A transmissão do DENV para o hospedeiro humano ocorre através da picada de mosquitos fêmeas infectadas, principalmente *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*, geralmente para se alimentar do sangue do hospedeiro e amadurecer seus ovos. Após a picada, o hospedeiro serve como reservatório que mantém o vírus vivo e em constante ciclo de replicação. Outras maneiras mais raras de contaminação incluem: transplantes de órgãos, transmissão vertical (mãe-bebê), via intranasal e exposição conjuntival. Embora a maioria dos casos de dengue apresentem sintomas menos severos, condições debilitantes, como diabetes, asma e deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase podem contribuir para o desenvolvimento de quadros fatais, uma vez que a deficiência dessa enzima prejudica a produção de nitrogênio e oxigênio reativos como óxido nítrico (NO), ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), usados pelo sistema imune para eliminar patógenos invasores (AL-ALIMI et al., 2014; GUARNER; HALE, 2019).

A transmissão do ZIKV para o hospedeiro humano pode ocorrer de quatro maneiras diferentes (Figura 3). A mais comum delas é através da picada do mosquito infectado, principalmente *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. hensilli* e *Ae. polynesiensis*. Após a picada, o vírus se replica nos queratinócitos epidérmicos, endoteliócitos de vasos sanguíneos, monócitos e produz efeitos citopáticos.

Pode ocorrer transmissão por meio de relações sexuais, uma vez que o vírus pode permanecer em fluídos sexuais por vários meses. Casos de transmissão via transfusão de sangue foram relatados, porém os casos mais graves estão associados à transmissão vertical, no qual a hospedeira gestante infectada transmite o vírus para o feto, ocasiões nas quais os fetos têm maior probabilidade de desenvolverem microcefalia e outros problemas neurológicos (BHARDWAJ et al., 2021).

Figura 3 – Ciclo de transmissão do ZIKV.



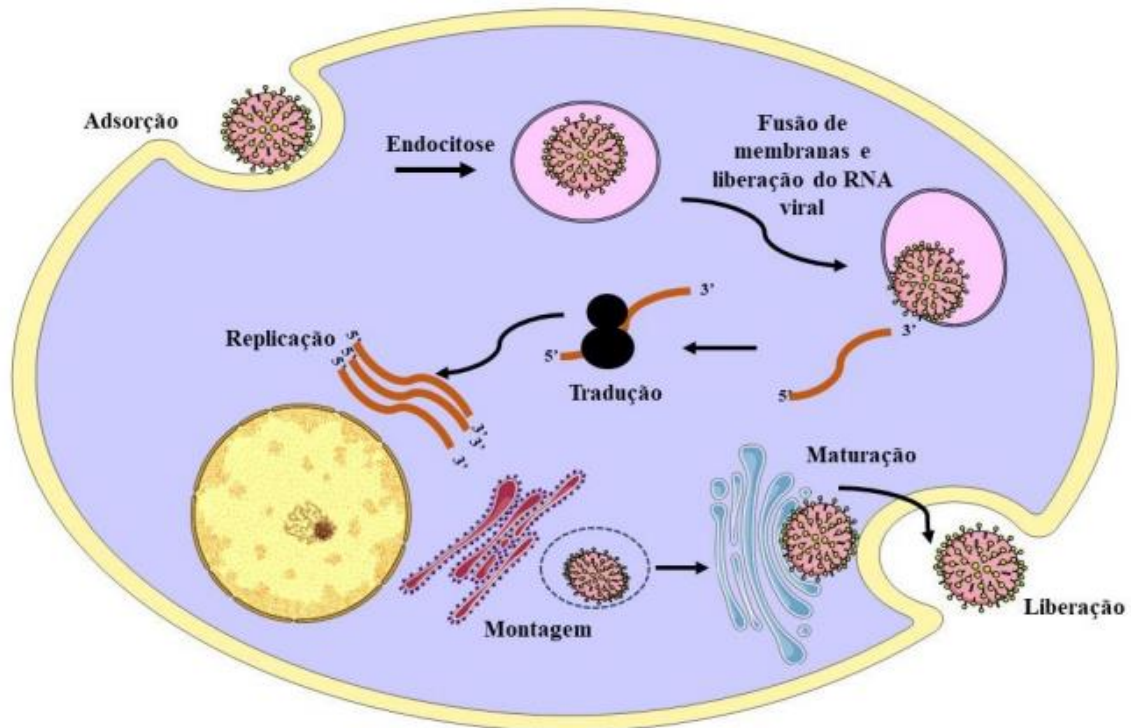
Fonte: BHARDWAJ et al., 2022. (tradução e adaptação)

Após a picada do vetor infectado, o ciclo de replicação viral inicia-se com a aderência dos vírions à superfície da célula hospedeira. As células susceptíveis à contaminação são predominantemente os monócitos e as células dendríticas. As células são infectadas como consequência de eventos envolvendo a proteína do envelope (E) do vírus, uma glicoproteína organizada em dímeros que é reconhecida por receptores celulares, normalmente dos tipos lectina-C, fosfatidilserina e tirosina quinase. Em seguida, ocorre a internalização do vírus por um mecanismo de endocitose clatrina-dependente. Devido ao baixo pH endossômico (~6), ocorrem mudanças conformacionais no envelope (E), permitindo a fusão das membranas virais e celulares, revelando o capsídeo e liberando RNA no citoplasma da célula hospedeira. O RNA é traduzido em poliproteínas pelos ribossomos hospedeiros e, após ser translocada para a membrana do retículo endoplasmático, essa poliproteína é clivada em três proteínas estruturais (pré-membrana (prM), envelope (E) e capsídeo (C)) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4, NS4B e NS5). As proteínas não estruturais replicam o RNA do genoma, enquanto que a montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático onde formam-se partículas virais imaturas.

As partículas virais imaturas são, então, transportadas pela via secretora, maturadas pela ação da protease viral NS2B-NS3 e clivadas pela furina do hospedeiro, o que gera os vírions maduros, que posteriormente são liberados por

exocitose (Figura 4) (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008; SILVA-JÚNIOR, 2019).

Figura 4 – Ciclo de replicação dos Flavivírus.



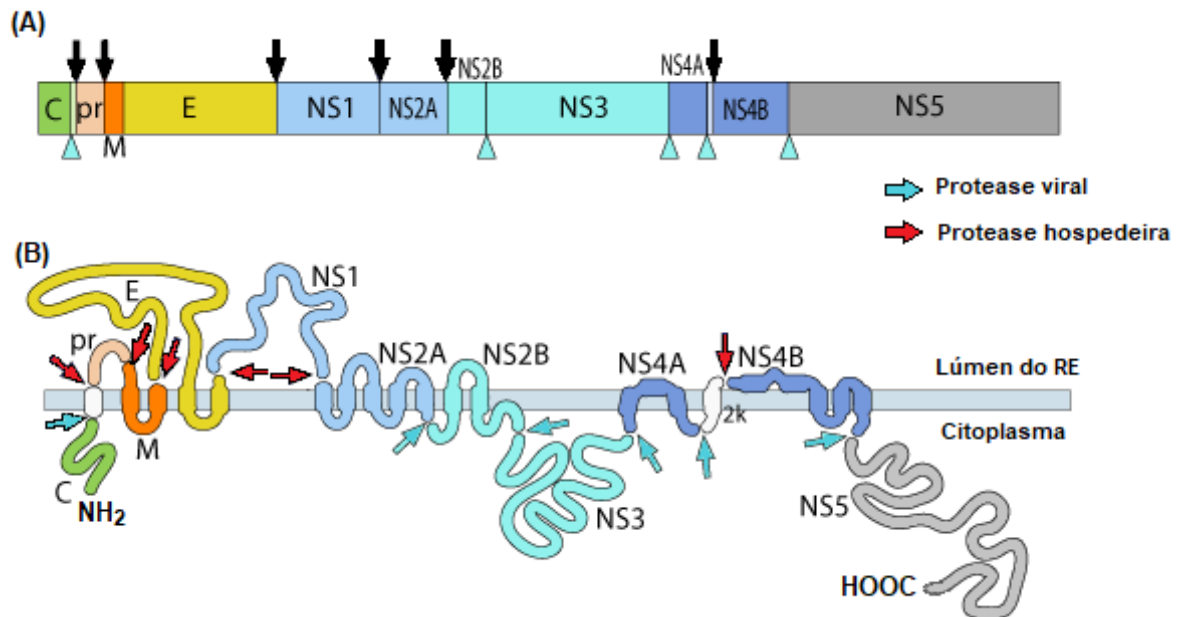
Fonte: SILVA, 2019.

2.1.5 Proteínas estruturais e não-estruturais

As poliproteínas flavivirais compreendem três proteínas estruturais e sete não-estruturais (Figura 5). As proteínas estruturais participam na formação da partícula viral e estão envolvidas no processo de fusão com as células hospedeiras. Por outro lado, as proteínas não estruturais estão envolvidas na replicação do RNA, montagem do vírion e modulação de resposta imune do hospedeiro (MILLIES et al., 2019).

As proteínas não estruturais dos flavivírus são multifuncionais. Contudo, muitas das funções dessas ainda não foram completamente elucidadas e continuam sob investigação (LI; ZHANG; LI, 2017).

Figura 5 – Componentes estruturais e não estruturais da poliproteína flaviviral.



Fonte: QUERESHI, 2018 (tradução e adaptação). (A) Produtos de clivagem e processamento da poliproteína. (B) Topologia da poliproteína flaviviral não processada inserida na membrana do retículo endoplasmático.

As três proteínas estruturais dos flavivírus, membrana (M), capsídeo (C) e envelope (E) estão envolvidas na formação do vírion. A primeira é um fragmento proteolítico da glicoproteína precursora de membrana (prM); a segunda encapsula o genoma viral, sendo responsável por proteger o material genético; e a terceira é responsável por mediar os processos de adesão do vírus à superfície da célula e a posterior fusão das membranas hospedeira e viral, representando o principal antígeno para o sistema imune (SILVA-JÚNIOR, 2019; ZHANG et al., 2017).

A NS1 (~55 kDa) é uma poliproteína necessária para a síntese de (–)ssRNA, bem como é indispensável em vários estágios da replicação viral e produção de partículas infecciosas, estando relacionada às formas severas de DENV (FONSECA et al., 2017; DEY et al., 2021). NS2A (~22 kDa) é uma poliproteína hidrofóbica que participa da replicação e organização estrutural do vírus, além de estar relacionada à regulação de interferon beta (INF- β) e a resposta imune do hospedeiro (FONSECA et al., 2017). A proteína NS2B (14 kDa) é uma proteína transmembranar que funciona como um cofator para a proteína NS3, formando uma serino protease ativa para reconhecimento e proteólise da poliproteína (DEY et al., 2021). A NS4A (16 kDa) e

NS4B (27 kDa) são proteínas de membrana envolvidas em rearranjos necessários à formação do complexo de replicação viral. Além disso, a NS4A está relacionada à amplificação do RNA viral, enquanto a NS4B, à inibição da resposta do interferon tipo I (INF-I) das células hospedeiras (CUMBERWORTH et al., 2017; MILLER et al., 2007). Por fim, a NS5 (103 kDa) é uma proteína com várias atividades enzimáticas, incluindo RNA-dependente RNA polimerase, RNA guanililtransferase e metiltransferase (MTase) (ACKERMANN; PADMANABHAN, 2001; ISSUR et al., 2009).

A proteína E e o complexo NS2B-NS3, especialmente do DENV e do ZIKV, serão abordadas mais detalhadamente por serem de maior interesse para este trabalho.

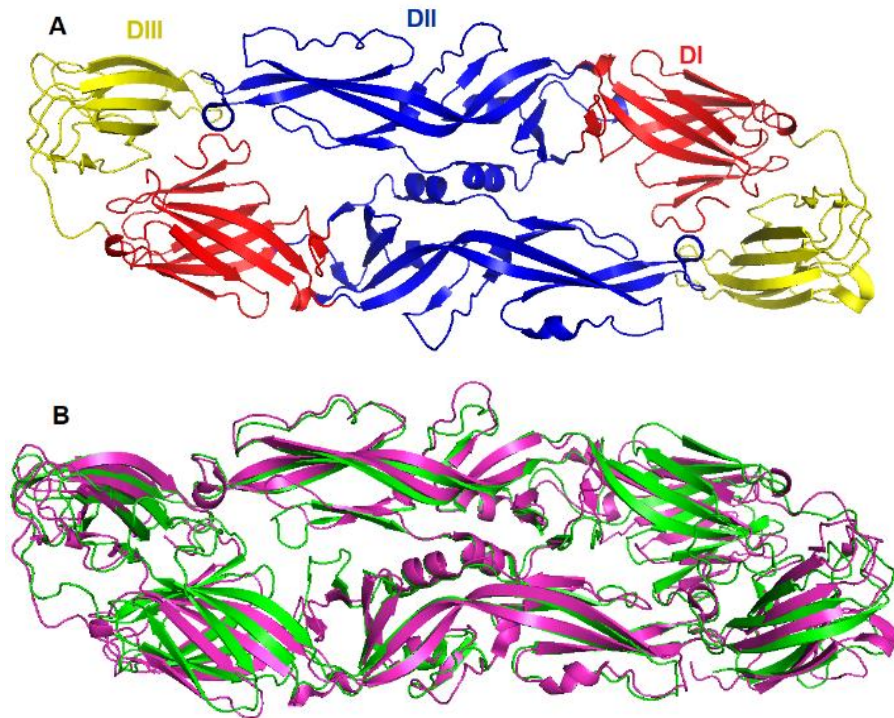
2.2 Estrutura e função da proteína E

A proteína E assume diferentes conformações nas formas madura, imatura e na forma de fusão ativada do vírus. Ela tem um papel importante durante a maturação, montagem, entrada e desempenha papel crucial no ciclo de infecção viral ao mediar a fusão da membrana viral com a membrana endossômica. Além disso, ela é um alvo para a maioria dos anticorpos neutralizantes (DEY et al., 2021; PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008).

A glicoproteína E dos flavivírus (Figura 6) é uma proteína de fusão classe II que compartilha cerca de 40% de identidade dos aminoácidos dentro o gênero *Flavivirus*, sendo a principal proteína de superfície viral (PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008). Ela consiste num ectodomínio solúvel formado pelos resíduos 1-394 e um domínio transmembranar helicoidal com os resíduos 395-495. O ectodomínio é dividido em três domínios, nomeados DI (resíduos 1-52, 132-192 e 272-299), DII (resíduos 53-131 e 193-271) e DIII (resíduos 300-394) (DEY et al., 2021). O DI conecta DII ao DIII; o DII contém o loop de fusão que interage com a membrana hospedeira durante a fusão das membranas, enquanto DIII é uma estrutura de ligação à imunoglobulinas, importante no reconhecimento molecular pelos receptores celulares e anticorpos neutralizantes, além de possuir um suposto sítio receptor-ligante e ter importante papel durante a fusão (SHI; GAO, 2017). O domínio transmembranar é o principal responsável por mediar a entrada viral em pH ácido (YANG et al., 2019).

A proteína E dos flavivírus mantêm quatro resíduos de histidina (His) (posições 144, 246, 284 e 319), localizados no interdomínio do dímero E, que podem ser importantes nos processos iniciais do ciclo de vida dos flavivírus ou para regular a trimerização da proteína E em pH baixo (ZHANG et al., 2017).

Figura 6 – Representação gráfica da proteína E dos flavivírus.



FONTE; Autor, 2022. Em (A), estrutura tridimensional da proteína E dos flavivírus e seus respectivos domínios (PDB ID: 1UZG). Em (B), sobreposição das proteínas E do DENV (PDB ID: 1OKE) e ZIKV (PDB ID: 5JHM), em verde e magenta, respectivamente. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* PyMol® v. 0.99.

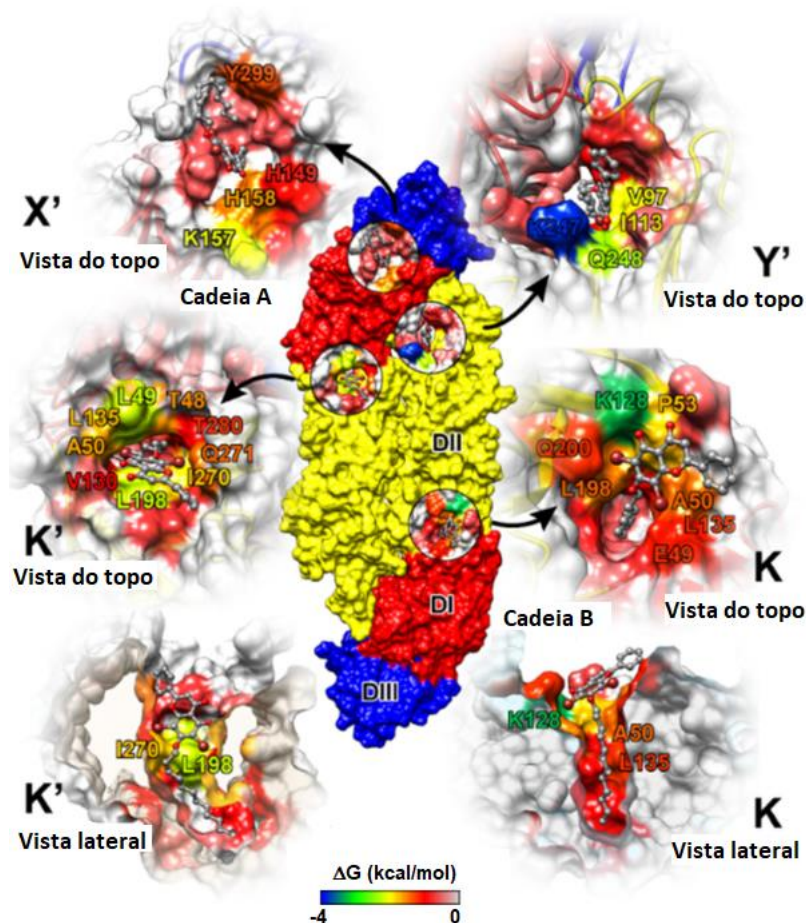
O ectodomínio é organizado em 60 espículas triméricas radiais na superfície viral e, até a maturação, é reorganizado em 90 dímeros localizados em uma orientação tangencial fortemente compactados uns contra os outros, o que torna a membrana lipídica viral interna inacessível. No vírion maduro, a proteína E é organizada em 30 aglomerados de três homodímeros, cobrindo a superfície do vírion e somando um total de 180 monômeros (DEY et al., 2021; PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008; SAMPATH; PADMANABHAN, 2009).

O mecanismo de fusão das membranas celular e viral possui duas funções importantes, sendo a liberação do nucleocapsídeo viral de seu envelope protetor e a

transferência da informação genética viral para o interior da célula hospedeira, onde se inicia o processo de replicação (STIASNY; HEINZ, 2006).

A proteína E possui 4 sítios de interesse para o planejamento de inibidores (Figura 7) dos quais o mais é abordado é o sítio β -octilglucosídeo, localizado entre os domínios DI e DII, devido está relacionado aos eventos iniciais da infecção viral (HENGPHASATPORN et al., 2020).

Figura 7. Sítios disponíveis para o planejamento de inibidores da proteína E do DENV e ZIKV.



Fonte: HENGPHASATPORN et al., 2020. Quatro sítios de ligação na proteína E (X', Y', K e K'). Nos sítios: potentes inibidores encontrados por métodos *in silico* e suas interações com resíduos de aminoácidos de acordo com a energia de afinidade.

Assim, a proteína E é um interessante alvo para o planejamento de inibidores da fusão de membranas e, como consequência, bloqueadores da entrada viral (PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008).

2.2.1 Inibidores da proteína E

Muitos esforços têm sido depositados no desenvolvimento de antivirais que possam bloquear os eventos iniciais do ciclo de vida dos flavivírus. Um dos principais pontos é o desenvolvimento de pequenas moléculas que possam se ligar à proteína E, na superfície do vírion e impedir a entrada viral (LI et al., 2019).

Um atrativo alvo tem sido um bolso hidrofóbico, localizado entre DI e DII da proteína E, que pode estar relacionado ao processo de entrada viral, e a região em forma de haste que precisa interagir com o trímero da proteína E durante a fusão de membrana endossomal (YANG et al., 2019).

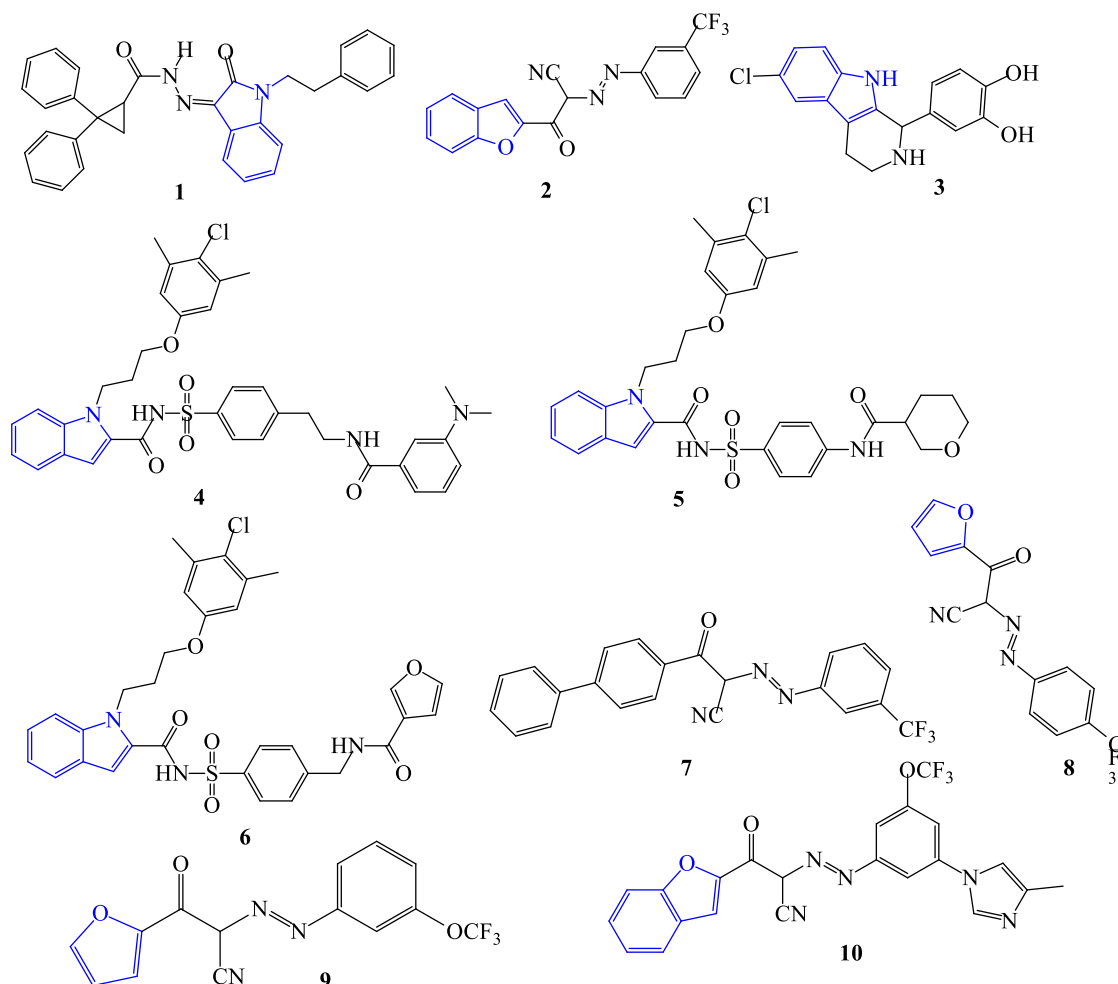
Utilizando triagem de alto rendimento baseada em células infectadas com DENV-2, o composto **1** (Figura 11) apresentou um valor de EC_{50} de $0,48 \pm 0,06 \mu M$. Este foi identificado como inibidor dos estágios iniciais da entrada viral, uma vez que foi verificada a redução da carga viral entre 94-95%, quando as células foram pré-incubadas com o inibidor e, em seguida, infectadas com o DENV-2, ao passo que a redução foi menor quando as células foram previamente infectadas e posteriormente tratadas com **1**. Além disso foi igualmente potente contra os outros sorotipos de DENV (1, 3 e 4), tendo como alvo a proteína E, afetando a translocação e o rearranjo de domínios ou interferindo no processo de fusão das membranas viral e celular (YANG et al., 2019).

O composto **2** foi identificado como um potente inibidor do ZIKV e dos quatro sorotipos de DENV, atuando por meio de uma forte ligação com o dímero da proteína E, entre DI e DII, bloqueando a transição para o trímero, estado pós-fusão do envelope viral (SCHMIDT et al., 2012; WISPELAERE et al., 2018). O composto **3** se liga diretamente à proteína E pré-fusão, inibindo a fusão viral de maneira dependente da concentração (LIAN et al., 2018).

Uma série de derivados indólicos (**4**, **5** e **6**) apresentou, como principal modo de ação, a inibição da proteína E durante a entrada viral do ZIKV e do DENV-2, exibindo toxicidade mínima (PITTS et al., 2019b). Derivados cianoidrazinas (**7**, **8**, **9** e **10**) também se mostraram capazes de bloquear a entrada viral por meio da inibição da fusão mediada pela proteína E para múltiplos flavivírus (LI et al., 2019).

Tomados em conjunto, nota-se que os inibidores da proteína E dos flavivírus supracitados (Figura 8) compartilham entre si determinadas características, seja a presença do grupo ciano, o anel indólico ou bioisosterismo.

Figura 8 – Inibidores da proteína E dos vírus DENV2 e ZIKV.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12.

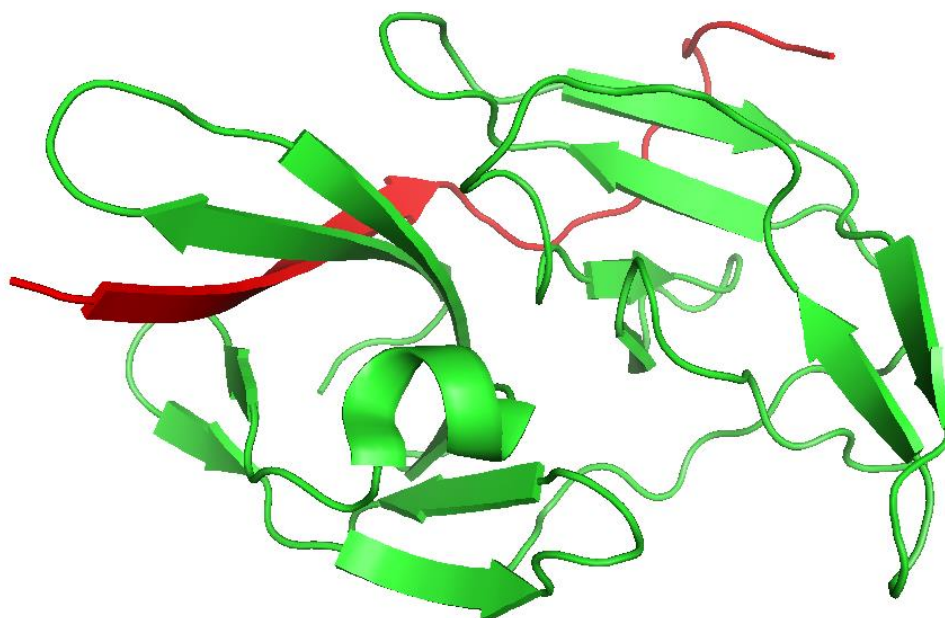
2.3 Estrutura e função da protease NS2B/NS3

A proteína NS3 é uma proteína multifuncional, que possui dois domínios funcionais, sendo um domínio protease (NS3^{pro}) e um domínio helicase (NS3^{hel}) que possui atividade de serino protease, RNA fosfatase, nucleosídeo fosfatase e helicase (SHI; GAO, 2017). É uma proteína importante para a replicação viral, mas para ser completamente ativa precisa estar associada à proteína NS2B, que atua como um cofator peptídico, essencial para o reconhecimento do substrato e estabilidade do complexo (AGUILERA-PESANTES et al., 2017; LI; ZHANG; LI, 2017). A proteína NS3 dos flavivírus apresenta uma tríade catalítica funcional, formada pelos resíduos His⁵¹,

Asp⁷⁵ e Ser¹³⁵, importantes para a clivagem do substrato peptídico e processamento da poliproteína (MUKHAMETOV et al., 2014).

O complexo NS2B-NS3 (Figura 9), formado pela associação das proteínas NS2B e NS3^{pro}, é responsável por clivar a poliproteína precursora das proteínas estruturais (P₁₋₄) e não estruturais (NS) que são essenciais para a reorganização estrutural, montagem e replicação dos vírions, ao passo que suprimem a resposta imune humana por clivar o gene estimulador de interferon (MILLIES et al., 2019a). A proteína NS2B contribui apenas com uma pequena proporção hidrofílica para a ativação da proteína NS3. Enquanto que a maior parte serve como âncoras de membrana hidrofílicas (VOSS; NITSCHKE, 2020).

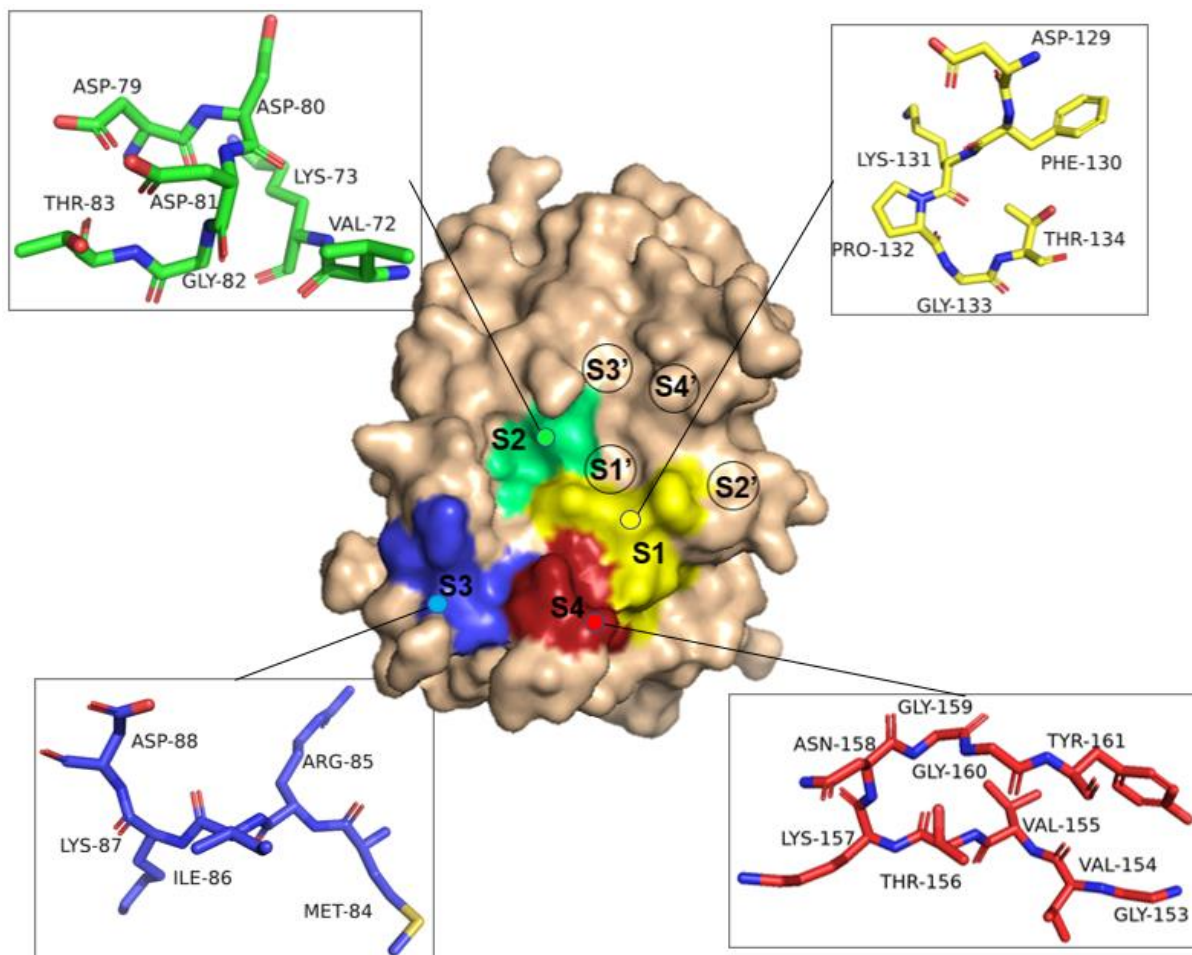
Figura 7 – Estrutura tridimensional para a protease NS2B-NS3 dos flavivírus.



FONTE: Autor, 2022. Em vermelho, a proteína NS2B e em verde a proteína NS3 (PDB ID: 5GXJ). Ilustração elaborada utilizando-se o *software* PyMol® v. 0.99.

Em relação ao substrato peptídico clivado, a área de ligação é dividida em bolsos secundários (sítios) denotados de S1-S4 (na região N-terminal) e subsítios S1'-S4' (na região C-terminal), enquanto os resíduos que se ligam a esses bolsos são denominados por P1-P4 ou P1'-P4', respectivamente (Figura 10) (BEHNAM; KLEIN, 2020).

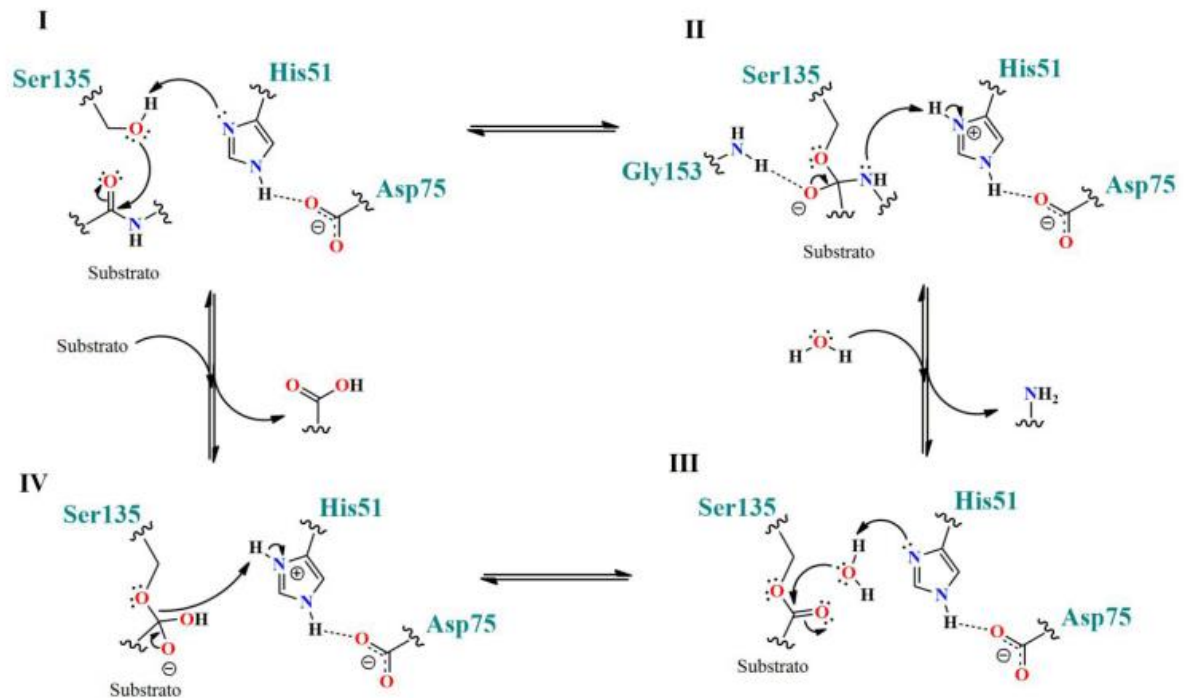
Figura 10 – Subsítios de ligação na protease NS3 dos flavivírus.



FONTE: Autor, 2022. (PDB ID: 3U1I). Ilustração elaborada utilizando-se o software PyMol® v. 0.99.

A clivagem do substrato peptídico ocorre inicialmente a partir da captura de um próton da Ser¹³⁵, pela His⁵¹, transformando o resíduo Ser¹³⁵ em um nucleófilo mais forte, que ataca a carbonila P1 do substrato (Figura 11, I). O intermediário formado é estabilizado por ligações de hidrogênio com a Gly¹⁵³ no buraco oxoaniônico (Figura 11, II), cuja decomposição resulta na clivagem da região C-terminal e liberação de uma amina como produto. A fração N-terminal permanece ligada covalentemente a Ser¹³⁵ via ligação éster. A His⁵¹, agindo como base melhora a nucleofilicidade de uma molécula água (Figura 11, III), gerando um ânion hidroxila que hidrolisa a ligação éster. Ocorre, então, a segunda clivagem e um ácido carboxílico é liberado como produto, envolvendo uma etapa de reprotonação (Figura 11, IV) (SILVA-JÚNIOR, 2019).

Figura 11 – Mecanismo enzimático da tríade catalítica na protease NS2B-NS3.



FONTE: Silva-Júnior, 2019. Em (I), o ataque nucleofílico realizado pela Ser¹³⁵; Em (II), o sítio oxoaniônico composto pela Gly¹⁵³, estabiliza o intermediário tetraédrico liberando uma amina como produto; Em (III), o substrato (covalentemente ligado) sofre um novo ataque nucleofílico pela água; Em (IV), um rearranjo ocorre e estabiliza o segundo intermediário tetraédrico, liberando um ácido carboxílico, como produto final.

Nos flavivírus, a sequência de aminoácidos da proteína NS3 é altamente conservada (Figura 12), variando entre 50 e 75% de identidade, sendo possível, portanto, supor que inibidores desenvolvidos para um determinado flavivírus possam também apresentar alguma atividade frente a outros membros da mesma família (MILLIES et al., 2019a).

Figura 12. Alinhamento de sequências dos domínios da protease NS3 de alguns flavivírus.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
DENV2	AGVLWDVPS	PPPMGKAE-L	EDGAYRIKQK	GIL-GYSQIG	AGVYKEGTFH	TMWHVTRGAV	LMHKGRRIEP	SWADVKKDLI	SYGGGWKLEG	EWKEG
DENV1	SGVLWDTPS	PPEVERAV-L	DDGIYRIILQR	GLL-GRSQVG	VGVFQEGVFH	TMWHVTRGAV	LMYQGRRIEP	SWASVKKDLI	SYGGGWRPQG	SWNAG
DENV3	SGVLWDVPS	PPETQKAE-L	EEGVYRIKQQ	GIF-GKTQVG	VGVQKEGVFH	TMWHVTRGAV	LTHNGKRLEP	NWASVVKDLI	SYGGGWRLSA	QWQKG
DENV4	SGALWDVPS	PAATKKA-L	SEGVYRIMQR	GLF-GKTQVG	VGIMHEGVFH	TMWHVTRGSV	ICHETGRLEP	SWADVNRDMI	SYGGGWRLGD	KWDKE
WNV	GGVLWDTPS	PKEYKKAD-T	TTGVYRIMTR	GLL-GSYQAG	AGVMVEGVFH	TLWHTTKGAA	IMSGEGRLDP	YWGSVKEDRL	CYGGPWKLQH	KWNGQ
JEV	GGVFWDTPS	PKPCSKGD-T	TTGVYRIMAR	GIL-GTYQAG	VGVMYENVFH	TLWHTTRGAA	IMSGEGKLP	YWGSVKEDRI	AYGGPWRFDR	KWNGT
SLEV	GGALWDVPS	PKVYPKCE-T	KPGIYRIMTR	GIL-GTFQAG	VGVMHEGVFH	TMWHATEGAV	LRNGEGRLDP	YAGDVRNDLI	SYGGPWKLISA	TWDGT
ZIKV	SGALWDVPA	PKEVKKGE-T	TDGVYRVMTR	RLL-GSTQVG	VGVMQEGVFH	TMWHVTKGAA	LRSGEGRLDP	YWGDKVQDLV	SYCGPWKLDA	AWDGL
YFV	SGDVLWDIPT	PKRIIECEHL	EDGIYGFQSS	TFL-GASQRG	VGVAQQGVFH	TMWHVTRGAF	LVRNGKKLIP	SWASVKEDLV	AYGGSWKLEG	RWDGE
TBEV	SDLVFSGGGG	RERGRDPFEV	KDGVYRIFSP	GLFWGQNVG	VGYGSKGVILH	TMWHVTRGAA	LSIDDAVAGP	YWADVREDVV	CYGAWSLEE	KWKG
POWV	TDLVFSGQLP	DQGEKRSFDI	KEGVYRIYAP	GLFWGYRQIG	VGYGTKGVILH	TMWHVTRGAA	LSVEGATSGP	YWADVREDVV	CYGAWSGLDK	KWKG
Consensus	..gvlwd.ps	p....k....	..G!YrI..r	gll.G..Q.G	vGv..eGVFH	T\$WHvTrGA.	l.....rl.P	yWadVk.Dl!	sYGG.W.l..	.W.g.
	100	110	120	130	140	150	160	170	180	
DENV2	EEVQVLALEP	GKNPRAVQTK	PGLFKTNAG-	TIGAVSLDFS	PGTSGSPIID	KKGKVVLGLY	NGVVTRSGAY	VSAIAQTEKS	IED-NPEIED	
DENV1	EEVQVIAVEP	GKNPKNVQTA	PCTFKTPEG-	EVGAIALDFK	PGTSGSPIVN	REGKIVGLY	NGVVTSTGT	VSAIAQAKAS	QEGFLPEIE	
DENV3	EEVQVIAVEP	GKNPKNFQTT	PCTEQTTTG-	EIGAIALDFK	PGTSGSPIIN	REGKVVLGLY	NGVVTKNNGY	VSGIAQTNAE	PGGFTPELE	
DENV4	EDVQVLAIEP	GKNPKHVQTK	PGLFKTLTG-	EIGAVTLDFK	PGTSGSPIIN	RKGKIVGLY	NGVVTKSQDY	VSAITQAEIRI	GE-PDIEVDE	
WNV	DEVQMIWVEP	GKNVKNVQTK	PGVFKTPEG-	EIGAVTLDFP	TGTSGSPIVD	KNGDVIGLY	NGVIMPNGSY	ISAIIVQGERM	DEPIPAGE	
JEV	DDVQVIAVEP	GKAANVQTK	PGVFRTPFG-	EVGAVSLDYP	RGTSGSPIID	SNEDIIGLY	NGVELGDSGY	VSAIVQGDQR	EEFVPEAYT	
SLEV	EEVQMIAVAP	GKPAINVQTT	PGVFKTPLG-	TIGAVTLDFP	KGTSGSPIIN	KKGEIIGLY	NGVLIGQGEY	VSGIITQERT	EEPIPDAYN	
ZIKV	SEVQLIAVEP	GERARNIQT	PGIFKTKDG-	DIGAVALDYP	AGTSGSPIID	KCGRVIGLY	NGVVIKNGSY	VSAITQGGKRE	EETFEVECFE	
YFV	EEVQVIAVEP	GKNVNVQTK	PSLFFVRNGG	EIGAVALDYP	SGTSGSPIVN	RNGEVIGLY	NGILVGDNSF	VSAISQTEVK	EEGKEELQE	
TBEV	ETVQVIAHFFP	GRAHEVHCQ	PGELILDTR	KLGAIPIDL	KGTSGSPIIN	AQGVVIGLY	NGLKT-NET	VSSIAQGEAE	KSRPNLPQA	
POWV	EVVQVIAHFFP	DSGHKIHQCQ	PGKLNLEGGR	VLGAIPIDL	RGTSGSPIIN	AQGDVLGLY	NGLKS-NDVY	ISSIAQGNVE	KSRPEMPLA	
Consensus	#eVQVIA..P	gkn..nvQt.	Pg.fkt..G.	eiGA!.ld.p	.GTSGSPI.#	..G.!iGLY	NgV....g.%	!SaI.Qge..	.e.p....e.	

Fonte: Li; Zhang; Li, 2017.

Adicionalmente, o complexo NS2B/NS3 pode se apresentar, principalmente, em duas diferentes conformações, sendo uma forma aberta, cataliticamente inativa, e outra fechada, cataliticamente ativa. Ainda, uma conformação “superaberta” tem sido relatada por Aleshin *et al.* (2016), cujas estruturas estão disponíveis no Protein Data Bank (PDB) com os códigos 6UM3 e 5TFN que, embora não sejam naturais, podem ser obtidas experimentalmente. Tais resultados ainda não foram publicados, porém podem ser encontrados sob os registros doi: 10.2210/pdb6UM3/pdb e doi: 10.2210/pdb5TFN/pdb, respectivamente. Na forma ativa a proteína NS2B está em torno da NS3, formando uma volta- β com a região C-terminal, a qual contribui para os sítios de ligação P2 e P3 da protease.

Além disso, a protease tem preferência por substratos com regiões dibásicas em P1 e P2, possuindo como sítio de clivagem a ligação peptídica dos resíduos de Lys-Arg, Arg-Arg, Arg-Lys, em tais posições. Consequentemente, substratos com caráter dibásico em P1 e P2 favorecem as interações eletrostáticas (CANNALIRE *et al.*, 2019b; KÜHL *et al.*, 2020; MILLIES *et al.*, 2019a; NITSCHKE *et al.*, 2014; VOSS; NITSCHKE, 2020).

Adicionalmente, a protease NS2B-NS3 apresenta um sítio alostérico situado na face oposta à tríade catalítica do sítio ativo, o qual vem sendo abordado como alvo para inibidores não-competitivos (alostéricos). Embora não esteja totalmente claro o

modo de ligação dos inibidores nesse sítio, sabe-se que este é delimitado pelos resíduos de ambas NS2B e NS3^{pro} (Met⁴⁹, Lys⁷⁴, Leu⁷⁶, Trp⁸³, Lys⁸⁴, Leu⁸⁵, Glu⁸⁶, Gly⁸⁷, Glu⁸⁸, Trp⁸⁹, Val¹⁴⁶, Val¹⁴⁷, Gly¹⁴⁸, Leu¹⁴⁹, Tyr¹⁵⁰, Gly¹⁵¹, Asn¹⁵², Ala¹⁶⁴, Ile¹⁶⁵ e Ile¹⁶⁶) e tem sido observada sua existência nas conformações aberta e fechada da protease do DENV-2 e ZIKV, sendo caracterizado por uma fenda predominantemente hidrofóbica (LIMA et al., 2021; SILVA-JÚNIOR, 2019). Também foi verificado por Millies e colaboradores (2019) que o sítio alostérico está localizado próximo da Asn¹⁵², que frequentemente é denominado como um interruptor molecular entre as conformações aberta e fechada. O resíduo Asn¹⁵² é conservado em todas as proteases dos flavivírus e a inativação da protease tem sido verificada quando este resíduo é modificado por outros aminoácidos (MAUS et al., 2021a; SILVA-JÚNIOR, 2019).

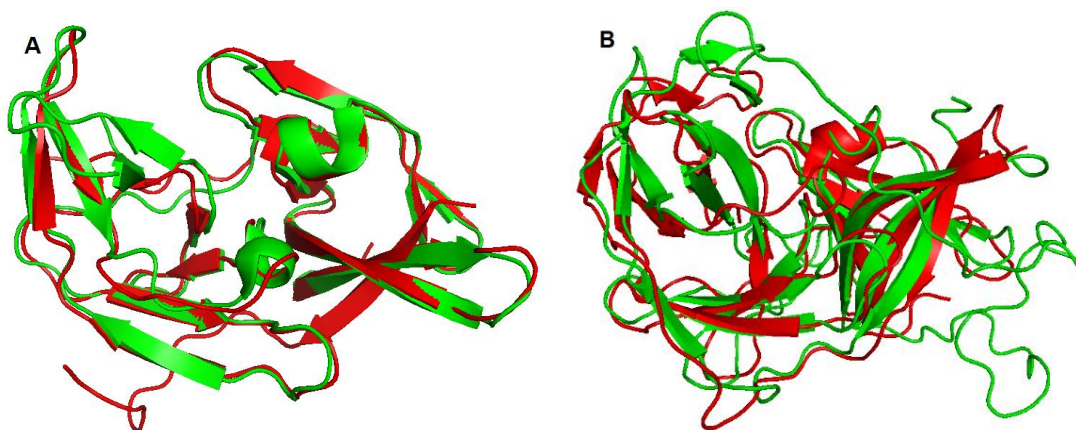
Desse modo, a proteína NS3^{pro} é um alvo atrativo para o desenvolvimento de agentes ant Flavivirais, visando o sítio ativo e/ou alostérico que possam atuar inibindo o complexo de replicação viral, inativando a protease e levando à morte do vírus (LI; ZHANG; LI, 2017; MILLIES et al., 2019a; SILVA-JÚNIOR, 2019).

2.3.1 NS2B-NS3 do DENV e ZIKV

O DENV possui cinco sorotipos, os quais apresentam cerca de 65% de similaridade e 45% de identidade dentre seus genomas virais. Por outro lado, são conhecidas apenas duas linhagens do ZIKV, sendo uma linhagem africana e outra asiática. Ambas as linhagens são praticamente idênticas, compartilhando mais de 95% de identidade de seus aminoácidos (DOWD et al., 2016; SILVA-JÚNIOR, 2019).

Entre a protease NS2B-NS3 do DENV e do ZIKV, a similaridade sequencial é maior que 50% e o valor RMSD observado é de 1.1 Å, indicando grande similaridade estrutural, a qual pode ser observada a partir da sobreposição das proteases de ambos os vírus nas conformações aberta e fechada (Figura 13) (MILLIES et al., 2019a). Sendo possível, à princípio, usar os mesmos, ou inibidores análogos contra ambos os alvos.

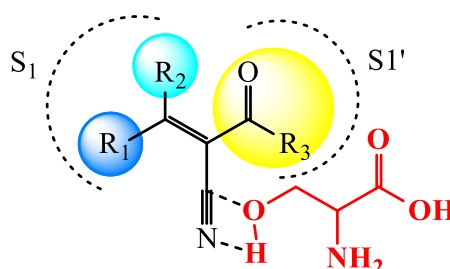
Figura 13 – Sobreposições das conformações aberta e fechada da protease NS2B-NS3 do DENV e ZIKV.



FONTE: Autor, 2022. Sobreposição da conformação aberta (A) e fechada (B) para a protease do DENV (PDB ID: 2FOM e 2M9P, respectivamente) em verde e ZIKV (PDB ID: 5GXJ e 5LC0, respectivamente) em vermelho. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* PyMol® v. 0.99.

Nitsche e colaboradores (2011) sintetizaram uma série de 86 arilcianoacrilamidas e avaliaram seu potencial inibitório frente à protease do DENV. No estudo foi observado que um substituinte arila em R_1 e um hidrogênio ou um pequeno fragmento alifático em R_2 poderiam interagir com o subsítio S_1 , enquanto o resíduo da amida mimetizaria uma estrutura peptídica e interagiria com os elementos de reconhecimento em S_1' . A nitrila, no entanto, poderia induzir uma interação dipolo-dipolo ou criar uma ligação covalente reversível entre o inibidor e a protease (Figura 14), sendo capaz de interagir com a Ser¹³⁵ do sítio catalítico (NITSCHKE; STEUER; KLEIN, 2011).

Figura 14 – Interação dipolo-dipolo de arilcianoacrilamidas com o resíduo catalítico (Ser¹³⁵) da protease NS2B-NS3.



FONTE: Autor, 2022. (Adaptação de NITSCHKE, 2011). Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12.

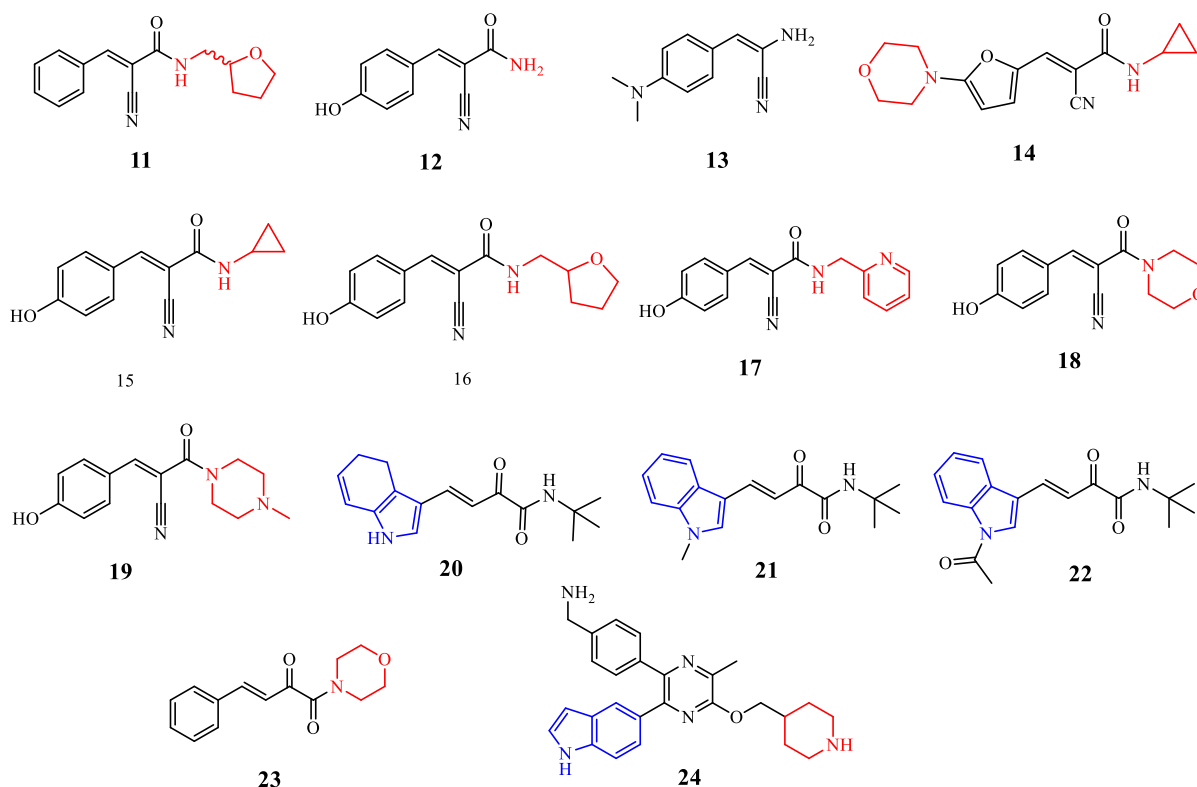
Dentre os derivados sintetizados no trabalho de Nitsche e colaboradores (2011), os compostos **11**, **12**, **13** e **14** (Figura 15) foram identificados como sendo os análogos mais promissores contra a protease flaviviral, sendo o composto **12** o mais ativo e seletivo contra DENV (51% de inibição, $K_i = 35,7 \mu\text{M}$). Contudo, outros análogos tais como **15-19**, também apresentaram boa atividade inibitória.

Quando comparada a porcentagem de inibição das proteases do DENV e do WNV em relação à trombina para o composto **12**, verifica-se valores de 51,7; 55,0 e 24,4, respectivamente. A porcentagem de inibição foi determinada usando-se concentrações de 0,1; 0,15 e 0,01 μM da enzima do DENV, WNV e trombina, respectivamente; enquanto a concentração do inibidor foi 50 μM para DENV e WNV e 25 μM para trombina. Os valores de K_i obtidos foram 35,7; 44,6 e 102 μM para DENV, WNV e trombina, respectivamente. Assim, estes valores indicam que o análogo **12** é seletivo para proteases flavivirais (NITSCHKE; STEUER; KLEIN, 2011).

Uma série de α -acetoamidas mostrou-se promissora frente a protease do DENV, sendo os compostos **20**, **21**, **22** e **23** (Figura 15) os mais potentes. Uma atenção especial deve ser direcionada ao composto **20**, que na concentração de 50 μM , apresentou atividade inibitória de 39,1% frente à protease do DENV (STEUER et al., 2011).

Outro trabalho reportou o composto **24** como potencial inibidor alostérico da protease, apresentando atividade contra os sorotipos DENV-2 e DENV-3, com valores de IC_{50} de 0,64 e 0,54 μM , respectivamente (YAO et al., 2019).

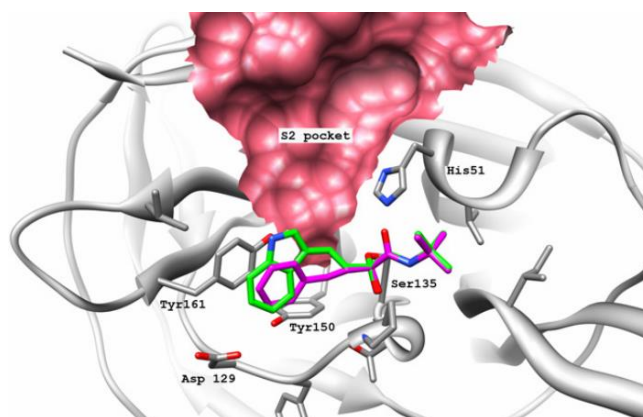
Figura 15 – Inibidores da protease NS2B-NS3 do DENV.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o software ChemDraw® v. 12.

Estudos complementares de docking molecular revelaram que o núcleo indólico se liga ao subsítio S1 da protease do DENV mantendo interações hidrofóbicas com os resíduos Tyr¹⁵⁰ e Asp¹²⁹, enquanto a cadeia lateral composta pelo grupamento α -acetoamida interage com os resíduos Ser¹³⁵ e His⁵¹ (Figura 16) (STEUER et al., 2011). Deste modo, a série de compostos sintetizados por Steuer e colaboradores são potentes inibidores competitivos do sítio catalítico da protease flaviviral.

Figura 16 – Interação do anel indólico do composto 20 com a protease NS2B-NS3.



FONTE: Steuer et. al., 2011.

2.4 Planejamento de Compostos Bioativos Baseados em Fragmentos (FBDD)

Os fragmentos são essencialmente moléculas pequenas com peso molecular ≤ 300 , número de aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 3 e $\log P \leq 3$. Para o FBDD, os fragmentos apresentam uma série de vantagens, as quais incluem: maior potencial para novas espécies químicas, melhores propriedades físico-químicas e maior eficiência de ligação no sítio ativo (SAUR et al., 2020; WANG et al., 2021). Além disso, os fragmentos devem apresentar baixo grau de complexidade para interagir atrativamente com o alvo e evitar interações desfavoráveis (KIRSCH et al., 2019).

Em geral, o planejamento de novas moléculas, através do FBDD (do inglês, *fragment-based drug design*) consiste de três passos principais: (i) construir uma biblioteca de pequenos fragmentos, os quais devem apresentar propriedades físico-químicas promissoras, diversidade estrutural, melhorando o perfil farmacocinético do composto final; (ii) realizar uma triagem dos fragmentos e descobrir quais deles têm maior afinidade pelo alvo selecionado, resultando em um ranqueamento baseado no score de cada um deles; por fim, (iii) otimizar os fragmentos (WANG et al., 2021; WILSON et al., 2021). A otimização dos fragmentos para obtenção de moléculas mais potentes pode ser alcançada por meio de três abordagens principais: (a) aumento do tamanho do fragmento, (b) por ligação do fragmento a um núcleo farmacofórico ou (c) por fusão de fragmentos (ERLANSON; DAVIS; JAHNKE, 2019; KIRSCH et al., 2019).

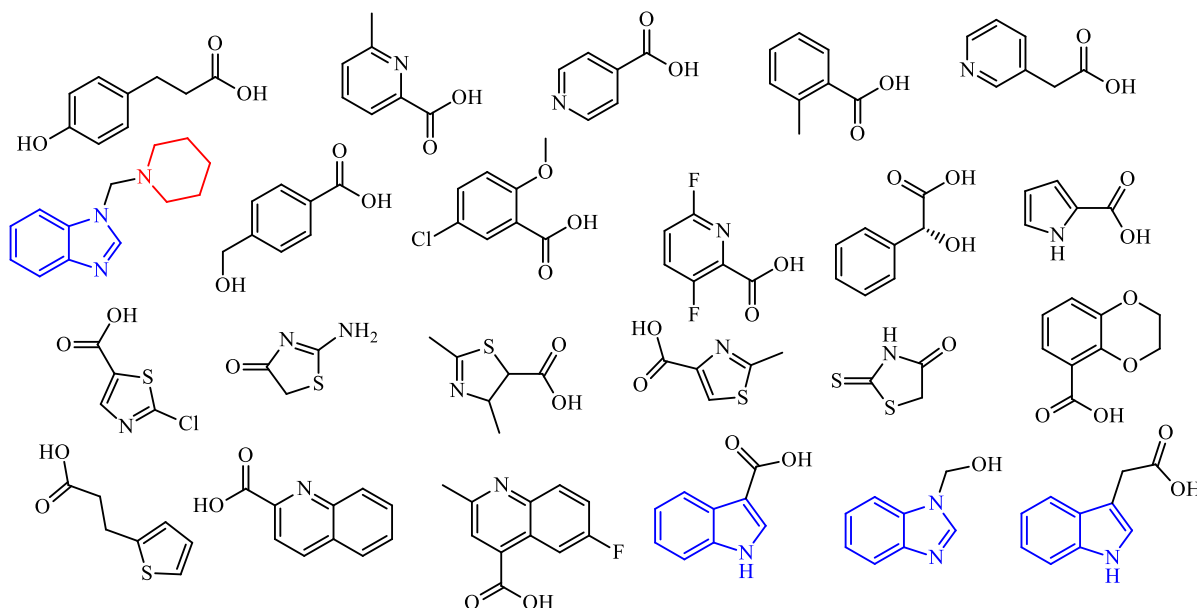
A abordagem preferida pelos pesquisadores para obtenção de compostos *leads* é o aumento do tamanho do fragmento (KUMAR; VOET; ZHANG, 2012). Esta é baseada na adição de um fragmento com interações significativas, seguido pela adição de um ou mais fragmentos que complementam um sítio ativo específico para melhorar a atividade farmacológica (KUMAR; VOET; ZHANG, 2012). Este processo pode ser realizado através de estrutura de raio-X, docking molecular ou por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (ERLANSON; DAVIS; JAHNKE, 2019; KUMAR; VOET; ZHANG, 2012). Durante esse processo, é fundamental que as interações mais importantes do fragmento inicial com o alvo sejam mantidas durante a formação dos compostos otimizados (KUMAR; VOET; ZHANG, 2012).

O docking molecular é uma ferramenta computacional cada vez mais utilizada para o desenvolvimento de novas moléculas baseadas em fragmentos (do inglês, *fragmente-based drug design – FBDD*), fornecendo uma melhor compreensão das interações entre proteínas e moléculas que exercem o papel de ligantes (MENG, X. Y., ZHANG, H. X., MEZEI, M., & CUI, 2011). Este é um método estocástico que busca quantizar as interações possíveis entre o ligante e a proteína, fornecendo uma pontuação (*score*) que estima o grau de afinidade do ligante pelo alvo. Quanto maior a afinidade de um ligante pela biomacromolécula mais promissor será esse ligante (YURIEV; AGOSTINO; RAMSLAND, 2011).

A estratégia FBDD tem como objetivo identificar estruturas químicas iniciais e, então, otimizá-las, baseando-se em um alvo específico (ERLANSON; DAVIS; JAHNKE, 2019; KUMAR; VOET; ZHANG, 2012). Esta estratégia foi primeiramente apresentada em 1996 por Fesik e colaboradores e seu conceito foi proposto por Hol na mesma década (KUMAR; VOET; ZHANG, 2012). Desde sua descoberta até os dias atuais, o FBDD tem sido associado a vários casos de sucesso, nos quais outros métodos foram insuficientes (ERLANSON; DAVIS; JAHNKE, 2019; KUMAR; VOET; ZHANG, 2012).

Em 2020, Quek e colaboradores usaram FBDD para identificar pequenos fragmentos moleculares contra a protease NS2B-NS3 do Zika. Estes pesquisadores identificaram mais de 20 fragmentos hits (Figura 17), os quais servem como referência e são úteis para o desenvolvimento de novos inibidores da protease NS2B-NS3 dos flavivírus.

Figura 17 – Fragmentos hits identificados contra a protease NS2B-NS3 do ZIKV.



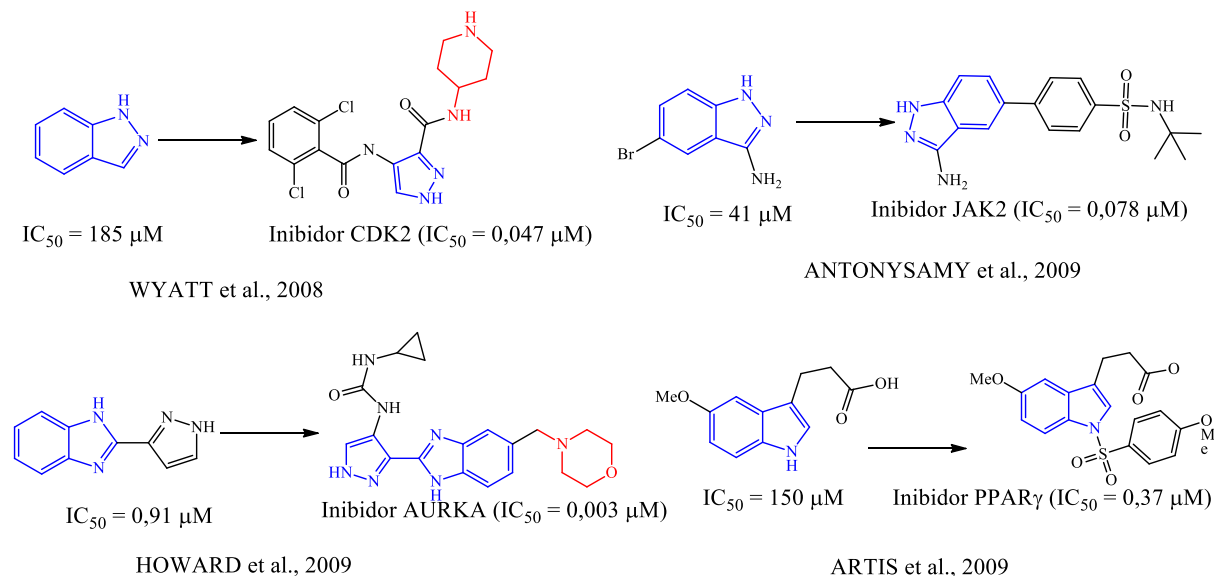
FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12.

A técnica de FBDD tem sido empregada com sucesso na busca por inibidores covalentes irreversíveis de tirosina quinase de Bruton (BTK) (QIU et al., 2018), na descoberta de derivados 2,3-diidro-1*H*-inden-1-amina como inibidores potentes e seletivos da monoaminoxidase B (XIAO et al., 2018).

A Astex Pharmaceuticals®, fazendo uso do docking molecular e FBDD, partiu do fragmento indazol ($IC_{50} = 185 \mu M$) e, a partir deste, foi capaz de criar um composto mais complexo e mais potente ($IC_{50} = 0,047 \mu M$) frente à quinase-2 dependente de ciclina – CDK2.

Outros trabalhos também têm obtido sucesso, tal como está evidenciado no trabalho de Murray e Blundell (2010) onde, partindo-se de fragmentos com valores de $IC_{50} > 100 \mu M$, foram obtidas diversas moléculas com valores de $IC_{50} < 0,4 \mu M$ (Figura 18).

Figura 18 – Inibidores de outros alvos encontrados por FBDD.



FONTE: Autor, 2022. (Adaptado).

Diante do exposto, torna-se evidente que a busca por novos inibidores da NS2B-NS3 é essencial para o desenvolvimento de potenciais agentes antivirais, uma vez que tal complexo enzimático está envolvido na síntese e processamento da poliproteína fundamental para o ciclo de replicação dos flavivírus. Além disso, é notório que a técnica de planejamento de compostos bioativos por fragmentos tem obtido resultados promissores, entretanto, tem sido pouco explorada no campo de desenvolvimento de antivirais. Dessa forma, este projeto de pesquisa almejou sintetizar novos potenciais inibidores planejados por meio da técnica de fragmentos e, em seguida, avaliar suas atividades frente à NS2B-NS3 do ZIKV e DENV. Posteriormente, os candidatos a antivirais, foram avaliados em ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral em células infectadas com flavivírus. Por fim, espera-se que o projeto possa contribuir para o avanço da química medicinal de antivirais, produzindo resultados relevantes para a literatura científica, os quais possam servir como subsídios para o desenvolvimento de pesquisas posteriores.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Sintetizar e avaliar a atividade antiviral de potenciais inibidores da proteína estrutural E e da protease NS2B-NS3 dos vírus da ZIKA e da Dengue planejados baseados em fragmentos.

3.2 Objetivos Específicos

- Planejar racionalmente potenciais inibidores das proteínas E e NS2B-NS3 de flavivírus por meio da técnica de *fragment-based drug design* (FBDD) em uma quimioteca *in-house*;
- Sintetizar os derivados mais promissores frente aos alvos almejados;
- Verificar o perfil citotóxico dos novos compostos por ensaios de MTT em células *Vero E6*;
- Avaliar a atividade inibitória dos compostos frente à protease NS2B-NS3 dos vírus Zika e Dengue em ensaios de fluorescências;
- Determinar parâmetros físico-químicos;
- Avaliar a atividade inibitória dos compostos em ensaios com células *Vero E6* infectadas por ZIKV;
- Propor e discutir a Relação Estrutura-Atividade (REA) para todas as novas séries de moléculas finais ativas frente ao ZIKV (em células e NS2B-NS3) e DENV (NS2B-NS3);
- Elucidar potenciais interações entre as moléculas mais promissoras e as proteínas E e NS2B-NS3 do ZIKV e DENV por meio de estudos de docking molecular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cromatografias

4.1.1 Cromatografias em camada delgada (CCD)

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de Sílica Gel 60 F₂₅₄ da MERCK® de 0,25 mm de espessura. Estas foram utilizadas para monitorar o andamento das reações, bem como, determinar os fatores de retenção (R_F) dos compostos finais. Os valores de R_F foram calculados através da razão: distância percorrida pela amostra / distância percorrida pela fase móvel, após eluição das respectivas placas (SIMÕES et al., 2010). Por fim, a interpretação das placas de CCD foi realizada com o auxílio de luz emissora de radiação ultravioleta (UV-vis), no comprimento de onda (λ) de 254 nm.

4.1.2 Cromatografia em coluna

Para a purificação de alguns compostos sintetizados neste trabalho foi utilizada técnica de cromatografia em coluna. Os compostos impuros foram incorporados em sílica gel 60 (0,063-0,2 mm, 70-230 mesh, da marca MERCK®) e adicionados à coluna cromatográfica seguido da adição do eluente apropriado para cada separação. As frações obtidas foram coletadas em tubos de ensaio com dimensões 16 x 150 mm (20 mL). Por fim, as frações contendo a substância de interesse pura foram misturadas, rotaevaporadas e secas a vácuo, rendendo o produto puro.

4.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

A pureza dos compostos e o tempo de retenção foram determinados a partir de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (do inglês: *High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC), utilizando-se cromatógrafo líquido HEWLETT PACKARD® 1100 series, empregando-se uma coluna C18 com dimensões de 75 mm x 2,0 mm, da marca AGILENT® InfinityLab Poroshell 120 SB. Para os experimentos, metanol $\geq$

99% (grau HPLC) foi utilizado como fase móvel do sistema. A concentração da amostra foi igual a 1mg/mL; o fluxo de corrida foi de 5 μ L/min; o tempo de corrida foi de 10 minutos e o volume de injeção de 5 μ L. Por fim, os tempos de retenção (R_T) foram computados em minutos (min) e a absorbância, em miliunidades de absorbância (mAU) (BRITO et al., 2017).

4.2 Pontos de Fusão (PF)

Os pontos de fusão foram determinados utilizando equipamento *MSTecnopon*[®], modelo *PFI Digital*, com capacidade de atingir a temperatura de 330 °C em tubos capilares de vidro, contendo individualmente cada uma das amostras sólidas. Inicialmente foi admitida a temperatura de 30 °C como temperatura de partida e, então, o aumento desta foi monitorado até a fusão completa da amostra, sendo considerado como ponto de fusão valores compreendidos em uma faixa de até 2 °C de diferença entre os experimentos realizados em triplicata.

4.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio (¹H) e Carbono Treze (¹³C)

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram obtidos em equipamento *Brüker*[®], modelo *Avance DRX 600 MHz – Ultrashield*[®], utilizando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) como solvente analítico. Sobre os espectros, os deslocamentos químicos (δ) foram computados em partes por milhão (ppm). As constantes de acoplamento (*J*) inerentes aos sinais de RMN de ¹H foram computadas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram instituídas da seguinte maneira: simpleto (s), simpleto de base larga (*br s*), duplete (*d*), duplo duplete (*dd*), tripleto (*t*), quarteto (*q*), quinteto (*qi*), sexteto (*sex*), septeto (*sep*), e multiplete (*m*).

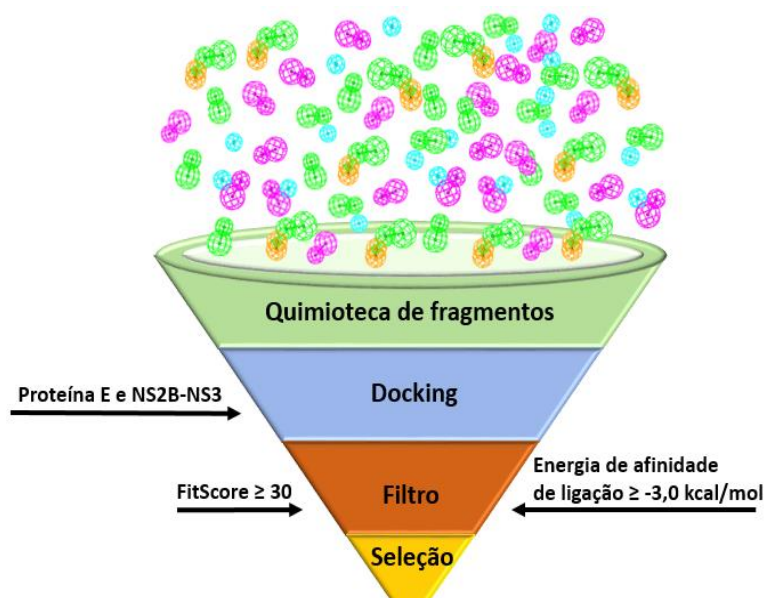
4.4 Planejamento Racional

4.4.1 Planejamento Racional de Inibidores Baseados em Fragmentos (FBDD)

Inicialmente, uma quimioteca *in-house*, contendo 254 fragmentos (incluindo reagentes e solventes) foi construída, onde estes foram convertidos em arquivos 3D utilizando-se o software *ChemDraw Ultra*® versão 12.0. Subsequentemente, estes foram minimizados energeticamente empregando-se o método *Austin Model* (AM1), no software *ArgusLab*®.

Posteriormente, foi realizado o docking molecular de todos os fragmentos frente às proteínas E e NS2B-NS3 do DENV (uma vez que são estruturas conservadas em vários flavivírus), visando selecionar os melhores fragmentos para o planejamento de novas moléculas (Figura 19), os melhores fragmentos foram, então, combinados para que fossem obtidas novas moléculas com maior grau de complexidade.

Figura 19 – Fluxo de trabalho utilizado para a seleção dos fragmentos por meio de docking molecular.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o software Microsoft Power Point 2013®.

Os arquivos contendo as estruturas tridimensionais das proteínas alvos foram obtidos no *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* – RCSB, sob os códigos PDB 2FOM para o sítio de inibição alostérica (<https://www.rcsb.org/structure/2FOM>), 3U1I para o sítio catalítico (<https://www.rcsb.org/structure/3U1I>) e 1OKE para a proteína estrutural E (<https://www.rcsb.org/structure/1OKE>). Posteriormente, as proteínas foram pré-tratadas empregando-se o software *AutoDock Tools*® (<http://autodock.scripps.edu/>)

para a retirada de moléculas cocrystalizadas à estrutura das proteínas, incluindo água e íons. Em seguida, foram introduzidas as coordenadas da caixa de busca como sendo x: -2,214; y: -13,879 e z: 18,198 (PDB: 2FOM); x:42,309, y: -44,083 e z: 40,912 (PDB: 3U1I) e x: -11,561; y: 74,872 e z: 50,188 (PDB: 1OKE). Tais coordenadas foram obtidas a partir dos respectivos alvos também por meio do software AutoDock Tools®, considerando a região delimitada pelos resíduos de aminoácidos essenciais para a total atividade do alvo.

4.5 Viabilidade Celular, Ensaio Antiviral e Anti-NS2B-NS3

4.5.1 Viabilidade celular

A avaliação da citotoxicidade foi realizada *in vitro* para todos os compostos sintetizados. As células *Vero E6* foram plaqueadas em uma microplaca com 96 poços, numa densidade de 2×10^4 células por poço e cultivadas a 37 °C com atmosfera de 5% CO₂. Monocamadas de células foram cultivadas em DMEM-*low* glicose (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) com 2% de soro fetal bovino (Gibco) e solução antibiótica antimicótica (Gibco) por 48 horas na presença dos acrilatos (LRS01-04), das cianoacrilamidas LRS (05-23) e do composto dinitrilado (LRS25) na concentração de 10 µM.

A viabilidade celular foi realizada usando-se o ensaio citotóxico MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). A solução de MTT foi adicionada na concentração de 0,5 mg/mL, seguida de incubação por 3 horas. O meio de cultura foi removido e 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço levando a solubilização dos cristais deformazan. O valor da absorbância do controle em branco (apenas o meio de cultura usado na ausência dos compostos) foi subtraído de todas as amostras. A absorbância de cada poço foi medida em um comprimento de onda de 492 nm e a porcentagem de viabilidade foi calculada por meio da equação 1.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = [\text{absorbância da amostra} / \text{média da absorbância das células de controle}] \times 100$$

Equação 1

4.5.2 Ensaio antiviral

Para ensaio antiviral, inicialmente, foi realizada a diluição seriada do estoque de ZIKV e a diluição viral que reduziu a viabilidade celular em pelo menos 80% foi utilizada nos ensaios antivirais. Depois disso, as células Vero E6 foram plaqueadas a 2×10^4 células/poço em uma microplaca de 96 poços e mantidas a 37 °C e 5% de atmosfera de CO₂ até atingir a confluência de ~80-90%. A adsorção do vírus foi então realizada incubando as células com diluição de ZIKV 1:200 em meio DMEM-baixa glicose/soro fetal bovino a 2% por 2 h com homogeneização a cada 15 min. Em seguida, o meio foi removido e as monocamadas celulares foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato, e os compostos sintetizados foram adicionadas a 10 ou 20 µM.

4.5.3 Ensaio anti-NS2B-NS3

4.5.3.1 Preparação da proteína NS2B-NS3

As proteases de DENV-2 e ZIKV foram expressas em células de *Escherichia coli* BL21-Gold (DE3) (Agilent Technologies), conforme descrito por Hammerstein *et al.* (2019). Em seguida, meios LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, à temperatura de 37 °C, foram usados para o crescimento celular. Além disso, a superexpressão foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG a uma DO₆₀₀ de ~0,8 nm e incubada a 20 °C, por 16 h. As células foram coletadas por centrifugação, choque congelado em nitrogênio líquido e armazenadas a -20 °C. Para purificação, as células foram ressuspensas em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 2 mM imidazol, 0,1% (v/v) TritonX-100, RNase e lisozima) e lisadas por sonicação (Sonopuls, Bandelin). A cromatografia de afinidade utilizando uma coluna HisTrap HP (GE Healthcare, Chicago, EUA) foi utilizada para analisar o sobrenadante, após centrifugação para remoção de detritos celulares. Quantidades aumentadas subsequentes de tampão de eluição (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM) foram usadas para remover proteínas ricas em histidina e outras impurezas. Ainda, cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) usando um HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (GE Healthcare, Chicago, EUA) e eluído em tampão SEC (20 mM

Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) foram empregadas como métodos para eluir e purificar todas as frações. Por fim, antes do armazenamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, as proteínas foram concentradas e congeladas rapidamente com nitrogênio líquido (MAUS et al., 2021b; MILLIES et al., 2019b).

4.5.3.2 Ensaios fluorométricos

Para investigar a atividade inibitória dos compostos em relação às proteases de DENV-2 e ZIKV, foi realizado um ensaio baseado nos substratos fluorogênicos ou substratos baseados em FRET. Os compostos e substratos testados foram preparados como soluções estoque de DMSO. Posteriormente, esses compostos foram dispersados em placas de microtitulação de 96 poços branco de fundo chato, sendo 90 μL de tampão, 2,5 μL de solução enzimática, 5 μL de inibidor em DMSO (ou DMSO puro como controle) e 2,5 μL de solução do substrato correspondente, totalizando 100 μL de volume por poço. Todos os valores de fluorescência foram medidos a partir de Greiner Bio-One, um leitor de placas Tecan Infinite F2000 PRO. Em geral, todos os resultados foram obtidos e analisados a partir de pelo menos três experimentos independentes de medidas. Uma concentração de 20 μM para os inibidores foi assumida como triagem inicial (LEATHERBARROW, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Planejamento dos Inibidores por FBDD

A técnica computacional de FBDD, embora não seja uma ferramenta recente, seu uso vem ganhando força desde a última década, sendo cada vez mais aplicada por vários pesquisadores em diversas áreas. Uma busca rápida pelo termo FBDD (no título de trabalhos) na plataforma do ScienceDirect exhibe mais de 463 resultados, dos quais o primeiro trabalho data de 1980. Contudo, a partir de 2009 é percebido o aumento significativo na quantidade de trabalhos que utilizam a técnica ou que a citam. Apenas em 2021, mais de 56 artigos relacionados ao tema foram depositados em tal plataforma.

A quantidade crescente de materiais publicados relacionados ao tema evidencia que a técnica é uma ferramenta que tem se mostrado promissora para o planejamento de moléculas contra vários alvos, incluindo proteínas e enzimas de diferentes vírus e bactérias.

Neste trabalho, a triagem de fragmentos frente à proteína E e ao complexo NS2B-NS3 dos flavivírus favoreceu a seleção do núcleo indólico como fragmento inicial para o planejamento de potenciais inibidores de entrada e replicação viral, com potencial atividade contra o DENV e ZIKV. O protocolo *in silico* desenvolvido nessa dissertação foi capaz de identificar tal núcleo, que também tem sido reportado em diferentes estudos, como mostrados na revisão deste trabalho. Tais resultados validam os processos de busca e fundamentam a escolha desse fragmento como núcleo para obtenção de compostos ativos. Além disso, o núcleo indólico está presente em vários fármacos de origem sintética, p.ex. Oxypertina, Psilocybin, Medmain, ou natural, p. ex. Okaramini N, Nostodione A e Vinblastina.

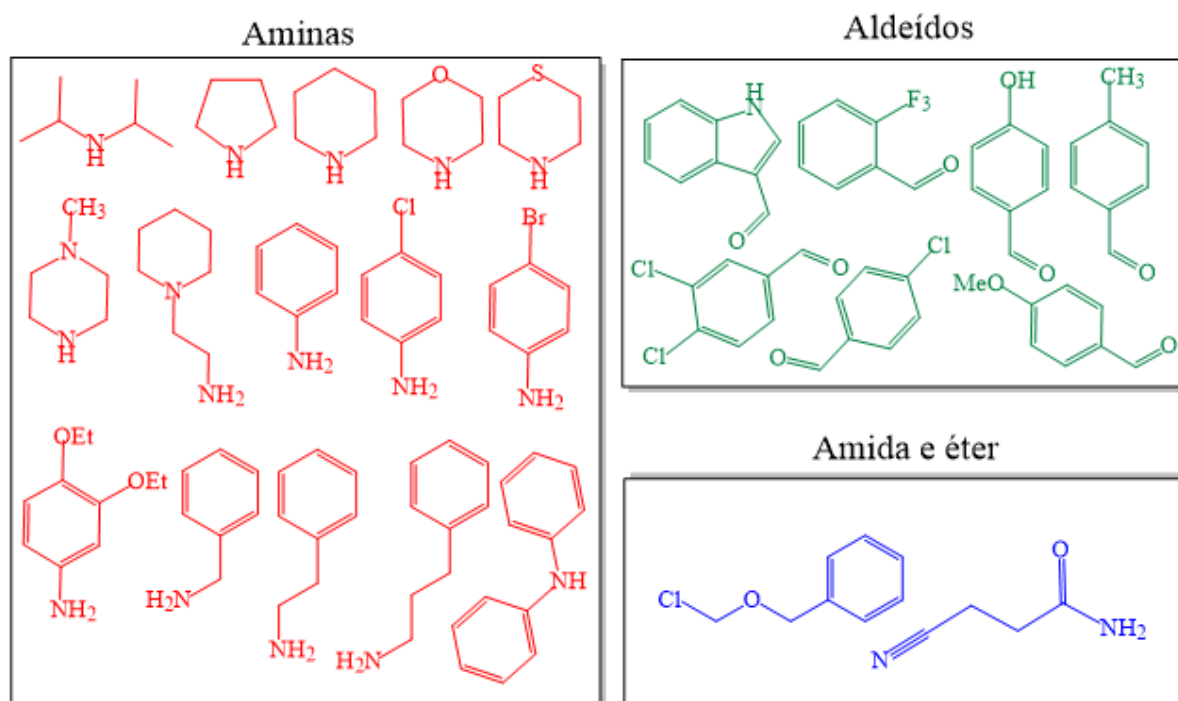
O processo de triagem virtual das pequenas moléculas permitiu a obtenção dos fragmentos com maiores possibilidades de potencializar a atividade inibitória das moléculas finais. Além disso, outros trabalhos descritos na literatura reportam vários inibidores da protease NS2B-NS3 e da proteína E do DENV e ZIKV que apresentam em suas estruturas vários dos fragmentos selecionados aqui, aumentando as chances de se obter compostos ativos. Observa-se também que as moléculas geradas são compatíveis com os conceitos de hibridização molecular, uma vez que são

caracterizadas por duas regiões contendo potenciais grupos farmacofóricos, conectados por um *linker*, nesse caso, uma α -cianocarbonila.

Para selecionar os melhores fragmentos, foram adotados como ponto de corte um FitScore de 30, quando o software GOLD[®] foi utilizado e -3,0 kcal/mol quando o software utilizado foi o AutoDock Vina[®]. Os valores de FitScore gerados pelo GOLD[®] são adimensionais e quanto maior forem esses valores, melhor é a interação proteína-ligante. Para o AutoDock Vina[®], por outro lado, quanto mais negativa a energia de afinidade, melhor é a interação proteína-ligante.

A partir do FBDD, 24 fragmentos foram considerados promissores, os quais foram selecionados e separados em aldeídos (7 fragmentos), éter (1 fragmento), amida (1 fragmento) e aminas (15 fragmentos) (Figura 20), e combinados entre si para formar moléculas mais complexas, compondo um conjunto de 128 novas possibilidades.

Figura 20 – Fragmentos obtidos na primeira etapa de triagem por FBDD.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o software ChemDraw[®] v. 12.

Para a realização da segunda etapa de triagem por FBDD para a construção das moléculas promissoras a partir das 128 possibilidades, deu-se preferência por fragmentos que estavam presentes em moléculas descritas na literatura com atividade

frente aos alvos desejados. Assim, foram considerados além do FitScore e da energia de afinidade, a disponibilidade do fragmento e sua atividade relatada na literatura.

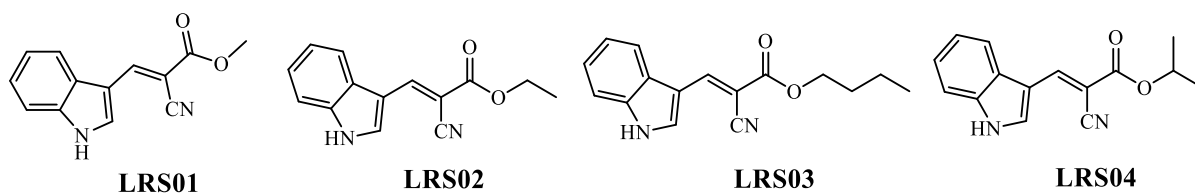
a) Seleção do núcleo farmacofórico:

Com base no trabalho de Steuer e colaboradores (2011), o anel indólico mostrou-se promissor para o planejamento de inibidores do sítio catalítico da protease NS2B-NS3 dos flavivírus, tendo como alvo o subsítio S1, fazendo interações com Tyr¹⁶¹, Asp¹²⁹ e Tyr¹⁵⁰, bem como, os resíduos Ser¹³⁵ e His⁵¹ da tríade catalítica. Além disso, o núcleo indólico é um farmacóforo versátil e presente em várias moléculas bioativas; utilizado para síntese de análogos com diversas atividades farmacológicas, incluindo atividade antiviral, devido seus diferentes mecanismos de ação (BARRAZA et al., 2021; BORISKIN et al., 2008; COBURN et al., 2013; SINDAC et al., 2013; ZHANG; CHEN; YANG, 2015). Por tanto, baseando-se nessas informações e no fato deste núcleo ter apresentado a maior afinidade pelo alvo, o indol-3-carboxaldeído foi selecionado como núcleo principal para a realização de modificações estruturais em vez dos demais benzaldeídos selecionados no docking e já reportados na literatura. Por fim, as seguintes hipóteses foram levantadas: *“O núcleo indólico pode potencializar as interações com o sítio hidrofóbico, uma vez que é volumoso? Substituições no núcleo aromático poderiam produzir moléculas ainda mais promissoras?”*

b) Seleção das aminas:

Do mesmo modo, as aminas foram selecionadas por suas energias de afinidade pelo alvo, dando prioridade àquelas previamente relatadas em outros inibidores reportados na literatura, como por exemplo, nos trabalhos de Nitsche et al. (2011) e Steuer et al. (2011). Ainda, como região terminal da molécula, foi-se permitido obter derivados do tipo α -cianoacrilatos (ésteres) (Figura 21), uma vez que estes são considerados intermediários das moléculas finais. Além disso, as seguintes hipóteses foram levantadas: *“Os acrilatos teriam atividades similares às acrilamidas? Ou a função amida é mais relevante para a atividade destes?”*

Figura 21 – Estrutura química dos α -cianoacrilatos intermediários.



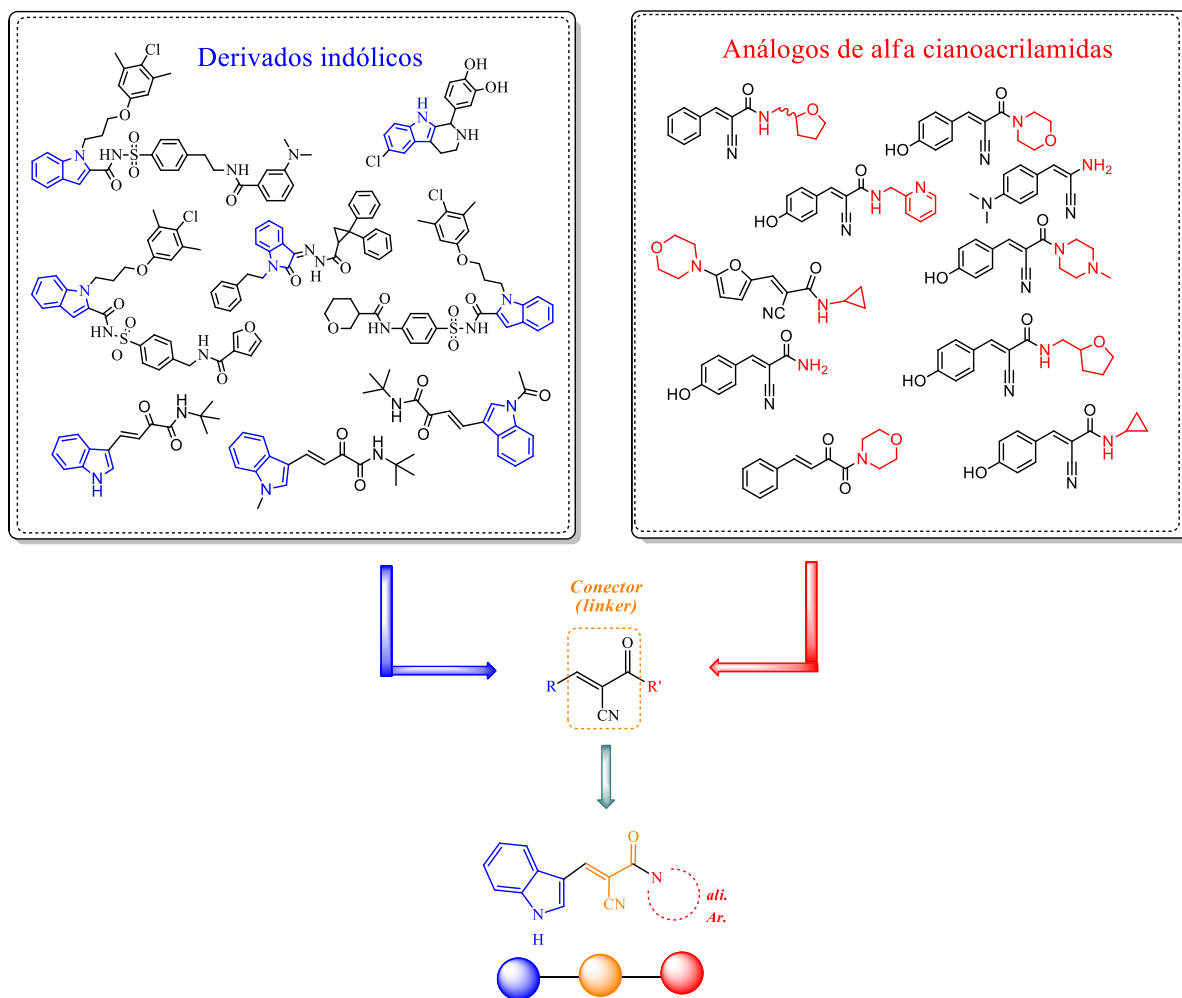
FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o software ChemDraw® v. 12.

c) Seleção do conector entre os dois grupos selecionados em (a) e (b):

Após a seleção do núcleo indólico e aminas como fragmentos para compor as novas moléculas, fez-se necessário selecionar um conector (do inglês, *linker*) para unir ambos os fragmentos. Assim, considerando os avanços nos estudos de Nitsche e colaboradores (2011) e Steuer e coautores (2011), verifica-se que o grupo α -cianoacrilato é frequentemente observado em moléculas ativas. Além disso, Nitsche; Steuer; Klein (2011) sugeriram que este grupo químico pode interagir via dipolo-dipolo (ou ligação covalente reversível) com o resíduo Ser¹³⁵ do sítio catalítico da NS2B-NS3. Assim, o grupo α -cianoacrilato foi selecionado como conector para as moléculas planejadas racionalmente. Por fim, uma molécula dinitrilada (LRS25) foi selecionada apenas considerando a importância desta interação e não o planejamento por FBDD. Essa escolha está associada às seguintes hipóteses: “*se o grupo ciano (C≡N) é capaz de interagir com a Ser¹³⁵ do sítio catalítico, então, uma molécula dinitrilada teria mais chances de interagir com esse mesmo resíduo? Então, tal molécula seria mais ativa?*”

Tendo em vista os resultados obtidos por Nitsche e colaboradores (2011) com α -cianoacrilamidas como inibidores da NS2B-NS3, bem como os resultados alcançados por Lian e colaboradores com o composto **3** (ver Figura 8) como inibidor de fusão da proteína E, as moléculas previstas para essa pesquisa foram obtidas pela sequência núcleo indólico-ciano-aminas (estas últimas sendo alifáticas e aromáticas), objetivando-se a atividade dual frente às proteínas E e NS2B-NS3 flavivirais (Figura 22).

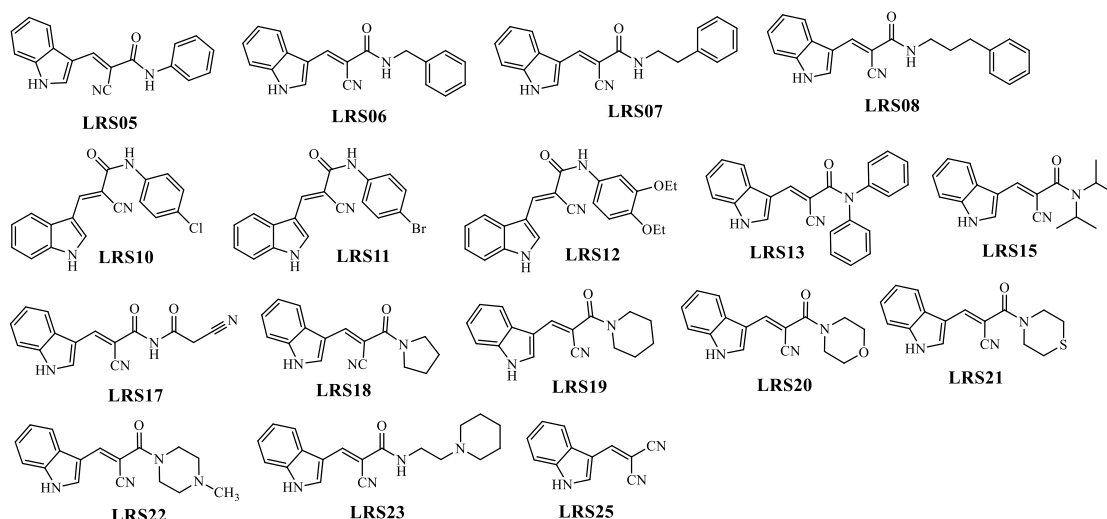
Figura 22 – Planejamento racional de potenciais inibidores duais das proteínas E e NS2B-NS3 de flavivírus.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o software ChemDraw® v. 12.

As novas moléculas foram, então, avaliadas por docking molecular com a finalidade de classificar as melhores estruturas para posterior síntese das mais promissoras (Figura 23). Para o segundo docking molecular, os pontos de corte adotados foram 45 e -7,5 kcal/mol (valores obtidos a partir da análise dos compostos em relação aos controles utilizados descritos na literatura) para *FitScore* (GOLD®) e a energia de afinidade (AutoDock Vina), respectivamente.

Figura 23 – Estruturas químicas das α -cianoacrilamidas promissoras selecionadas por FBDD.

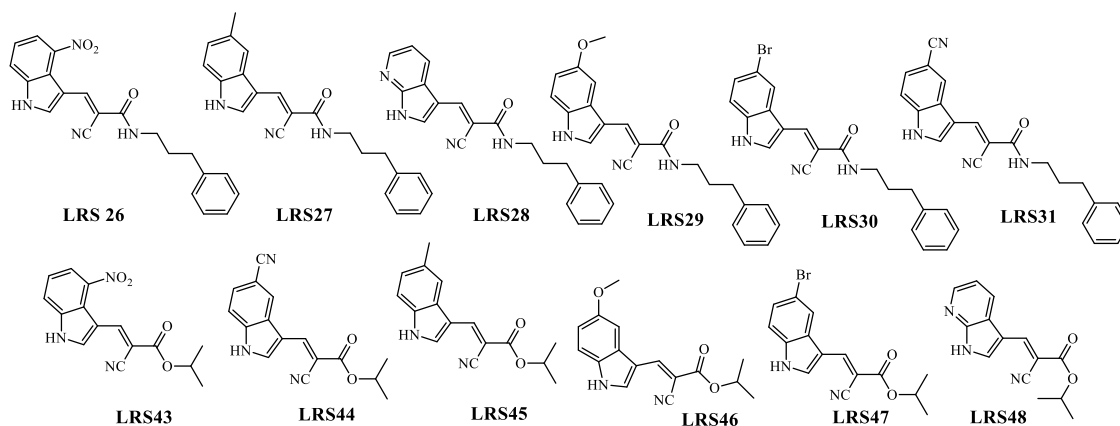


FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12.

Ainda, para todos os complexos ligante-alvo, foram avaliadas as interações dos ligantes e a frequência com que os resíduos apareciam nestes, a fim de elucidar importantes interações entre as α -cianoacrilamidas e os alvos.

Por fim, foram planejadas duas outras séries de compostos baseadas nas atividades inibitórias observadas, sendo a primeira delas, composta por cianoacrilamidas, enquanto a segunda, cianoacrilatos. No entanto, ambas eram derivadas de indóis com substituintes nas posições 4, 5 e 7, a fim de verificar a influência de tais substituições na atividade dos compostos mais ativos (Figura 24).

Figura 24. Derivados indólicos de cianoacrilamidas e cianoacrilatos contendo substituintes nas posições 4, 5 e 7.



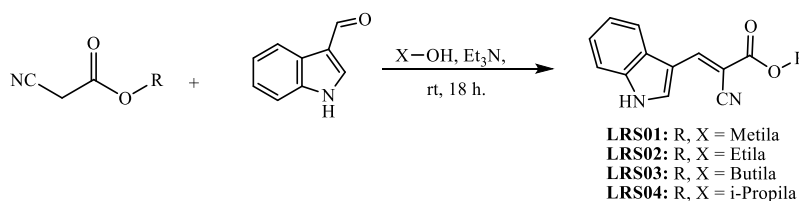
Fonte: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12.

5.1.1 Síntese dos indol-3-cianoacrilatos LRS (01-04)

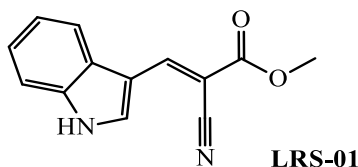
A primeira série de compostos sintetizados foi a série dos cianoacrilatos, LRS (01-04). Para obtenção destes foi empregada a reação de condensação de Knövenagel, uma importante reação em química orgânica para formação de ligação carbono-carbono, a partir de um aldeído e de uma nitrila ativada (OLIVEIRA et al., 2018).

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,5 mL de álcool (metanol, etanol, butanol ou isobutanol), foram adicionados 1,1 eq. do cianoacetato correspondente e 1,1 eq. de trietilamina (Et_3N), como base catalítica. A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente (r.t) por 30 minutos (tempo necessário para formação do nucleófilo). Em seguida, foram adicionados 100 mg (1.0 eq.) de indol-3-carboxaldeído, previamente solubilizados no respectivo álcool utilizado como solvente (Esquema 1). A mistura reacional permaneceu sob agitação por 18 horas à temperatura ambiente. Após o término da reação, verificado por CCD, a solução foi rotaevaporada, filtrada e lavada com água destilada para obtenção do produto puro.

Esquema 1 – Síntese dos análogos LRS01-LRS04.



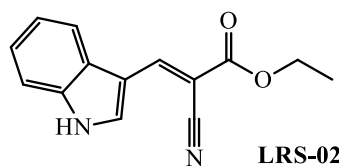
FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12.



Chemical Formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$

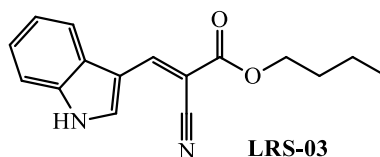
Rendimento: 98%; Aspecto: pó amorfo amarelo; R_F : 0,75; R_T : 3,19 min; Pureza: 99,9%; P_F : 209-210 °C; RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm) δ 3,83 (s, 3H, CH_3); 7,27 (t, 1H, CH_{Ar} , $J = 7,1$ Hz); 7,30 (t, 1H, CH_{Ar} , $J = 7,1$ Hz); 7,57 (d, 1H, CH_{Ar} , $J = 7,9$ Hz); 7,98 (d, 1H, CH_{Ar} , $J = 7,7$ Hz); 8,58 (s, 1H, CH_{Ar}); 8,58 (s, 1H, CH); 12,61 (br s, 1H,

NH). RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 53,10; 92,47; 110,48; 113,45; 118,51; 119,13; 122,68; 124,15; 127,39; 133,31; 136,78; 147,28; 164,27.



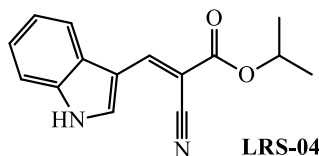
Chemical Formula: $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$

Rendimento: 96%; Aspecto: pó amorfo amarelo; R_F : 0,80; R_T : 3.27 min; Pureza: 99,9%; P_F : 171-172 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 1,31 (*t*, 3H, CH_3 , $J = 7,1$ Hz); 4,29 (*q*, 2H, CH_2 , $J = 7,1$ Hz); 7,27 (*t*, 1H, CH_{Ar} , $J = 6,9$ Hz); 7,31 (*t*, 1H, CH_{Ar} , $J = 6,9$ Hz); 7,58 (*d*, 1H, CH_{Ar} , $J = 7,8$ Hz); 7,97 (*d*, 1H, CH_{Ar} , $J = 7,7$ Hz); 8,57 (*s*, 1H, CH_{Ar}); 8,58 (*s*, 1H, CH); 12,57 (*br s*, 1H, NH). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 14,63; 61,89; 92,89; 110,47; 113,44; 118,49; 119,09; 122,64; 124,12; 127,39; 133,2; 136,79; 147,12; 163,75.



Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$

Rendimento: 90%; Aspecto: pó amorfo amarelo; R_F : 0,85; R_T : 3,59; Pureza: 99,9% P_F : 171-172 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 0,94 (*t*, 3H, CH_3 , $J = 7,4$ Hz); 1,41 (*sex*, 2H, CH_2 , $J = 7,4$ Hz); 1,67 (*qi*, 2H, CH_2 , $J = 7,3$ Hz); 4,25 (*t*, 2H, CH_2 , $J = 6,5$ Hz); 7,27 (*t*, 1H, CH_{Ar} , $J = 7,3$ Hz); 7,31 (*t*, 1H, CH_{Ar} , $J = 7,4$ Hz); 7,57 (*d*, 1H, CH_{Ar} , $J = 7,9$ Hz); 7,96 (*d*, 1H, CH_{Ar} , $J = 7,8$ Hz); 8,58 (*s*, 1H, CH_{Ar}); 8,58 (*s*, 1H, CH); 12,58 (*br s*, 1H, NH). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 14,04; 19,09; 30,68; 65,51; 92,79; 110,46; 113,45; 118,46; 119,07; 122,66; 124,13; 127,38; 133,23; 136,77; 147,11; 163,79.



Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$

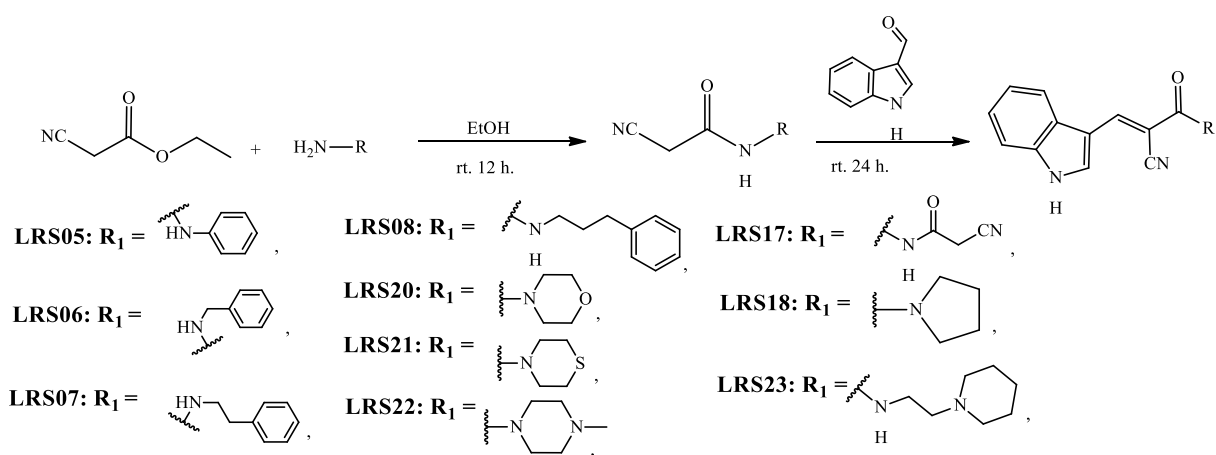
Rendimento: 82%; Aspecto: pó amorfo amarelo; R_F : 0,82; R_T : 3,37; Pureza: 99,9% P_F : 161-162 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 1,30 (*s*, 3H, CH_3); 1,31 (*s*, 3H, CH_3); 5,08 (*sept*, 1H, CH, $J = 6,2$ Hz); 7,26 (*t*, 1H, CH_{Ar} , $J = 6,9$ Hz); 7,30 (*t*, 1H, CH_{Ar} , $J = 7,0$

Hz); 7,57 (*d*, 1H, CH_{Ar}, *J*= 7,8 Hz); 7,96 (*d*, 1H, CH_{Ar}, *J*= 7,8 Hz); 8,55 (*s*, 1H, CH_{Ar}); 8,56 (*s*, 1H, CH); 12,56 (*br s*, 1H, NH). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 22,09; 69,60; 93,25; 110,42; 113,44; 118,49; 119,07; 122,61; 124,11; 127,39; 133,22; 136,77; 146,99; 163,25.

5.1.2 Síntese dos análogos indol-3-cianoacrilamidas LRS (05-08, 17, 18, 20-23)

A segunda série de compostos LRS (05, 06, 07, 08, 17, 18, 20-23) compreende os indol-3-cianoacrilamidas. Estes foram sintetizados a partir da adição, em um balão de fundo redondo de 50 mL, de 1,1 eq. de cianoacetato de etila, 1,1 eq. da amina correspondente (para os produtos LRS (18, 20-23) foram utilizados 2,2 eq. da amina), e 0,5 mL de butanol. Então, a mistura reacional permaneceu sob agitação por 12 horas. Posteriormente, foram adicionados 1,1 eq. de trietilamina para a formação do nucleófilo. Após 30 minutos, foi adicionado 1,0 eq. do indol-3-carboxaldeído e a reação permaneceu sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente (Esquema 2).

Esquema 2 – Síntese dos análogos LRS (05, 06, 07, 08, 17, 18, 20-23).



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12.

Finalizada a reação dos compostos LRS (05-08), realizou-se então uma extração líquido-líquido usando-se acetato de etila/água destilada na proporção 1:3. Posteriormente, a fase orgânica de cada mistura foi coletada e evaporada, rendendo um pó amorfo como produto, que foi posteriormente purificado por meio de uma coluna cromatográfica, utilizando-se hexano e acetato (7:3) como fase móvel, rendendo os respectivos produtos puros. Os produtos LRS17, LRS18, LRS20, LRS21 e LRS23

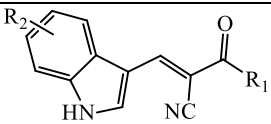
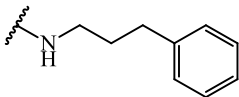
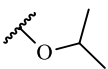
foram obtidos impuros. Portanto, foi realizada coluna cromatográfica para purificar cada produto, utilizando-se hexano e acetato de etila (8:2) como fase móvel. Contudo, os produtos desejados ficaram impregnados na sílica. Assim, estes foram removidos da sílica utilizando-se acetato de etila puro. O solvente orgânico foi coletado e evaporado para obtenção dos respectivos produtos puros.

A síntese dos compostos LRS (26-31, 43-48) (Tabela 1) foi realizada seguindo-se a mesma rota descritas nos esquemas anteriores.

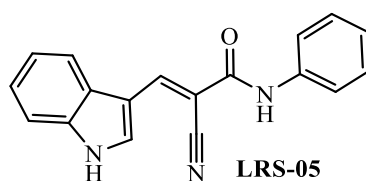
Para a síntese dos compostos LRS (26-31) foram adicionados 1,2 eq. de cianoacetato de metila, 1,2 eq. de 3-fenilpropilamina e 0,5 mL de butanol em um balão de fundo redondo de 50 mL. Então, a mistura reacional permaneceu sob agitação por 12 horas. Posteriormente, foram adicionados 1,1 eq. de trietilamina e após 30 minutos, foi adicionado 1,0 eq. do indol correspondente. A reação permaneceu sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,5 mL de isopropanol, foram adicionados 1,2 eq. cianoacetato de isopropila e 1,2 eq. de trietilamina (Et_3N). A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente (r.t) por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 mg (1,0 eq.) do respectivo indol para obtenção dos compostos LRS (43-48). A mistura reacional permaneceu sob agitação por 18 horas à temperatura ambiente. Após o término da reação, verificado por CCD, a solução foi rotaevaporada, filtrada e lavada com água destilada para obtenção do produto puro.

Tabela 1. Derivados contendo substituintes no anel indólico.

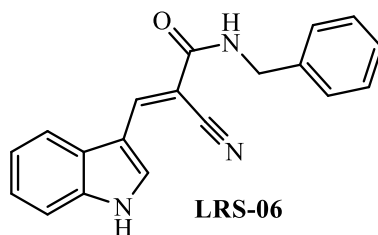
		
Código	R ₁	R ₂
LRS26		4-NO ₂
LRS27		5-Me
LRS28		7-Aza
LRS29		5-MeOH
LRS30		5-Br
LRS31		5-CN
LRS43		4-NO ₂
LRS44		5-CN
LRS45		5-Me
LRS46		5-MeOH
LRS47		5-Br
LRS48		7-Aza

Fonte: Autor, 2022.



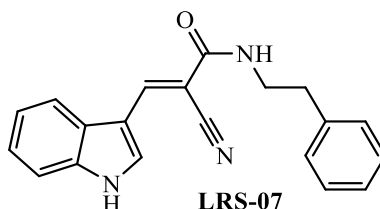
Chemical Formula: C₁₈H₁₃N₃O

Rendimento: 59,8%; Aspecto: pó amorfo marrom; R_F: 0,67; R_T: 3,06 min; Pureza: 95%
 P_F: 182-183 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 7,12 (*t*, 1H, CH_{Ar}, *J*= 7,1 Hz); 7,28 (*t*, 3H, CH_{Ar}, *J*= 7,5 Hz); 7,37 (*t*, 2H, CH_{Ar}, *J*= 7,5 Hz); 7,57 (*d*, 1H, CH_{Ar}, *J*= 7,7 Hz); 7,69 (*d*, 1H, CH_{Ar}, *J*= 7,8 Hz); 8,0 (*s*, 1H, CH_{Ar}); 8,53 (*s*, 1H, CH_{Ar}); 8,58 (*s*, 1H, CH); 10,17 (*br s*, 1H, NH); 12,42 (*br s*, 1H, NH). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 98,60; 110,12; 113,26; 119,04; 119,08; 121,15; 122,06; 122,66; 123,83; 124,37; 127,67; 129,10; 131,05; 136,53; 139,14; 143,21; 161,97; 163,76.



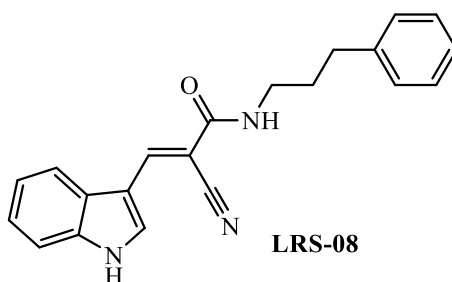
Chemical Formula: $C_{19}H_{15}N_3O$

Rendimento: 63%; Aspecto: pó amorfo amarelo; R_F : 0,65; R_T : 3,31; Pureza: 95% P_F : 242-243 °C; 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 4,44(*d*, 2H, CH_2 , J = 5,7 Hz); 7,23-7,29 (*m*, 3H, CH_{Ar}); 7,34-7,36 (*m*, 4H, CH_{Ar}); 7,55 (*d*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,8 Hz); 7,92 (*d*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,7 Hz); 8,48 (*s*, 1H, CH); 8,52 (*s*, 1H, CH_{Ar}); 8,84 (*t*, 1H, NH, J = 5,7 Hz); 12,34 (*br s*, 1H, NH). ^{13}C NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 43,46; 97,71; 110,09; 113,20; 118,86; 119,14; 122,00; 123,73; 127,29; 127,63; 127,82; 128,76; 130,80; 136,52; 139,87; 142,77; 162,68.



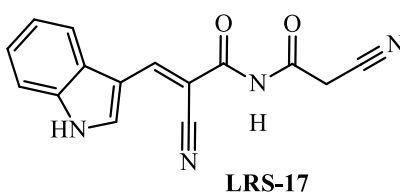
Chemical Formula: $C_{20}H_{17}N_3O$

Rendimento: 55%; Aspecto: pó amorfo amarelo; R_F : 0,92; R_T : 3,20; Pureza: 98% P_F : 278-279 °C; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 2,95 (*t*, 2H, CH_2 , J = 6,8 Hz); 3,71 (*q*, 2H, CH_2 , J = 6,5 Hz); 6,25 (*br s*, 1H, NH); 7,28 (*s*, 1H, CH_{Ar}); 7,32-7,38 (*m*, 6H, CH_{Ar}); 7,89 (*d*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,2 Hz); 8,48 (*d*, 1H, CH_{Ar} , J = 2,5 Hz); 8,7 (*s*, 1H, CH); 8,88 (*br s*, 1H, NH); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 35,73; 41,63; 111,55; 111,83; 118,71; 122,47; 124,14; 126,71; 127,38; 128,74; 128,77; 129,01; 132,06; 135,61; 138,45; 144,22; 150,50; 161,53.



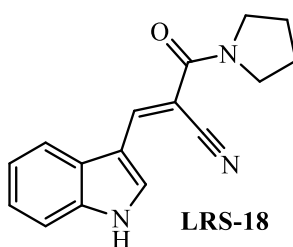
Chemical Formula: $C_{21}H_{19}N_3O$

Rendimento: 55%; Aspecto: pó amorfo amarelo; R_F : 0,60; R_T : 3,28; Pureza: 98% P_F : 211-212 °C; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 1,99 (*qi*, 2H, CH_2 , J = 7,3 Hz), 2,74 (*t*, 2H, CH_2 , J = 7,4 Hz); 3,49 (*q*, 2H, CH_2 , J = 6,6 Hz); 6,21 (*br s*, 1H, NH); 7,21-7,24 (*m*, 3H, CH_{Ar}); 7,31-7,36 (*m*, 4H, CH_{Ar}); 7,48 (*d*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,2 Hz); 7,88 (*d*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,3 Hz); 8,49 (*d*, 1H, CH_{Ar} , J = 2,6 Hz); 8,7 (*s*, 1H, CH); 8,95 (*br s*, 1H, NH). ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 31,04; 33,18; 39,99; 96,96; 111,54; 111,84; 118,72; 119,05; 122,45; 124,13; 126,08; 127,38; 128,35; 128,52; 129,00; 135,63; 141,13; 144,25; 161,57.



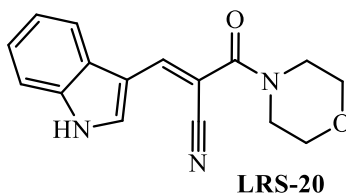
Chemical Formula: $C_{15}H_{10}N_4O_2$

Rendimento: 66%; Aspecto: pó cor creme amorfo; R_F : 0,42; R_T : 2,95; Pureza: 97% P_F : 153-154 °C; 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$, ppm) δ 3,59 (*s*, 2H, CH_2); 7,24 (*t*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,2 Hz); 7,26 (*t*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,2 Hz); 7,51 (*d*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,8 Hz); 7,67 (*br s*, 1H, NH); 8,08 (*d*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,5 Hz); 8,28 (*s*, 1H, CH_{Ar}); 9,93 (*s*, 1H, CH); 12,18 (*br s*, 1H, NH). ^{13}C NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$, ppm) δ 25,78; 112,88; 116,74; 118,63; 121,27; 122,57; 123,91; 124,59; 137,52; 138,88; 164,52; 185,42.



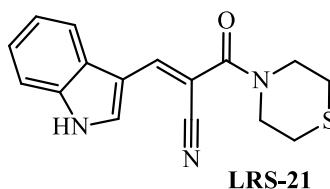
Chemical Formula: $C_{16}H_{15}N_3O$

Rendimento: 60%; Aspecto: pó amorfo amarelo; R_F : 0,28; R_T : 3,15; Pureza: 99% P_F : 225-225 °C; 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 1,82-1,95 (*m'*, 4H, CH_2); 3,41-3,50 (*m'*, 2H, CH_2); 3,66-3,77 (*m'*, 2H, CH_2); 7,22 (*t*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,5 Hz); 7,27 (*t*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,5 Hz); 7,55 (*d*, 1H, CH_{Ar} , J = 8,0 Hz); 7,90 (*d*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,8 Hz); 8,31 (*s*, 1H, CH_{Ar}); 8,45 (*s*, 1H, CH); 12,29 (*br s*, 1H, NH). ^{13}C NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 24,17; 26,65; 47,45; 48,76; 97,81; 110,25; 113,10; 118,84; 119,26; 121,95; 123,65; 127,49; 130,33; 136,43; 144,48; 162,31.



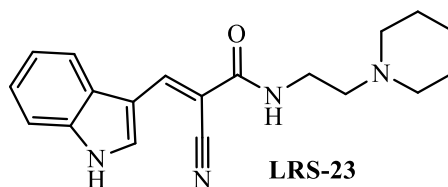
Chemical Formula: $C_{16}H_{15}N_3O_2$

Rendimento: 34%; Aspecto: pó amorfo amarelo; R_F : 0,07; R_T : 3,30; Pureza: 96% P_F : 154-155 °C; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 3,03 (t, 4H, CH_2 , J = 4,6 Hz); 3,75 (t, 4H, CH_2 , J = 4,6 Hz); 7,19 (t, 1H, CH_{Ar} , J = 7,2 Hz); 7,24 (t, 1H, CH_{Ar} , J = 7,4 Hz); 7,52 (d, 1H, CH_{Ar} , J = 7,9 Hz); 7,81 (d, 1H, CH_{Ar} , J = 7,8 Hz); 8,31 (s, 1H, CH_{Ar}); 8,36 (s, 1H, CH), 12,32 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 43,66; 64,71; 110,27; 112,98; 118,50; 120,97; 121,54; 123,26; 127,50; 129,31; 136,47; 141,76; 165,95.



Chemical Formula: $C_{16}H_{15}N_3OS$

Rendimento: 81%; Aspecto: pó amorfo amarelo; R_F : 0,60; R_T : 3,11; Pureza: 99% P_F : 170-172 °C; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 2,71 (t, 4H, CH_2 , J = 4,4 Hz); 3,84 (s, 4H, CH_2); 7,22 (t, 1H, CH_{Ar} , J = 7,5 Hz); 7,27 (t, 1H, CH_{Ar} , J = 7,5 Hz); 7,54 (d, 1H, CH_{Ar} , J = 8,0 Hz); 7,93 (d, 1H, CH_{Ar} , J = 7,8 Hz); 8,12 (s, 1H, CH_{Ar}); 8,41 (s, 1H, CH); 12,28 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 14,42; 22,50; 27,11; 31,44; 96,90; 110,32; 113,32; 119,01; 119,05; 121,95; 123,74; 127,41; 130,28; 136,38; 144,27; 164,52.



Chemical Formula: $C_{19}H_{22}N_4O$

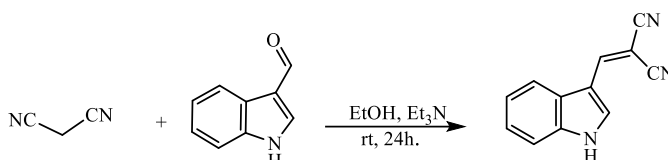
Rendimento: 34%; Aspecto: pó amorfo amarelo; R_F : 0,12; R_T : 1,88; Pureza: 95% P_F : 151-152 °C; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 1,38 (s, 2H, CH_2); 1,50 (s, 5H, CH_2); 2,40-2,44 (m, 7H, CH_2); 7,23-7,29 (m, 2H, CH_{Ar}); 7,55 (d, 1H, CH_{Ar}); 7,91 (d, 1H, CH_{Ar}); 8,13 (br s, 1H, NH); 8,45 (s, 2H, CH e CH_{Ar}); 12,37 (br s, 1H, NH). ^{13}C NMR (150 MHz,

DMSO-*d*₆, ppm) δ 24,42; 26,00; 37,51; 54,44; 57,77; 97,65; 110,04; 113,20; 118,84; 119,17; 122,00; 123,72; 127,56; 130,74; 136,52; 142,68; 162,29.

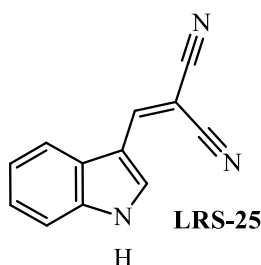
Além das indol-3-cianoacrilamidas, um derivado dinitrilado (LRS25) foi obtido a partir da adição de uma malononitrila ao aldeído, com finalidade de potencializar as chances de interação com o resíduo Ser¹³⁵, como mostrado na Figura 13.

Para a síntese do composto LRS25 foram adicionados, em balão de fundo redondo, 1,1 eq. de malononitrila e 0,5 mL de etanol, seguido da adição de 1,2 eq. de trietilamina como base catalítica. A reação permaneceu sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, foram adicionados 1,0 eq. do indol-3-carboxaldeído (Esquema 3). Acompanhada por CCD, a reação finalizou após 24 horas. Observada a impureza do produto, foi então realizada coluna cromatográfica usando-se hexano e acetato de etila (8:2) como fase móvel para obtenção do produto puro.

Esquema 3 – Síntese do derivado dinitrilado (LRS25).

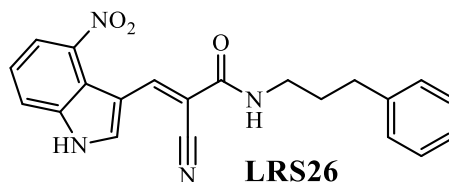


FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o software ChemDraw® v. 12.



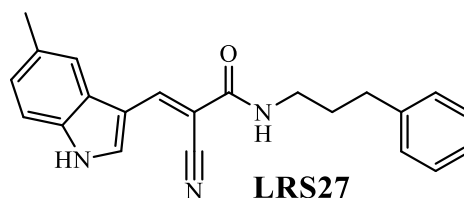
Chemical Formula: C₁₂H₇N₃

Rendimento: 49%; Aspecto: pó amorfo marrom; R_F: 0,75; R_T: 3,04; Pureza: 97% P_F: 171-172 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 7,29 (*t*, 1H, CH_{Ar}, *J*= 7,2 Hz); 7,30 (*t*, 1H, CH_{Ar}, *J*= 7,2 Hz); 7,58 (*d*, 1H, CH_{Ar}, *J*= 7,6 Hz); 8,05 (*d*, 1H, CH_{Ar}, *J*= 7,5 Hz); 8,53 (*s*, 1H, CH_{Ar}), 8,71 (*s*, 1H, CH); 12,73 (*br s*, 1H, NH). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 63,75; 111,46; 113,53; 116,35; 116,41; 119,55; 123,05; 124,44; 127,18; 133,79; 136,67; 153,08.



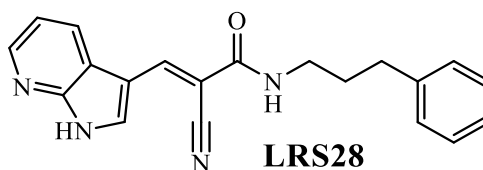
Chemical Formula: $C_{21}H_{18}N_4O_3$

Rendimento: 86%; Aspecto: pó amorfo cor creme; R_F : 0,67; R_T : 3,05; Pureza: 99%; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 1,82 (*qi*, 2H, CH_2 , J = 7,4 Hz); 2,62 (*t*, 2H, CH_2 , J = 7,6 Hz); 3,24 (*q*, 2H, CH_2 , J = 6,6 Hz); 7,18 (*t*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,2 Hz); 7,24 (*d*, 2H, CH_{Ar} , J = 7,1 Hz); 7,29 (*t*, 2H, CH_{Ar} , J = 7,5 Hz); 7,45 (*t*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,9 Hz); 8,00 (*q*, 2H, CH_{Ar} , J = 7,3 Hz); 8,24 (*t*, 1H, NH, J = 5,5 Hz); 8,60 (*s*, 1H, CH); 8,61 (*s*, 1H, CH_{Ar}) 12,89 (*br s*, 1H, NH). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 31,13; 33,01; 101,09; 108,72; 118,24; 118,30; 119,80; 120,14; 122,83; 136,14; 128,78; 134,21; 139,38; 142,15; 146,16; 161,92.



Chemical Formula: $C_{22}H_{21}N_3O$

Rendimento: 92%; Aspecto: pó amarelo amorfo; R_F : 0,52; R_T : 3,39; Pureza: 99%; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 1,83 (*qi*, 2H, CH_2 , J = 7,3 Hz); 2,44 (*s*, 3H, CH_3); 2,63 (*t*, 2H, CH_2 , J = 7,5 Hz); 3,25 (*q*, 2H, CH_2 , J = 6,4 Hz); 7,10 (*d*, 1H, CH_{Ar} , J = 8,2 Hz); 7,18 (*t*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,1 Hz); 7,24 (*d*, 2H, CH_{Ar} , J = 7,6 Hz); 7,29 (*t*, 2H, CH_{Ar} , J = 7,4 Hz); 7,43 (*d*, 1H, CH_{Ar} , J = 8,1 Hz); 7,69 (*s*, 1H, CH_{Ar}); 8,27 (*t*, 1H, NH, J = 4,9 Hz); 8,40 (*d*, 2H, CH_{Ar} , J = 7,1 Hz); 12,21 (*br s*, 1H, NH). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 21,73; 31,25; 33,06; 97,67; 109,66; 112,84; 118,38; 119,24; 125,25; 126,20; 127,95; 128,75; 130,42; 130,99; 134,78; 142,18; 142,34; 162,63.



Chemical Formula: $C_{20}H_{18}N_4O$

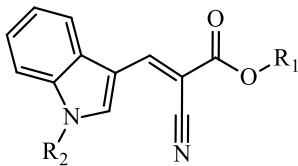
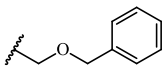
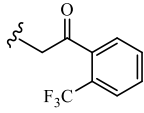
Rendimento: 86%; Aspecto: pó branco amorfo; R_F : 0,46; R_T : 3,20; Pureza: 98%; 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 1,83 (*qi*, 2H, CH_2 , J = 7,3 Hz); 2,63 (*s*, 2H, CH_2 , J = 7,6 Hz); 3,26 (*q*, 2H, CH, J = 6,4 Hz) 7,18 (*t*, 1H, CH_{Ar} , J = 7,2 Hz); 7,23 (*d*, 2H, CH_{Ar} ,

$J = 7,5$ Hz); 7,29 (*q*, 3H, CH_{Ar} , $J = 7,6$ Hz); 8,30 (*t*, 1H, NH, $J = 5,0$ Hz); 8,40 (*t*, 3H, CH_{Ar} , $J = 6,5$ Hz); 8,48 (*s*, 1H, CH_{Ar}); 12,84 (*br s*, 1H, NH). ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm) δ 21,73; 31,25; 33,06; 97,67; 109,66; 112,84; 118,38; 119,24; 125,25; 126,20; 127,95; 128,75; 130,42; 130,99; 134,78; 142,18; 142,34; 162,63.

Ainda, durante a execução deste projeto de pesquisa, observou-se que as sínteses dos cianoacrilatos utilizando-se etanol como solvente geraram produtos de reações de transesterificação, nesse caso, todos os ésteres planejados foram convertidos no composto LRS02, uma vez que o etanol foi utilizado como meio reacional e não nos derivados desejados. Portanto, a síntese dos cianoacrilatos foi realizada em propanol, isopropanol em *n*-butanol. Ademais, não foi possível obter-se acrilamidas a partir do tratamento dos acrilatos com as aminas selecionadas, exigindo assim uma segunda via para obtenção das acrilamidas desejadas.

Posteriormente, os acrilatos LRS (01-04) foram submetidos a reações com haletos de alquilas, objetivando-se a substituição do hidrogênio no nitrogênio secundário do anel indólico (NH). No entanto, nenhuma das tentativas resultaram em algum sucesso (Tabela 2). Porém, a influência de outros parâmetros reacionais será explorada, tais como temperatura, solvente e base.

Tabela 2 – Reações de substituição do hidrogênio indólico que falharam.

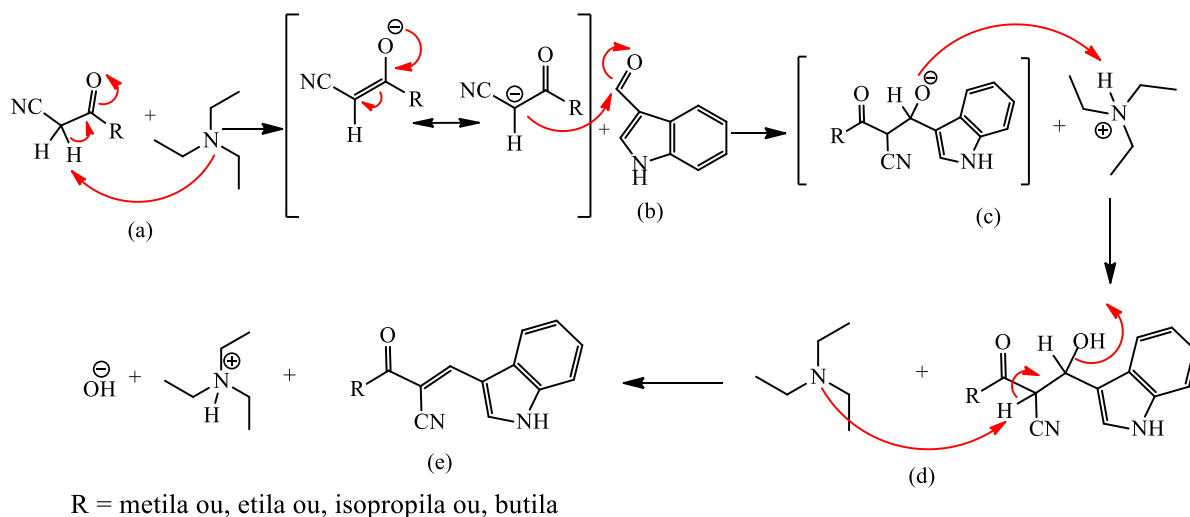
						
Código	R ₁	R ₂	Equivalentes	Solvente	Base	Temp.
LRS01-01	Metila					
LRS02-01	Etila					
LRS03-01	Butila		1,0	Acetonitrila	K ₂ CO ₃	r. t
LRS04-01	<i>i</i> -propila					
LRS01-02	Metila					
LRS02-02	Etila					
LRS03-02	Butila		1,0	Acetonitrila	K ₂ CO ₃	r. t
LRS04-02	<i>i</i> -propila					

Fonte: Autor, 2022.

5.1.3 Mecanismos de reações propostos para a síntese das moléculas planejadas racionalmente

Os cianoacrilatos e o análogo dinitrilado foram obtidos através da reação de condensação Knövenagel (Figura 25), com rendimentos entre 49 e 98%. Tal reação é uma síntese clássica que foi descrita por Emil Knövenagel em 1980. Essa é uma reação de condensação aldólica modificada, com uma adição nucleofílica entre uma cetona ou aldeído e um composto de hidrogênio ativo (também chamado de hidrogênio ácido), na presença de um catalisador básico, resultando na formação de uma ligação carbono-carbono. O composto de hidrogênio ativo possui um hidrogênio ácido que pode ser capturado pela base. Os hidrogênios ativos estão mais fracamente ligados ao carbono, devido à presença de grupos retiradores de elétrons, tais como CO_2R , COR , CHO , CN e NO_2 em carbonos adjacentes. A reação geralmente é seguida por uma desidratação espontânea, rendendo um produto insaturado. Inicialmente, (a) a base abstrai um próton do cianoéster, formando um enol intermediário. Em seguida, (b) este realiza um ataque nucleofílico à carbonila do aldeído (ou cetona), gerando um íon alcóxido. Este, por sua vez, (c) abstrai um próton do ácido conjugado da base, formando um álcool e reestabelecendo a base. Por fim, (d) outra molécula de base abstrai um segundo próton formando a ligação dupla (desidratação de álcool catalisada por base), (e) conduzindo ao produto final.

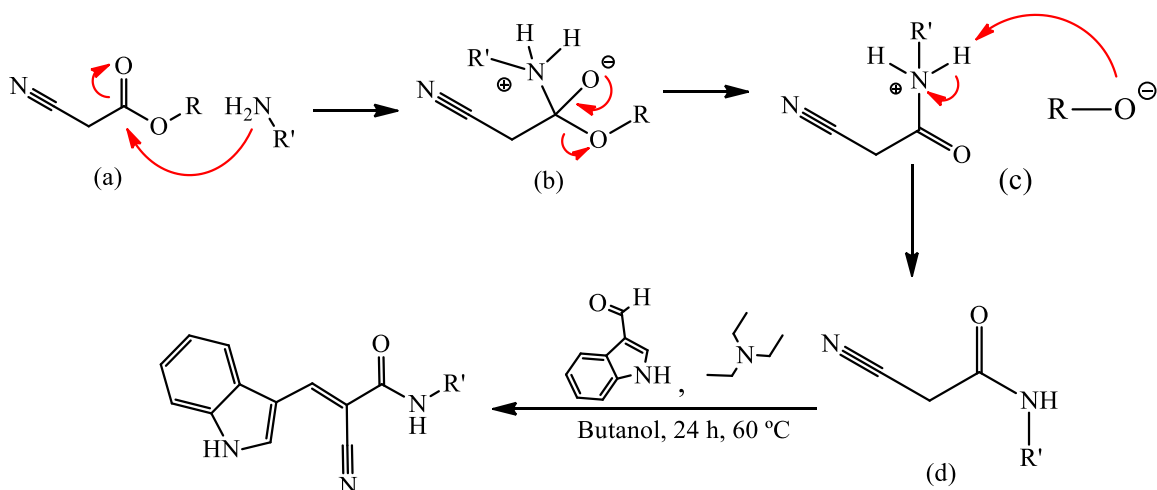
Figura 25 – Mecanismo reacional proposto para a obtenção dos cianoacrilatos LRS (01-04) ou derivado dinitrilado (LRS25).



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o software ChemDraw® v. 12.

A síntese das cianoacrilamidas ocorreu em dois passos com rendimentos variando de 34 a 63 %. O primeiro passo foi a reação de adição da amina, primária ou secundária, ao cianoacetato de etila para a formação da amida (reação de aminólise). Em seguida, ocorre o acoplamento da acrilamida intermediária ao núcleo indólico, via condensação de Knövenagel (Figura 26). Inicialmente, (a) ocorre um ataque nucleofílico da amina à carbonila do éster. Em seguida, (b) a carbonila é reestabelecida, eliminando um íon alcóxido, que remove um hidrogênio do nitrogênio, gerando um álcool (c) e a amina desejada (d). A segunda etapa consiste no mecanismo de reação para a síntese dos cianoacrilatos (d) via reação de condensação Knövenagel (Ver figura 25), como discutido anteriormente.

Figura 26 – Mecanismo reacional proposto para a obtenção das cianoacrilamidas.



R = metila ou, etila ou, isopropila ou, butila

FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12

5.2 Rendimento dos compostos sintetizados

Com exceção dos compostos LRS (20, 23 e 25), que tiveram rendimentos inferiores a 50%, todos os demais compostos sintetizados foram obtidos com bons rendimentos, variando de 55 a 98%. A seguir, os mecanismos reacionais para a síntese dos cianoacrilatos e das cianoacrilamidas serão descritos em detalhes, seguidos da caracterização de cada composto.

5.3 Caracterização Estrutural dos Compostos Sintetizados

Em geral, os cianoacrilatos LRS (01-04) e as cianoacrilamidas LRS (05-23) apresentaram tempo de retenção entre 2,9 e 3,6 minutos, respectivamente (dados obtidos a partir de um fluxo de 1 mL/min de metanol grau HPLC em uma corrida analítica de 10 minutos).

O espectro de RMN de ^1H revelou que o sinal da metina ($\text{R}=\text{CH}$) é verificado em $\sim 8,5$ ppm, o que confirma que a reação de condensação de Knövenagel ocorreu. Os sinais dos grupos alquilas ligados à função éster foram observados em 3,83 ppm para a metila (CH_3) do LRS01; 1,31 e 4,29 ppm para CH_3 e metileno (CH_2), respectivamente, do LRS02; enquanto para o LRS03 o sinal do CH_3 é observado em 0,94 ppm e os sinais de CH_2 em 1,4, 1,67 e 4,25 ppm; para o LRS04 os sinais do grupo *i*-propila observa-se o sinal dos dois CH_3 em 1,3 ppm e do CH em 5,08 ppm. Com relação aos espectros de ^{13}C para tais compostos, o sinal da metina é observado em ~ 110 ppm. Para os carbonos dos grupos alquilas ligados à função éster, estes se apresentaram na faixa entre 14 e 69 ppm.

Nos espectros RMN de ^1H para as cianoacrilamidas LRS (05-23), o sinal da metina foi verificado entre 8,2 e 8,7 ppm. Ainda os sinais dos grupos alquilas das acrilamidas foram observados como sendo 4,44 (CH_2) para o LRS06; 2,95 (CH_2); 3,71 (CH_2) para LRS07 e 1,99 (CH_2); 2,74 (CH_2); 3,49 (CH_2) para LRS08. Para esses compostos também foi verificado que os sinais de CH aromáticos (CH_{Ar}) estavam compreendidos entre 7,2 e 7,4 ppm.

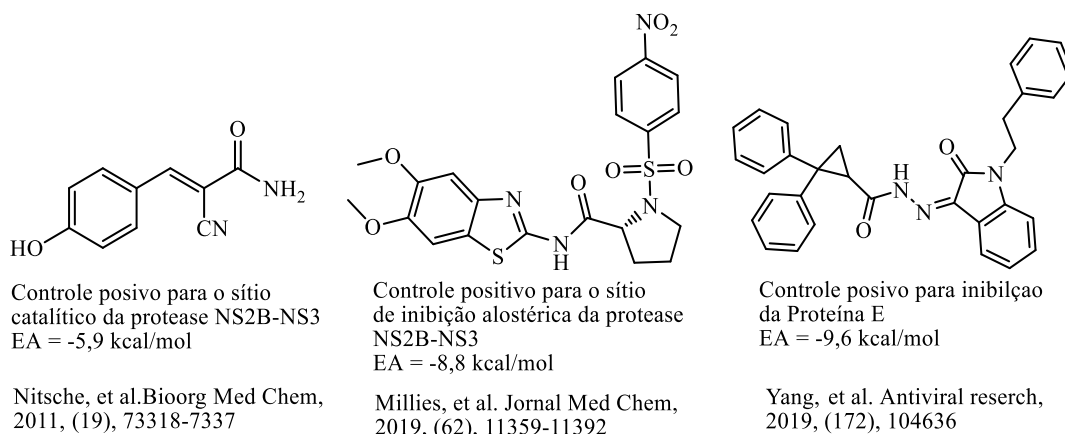
Os sinais no RMN de ^1H para o nitrogênio indólico (NH) nas acrilamidas LRS06, LRS07, LRS08 e LRS17 foram observados em 12,34; 8,88; 8,95 e 12,18 ppm, respectivamente. Por fim, todos os sinais referentes aos substituintes acrilamidas se mostraram compatíveis com as estruturas almejadas. Ademais, todos os espectros de RMN de ^1H (contendo as zonas de ampliação) e ^{13}C estão disponíveis por material em anexo à dissertação.

5.4 Docking molecular

Após a execução de todos os experimentos de docking molecular, utilizando os softwares anteriormente descritos, os resultados para as energias de afinidade

ligantes/proteínas foram agrupados de acordo com o alvo. É possível observar que os ligantes racionalmente planejados apresentam, de modo geral, uma interessante afinidade (energia de afinidade mais negativa e maior valor de fitscore) pelos alvos desejados, isto é, a protease NS2B-NS3 e a proteína E, quando as energias de afinidade foram comparadas com 3 compostos adotados como controle para cada alvo (Figura 27).

Figura 27. Compostos usados como controles positivos.



Fonte: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* ChemDraw® v. 12

5.5 Resultados para a proteína E

5.5.1 Docking na proteína E

Todas as moléculas planejadas apresentaram valores de energia de afinidade bastante significativos quando comparados com os controles. Contudo, para o derivado dinitrilado foi observado o menor valor de energia de afinidade (-7,4 kcal/mol), portanto, abaixo do valor de corte (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de energia de afinidade (E_A em Kcal/mol) e FitScore obtidos a partir da formação dos complexos ligante/proteína com a proteína E.

Código	E_A^a	FitScore ^b	Código	E_A^a	FitScore ^b
LRS01	-7,5	32,95	LRS13	-8,7	33,68
LRS02	-7,6	32,75	LRS15	-7,6	42,66
LRS03	-7,5	33,19	LRS17	-7,9	38,39
LRS04	-7,5	32,18	LRS18	-8,3	41,93
LRS05	-8,6	38,80	LRS19	-8,6	37,37
LRS06	-8,7	47,72	LRS20	-8,2	38,67
LRS07	-8,7	43,94	LRS21	-8,1	33,83
LRS08	-8,6	49,87	LRS22	-8,4	35,44
LRS10	-8,8	38,47	LRS23	-8,1	46,50
LRS11	-8,9	39,07	LRS25	-7,4	34,58
LRS12	-7,7	41,54			

^a: AutoDock Vina; ^b: Gold. Destaque em vermelho para melhor fitscore e E_A .

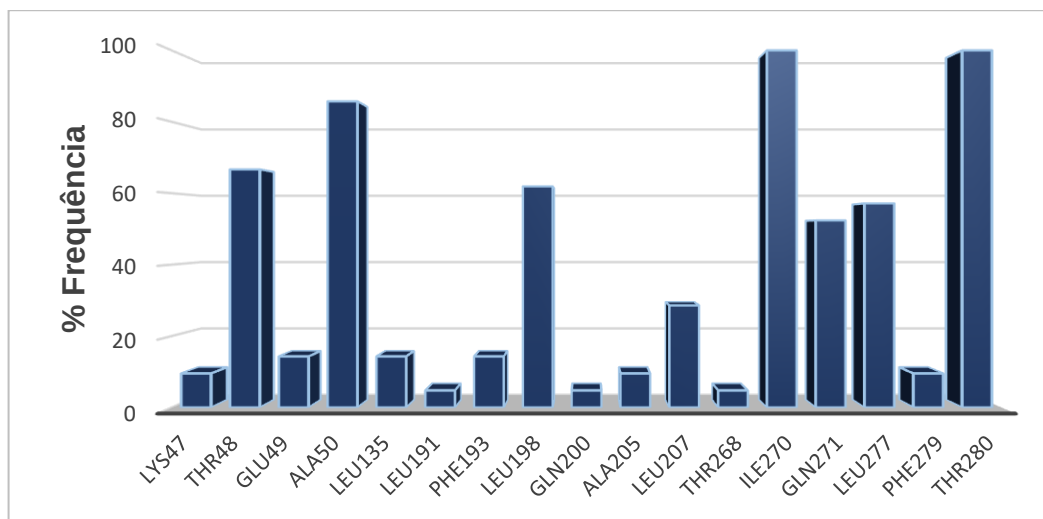
A partir da análise da Tabela 3 é possível perceber que os compostos LRS (01-04) apresentam valores de E_A e fitscore muito próximos os quais não variam de forma dependente da quantidade de carbonos, sugerindo que a cadeia alquila tem pouca influência nos valores de tais parâmetros. Analisando as afinidades dos ligantes LRS (05-11) e LRS (18-23) pela proteína E, é possível perceber que elas se mantêm entre -8 e -9, sugerindo que cadeias aromáticas e cadeias heterocíclicas, mesmo com a modificação do heteroátomo da cadeia cíclica podem potencializar a atividade das moléculas. Por fim, o derivado dinitrilado não apresentou afinidade satisfatória com os alvos ($E_A < -7,5$ kcal/mol).

Considerando os valores de *fitscore*, nota-se que eles são relativamente baixos, quando comparados ao valor de corte (*fitscore* = 45).

A partir das imagens obtidas através do docking molecular foi possível observar quais resíduos de aminoácidos realizam interações com os compostos e a frequência que eles aparecem. Por tanto, gráficos foram gerados com a finalidade de melhor avaliar a influência de tais interações.

As moléculas também interagiram com resíduos que são conservados nas proteínas E do DENV-2 e do ZIKV, tais como Thr⁴⁸, Leu¹³⁵, Leu¹⁹¹, Phe¹⁹³, Leu²⁰⁷ e Phe²⁷⁹ (Gráfico 1) (WISPELAERE et al., 2018).

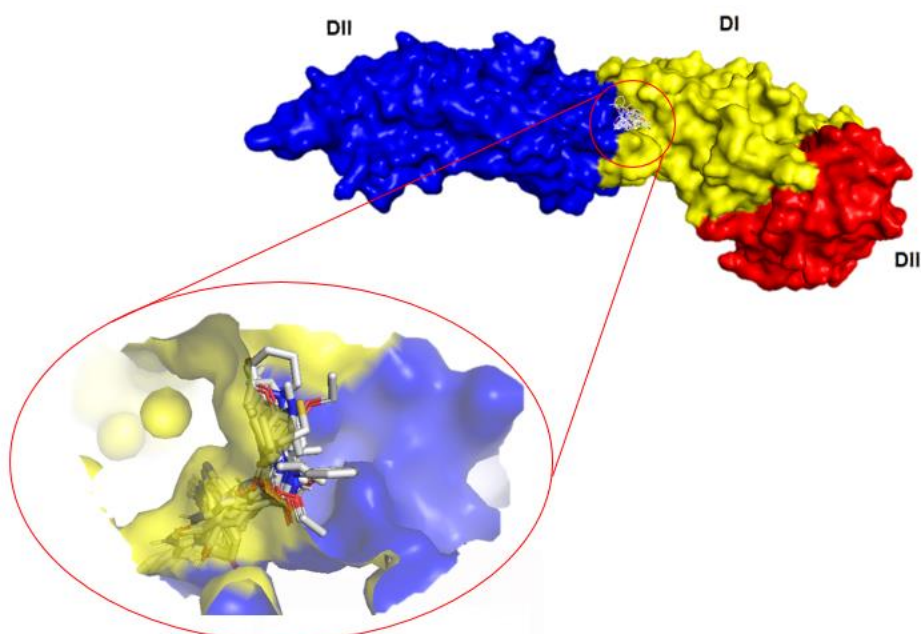
Gráfico 1 – Frequência de visualização de resíduos do sítio de ligação da proteína E.



FONTE: Autor, 2022. Gráfico elaborado utilizando-se o *software* Microsoft® Office Excel 2013.

Estes resíduos, juntamente com os demais, envolvidos nas interações com os ligantes, formam um sítio entre os domínios DI e DII, denominado bolso β -octilglucosídeo (β OG) (Figura 28), onde ocorrem as principais mudanças conformacionais durante a fusão da membrana de modo que os ligantes neste sítio podem inibir a entrada viral (WISPELAERE et al., 2018).

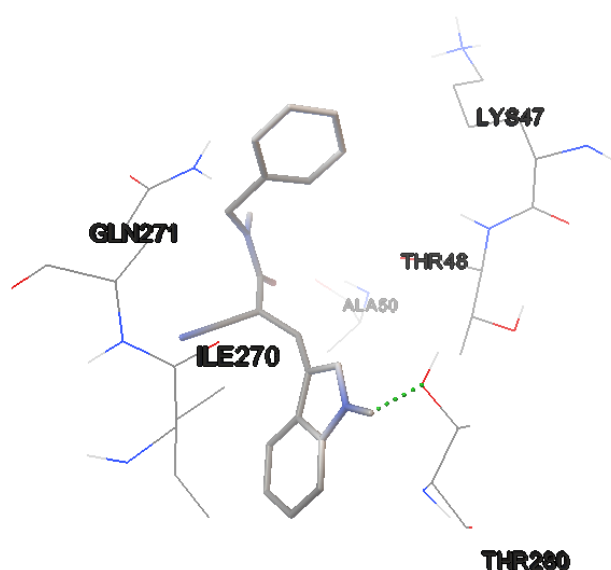
Figura 28 – Bolso β OG da proteína E.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* PyMol® v. 0.99.

No docking foi observado que análogo LRS06 interage com 6 aminoácidos na região entre DI e DII da proteína E (Figura 29). Este composto apresenta interações hidrofóbicas, eletrostáticas e de hidrogênio. Neste sentido, verificou-se interação dipolo-dipolo da carbonila com a Ala⁵⁰ e do grupo ciano com a Ile²⁷⁰. A interação de hidrogênio foi observada entre o hidrogênio do núcleo indólico e o resíduo Thr²⁸⁰. Por fim, os demais resíduos realizam interações hidrofóbicas, estabilizando a região da cadeia alquila da fenila.

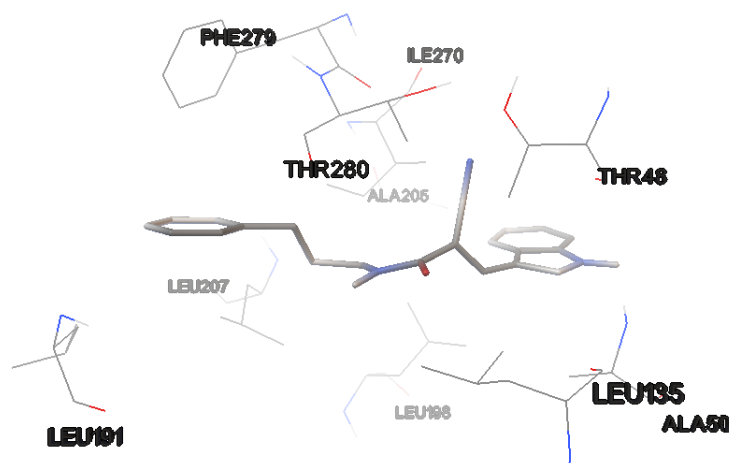
Figura 29 – Interações para o composto LRS06 inserido entre os domínios DI e DII da proteína E do DENV.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools® v. 1.5.6. As interações de hidrogênio estão representadas como pontos na cor verde.

De modo semelhante ao observado para os compostos LRS07 e LRS08 no sítio alostérico, no sítio de inibição da proteína E, a extensão da cadeia alquila pela adição do fragmento $-(CH_2)_2-$ possibilita a formação de interações adicionais com um maior número de resíduos interagindo com o composto LRS08, quando comparado ao LRS06 (Figura 30). Contudo, diferentemente do composto LRS06, o LRS08 não possui interação de hidrogênio. Este tem interação dipolo-dipolo entre o grupo ciano e a Thr²⁸⁰ e entre a carbonila e o resíduo Ala⁵⁰. Além disso, observa-se que os resíduos Phe²⁷⁹, Leu²⁰⁷ e Leu¹⁹¹ contribuem para estabilizar a região da fenila por interações hidrofóbicas.

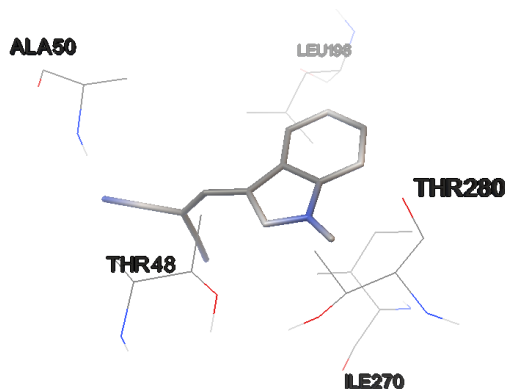
Figura 30 – Interações para o composto LRS08 inserido entre os domínios DI e DII da proteína E do DENV.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools® v. 1.5.6.

Novamente, o composto LRS25 apresentou a menor afinidade pelo alvo. Este interage apenas com 5 aminoácidos, dos quais Thr²⁸⁰ e Ala⁵⁰ realizam interação dipolo-dipolo com o NH do núcleo indólico e um grupo ciano, respectivamente (Figura 31). Os demais resíduos realizam apenas interações hidrofóbicas. Além disso, observa-se que os dois grupos ciano estão na parte mais externa da cavidade entre DI e DII, região delimitada pelos resíduos Thr⁴⁸ e Ala⁵⁰ e, portanto, mais exposto ao solvente do que os compostos LRS06 e LRS08. A polaridade da molécula na região dos dois grupos ciano, associada à exposição ao solvente pode contribuir para diminuir a estabilidade do complexo formado.

Figura 31 – Interações para o composto LRS25 inserido entre os domínios DI e DII da proteína E do DENV.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools® v. 1.5.6.

A interação dos compostos LRS06, LRS08 e LRS25 com os resíduos Thr⁴⁸, Ala⁵⁰, Leu¹³⁵, Leu¹⁹¹, Leu¹⁹⁸ e Leu²⁰⁷ são particularmente interessantes, visto que estes estão associados a moléculas *hits* com atividade inibitória contra a proteína E (HENGPHASATPORN et al., 2020). Em adição, o composto LRS06 apresenta uma interação com o resíduo Gln²⁷¹, o qual tem sido sugerido ter papel importante para a ligação do inibidor no sítio β OG (DE WISPELAERE et al., 2018).

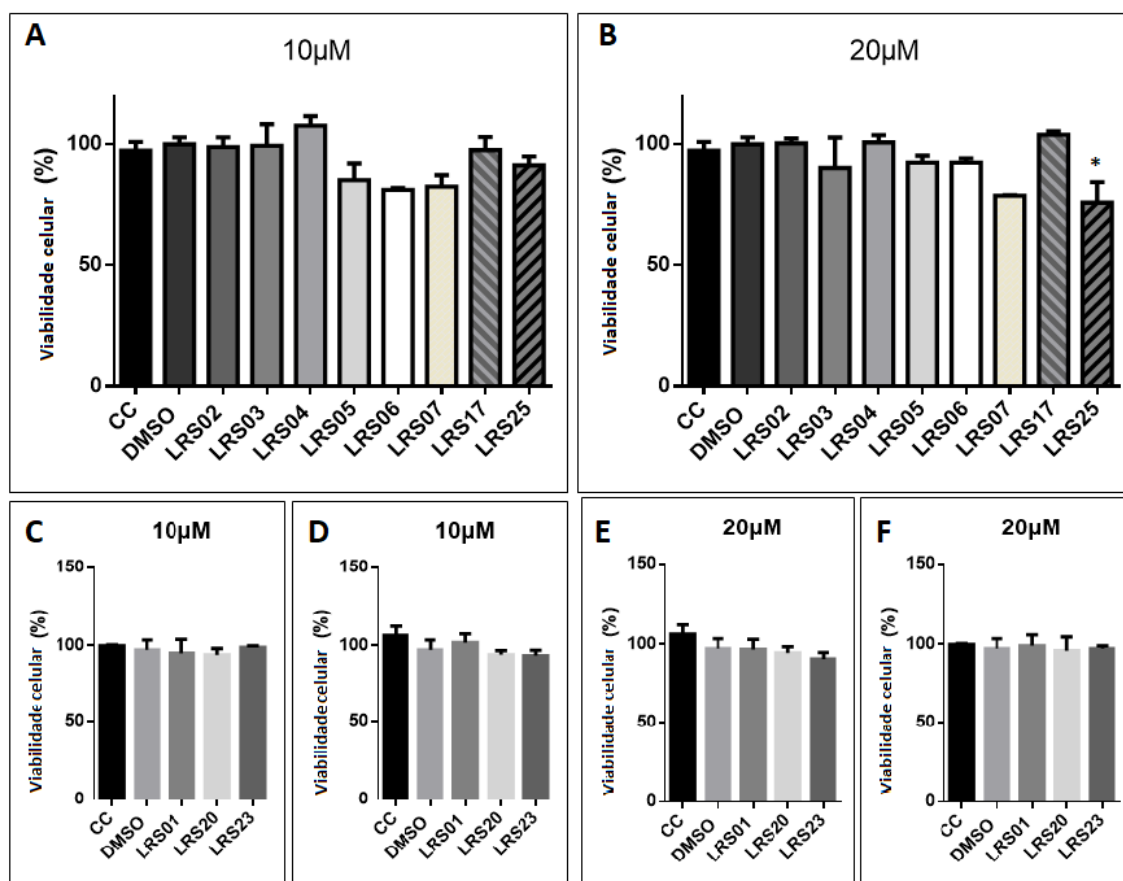
5.6 Avaliação Citotóxica e Antiviral dos Compostos Sintetizados

5.6.1 Avaliação citotóxica pelo método de MTT

Esta etapa do estudo foi realizada por meio da parceria com o Prof. Dr. Ênio J. Bassi, no laboratório de pesquisa em virologia e imunologia (LAPEVI), no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS/UFAL, que aceitou fazer parte desse projeto de pesquisa.

Inicialmente, os compostos LRS (01-07, 17, 20, 23, 25) foram avaliados quanto seu perfil citotóxico em células *Vero E6* pelo método de MTT. Os testes para determinação da citotoxicidade foram realizados em duas concentrações, 10 e 20 μ M. Os resultados obtidos evidenciaram que os compostos testados, exceto o LRS25 à concentração de 20 μ M, não apresentaram perfil citotóxico estatisticamente relevante (Figura 32). Os demais compostos sintetizados nessa dissertação estão em fase de testes e serão publicados posteriormente.

Figura 32 – Viabilidade celular para os compostos LRS (01-07, 17, 20, 23 e 25) em ensaio de citotoxicidade.



Fonte: Autor, 2022. A citotoxicidade foi realizada *in vitro* para os compostos sintetizados frente a células *Vero E6* nas concentrações de 10 e 20 µM pelo método de MTT, após 48 horas. Os resultados foram expressos a partir da média $\pm$ desvio padrão de duplicatas nas concentrações de 10 e 20 µM, analisado após 48 horas. * $p \leq 0,1$ versus CC; CC= controle celular contendo apenas o meio de cultura.

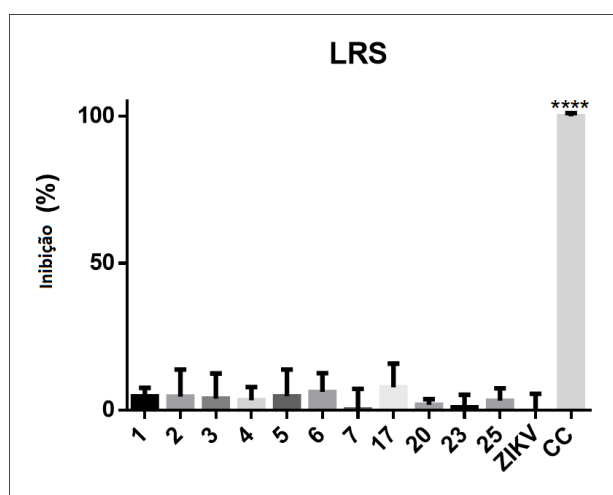
5.6.2 Avaliação da atividade antiviral frente ao ZIKV

A fim de verificar o efeito protetor dos compostos como inibidores de entrada viral foi realizado o ensaio antiviral. A partir do qual é possível inferir se os compostos possuem o efeito protetor quando as células são pré tratadas e posteriormente infectadas com o vírus. Havendo redução da atividade viral significa que os compostos impedem a entrada viral.

Tais ensaios foram realizados em células *Vero E6* infectadas com ZIKV em uma M.O.I de 1:5, utilizando-se uma concentração de 20 µM de cada composto. Como

mostrado na figura 33, nenhum dos compostos apresentou inibição estatisticamente significativa na concentração avaliada. Portanto, há a necessidade da realização dos testes em concentrações maiores, afim de verificar qual a concentração necessária para que alguma atividade antiviral significativa possa ser observada. Ainda, as propriedades físico-químicas dos compostos devem ser levadas em consideração e investigadas, visando observar se a inatividade dos compostos em ensaios celulares pode estar associada a fatores de específicos, tais como a lipofilicidade e a solubilidade.

Figura 33 – Resultado da avaliação da atividade antiviral para os compostos LRS (01-07, 17, 20, 23 e 25).



Fonte: Autor, 2022. A adição do vírus foi realizada por 2 horas, seguidas pela adição dos compostos à concentração de 20 μM . A viabilidade celular é obtida após 48 horas e a % inibição viral foi determinada para cada composto. Os resultados foram expressos a partir da média $\pm$ desvio padrão de triplicatas à concentração de 20 μM , analisado após 48 horas. **** $p \leq 0.0001$ versus CC; CC= controle celular não tratado. ZIKV= células não tratadas e infectadas com ZIKV.

5.7 Resultados para a protease NS2B/NS3

5.7.1 Docking na protease NS2B/NS3

A partir dos valores de energia de afinidade e fitscore é possível notar que, em geral, os compostos apresentam maior afinidade pelo sítio alostérico em relação ao sítio catalítico da protease, sugerindo maior potencial de inibição não competitiva (alostérica).

A partir da tabela 4 é possível notar que, considerando o valor do fitscore, o composto LRS08 é o mais promissor como inibidor dos sítios ativo e catalítico.

Tabela 4 – Valores de energia de afinidade (E_A em Kcal/mol) e FitScore obtidos a partir da formação dos complexos ligante/proteína.

Código	(NS2B-NS3)			
	Sítio alostérico		Sítio catalítico	
	E_A^a	FitScore ^b	E_A^a	FitScore ^b
LRS01	-7,6	60,99	-6,6	45,61
LRS02	-7,5	61,70	-6,7	47,42
LRS03	-7,7	61,65	-6,8	51,01
LRS04	-7,9	67,17	-6,9	47,15
LRS05	-8,4	71,70	-7,4	53,90
LRS06	-8,4	72,41	-8,1	60,37
LRS07	-9,0	78,92	-7,0	63,52
LRS08	-8,7	81,73	-6,6	63,57
LRS10	-8,4	74,68	-8,1	53,35
LRS11	-8,3	72,91	-7,8	54,24
LRS12	-7,7	75,43	-7,2	57,88
LRS13	-8,5	76,95	-8,2	57,78
LRS15	-7,5	61,21	-6,6	50,16
LRS17	-7,7	60,48	-7,0	49,79
LRS18	-7,9	66,16	-7,1	51,47
LRS19	-7,7	63,94	-7,6	51,84
LRS20	-8,2	64,50	-7,1	51,60
LRS21	-7,5	60,93	-7,0	51,49
LRS22	-8,2	70,85	-7,5	50,00
LRS23	-7,6	76,33	-7,6	57,25
LRS25	-6,9	49,06	-6,8	43,35

^a: AutoDock Vina; ^b: Gold. Destaque em vermelho para melhor fitscore e E_A .

Os compostos LRS (01-04) diferem apenas no tamanho da cadeia alquila e, de modo geral é observado que esse aumento da cadeia não interfere significativamente para aumentar a interação do ligante com os ambos os alvos. Com exceção do

composto LRS12, é observado que a adição de uma amina aromática, contribui para aumentar a energia de afinidade dos complexos nos compostos LRS (05-08, 10, 11 e 13).

A partir da tabela 4 é possível sugerir que os compostos LRS (07 e 08) e LRS (06 e 13) como os mais promissores frente aos sítios alostérico e catalítico da protease NS2B-NS3, respectivamente. Em contraste, o análogo LRS25 foi o que apresentou a menor afinidade pelos alvos.

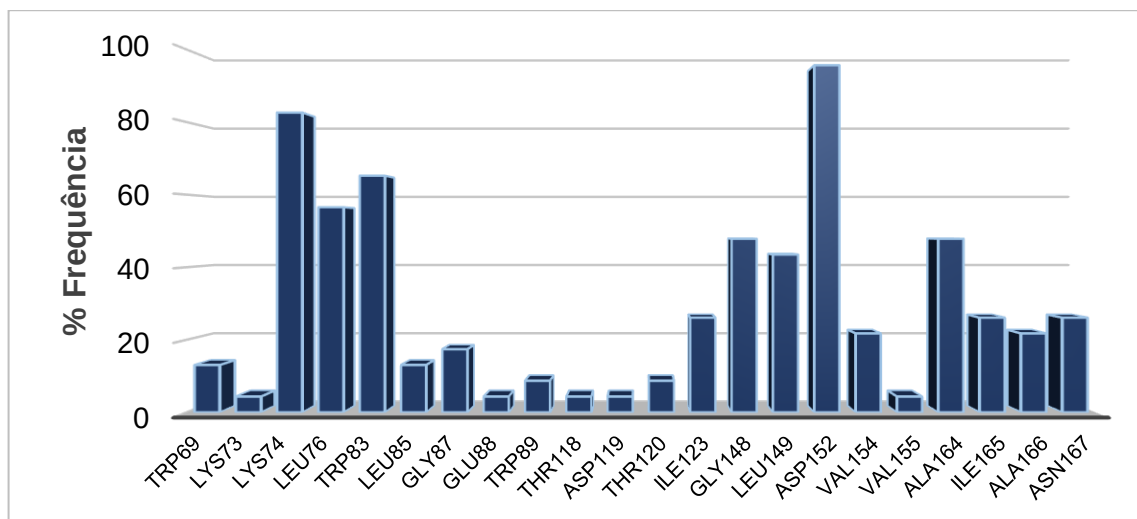
Os análogos LRS (15, 17 e 18) apresentam maior afinidade pelo sítio alostérico, se comparados ao sítio ativo. No análogo LRS23, a adição de 1-(2-aminoetil)piperidina não conduz à nenhuma mudança significativa na energia de afinidade, se compararmos ao LRS19 frente aos sítios da protease.

Considerando os compostos LRS (19-21) nota-se que a presença do oxigênio da morfolina em LRS20 contribui para aumentar a energia de afinidade do complexo (NS2B-NS3/ligante) no sítio alostérico, enquanto que a presença do enxofre da tiomorfolina em LRS21, leva à diminuição de afinidade, quando comparados ao LRS19 com -CH₂ na mesma posição do anel. Por outro lado, é observado que para o sítio ativo a adição de ambos heteroátomos é desfavorável.

Após as simulações de docking foi possível observar com quais resíduos de aminoácidos os compostos fazem interações em cada alvo e a frequência com que estes aparecem. Portanto, foram gerados gráficos evidenciando os resíduos mais frequente entre os ligantes nos sítios ativo e alostérico da protease NS2B-NS3.

O gráfico 2 evidencia um número grande de aminoácidos que interagem com os análogos avaliados, com maior frequência de ocorrência para Lys⁷⁴ (82,5%), Leu⁷⁶ (56,5%), Trp⁸³ (65%) e Asp¹⁵² (95%). O resíduo mais frequente é a Asp¹⁵², o qual é conservado em todas as proteases flavivirais, geralmente denominado “interruptor” molecular entre as conformações aberta e fechada de modo que, interações de inibidores com este resíduo poderiam estabilizar a conformação aberta e inibir a formação de uma estrutura proteolítica, a *β-hairpina* (MILLIES et al., 2019a; SILVA-JÚNIOR, 2019).

Gráfico 2 – Frequência de visualização de resíduos do sítio alostérico da NS2B-NS3.



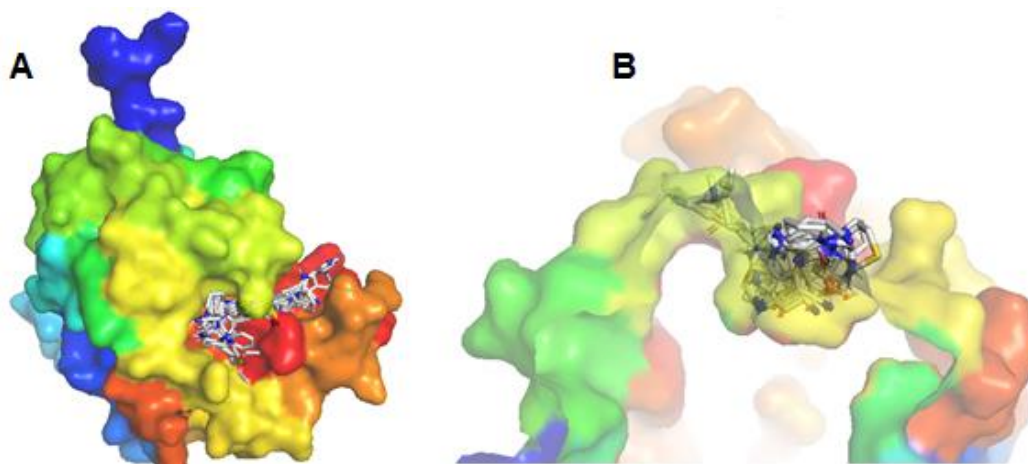
FONTE: Autor, 2022. Gráfico elaborado utilizando-se o *software* Microsoft® Office Excel 2013.

O resíduo Lys⁷⁴ é o segundo aminoácido de maior incidência, onde tem sido observado que interações com este resíduo, que está imediatamente adjacente ao resíduo Asp⁷⁵ do sítio catalítico, podem reduzir a atividade da protease devido à mudança conformacional induzida por um ligante (OTHMAN et al., 2008).

De modo análogo ao observado por Sheikh e colaboradores (2021), os resíduos Leu⁷⁶ e Leu¹⁴⁹, os quais aparecem com uma frequência superior a 40%, formam interações hidrofóbicas com o núcleo indólico, contribuindo para estabilizar o complexo formado (PELLICCIA et al., 2017).

Em relação ao modo de ligação dos compostos no sítio alostérico, verificou-se que todos os derivados analisados se ligam de maneira similar ao sítio alostérico (Figura 34A). Na figura 34B é possível visualizar a parte interna da proteína, evidenciando o modo de interação dos compostos com o sítio alostérico.

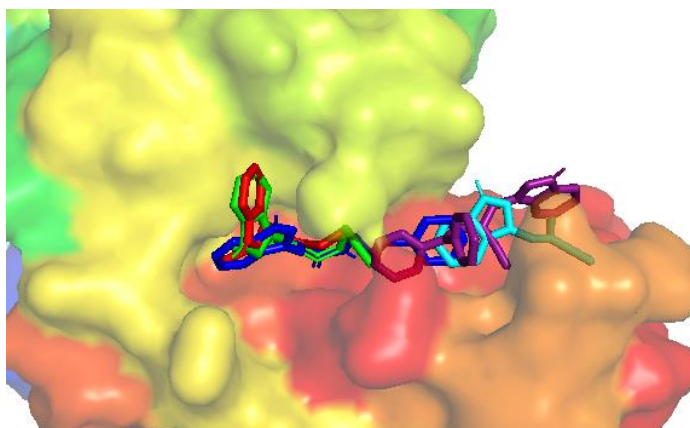
Figura 34 – Cluster dos compostos LRS (01-08, 10-13, 15-19, 20-23 e 25) em complexo com a NS2B-NS3 do DENV no sítio alostérico.



FONTE: Autor, 2022. Em (A), *cluster* formado pelos compostos LRS (01-08, 10-13, 15-19, 20-23 e 25) inseridos no sítio alostérico (bolso hidrofóbico ou *pocket*) da NS2B-NS3 do DENV3 (PDB ID: 3U1I); em (B), visão interna do *cluster* evidenciando a interação do núcleo indólico na parte mais interna do *pocket*. Método de coloração *rainbow*. Ilustração elaborada utilizando-se o software PyMol® v. 0.99.

Além disso, verifica-se que estes compostos apresentam seus núcleos indólicos orientados em direção a parte mais profunda deste bolso hidrofóbico, com exceção dos compostos LRS (03, 08, 13, 20 e 25), nos quais tal região se apresenta na parte mais externa do bolso devido, principalmente, ao tamanho da cadeia lateral (Figura 35).

Figura 35 – visualização dos compostos LRS (03, 08, 13, 20 e 25) inseridos no bolso hidrofóbico da NS2B-NS3 do DENV.

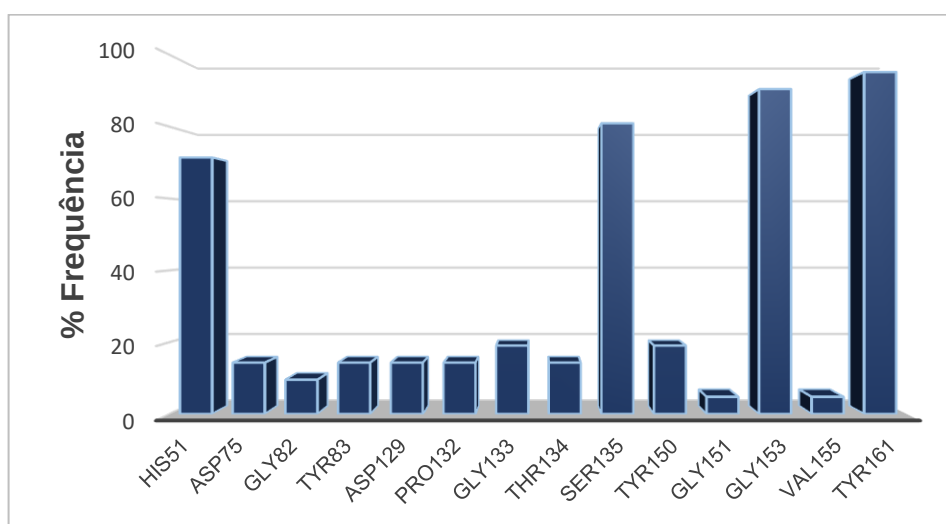


FONTE: Autor, 2022. Em cores: LRS03 (verde), LRS08 (azul), LRS13 (roxo), LRS20 (vermelho) e LRS25 (ciano). Método de coloração *Rainbow*. Ilustração elaborada utilizando-se o software PyMol® v. 0.99.

A presença de duas fenilas no derivado LRS13, evidencia o impedimento da entrada deste no sítio de ligação por ser um grupo mais volumoso. Os compostos LRS (03, 08 e 20) se ligam de modo semelhante. Em ambos, a porção da cadeia alquila ocupa a parte mais interna do bolso alostérico.

A partir do gráfico 3, constata-se que 14 aminoácidos da protease em sua conformação ativa fazem interações com os cianoacrilatos e cianoacrilamidas. Dentre estes, os aminoácidos His⁵¹ (71%), Ser¹³⁵ (80,9%), Gly¹⁵³ (90%) e Tyr¹⁶¹ (95%) são os mais frequentes. Mais de 65% das moléculas analisadas interagem com dois dos três resíduos do sítio catalítico, His⁵¹ e Ser¹³⁵, que são importantes para a atividade da proteína. Outros resíduos, embora menos frequentes, podem ter papel importante para potencializar a atividade inibitória dos compostos.

Gráfico 3 – Frequência de interação de resíduos do sítio ativo da NS2B-NS3 com os acrilatos e acrilamidas.



FONTE: Autor, 2022. Gráfico elaborado utilizando-se o software Microsoft® Office Excel 2013.

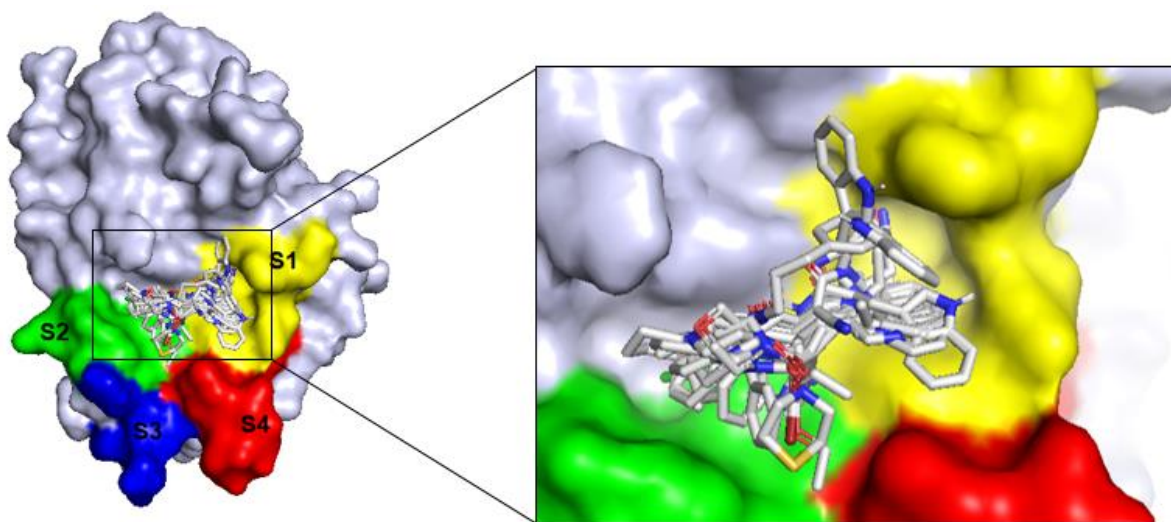
Tem sido verificado que mutações dos resíduos da tríade catalítica (His⁵¹, Asp⁷⁵ e Ser¹³⁵), bem como, de outros resíduos adjacentes a estes, tais como Tyr¹⁵⁰ e a Gly¹⁵¹, pode resultar em perda total, ou parcial da atividade da protease; enquanto que mutações nos resíduos Gly¹³³ e Val¹⁵⁵, sugerem perda moderada (LI; ZHANG; LI, 2017).

Do mesmo modo que observado no trabalho de Steuer e colaboradores (2011), o anel aromático do núcleo indólico ocupa, principalmente, a região do subsítio S1, mantendo interações de empilhamento π - π com o resíduo Tyr¹⁶¹, além de interações

dipolo-dipolo com a Gly¹⁵³ do bolso P1. Vários trabalhos têm relatado a importância de interações com os resíduos Asp¹²⁹, Tyr¹⁵⁰ (GANESH et al., 2005); Gly¹⁵¹, Gly¹⁵³ (TOMLINSON et al., 2009); Pro¹³², Gly¹³³, Thr¹³⁴, Tyr¹⁵⁰ e Tyr¹⁶¹ para a inibição da atividade da protease (VISWANATHAN et al., 2014).

Além da preferência do núcleo indólico pelo subsítio S1, também foi observada a preferência dos grupos fenílicos e das aminas cíclicas pelo subsítio S2 (Figura 36). Este último é caracterizado por ser um ambiente negativamente carregado (também conhecido como cavidade oxoaniônica), conforme tem sido descrito na literatura, permitindo interações eletrostáticas (KNEHANS et al., 2011; STEUER et al., 2011).

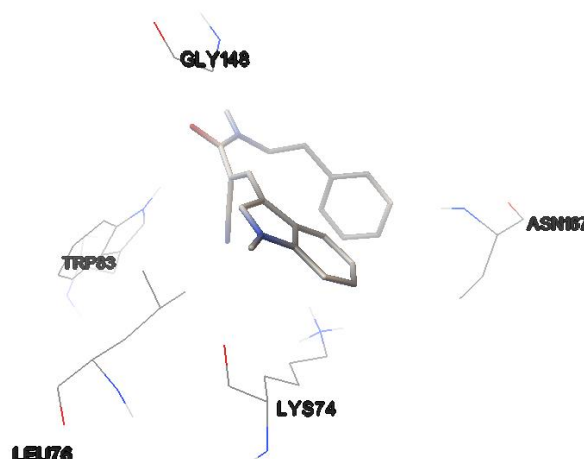
Figura 36 – Visualização do cluster dos compostos em suas correspondentes poses de ligação na interface entre os subsítios S1 e S2 da NS2B-NS3.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o software PyMol® v. 0.99. Em amarelo, subsítio S1; em verde, subsítio S2; em azul, subsítio S3; e em vermelho, subsítio S4.

Iniciando-se pelo composto LRS07, observa-se que este interage com apenas 5 aminoácidos no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV2. Em adição, são observadas interações eletrostáticas apenas entre Trp⁸³ e o grupo ciano do mesmo modo que Asn¹⁶⁷ e o NH do núcleo indólico (Figura 37).

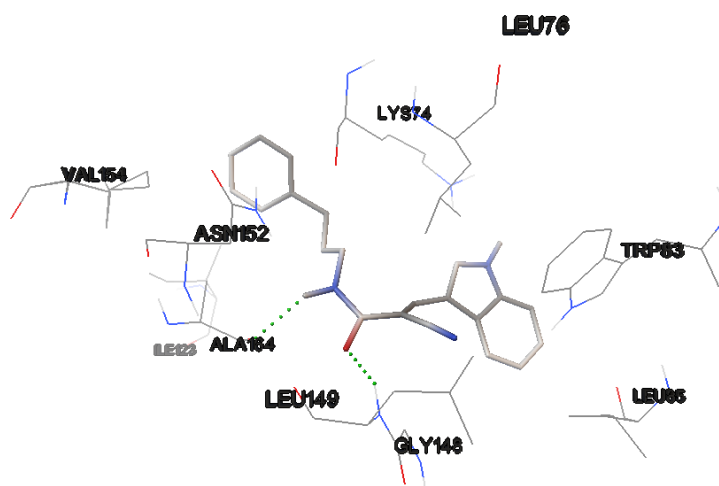
Figura 37 – Interações para o composto LRS07 inserido no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools® v. 1.5.6.

O composto LRS08 difere do LRS07 pela simples adição de um grupo metileno (CH_2), aumentado a cadeia hidrofóbica. Contudo, essa modificação é suficiente para dobrar o número de interações com resíduos de aminoácidos, aumentando o valor de *fitscore*. Adicionalmente, foram observadas a formação de duas ligações de hidrogênio entre o ligante e os resíduos Ala¹⁶⁴ e Leu¹⁴⁸, respectivamente; além de interações do tipo dipolo-dipolo com Asn¹⁵² e Trp⁸³ (Figura 38).

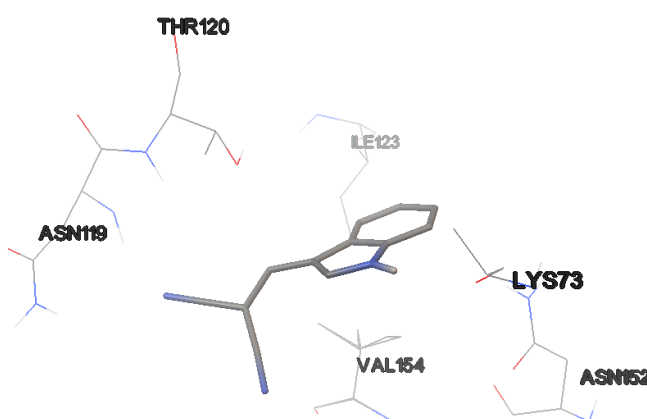
Figura 38 – Interações para o composto LRS08 inserido no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools® v. 1.5.6. As interações de hidrogênio estão representadas como pontos na cor verde.

Por outro lado, o composto LRS25 realiza interações dipolo-dipolo com os resíduos Thr¹²⁰ e Lys⁷³ e interações hidrofóbicas com Lys⁷³, ambas as interações são exclusivas deste composto (Figura 39). Adicionalmente, pode-se sugerir que a interação com estes resíduos não favoreça a estabilidade do complexo; enquanto que outros resíduos ausentes em LRS25, mas presentes em LRS (07-08) como Lys⁷⁴, Leu⁷⁶, Trp⁸³ e Gly¹⁴⁸, podem ser responsáveis por tal estabilidade adicional (PELLICCIA et al., 2017).

Figura 39 – Interações para o composto LRS25 inserido no sítio alostérico da NS2B-NS3 do DENV.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools® v. 1.5.6.

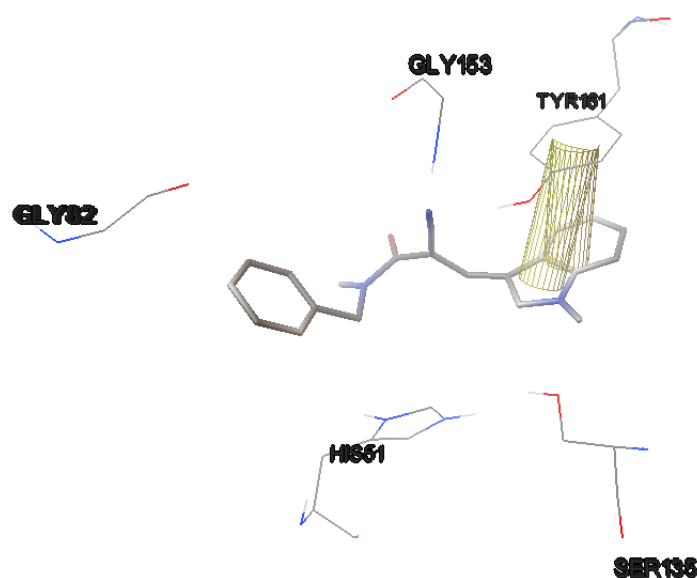
As interações do núcleo indólico com os resíduos Lys⁷⁴, Leu⁷⁶, Trp⁸³ e Asn¹⁶⁷ são particularmente interessantes, uma vez que foram observadas na literatura em compostos indólicos e seus bioisómeros (MILLIES et al., 2019a; PELLICCIA et al., 2017). Entretanto, a presença de uma segunda nitrila está associada à perda da atividade, como foi observado em arilcianoacrilamidas (NITSCHKE; STEUER; KLEIN, 2011).

De maneira geral, é observado que tanto os dois compostos mais potentes, LRS (06-13), como o menos potente, LRS25, frente ao sítio ativo da NS2B-NS3 apresentam interações com poucos resíduos de aminoácidos e interações de empilhamento $\pi-\pi$ entre Tyr¹⁶¹ e o núcleo indólico.

Para o derivado LRS06 é possível observar a interação hidrofóbica deste com a His⁵¹ do sítio catalítico e com a Gly⁸². Assim como observado para os compostos LRS13 e LRS25, onde verifica-se que a Tyr¹⁶¹ forma interações de empilhamento $\pi-\pi$

com grupo indólico. Interessantemente, a Ser¹³⁵ realiza interações dipolo-dipolo com o -NH do anel indólico; enquanto que o grupo ciano forma interações dipolo-dipolo com o resíduo Gly¹⁵³ (Figura 40). Adicionalmente, pode-se sugerir que as interações dipolo-dipolo com esses resíduos favoreçam a estabilidade do complexo.

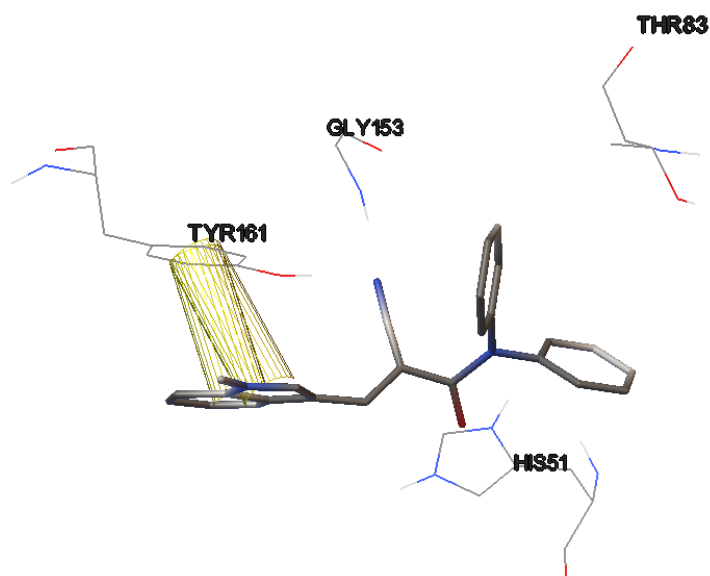
Figura 40 – Interações para o composto LRS06 inserido no sítio ativo da NS2B-NS3 do DENV.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools® v. 1.5.6.

O composto LRS13 apresenta, de forma análoga, os mesmos tipos de interações do composto LRS06 com os mesmos resíduos (Figura 40), exceto pela ausência da interação dipolo-dipolo com a Ser¹³⁵, o que gera uma pequena perda na afinidade do ligante pelo alvo (ver tabela 4). Embora a ausência da Ser¹³⁵ cause perda da afinidade, esta não é muito pronunciada, provavelmente, pela presença da Thr⁸³ que interage hidrofobicamente com o grupamento bifenila.

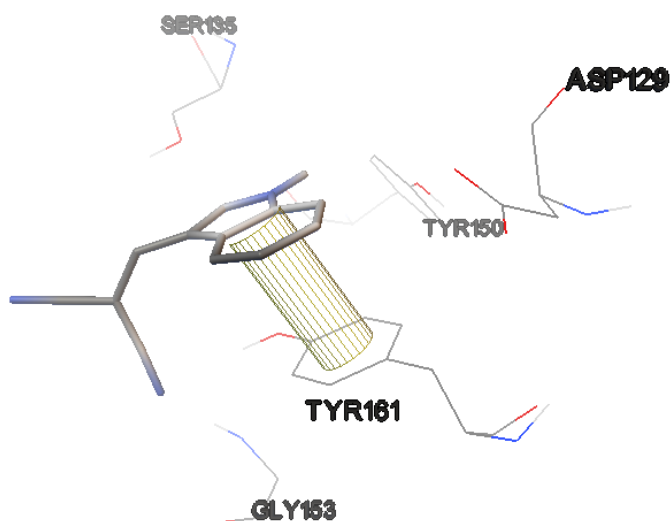
Figura 40 – Interações para o composto LRS13 inserido no sítio ativo da NS2B-NS3 do DENV.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools® v. 1.5.6.

Para o LRS25 é observada a ausência da interação com a His⁵¹ e, como consequência, leva à diminuição da afinidade do composto pelo alvo (ver tabela 3). Diferentemente dos compostos LRS06 e LRS13, a interação de empilhamento $\pi-\pi$ observada para o derivado LRS25 ocorre apenas entre a Tyr¹⁶¹ e o ciclo de 5 membros do núcleo indólico, influenciando o valor da energia de afinidade e FitScore (Figura 41). Interessantemente, apesar de apresentar os resíduos de aminoácidos Tyr¹⁵⁰ e Asp¹²⁹, que são ausentes em LRS06 e LRS13, estes não contribuem significativamente para estabilidade deste complexo. Além disso, nota-se também que a presença de um segundo grupo ciano não tem influência na afinidade do ligante pelo alvo, visto que o segundo grupo ciano aparentemente está mais livremente localizado, não estando envolvido em nenhum tipo de interação.

Figura 41 – Interações para o composto LRS25 inserido no sítio ativo da NS2B-NS3 do DENV.



FONTE: Autor, 2022. Ilustração elaborada utilizando-se o *software* AutoDock Tools® v. 1.5.6.

O modo de interação dos compostos LRS06, LRS13 e LRS25, destacando principalmente o núcleo indólico no bolso S1, tem estado associado a inibidores potentes da protease flaviviral (KNEHANS et al., 2011; LIU et al., 2014; STEUER et al., 2011). Além disso, a interação com a Tyr¹⁶¹ e com a Gly¹⁵³ tem sido observada em trabalhos com compostos indólicos que apresentaram valores de $IC_{50} < 3 \mu M$ (BOLLATI et al., 2010; LIU et al., 2014).

Em relação aos compostos LRS06 e LRS08, estes apresentam basicamente as mesmas energias de afinidade e FitScore, com uma diferença muito pequena na estrutura de ambos, quando comparados. O composto LRS06 tem $-8,7$ kcal/mol e $47,72$, enquanto LRS08 apresentou $-8,6$ kcal/mol e $49,87$, como valores de E_A e FitScore, respectivamente (ver tabela 3). Desse modo, a interação entre os compostos mencionados e o alvo pode ser numericamente considerada a mesma para avaliar as interações envolvendo a proteína e estes compostos.

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

Esta etapa do estudo foi realizada por meio da parceria com a doutoranda Hannah Maus do instituto de ciências farmacêuticas e biomédicas da Universidade

Johannes Gutenberg, em Mainz na Alemanha, que gentilmente aceitou fazer parte colaborar com este projeto de pesquisa.

De todos os análogos sintetizados, os compostos LRS (01-08, 17, 18, 20, 23, 25) foram avaliados quanto aos seus respectivos potenciais como inibidores da protease NS2B-NS3 do ZIKV e DENV-2. Durante esta etapa os compostos foram testados em uma concentração fixa de 20 μ M.

Todos os resultados obtidos e, posteriormente, analisados foram agrupados na tabela 5. Além disso, a relação estrutura-atividade (REA) foi profundamente discutida para todos os compostos da tabela.

Tabela 5 – Atividade inibitória das cianoacrilamidas LRS (01-08, 17, 18, 20, 23, 25) frente à protease NS2B-NS3 dos vírus Zika e Dengue.

Código	NS2B-NS3 (20 μ M)	
	ZIKV %inibição $\pm$ D.P.	DENV %inibição $\pm$ D.P.
LRS01	20 $\pm$ 3	27 $\pm$ 1
LRS02	20 $\pm$ 5	26 $\pm$ 2
LRS03	17 $\pm$ 3	22 $\pm$ 4
LRS04	26 $\pm$ 8	25 $\pm$ 4
LRS05	25 $\pm$ 2	21 $\pm$ 4
LRS06	22 $\pm$ 4	23 $\pm$ 3
LRS07	22 $\pm$ 4	20 $\pm$ 3
LRS08	26 $\pm$ 4	19 $\pm$ 3
LRS17	0 $\pm$ 3	0 $\pm$ 7
LRS18	18 $\pm$ 7	15 $\pm$ 5
LRS20	11 $\pm$ 4	11 $\pm$ 3
LRS23	17 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2
LRS25	16 $\pm$ 1	12 $\pm$ 2

Fonte: Autor, 2022. Ensaios realizados em triplicatas.

Em geral, todos os derivados apresentaram baixa atividade inibitória, com exceção do análogo LRS17 que foi completamente inativo. Os derivados LRS 01, LRS02 e LRS04 diferem apenas na quantidade de carbonos da cadeia alquila de modo que nenhum efeito significativo foi observado com o aumento de carbonos. O composto LRS03 possui o grupo isopropila, apresentando a menor inibição quando

comparado com os outros acrilatos LRS01, LRS02 e LRS04. Observou-se que, embora a diferença não seja significativa, o potencial inibidor dos compostos LRS (01-03) é maior frente à protease do DENV. Por outro lado, a atividade inibitória do LRS 04 se mantém na mesma faixa frente a ambos os alvos.

Os análogos contendo o grupo amida com uma cadeia alquila ligada ao anel benzênico LRS (05-08), apresentam melhor atividade inibitória frente ao ZIKV, quando comparado aos compostos LRS (01-03) do que contra o DENV. Porém, a porcentagem de inibição do DENV se mantém próximo de 20% para.

Em contraste, os compostos LRS (17, 18, 20, 23 e 25) apresentam, em geral, os menores valores de inibição de ambos os vírus. É importante notar que tais compostos apresentam o grupo amida, como nos análogos LRS (05-08), mas são desprovidos do anel aromático e, com exceção do LRS17 e LRS18, os demais possuem cadeia cíclica com 2 ou mais grupos $-CH_2-$, o que supõe que o grupo amida sozinho é insuficiente para melhorar a atividade inibitória. Portanto, os resultados sugerem que a atividade inibitória dos compostos está associada à presença de uma cadeia hidrofóbica e à presença de uma amida com cadeia lateral aromática. Assim, uma amida aromática e uma cadeia alquila não ramificada com até quatro carbonos podem ser considerados como sendo os substituintes mais promissores nesta série de compostos.

5.7.3 Determinação de parâmetros físico-químicos

Com a finalidade de obter informações adicionais sobre algumas propriedades físico-químicas dos compostos sintetizados, realizou-se uma análise de todos eles na plataforma SwissADME, disponível gratuitamente. Dentre os parâmetros determinados pela plataforma, dois deles foram examinados, sendo lipofilicidade e solubilidade em água.

A lipofilicidade é um parâmetro importante, visto que descreve a habilidade de uma molécula em atravessar membranas lipídicas. Tal propriedade pode afetar a taxa e a extensão da absorção de um fármaco, podendo impactar diretamente a sua biodisponibilidade oral. Assim, o valor de $\log P_{o/w}$ não pode ser muito alto porque dificultaria a dissolução deste em meio aquoso (trato gastrointestinal - TGI e no plasma), dificultando sua distribuição. Por outro lado, um valor muito baixo de $\log P_{o/w}$

pode implicar em uma baixa absorção, como consequência da alta hidrosolubilidade do composto, resultando em baixa permeabilidade pelas membranas lipídicas e maior excreção. Assim, são preferíveis valores de lipofilicidade entre 0 e 3, sendo mais provável que exista um bom balanço entre permeabilidade e solubilidade nessa faixa. O valor de $\log P$ é determinado pelo coeficiente de partição (P) de uma substância entre uma fase aquosa e uma fase orgânica (lipídica) (GARETH, 2013).

O segundo parâmetro, solubilidade em água (LogS), é uma das propriedades-chaves de moléculas e de grande interesse na química medicinal, haja visto que a solubilidade de compostos ativos afeta de modo significativo a sua absorção e distribuição em meio biológico, afetando assim sua eficácia. Dito isso, a solubilidade mensura a habilidade de uma molécula ser distribuída dentro de um organismo biológico. A maioria dos fármacos (cerca de 85%), tem LogS entre -1 e -5 , de modo que, valores dentro desta faixa são satisfatórios, embora valores inferiores a -2 sejam preferíveis (GARETH, 2013). Por fim, a tabela 6 apresenta os valores de lipofilicidade ($\text{Log } P_{o/w}$) e solubilidade (LogS (ESOL)) obtidos através da web-ferramenta SwissADME.

Tabela 6 – Propriedades físico-químicas dos compostos LRS (01-08, 17, 20, 21, 23 e 25).

Código	LogP_{w/o}	LogS (ESOL)
LRS01	1,97	-2,86
LRS02	2,32	-3,09
LRS03	2,97	-3,65
LRS04	2,62	-3,42
LRS05	2,94	-4,25
LRS06	2,86	-3,86
LRS07	3,15	-4,15
LRS08	3,46	-4,38
LRS17	0,29	-2,40
LRS20	1,67	-2,64
LRS21	2,22	-3,25
LRS23	2,36	-3,33
LRS25	1,87	-2,69
LRS26	2,75	-4,44
LRS27	3,80	-4,68
LRS28	2,95	-3,92

Fonte: Autor, 2022. SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>).

A partir da análise da tabela 5, nota-se que todos os compostos, com exceção dos LRS (07, 08 e 27) apresentam valores de LogP entre 0 e 3, sugerindo que eles apresentam boa permeabilidade em membranas biológicas. Os valores de LogS também estão na faixa desejada, com valores maiores que -5 e menores do que -2. Assim, os compostos sintetizados já apresentam algumas propriedades de fármacos, de modo que novas modificações estruturais podem ser feitas apenas para melhorar a atividade inibitória, desde que tais modificações não causem alterações significativas nos valores de LogP e logS.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Foram sintetizados 26 com rendimentos entre 30 e 98%. Em geral, verificou-se, por meio de docking molecular, que as cianoacrilamidas derivadas de aminas aromáticas LRS (05-13) apresentam maior afinidade tanto pela protease NS2B-NS3 como pela proteína E flaviviral, enquanto que os cianoacrilatos LRS (01-04) e os compostos derivados de aminas não aromáticas, cíclicas ou alifáticas LRS15, LRS (17-23), apresentaram afinidades mais baixas por tais alvos. Quanto à adição de uma segunda nitrila, observou-se que esta não é vantajosa frente a qualquer um dos dois alvos.

Apesar da suposição inicial da interação entre o grupo ciano e o resíduo Ser¹³⁵ do sítio catalítico da protease flaviviral, neste trabalho constatou-se que este realiza interações dipolo-dipolo preferencialmente com o NH do núcleo indólico, enquanto que o grupo ciano interage principalmente com a Gly¹⁵³. Contudo, essa mudança na interação dos resíduos com os compostos pode contribuir para estabilizar o complexo ligante/proteína.

Todos os compostos, com exceção do LRS 17 apresentaram alguma atividade frente à protease NS2B-NS3 do ZIKV e do DENV. Além disso, apenas o LRS25 apresentou perfil citotóxico na concentração de 20 μ M e todos apresentaram bons valores de LogS.

Os derivados mais promissores, LRS04 e LRS08, foram posteriormente utilizados para a síntese dos análogos LRS (43-48) e LRS (26-31), respectivamente. Embora tais compostos não tenham sido avaliados quanto a citotoxicidade e atividade biológica, espera-se que tais derivados apresentem melhor atividade anti-ZIKV e anti-DENV, visto que várias substituições da cadeia lateral foram realizadas, mas o potencial antiviral não foi alcançado.

Adicionalmente, após confirmados os resultados positivos da atividade anti-flaviviral dos demais compostos sintetizados, estes serão utilizados para guiar novas modificações estruturais, principalmente substituições do hidrogênio do núcleo indólico por outros fragmentos ou grupos farmacofóricos.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M.; PADMANABHAN, R. De Novo Synthesis of RNA by the Dengue Virus RNA-dependent RNA Polymerase Exhibits Temperature Dependence at the Initiation but Not Elongation Phase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39926–39937, 2001.
- AGUILERA-PESANTES, D. et al. Discovering key residues of dengue virus NS2b-NS3-protease: New binding sites for antiviral inhibitors design. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 492, n. 4, p. 631–642, 28 out. 2017.
- AL-ALIMI, A. A. et al. Dengue Virus Type 2 (DENV2)-Induced Oxidative Responses in Monocytes from Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD)-Deficient and G6PD Normal Subjects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 3, p. e2711, 13 mar. 2014.
- ASSAID, N. et al. Serological evidence of West Nile virus infection in human populations and domestic birds in the Northwest of Morocco. v. 76, n. March, 2021.
- AZEVEDO COSTA, E. et al. West Nile virus detection in horses in three Brazilian states. **bioRxiv**, p. 2021.01.06.425363, 2021.
- BALTINA, L. A. et al. Antiviral activity of glycyrrhizic acid conjugates with amino acid esters against Zika virus. v. 294, n. March 2020, p. 1–9, 2021.
- BARRAZA, S. J. et al. Synthesis and biological activity of conformationally restricted indole-based inhibitors of neurotropic alphavirus replication: Generation of a three-dimensional pharmacophore. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 46, n. February, p. 128171, 2021.
- BEHNAM, M. A. M.; KLEIN, C. D. P. Conformational selection in the flaviviral NS2B-NS3 protease. **Biochimie**, v. 174, p. 117–125, 2020.
- BHARDWAJ, U. et al. Gist of Zika Virus pathogenesis. **Virology**, v. 560, n. February, p. 86–95, 2021.

BOLLATI, M. et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. **Antiviral Research**, v. 87, n. 2, p. 125–148, 2010.

BORISKIN, Y. et al. Arbidol: A Broad-Spectrum Antiviral Compound that Blocks Viral Fusion. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 997–1005, 2008.

BRITO, W. A. DE et al. Development and Validation of HPLC-DAD and UHPLC-DAD Methods for the Simultaneous Determination of Guanyldihydrazone Derivatives Employing a Factorial Design. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 9, p. 1–15, 2017.

CANNALIRE, R. et al. Broad spectrum anti- flavivirus pyridobenzothiazolones leading to less infective virions. v. 167, n. March, p. 6–12, 2019a.

CANNALIRE, R. et al. Broad spectrum anti-flavivirus pyridobenzothiazolones leading to less infective virions. **Antiviral Research**, v. 167, n. March, p. 6–12, 2019b.

CARVALHO, V. L.; LONG, M. T. Insect-Specific Viruses: An overview and their relationship to arboviruses of concern to humans and animals. **Virology**, v. 557, n. September 2020, p. 34–43, 2021.

CHAPPELL, K. et al. West Nile Virus NS2B/NS3 Protease As An Antiviral Target. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 27, p. 2771–2784, 2008.

CHEN, L. et al. Antiviral activity of peptide inhibitors derived from the protein E stem against Japanese encephalitis and Zika viruses. v. 141, 2017.

CHEN, L. H.; HAMER, D. H. Zika Virus: Rapid spread in the western hemisphere. **Annals of Internal Medicine**, v. 164, n. 9, p. 613–615, 2016.

CHINTHAKINDI, P. K. et al. Targeting the NS2B-NS3 protease of tick-borne encephalitis virus with pan-flaviviral protease inhibitors Anja Sandstr o. v. 190, n. December 2020, 2021.

COBURN, C. A. et al. Discovery of MK-8742: An HCV NS5A inhibitor with broad genotype activity. **ChemMedChem**, v. 8, n. 12, p. 1930–1940, 2013.

CUMBERWORTH, S. L. et al. Inhibition of type I interferon induction and signalling by mosquito-borne flaviviruses. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 1–8, 2017.

DA FONSECA, N. J. et al. Sequence, structure and function relationships in flaviviruses as assessed by evolutive aspects of its conserved non-structural protein domains. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 492, n. 4, p. 565–571, 2017.

DE WISPELAERE, M. et al. Inhibition of Flaviviruses by Targeting a Conserved Pocket on the Viral Envelope Protein. **Cell Chemical Biology**, v. 25, n. 8, p. 1006- 1016.e8, 2018.

DEY, D. et al. Structural and biochemical insights into flavivirus proteins. **Virus Research**, v. 296, n. November 2020, p. 198343, 2021.

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

EDGERTON, S. V. et al. Evolution and epidemiologic dynamics of dengue virus in Nicaragua during the emergence of chikungunya and Zika viruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 92, n. November 2020, p. 104680, 2021.

EL COSTA, H. et al. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. **Scientific Reports**, v. 6, n. September, p. 1–9, 2016.

ERLANSON, D. A.; DAVIS, B. J.; JAHNKE, W. Fragment-Based Drug Discovery: Advancing Fragments in the Absence of Crystal Structures. **Cell Chemical Biology**, v. 26, n. 1, p. 9–15, 2019.

FELICETTI, T. et al. Sustainable, three-component, one-pot procedure to obtain active anti-flavivirus agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 210, p. 112992, jan. 2021.

GANESH, V. K. et al. Identification and characterization of nonsubstrate based inhibitors of the essential dengue and West Nile virus proteases. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 257–264, 2005.

GARCIA, L. P. et al. Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com medicamentos. **Discussion Papers**, 2011.

GARETH, T. **Medicinal Chemistry: An Introduction**. 2^a ed. [s.l.] Wiley-Interscience, 2013.

GUARNER, J.; HALE, G. L. Four human diseases with significant public health impact caused by mosquito-borne flaviviruses: West Nile, Zika, dengue and yellow fever. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 170–176, 2019.

HAMMAMI, S.; BEN HASSINE, T. **Emergent mosquito-borne flaviviruses and animal diseases**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

HAN, L. et al. Anti- flavivirus activity of polyoxometalate. v. 179, n. May, 2020.

HENGPHASATPORN, K. et al. Multiple virtual screening strategies for the discovery of novel compounds active against dengue virus: A hit identification study. **Scientia Pharmaceutica**, v. 88, n. 1, 2020.

HOSSAIN, S. et al. Immunoinformatics approach to designing a multi-epitope vaccine against Saint Louis Encephalitis Virus. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 22, p. 100500, 2021.

IANI, F. C. M. et al. Epidemiology and evolution of Zika virus in Minas Gerais, Southeast Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 91, n. February, p. 1–7, 2021.

ISHIKAWA, T.; YAMANAKA, A.; KONISHI, E. A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. **Vaccine**, v. 32, n. 12, p. 1326–1337, 2014.

ISLAM, R. et al. Delineating blueprint of an epitope-based peptide vaccine against the multiple serovars of dengue virus: A hierarchical reverse vaccinology approach. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 20, p. 100430, 2020.

ISSUR, M. et al. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. **Rna**, v. 15, n. 12, p. 2340–2350, 2009.

JAMAL SABIR, M.; BINT SAUD AL-SAUD, N.; MOHMOUD HASSAN, S. Dengue and Human Health: A Global Scenario of its Occurrence, Diagnosis and Therapeutics. **Saudi Journal of Biological Sciences**, n. xxxx, 2021.

KHEIRALLAH, K. A. et al. Prioritizing zoonotic diseases utilizing the One Health approach: Jordan's experience. **One Health**, v. 13, n. April, 2021.

KIRSCH, P. et al. Concepts and Core Principles of Fragment-Based Drug Design. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4309, 26 nov. 2019.

KNEHANS, T. et al. Structure-guided fragment-based in silico drug design of dengue protease inhibitors. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 25, n. 3, p. 263–274, 2011.

KÜHL, N. et al. 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**, v. 63, n. 15, p. 8179–8197, 2020.

KUMAR, A.; VOET, A.; ZHANG, K. Y. J. Fragment Based Drug Design: From Experimental to Computational Approaches. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 30, p. 5128–5147, 2012.

LEATHERBARROW, R. J. **GraFit 6** West Sussex Erithacus Software Limited: East Grinstead, , 2007.

LI, J. et al. Development of a replicon cell line-based high throughput antiviral assay for screening inhibitors of Zika virus. v. 150, n. August 2017, p. 148–154, 2018.

LI, P. C. et al. Small Molecules Targeting the Flavivirus e Protein with Broad-Spectrum Activity and Antiviral Efficacy in Vivo. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, p. 460–472, 2019.

LI, Z.; ZHANG, J.; LI, H. **Flavivirus NS2B/NS3 protease: Structure, function, and inhibition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

LIAN, W. et al. Discovery of Immunologically Inspired Small Molecules That Target the Viral Envelope Protein. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 9, p. 1395–1406, 2018.

LIMA, C. S. et al. Flavonoids from *Pterogyne nitens* as Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 109, n. January, 2021.

LIU, H. et al. Identification of novel thiadiazoloacrylamide analogues as inhibitors of dengue-2 virus NS2B/NS3 protease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 22, p. 6344–6352, 2014.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55–64, 2014.

MACLACHLAN, N. J. et al. Chapter 29 – Flaviviridae. **Fenner's Veterinary Virology**, p. 525–545, 2017.

MAUS, H. et al. SAR of novel benzothiazoles targeting an allosteric pocket of DENV and ZIKV NS2B/NS3 proteases. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 47, n. August, p. 116392, 2021a.

MAUS, H. et al. SAR of novel benzothiazoles targeting an allosteric pocket of DENV and ZIKV NS2B/NS3 proteases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 116392, out. 2021b.

MENG, X. Y., ZHANG, H. X., MEZEI, M., & CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. Current computer-aided drug design. **Current Computer Aided Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011.

MESSINA, J. P. et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1508–1515, 2019.

MILLER, S. et al. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8873–8882, 2007.

MILLIES, B. et al. Proline-Based Allosteric Inhibitors of Zika and Dengue Virus NS2B/NS3 Proteases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 24, p. 11359–11382, 2019a.

MILLIES, B. et al. Proline-Based Allosteric Inhibitors of Zika and Dengue Virus NS2B/NS3 Proteases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 24, p. 11359–11382, 26 dez. 2019b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 14, 2021. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 14, p. 1–24, 2021.

MODY, A. et al. Variations in West Nile Virus neuroinvasive infection: A case series of three patients in West Phoenix. **IDCases**, v. 24, p. e01066, 2021.

MUKHAMETOV, A. et al. Allosteric pocket of the dengue virus (serotype 2) NS2B/NS3 protease: In silico ligand screening and molecular dynamics studies of inhibition. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 52, p. 103–113, jul. 2014.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.

MURUGESAN, A.; MANOHARAN, M. **Dengue virus**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (denv-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67–70, 2015.

NITSCHKE, C. et al. Biochemistry and medicinal chemistry of the dengue virus protease. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 22, p. 11348–11381, 2014.

NITSCHKE, C.; STEUER, C.; KLEIN, C. D. Arylcianoacrylamides as inhibitors of the Dengue and West Nile virus proteases. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 24, p. 7318–7337, 2011.

NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; DAMONTE, E. B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. v. 66, p. 103–110, 2005.

OLIVEIRA, A. F. C. DA S. et al. Zirconium catalyzed synthesis of 2-arylidene Indan-1,3-diones and evaluation of their inhibitory activity against NS2B-NS3 WNV protease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 149, p. 98–109, 2018.

ONO, L. et al. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). v. 60, p. 201–208, 2003.

OTHMAN, R. et al. Docking of noncompetitive inhibitors into dengue virus type 2 protease: Understanding the interactions with allosteric binding sites. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 8, p. 1582–1591, 2008.

OTTE, J.; PICA-CIAMARRA, U. Emerging infectious zoonotic diseases: The neglected role of food animals. **One Health**, v. 13, 1 dez. 2021.

PACCA, C. C. **BUSCA DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL CONTRA OS VIRUS DA FEBRE AMARELA E ENCEFALITE DE SAINT LOUIS**. [s.l.] Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 2013.

PAHO; OMS. **Cases of Zika Virus Disease**. Disponível em: <https://www3.paho.org/data/index.php/en/?option=com_content&view=article&id=524:zika-weekly-en&Itemid=352>. Acesso em: 23 jan. 2022.

PAHO/WHO. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html?start=2>>. Acesso em: 23 jan. 2022.

PAPA, A. et al. West Nile fever upsurge in a Greek regional unit. **Acta Tropica**, p. 106010, 2021.

PAYNE, S. Family Flaviviridae. **Viruses**, p. 129–139, 2017.

PELLICCIA, S. et al. Inhibition of dengue virus replication by novel inhibitors of RNA-dependent RNA polymerase and protease activities. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 1091–1101, 2017.

PERERA, R.; KHALIQ, M.; KUHN, R. J. Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. **Antiviral Research**, v. 80, n. 1, p. 11–22, 2008.

PITTS, J. et al. Identification of small molecule inhibitors targeting the Zika virus envelope protein. **Antiviral Research**, v. 164, n. December 2018, p. 147–153, 2019a.

PITTS, J. et al. Identification of small molecule inhibitors targeting the Zika virus envelope protein. **Antiviral Research**, v. 164, n. December 2018, p. 147–153, 2019b.

PRETO, C. et al. Vaccination coverage and adherence to a dengue vaccination program in the state of Paraná, Brazil. **Vaccine**, v. 39, n. 4, p. 711–719, 2021.

QI, Y. et al. Anti-flavivirus activity of polyoxometalate. **Antiviral Research**, v. 179, n. January, 2020.

QIU, H. et al. Discovery of potent, highly selective covalent irreversible BTK inhibitors from a fragment hit. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 17, p. 2939–2944, 2018.

RAI, P. et al. Molecular investigation of the dengue outbreak in Karnataka, South India, reveals co-circulation of all four dengue virus serotypes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 92, n. April, p. 104880, 2021.

RASSIAS, G. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Cell-active carbazole derivatives as inhibitors of the zika virus protease. v. 180, p. 536–545, 2019.

REY, F. A. et al. The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. **EMBO reports**, v. 19, n. 2, p. 206–224, 2018.

RYU, W.-S. Flaviviruses. In: **Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 165–175.

SADEGHIEH, T. et al. Yellow fever virus outbreak in Brazil under current and future climate. **Infectious Disease Modelling**, v. 6, p. 664–677, 2021.

SAMPATH, A.; PADMANABHAN, R. **Molecular targets for flavivirus drug discovery** **Antiviral Research**, 2009.

SAUR, M. et al. Fragment-based drug discovery using cryo-EM. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 3, p. 485–490, 2020.

SCHMIDT, A. G. et al. Small-molecule inhibitors of dengue-virus entry. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002627, 5 abr. 2012.

SHAH, P. S. et al. Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. **Cell**, v. 175, n. 7, p. 1931-1945.e18, 2018a.

SHAH, P. S. et al. Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. **Cell**, v. 175, n. 7, p. 1931-1945.e18, 2018b.

SHI, Y.; GAO, G. F. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 6, p. 443–456, 2017.

SILVA, S. J. R. DA; MAGALHÃES, J. J. F. DE; PENA, L. Simultaneous Circulation of DENV, CHIKV, ZIKV and SARS-CoV-2 in Brazil: an Inconvenient Truth. **One Health**, v. 12, n. December 2020, p. 2020–2022, 2021.

SILVA-JÚNIOR, E. F. DE. **SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS DUAIS FRENTE ÀS ENZIMAS NS2B-NS3 DOS VÍRUS DENGUE E ZIKA E NSP2 DO VÍRUS CHIKUNGUNYA (Volume I)**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2019.

SINDAC, J. A. et al. Optimization of novel indole-2-carboxamide inhibitors of neurotropic alphavirus replication. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 9222–9241, 2013.

SOLOMON, T.; MALLEWA, M. Emerging viral diseases. **Medicine**, v. 33, n. 7, p. 14–15, 2005.

STEUER, C. et al. Synthesis and biological evaluation of α -ketoamides as inhibitors of the Dengue virus protease with antiviral activity in cell-culture. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 4067–4074, 2011.

STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus membrane fusion. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 10, p. 2755–2766, 2006.

THARAPPEL, A. M. et al. Castanospermine reduces Zika virus infection-associated seizure by inhibiting both the viral load and inflammation in mouse models. v. 183, n. September, 2020.

TOMLINSON, S. M. et al. Structure-based discovery of dengue virus protease inhibitors. **Antiviral Research**, v. 82, n. 3, p. 110–114, 2009.

VASILENKO, D. A. et al. Tick-borne flavivirus reproduction inhibitors based on isoxazole core linked with adamantane. **Bioorganic Chemistry**, v. 87, n. March, p. 629–637, 2019.

VISWANATHAN, U. et al. Identification of a Novel Inhibitor of Dengue Virus Protease through Use of a Virtual Screening Drug Discovery Web Portal. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 10, p. 2816–2825, 2014.

VOSS, S.; NITSCHKE, C. Inhibitors of the Zika virus protease NS2B-NS3. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 5, p. 126965, 2020.

WANG, Z. Z. et al. Fragment-based drug design facilitates selective kinase inhibitor discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 42, n. 7, p. 551–565, 2021.

WILSON, D. M. et al. Fragment- and structure-based drug discovery for developing therapeutic agents targeting the DNA Damage Response. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 163, p. 130–142, 2021.

WISPELAERE, M. DE et al. Inhibition of Flaviviruses by Targeting a Conserved Pocket on the Viral Envelope Protein. **Cell Chemical Biology**, v. 25, n. 8, p. 1006- 1016.e8, ago. 2018.

XIAO, X. et al. Design, synthesis and bioevaluation of novel 2,3-dihydro-1H-inden-1-amine derivatives as potent and selective human monoamine oxidase B inhibitors based on rasagiline. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 588–593, 2018.

YANG, C. C. et al. A novel flavivirus entry inhibitor, BP34610, discovered through high-throughput screening with dengue reporter viruses **Antiviral Research**, 2019.

YAO, Y. et al. Discovery, X-ray Crystallography and Antiviral Activity of Allosteric Inhibitors of Flavivirus NS2B-NS3 Protease. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 17, p. 6832–6836, 2019.

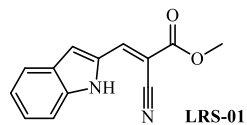
YURIEV, E.; AGOSTINO, M.; RAMSLAND, P. A. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. **Journal of Molecular Recognition**, v. 24, n. 2, p. 149–164, 2011.

ZHANG, M. Z.; CHEN, Q.; YANG, G. F. A review on recent developments of indole-containing antiviral agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 421–441, 2015.

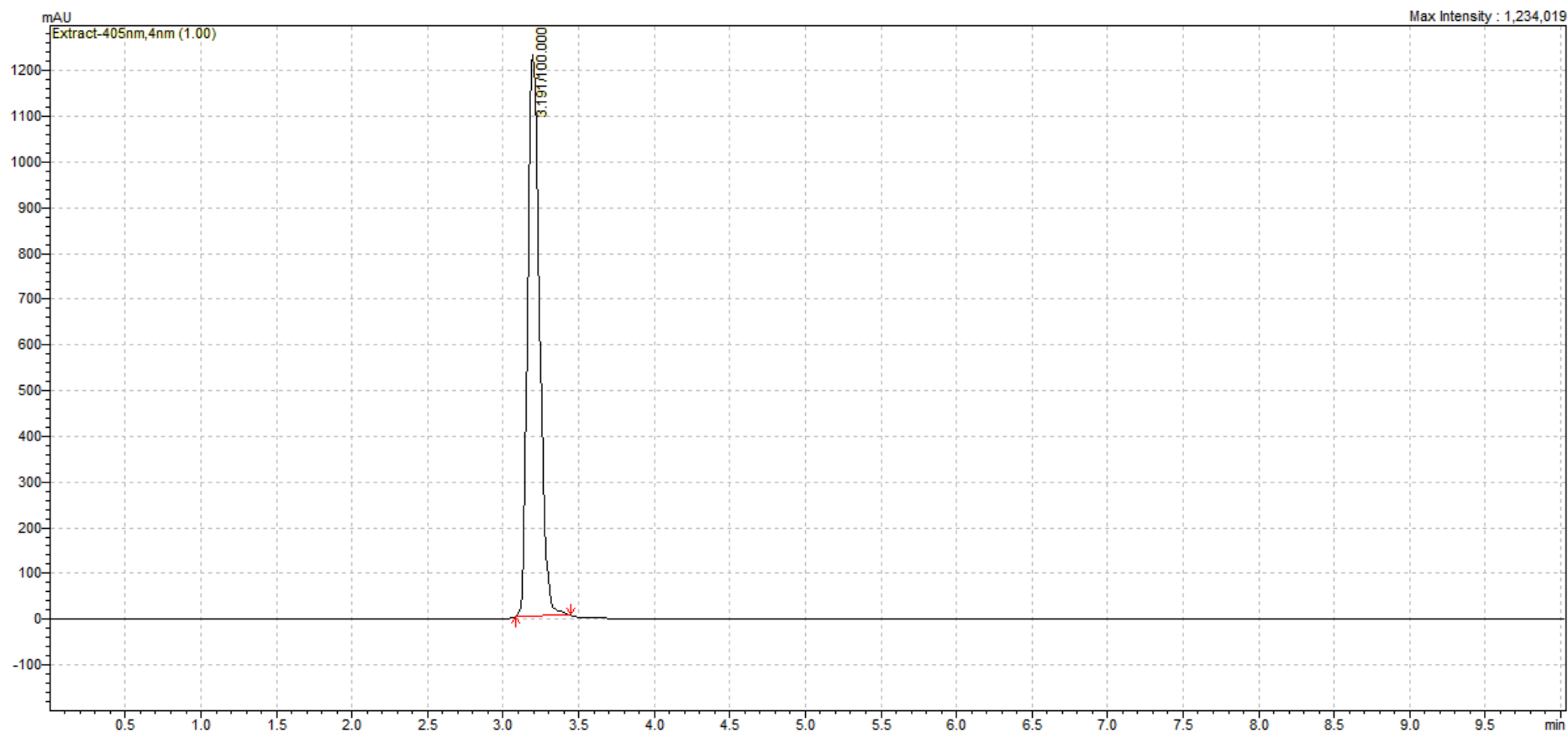
ZHANG, X. et al. Structures and functions of the envelope glycoprotein in flavivirus infections. **Viruses**, v. 9, n. 11, p. 1–14, 2017.

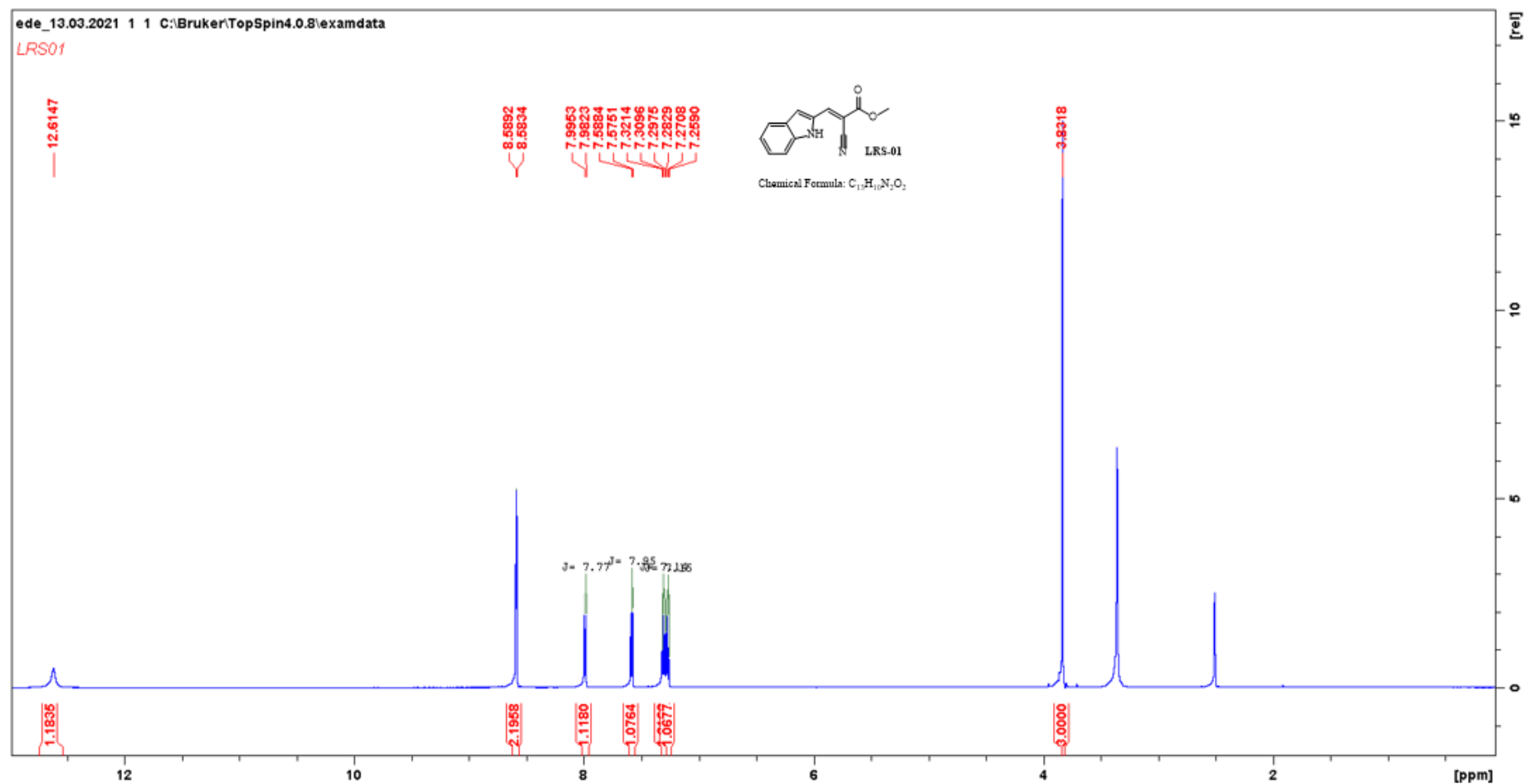
ZHOU, D. et al. Rapid and simultaneous detection of Japanese encephalitis virus by real-time nucleic acid sequence-based amplification. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, n. December 2020, p. 104724, 2021.

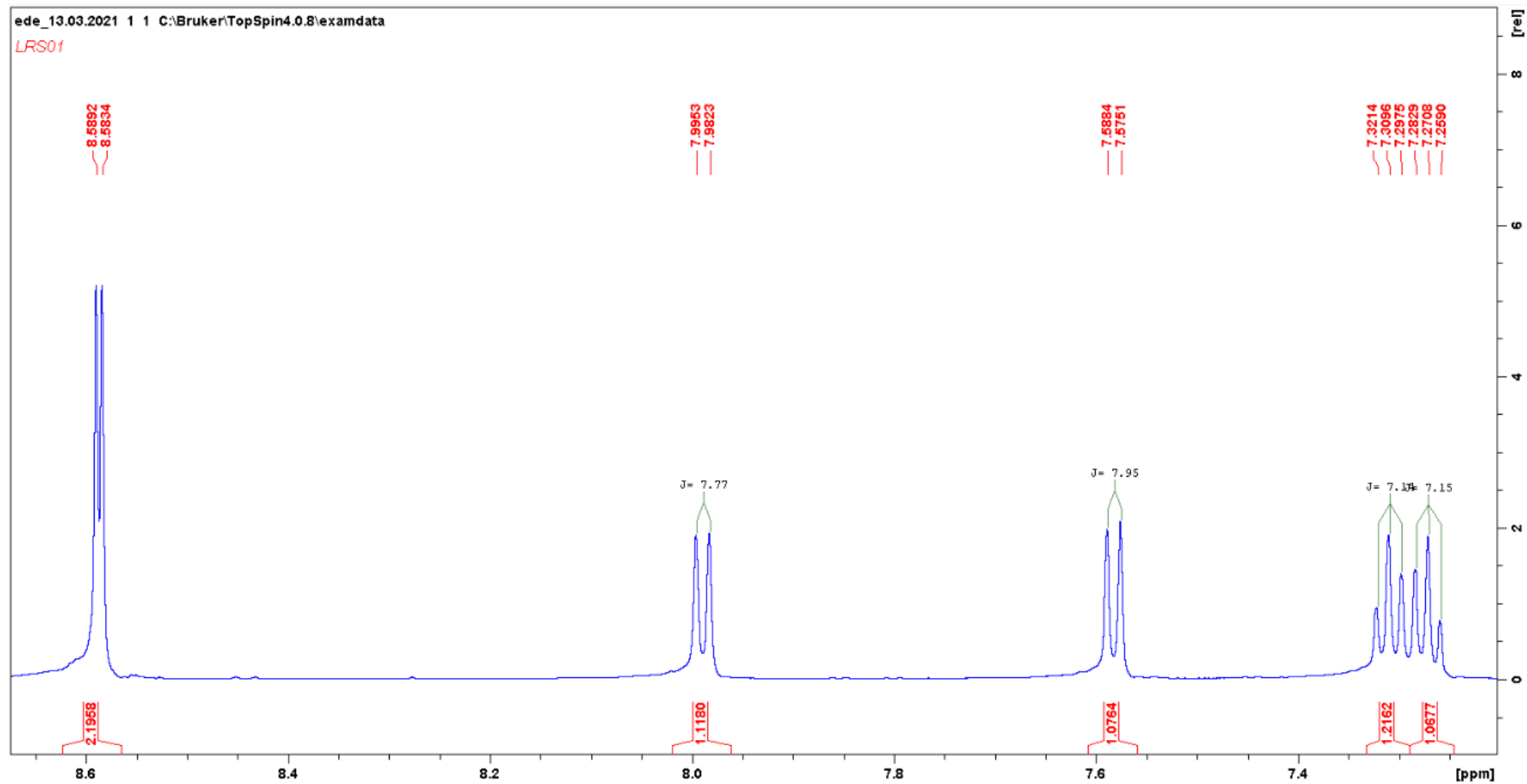
ANEXO A – Caracterização estrutural dos compostos sintetizados

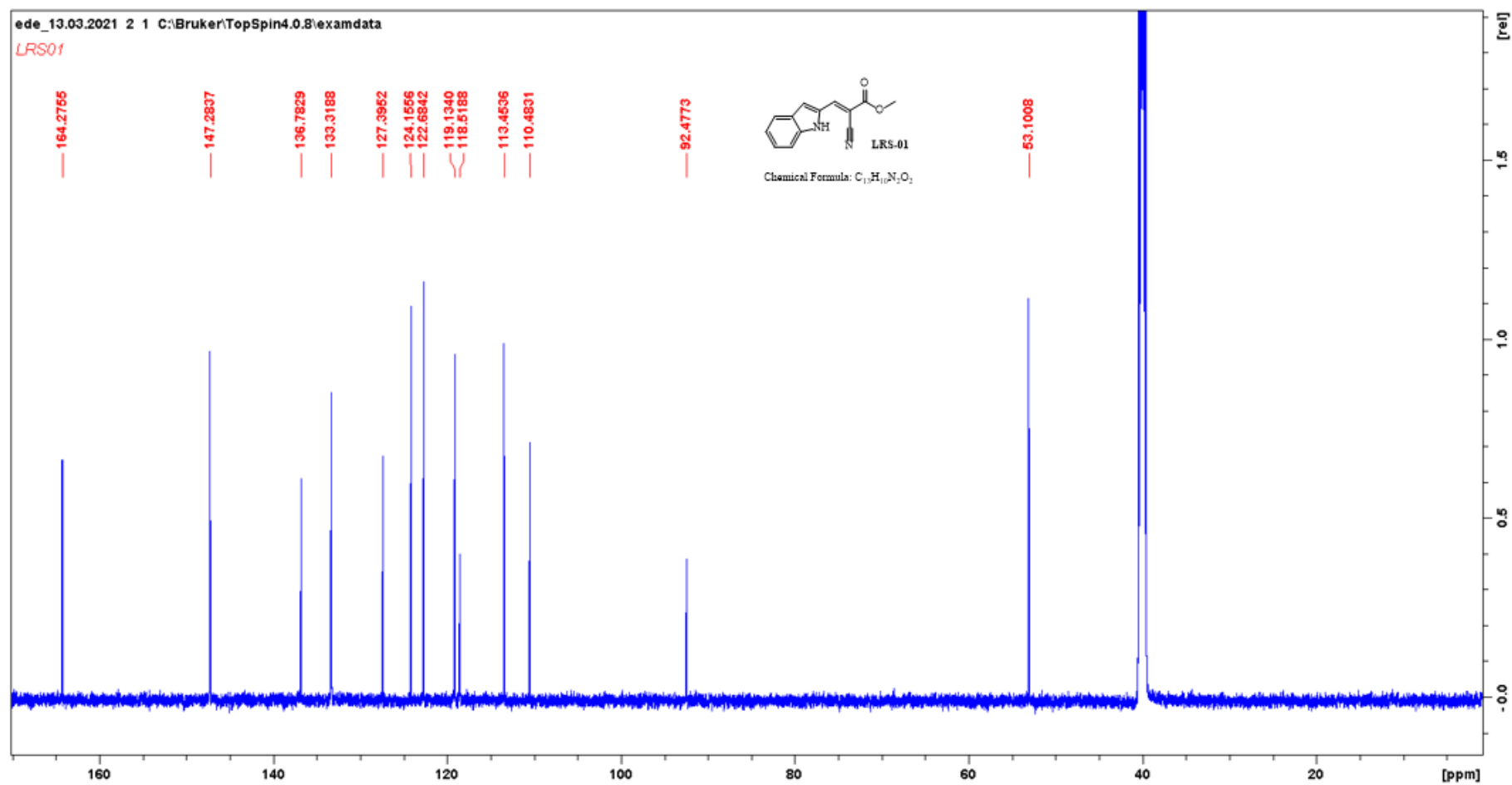
**LRS-01**

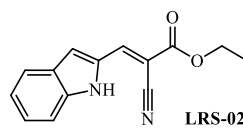
Chemical Formula: C₁₃H₁₀N₂O₂



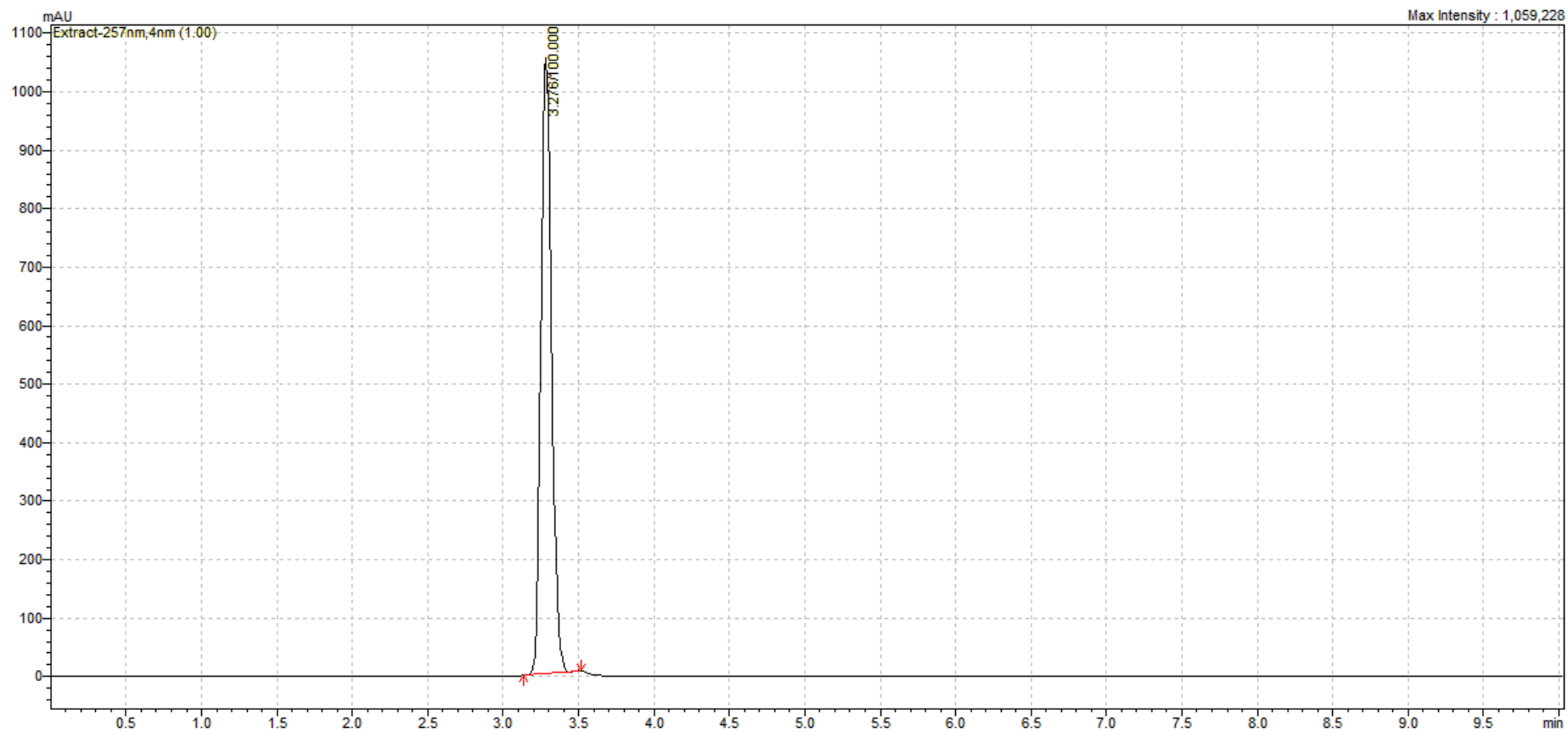


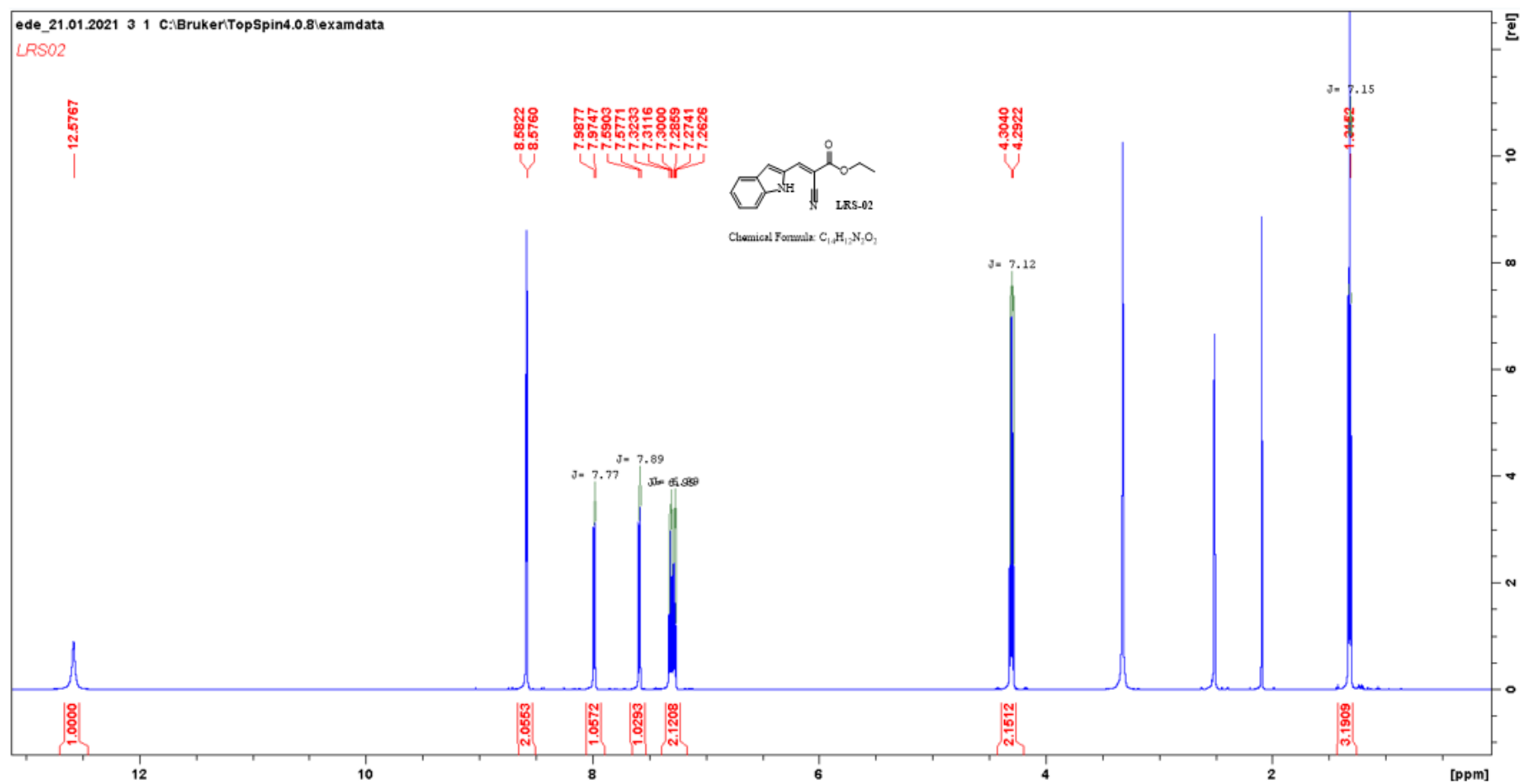






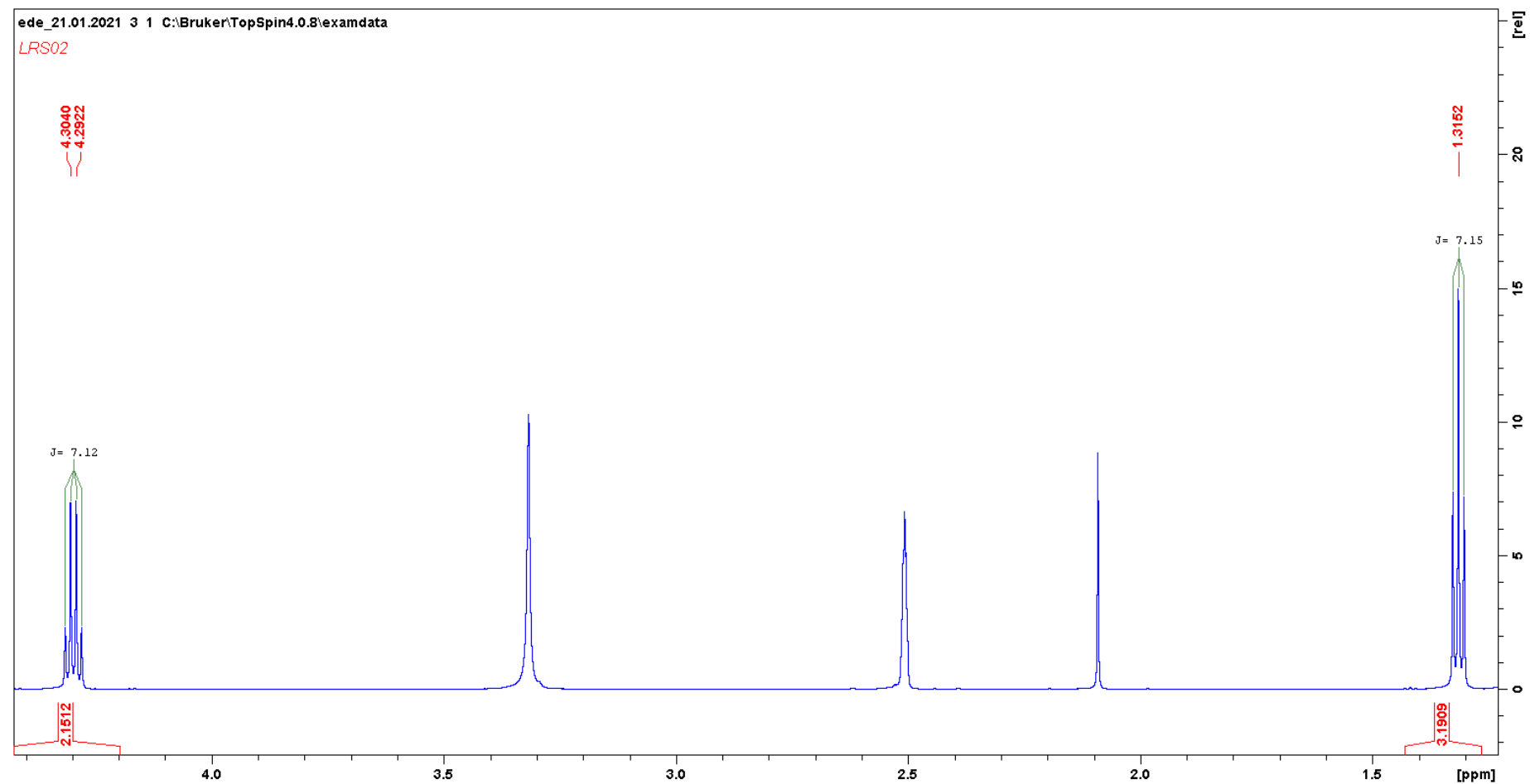
LRS-02

Chemical Formula: $C_{14}H_{12}N_2O_2$ 



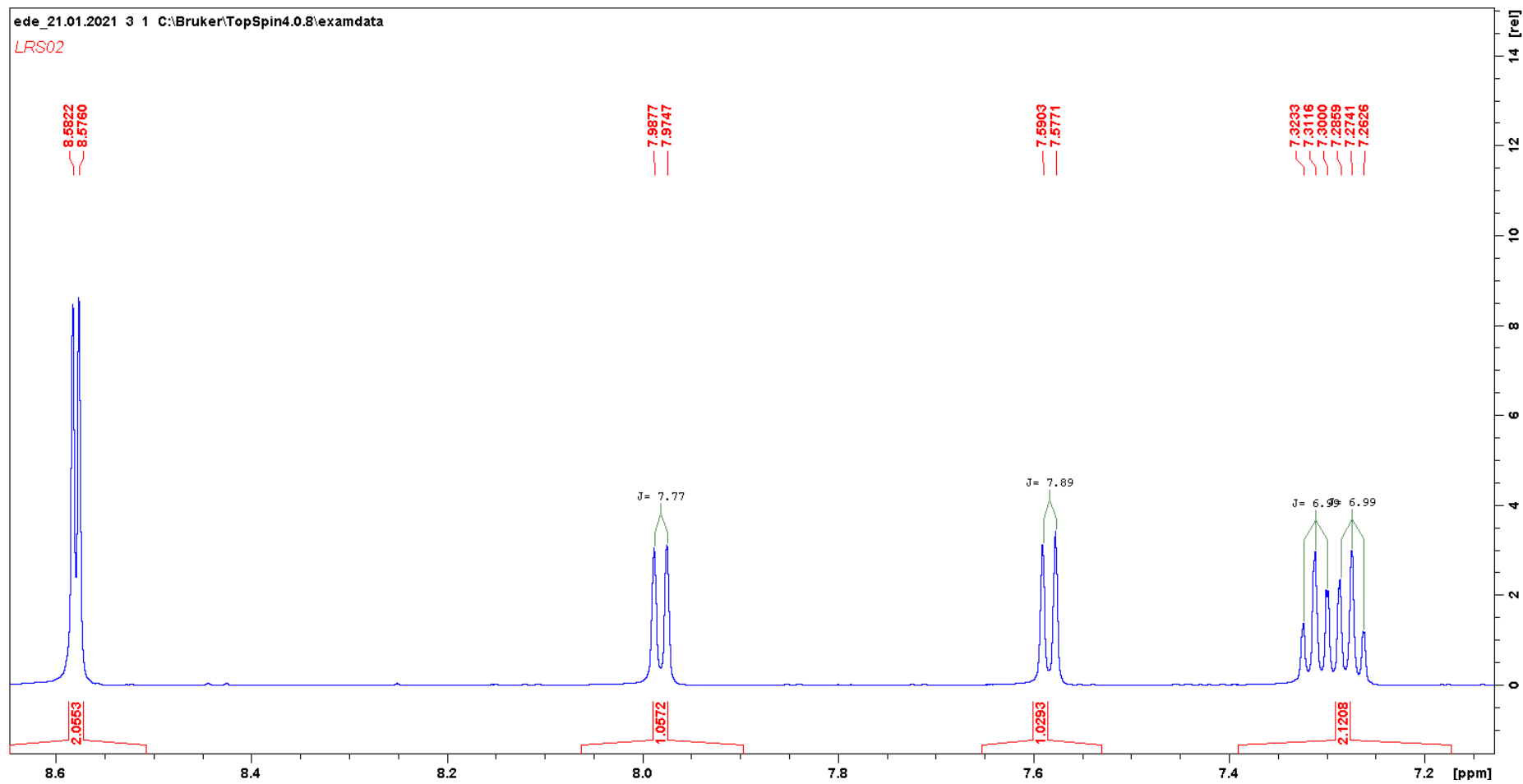
ede_21.01.2021 3 1 C:\Bruker\TopSpin4.0.8\examdata

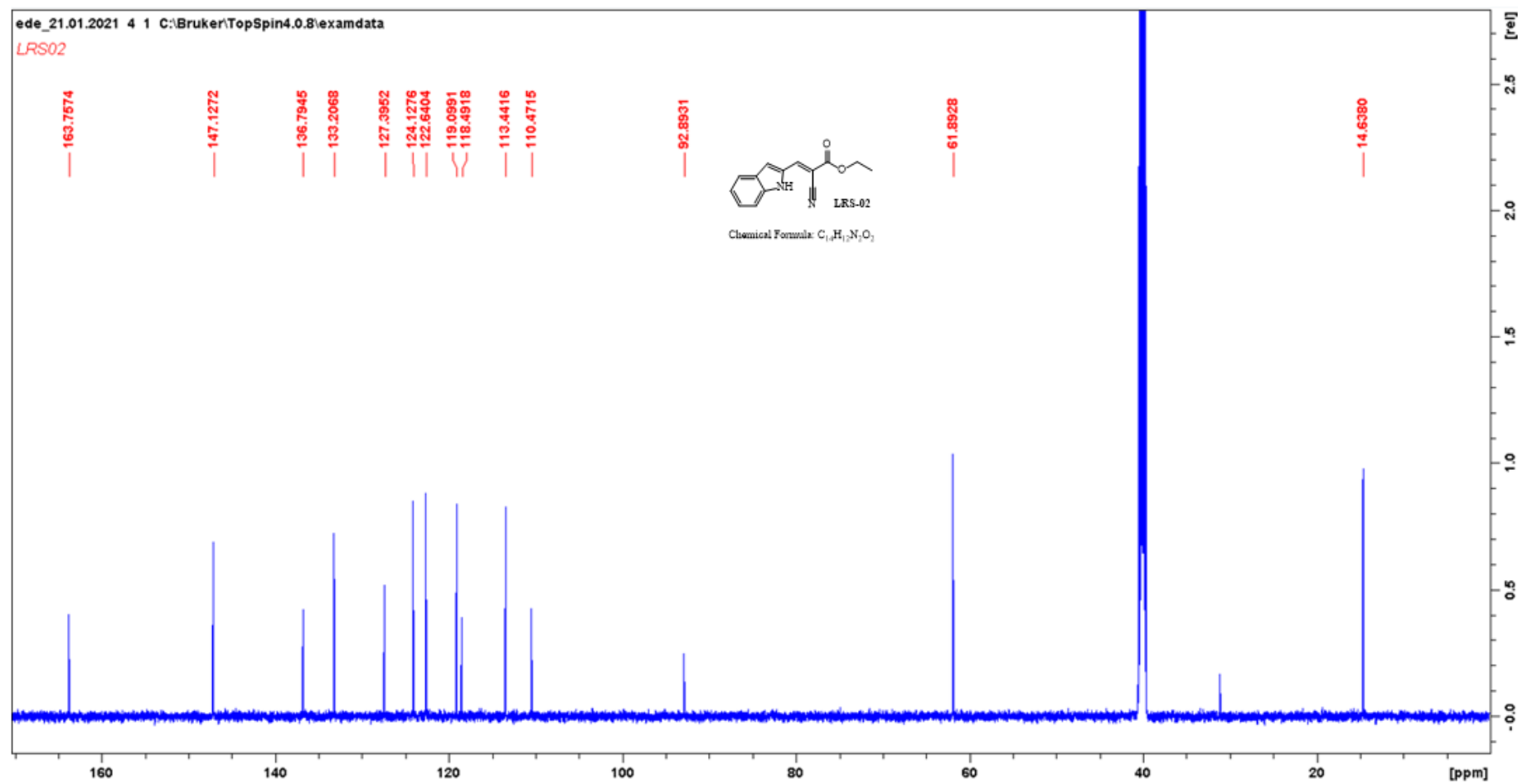
LRS02

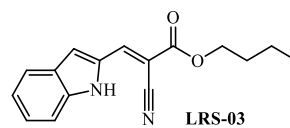


ede_21.01.2021 3 1 C:\Bruker\TopSpin4.0.8\examdata

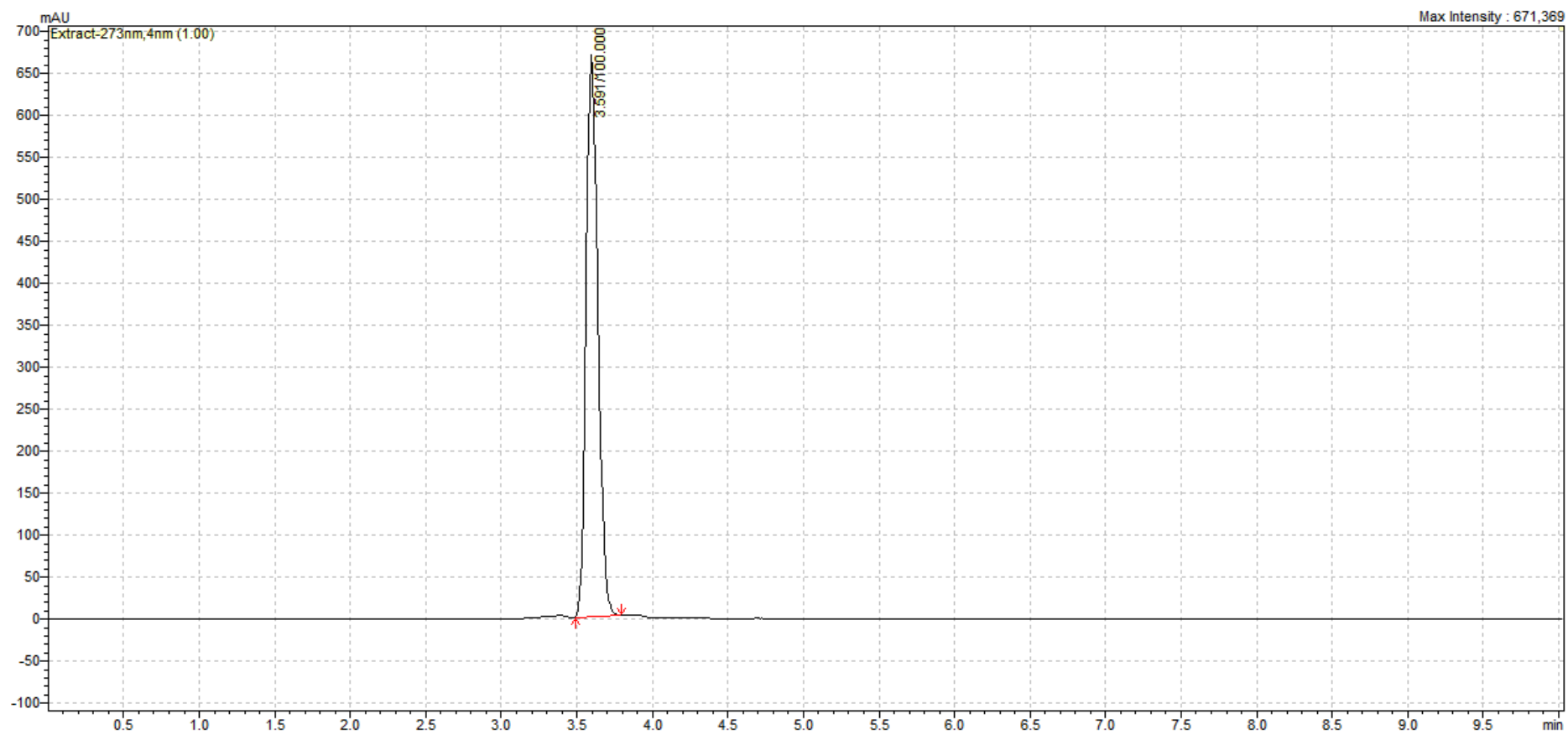
LRS02

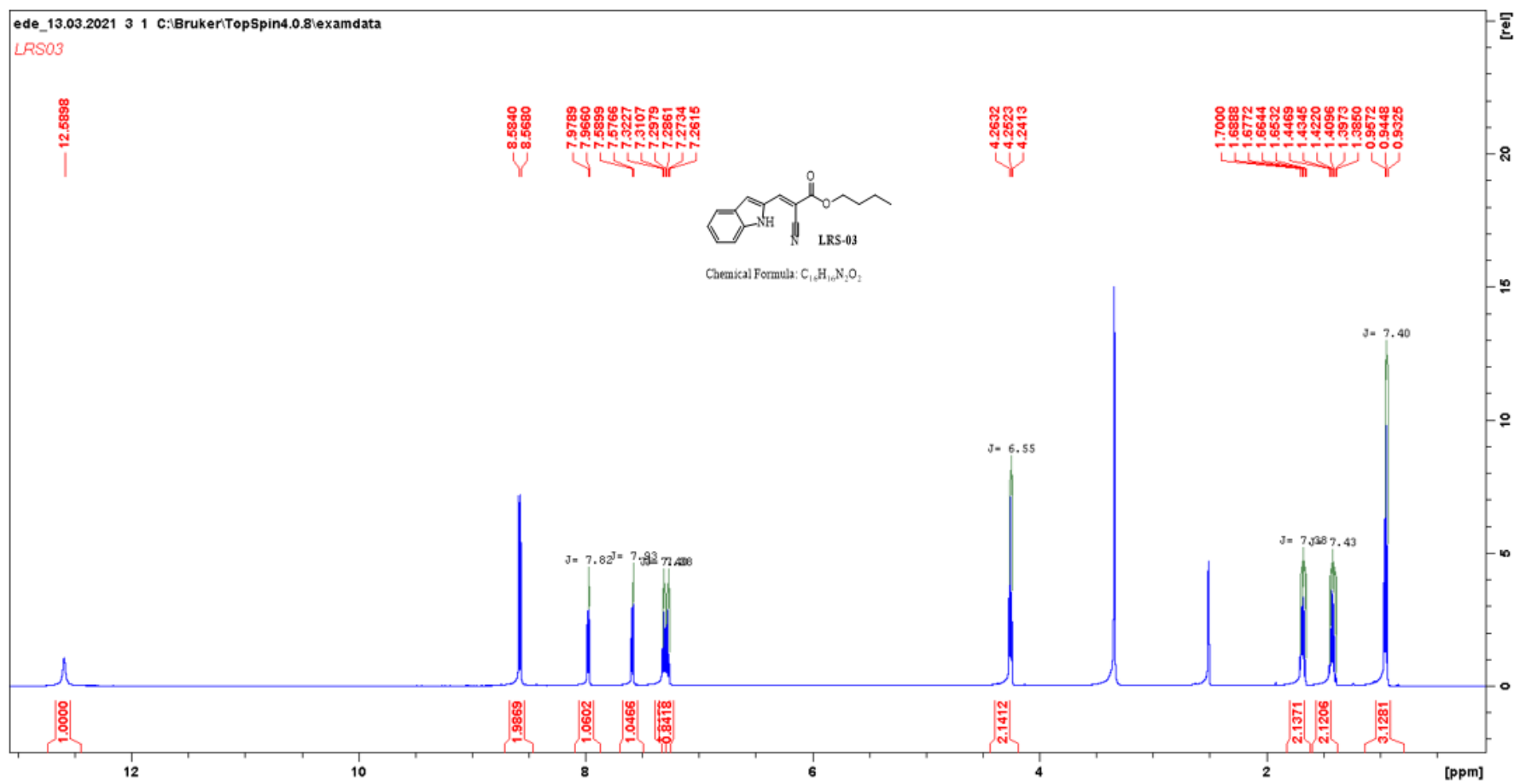


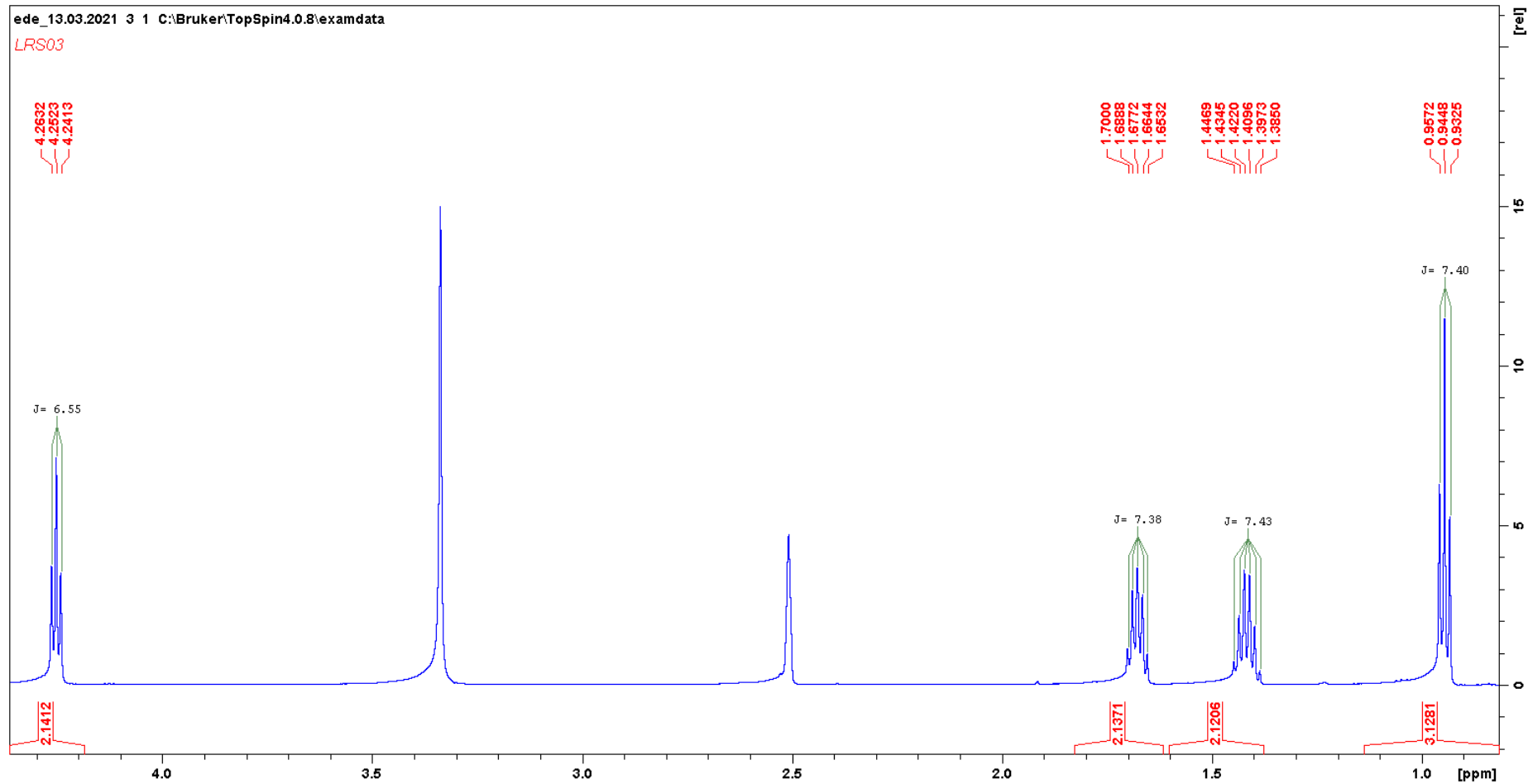




Chemical Formula: C₁₆H₁₆N₂O₂

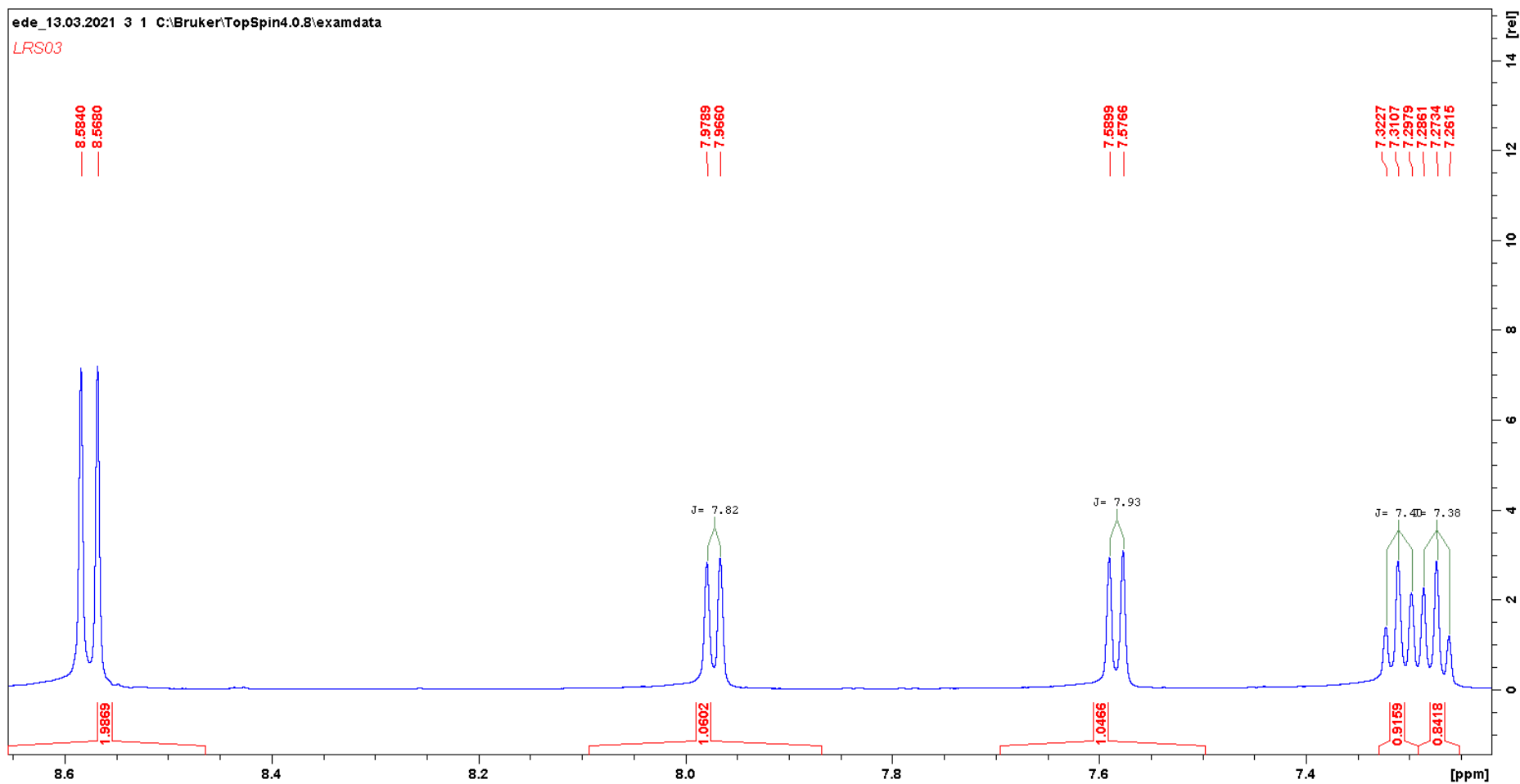


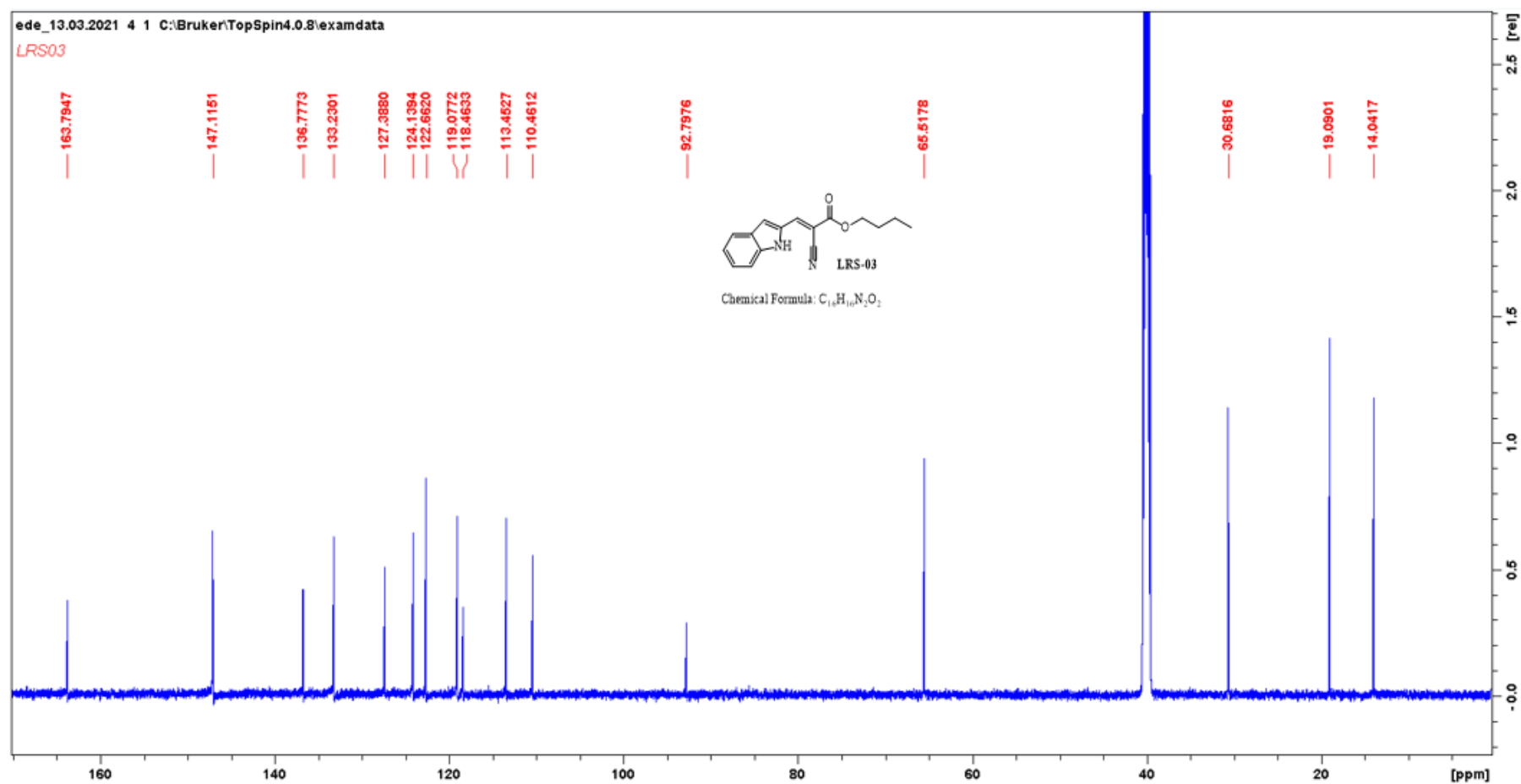


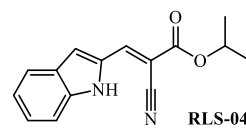


ede_13.03.2021 3 1 C:\Bruker\TopSpin4.0.8\examdata

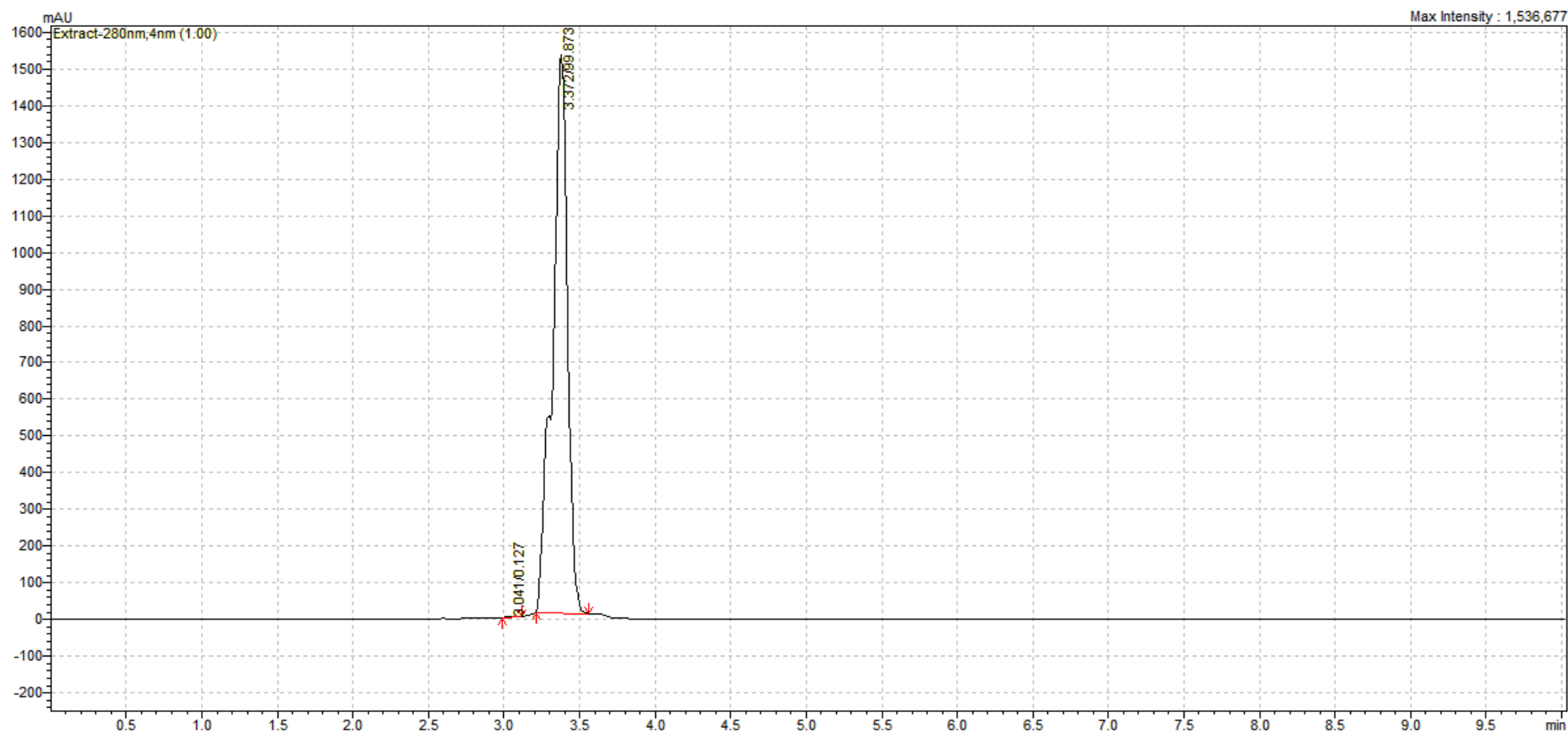
LRS03

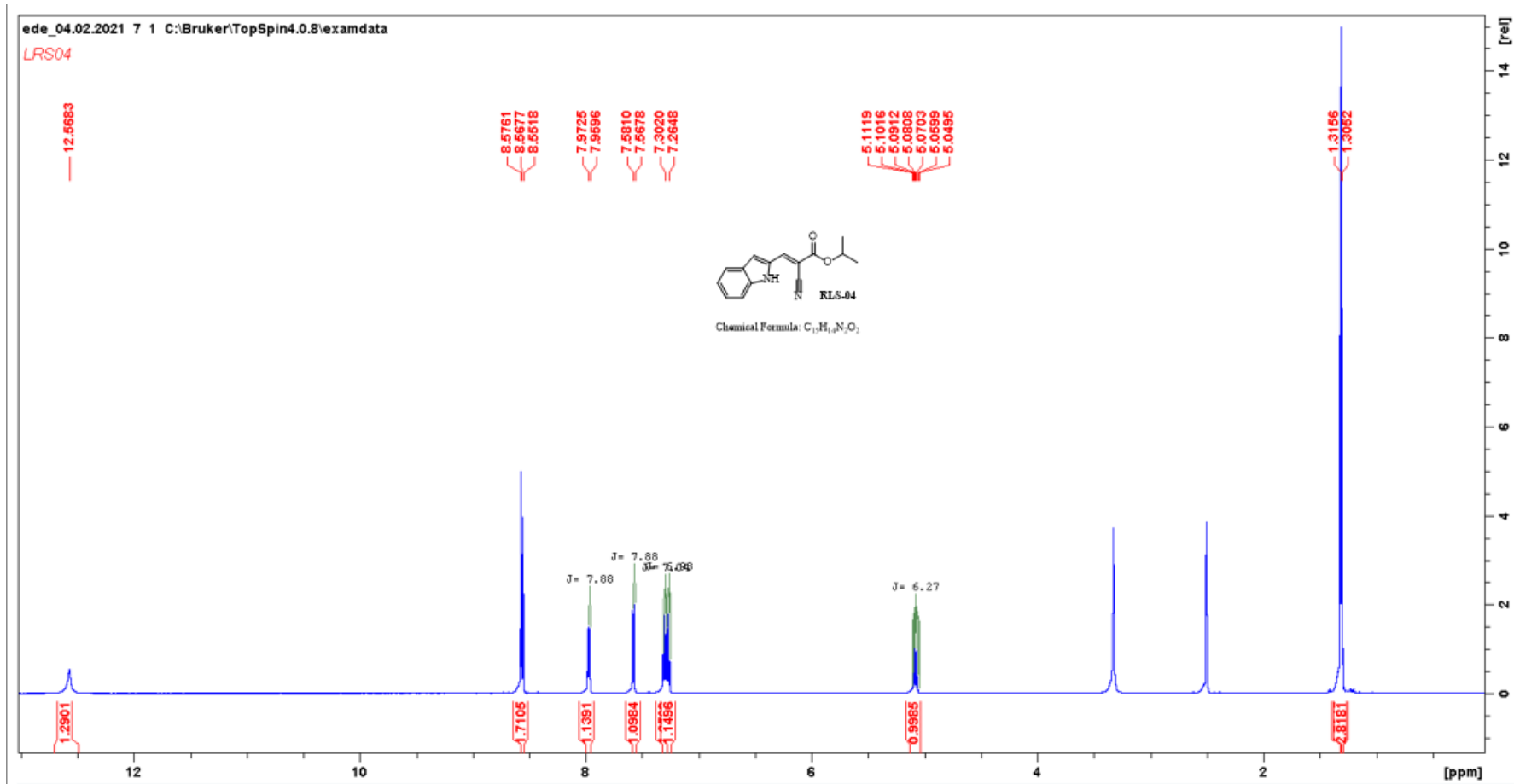


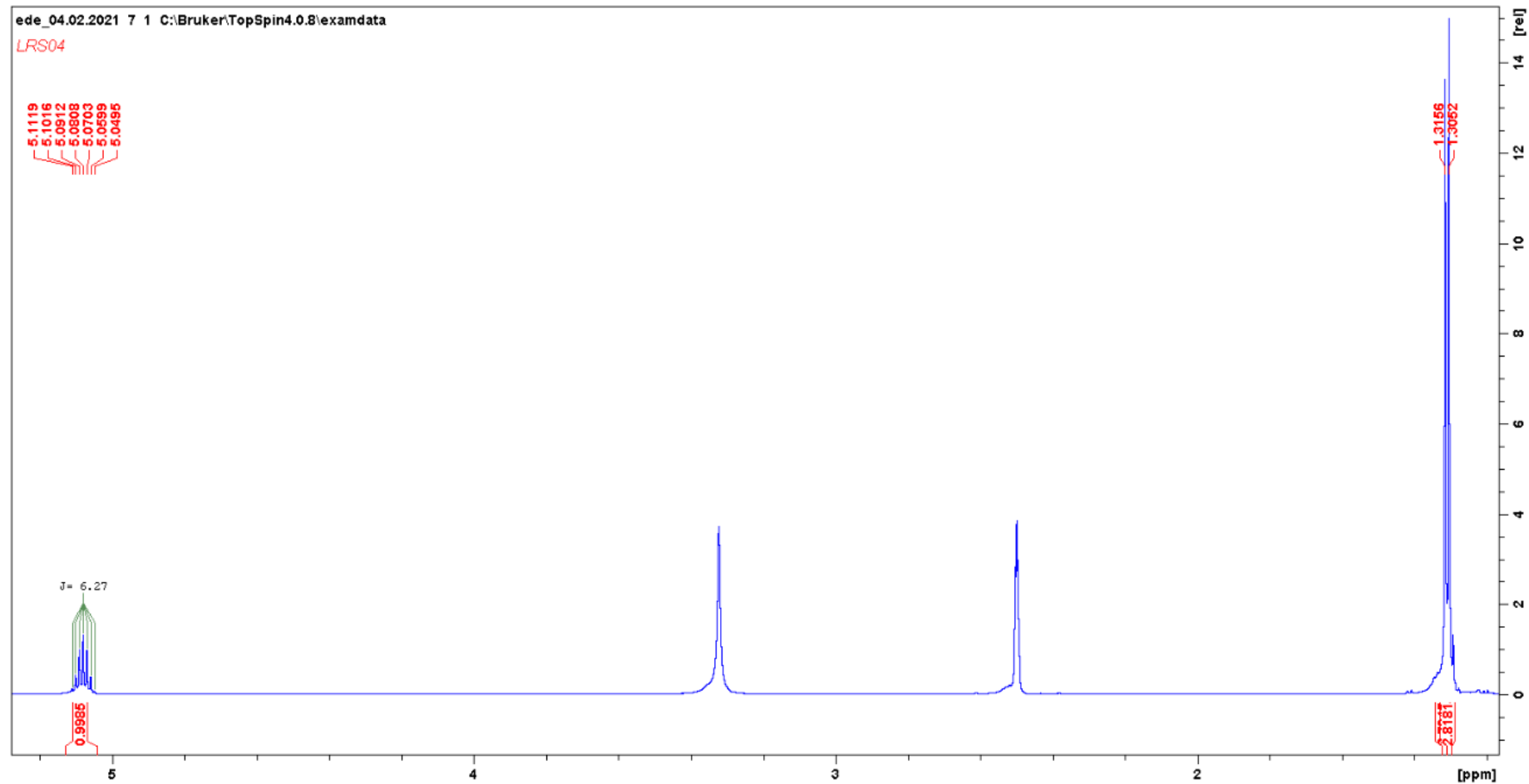


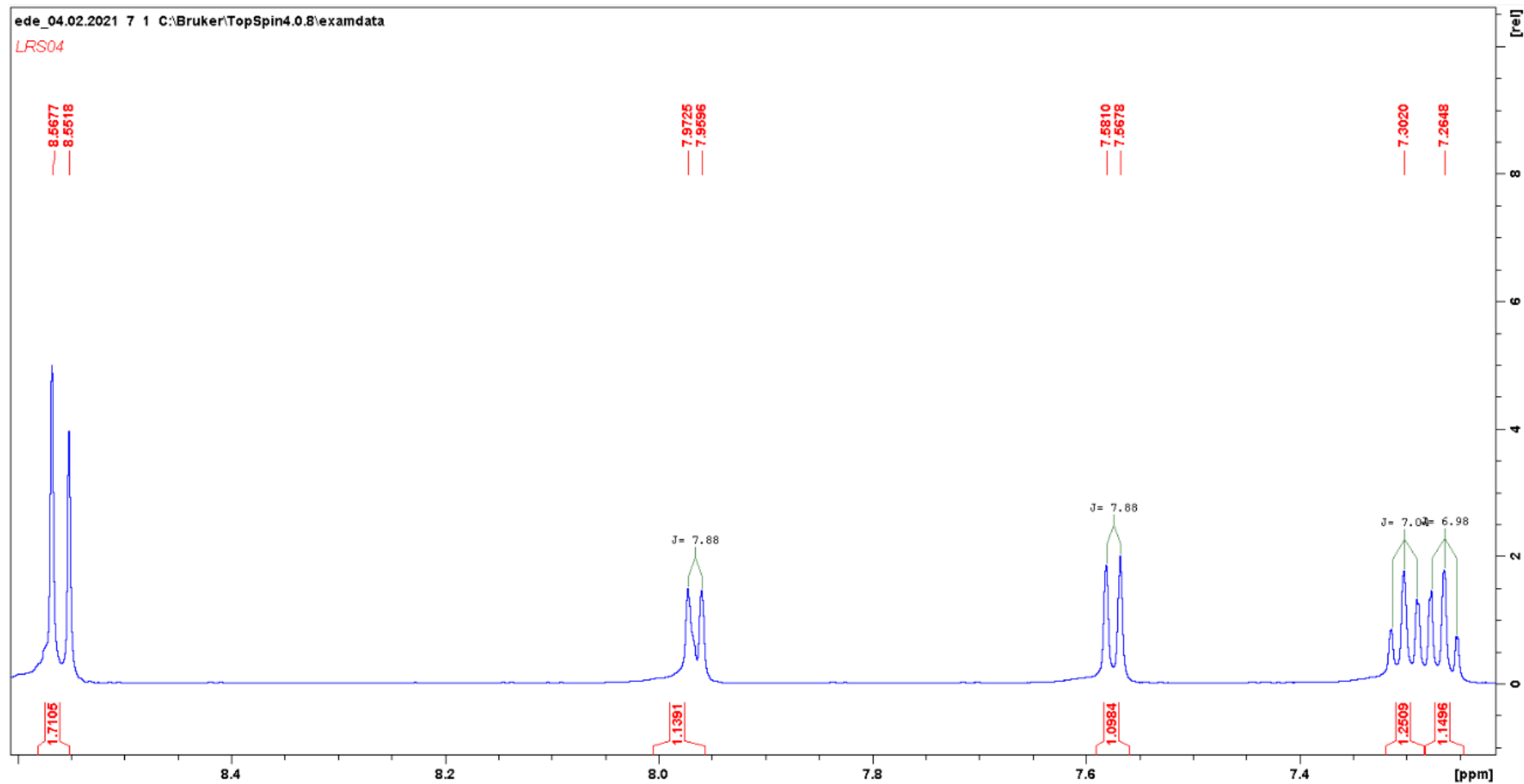


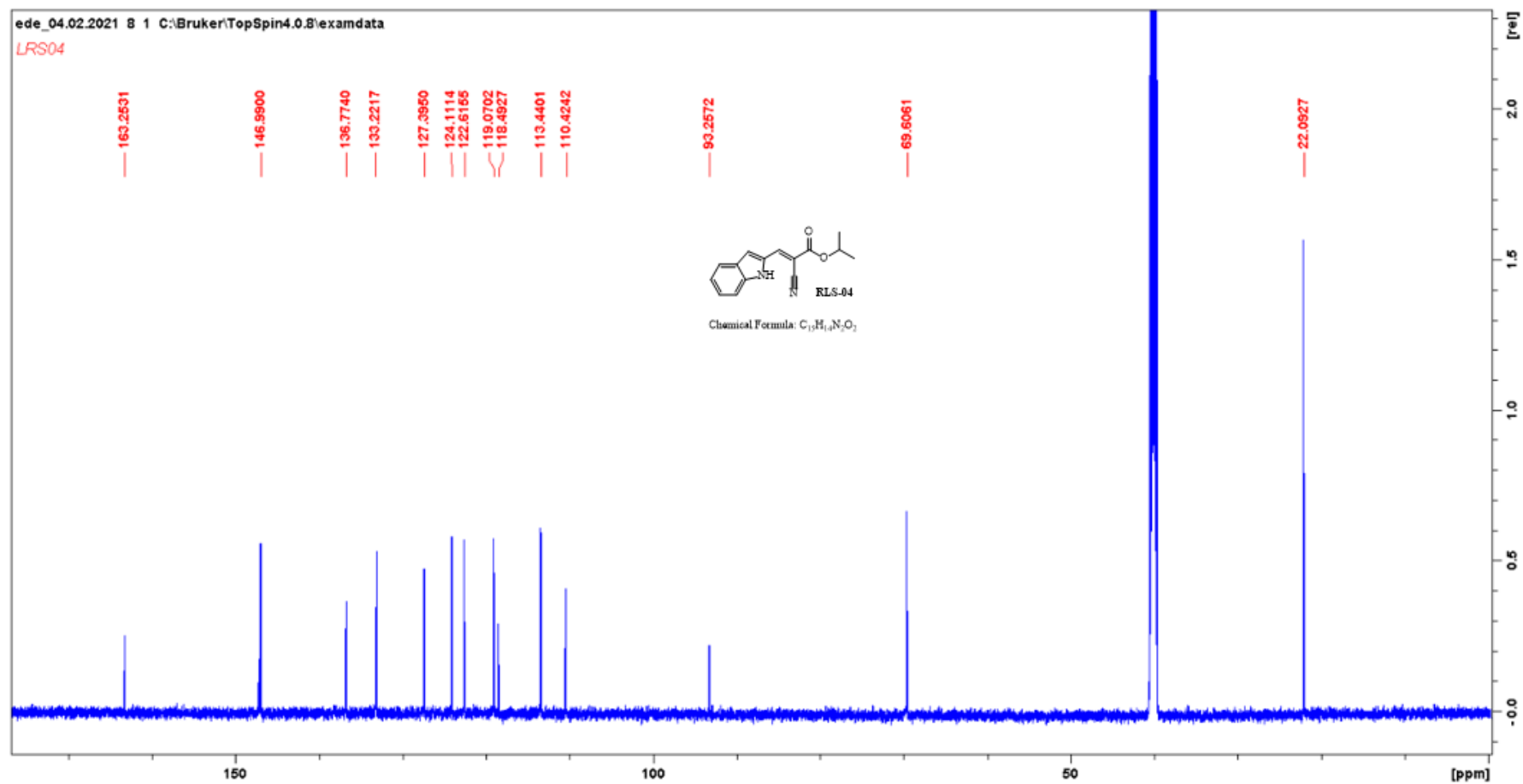
RLS-04

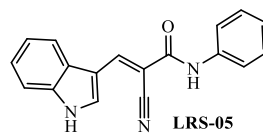
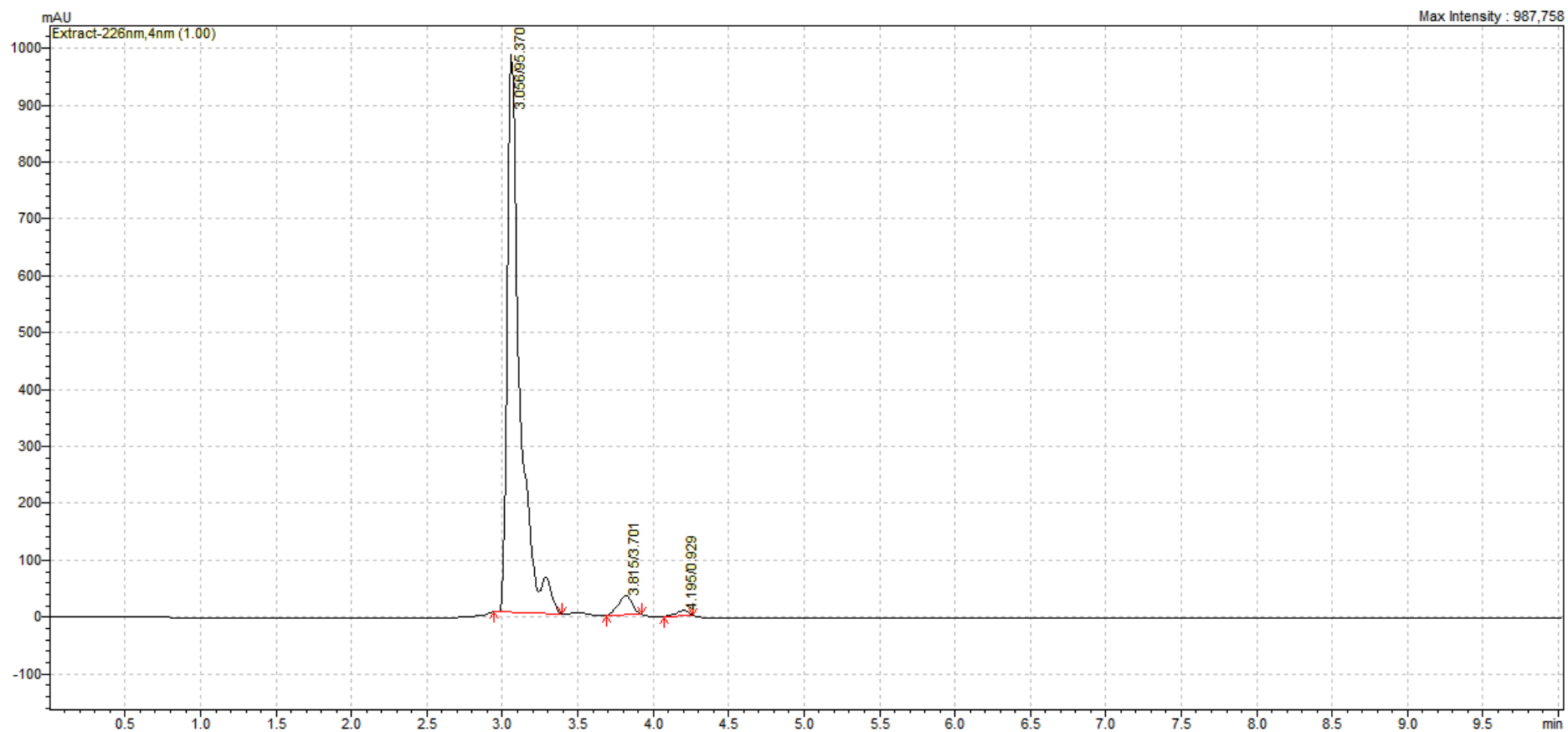
Chemical Formula: $C_{15}H_{14}N_2O_2$ 

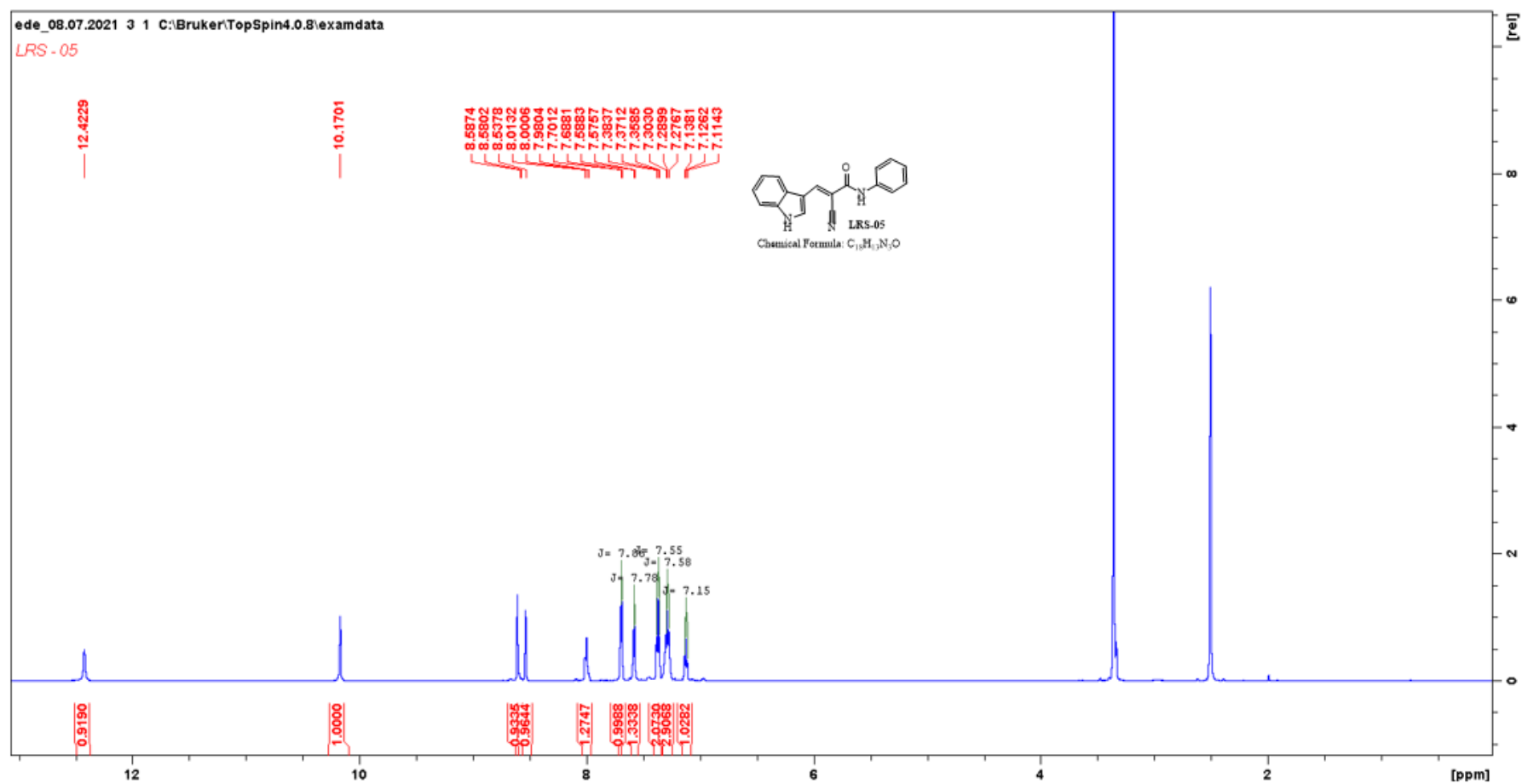






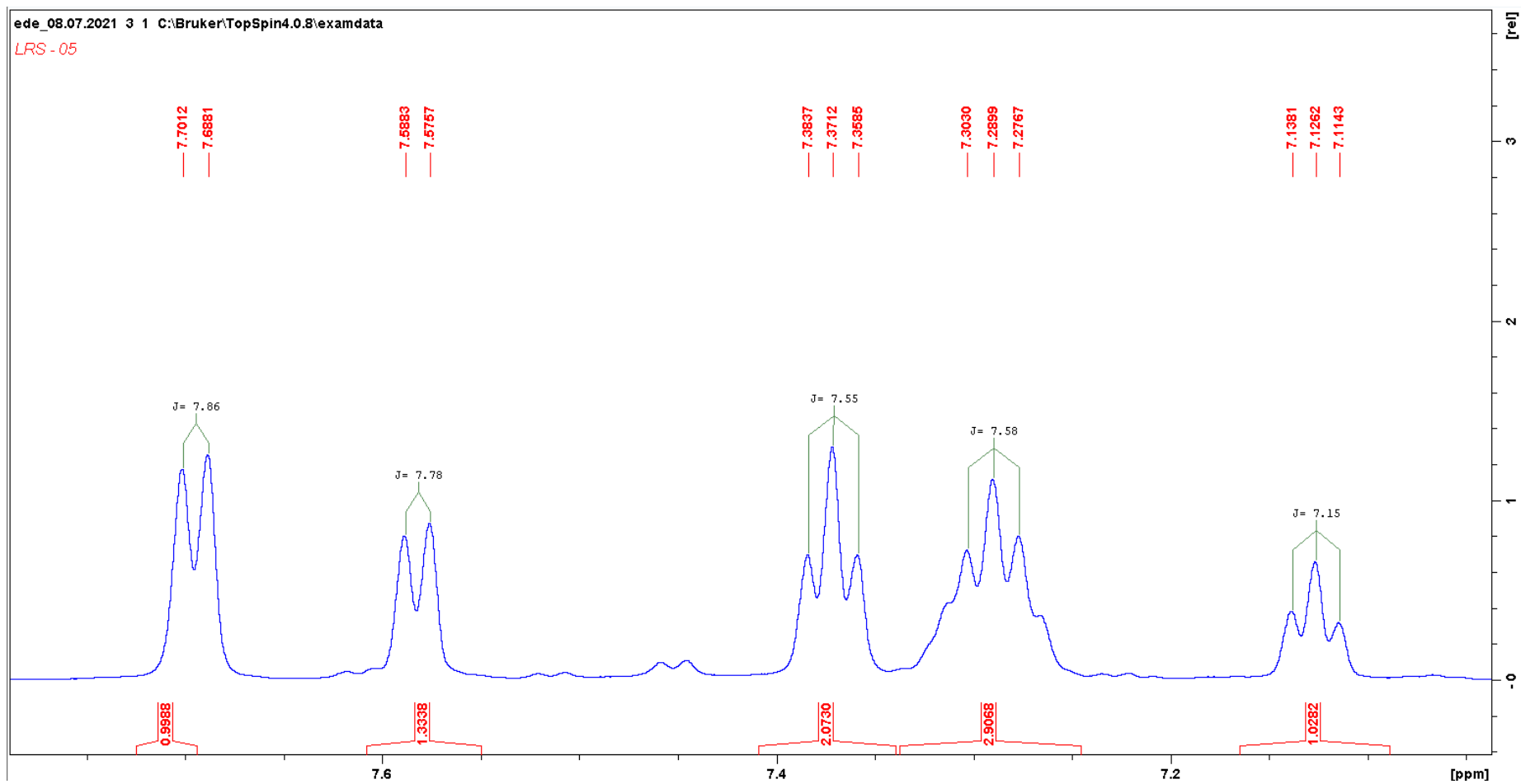


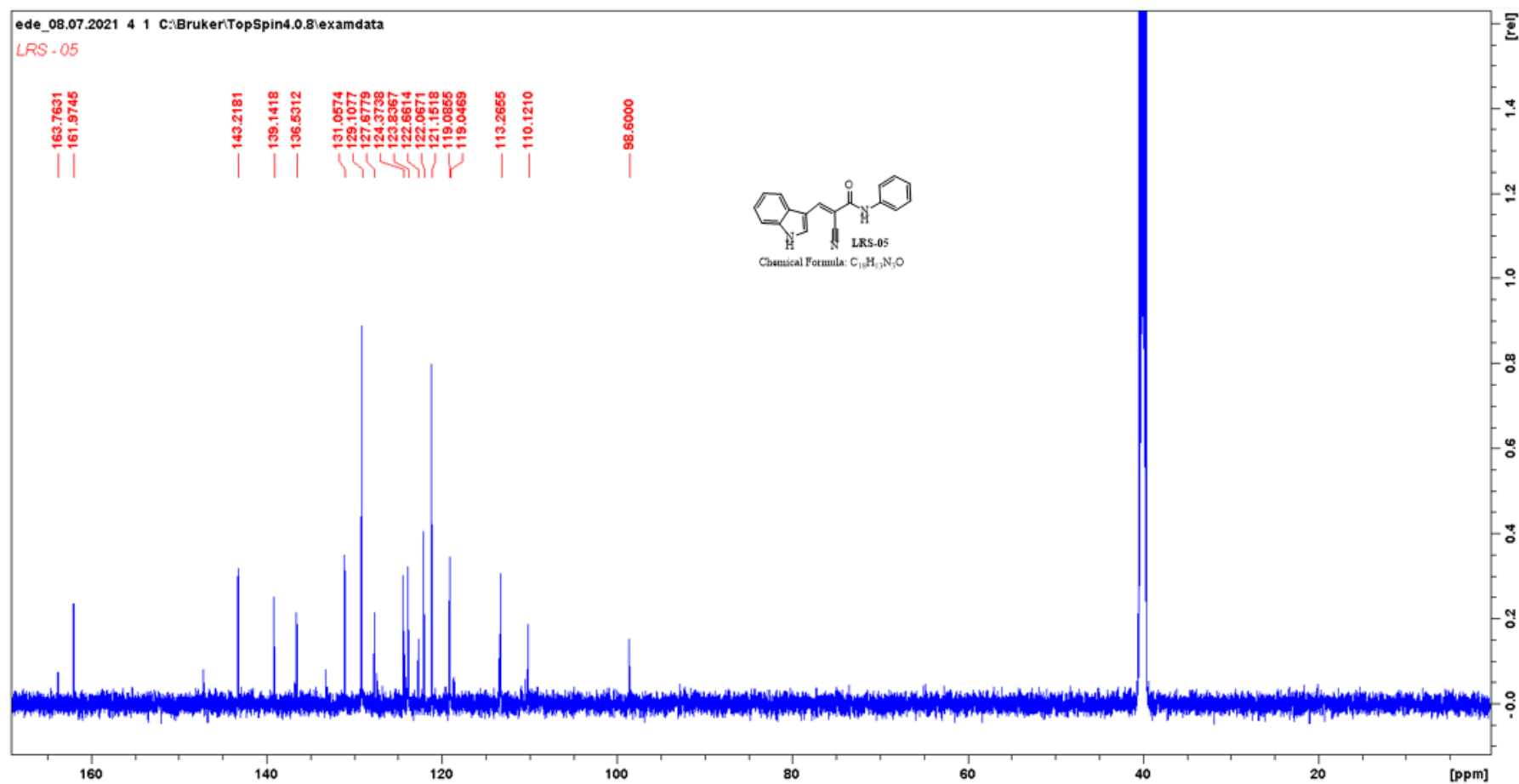
**LRS-05**Chemical Formula: $C_{18}H_{13}N_3O$ 

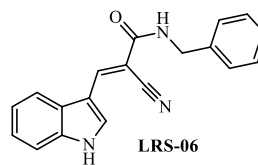


ede_08.07.2021 3 1 C:\Bruker\TopSpin4.0.8\examdata

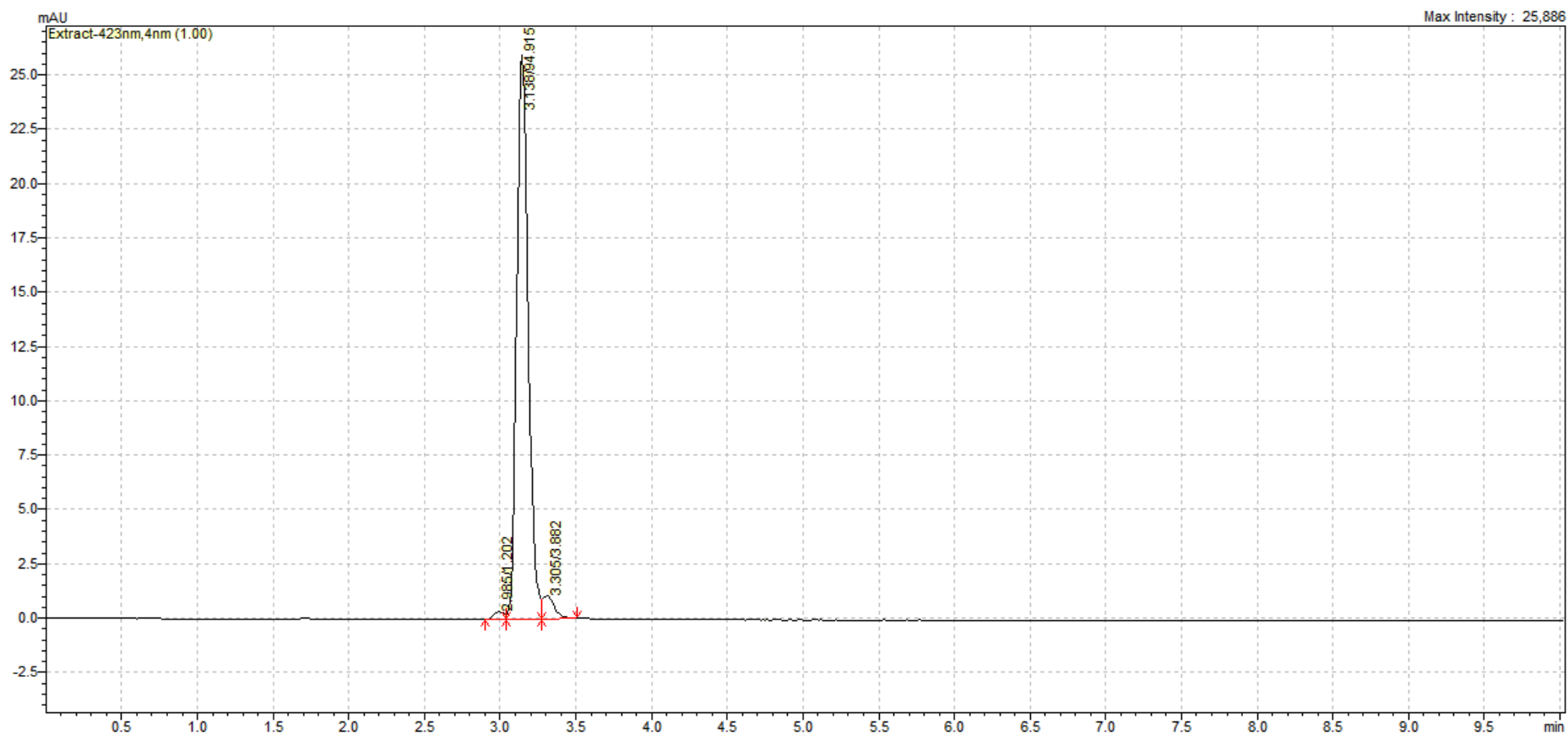
LRS - 05

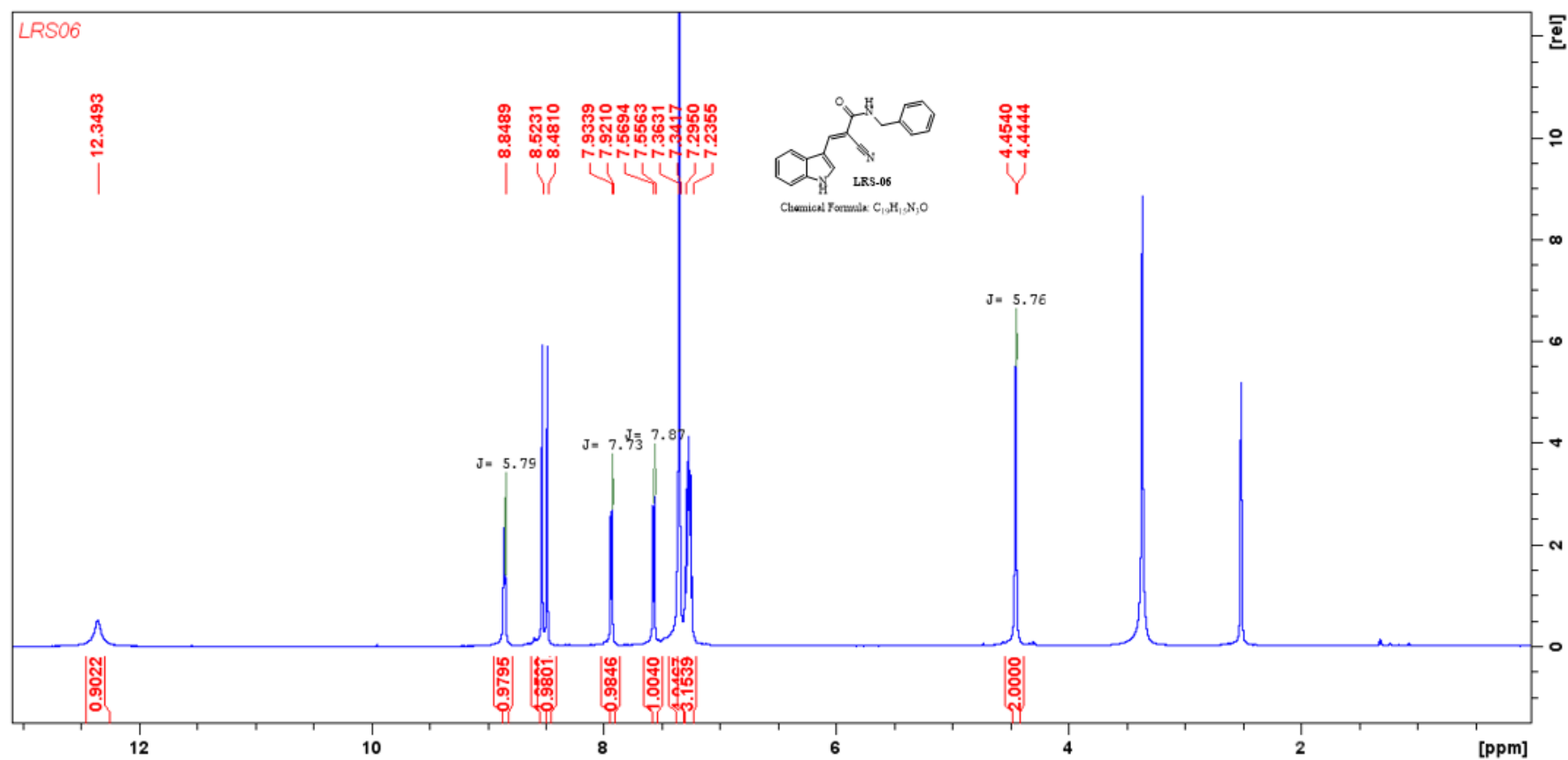


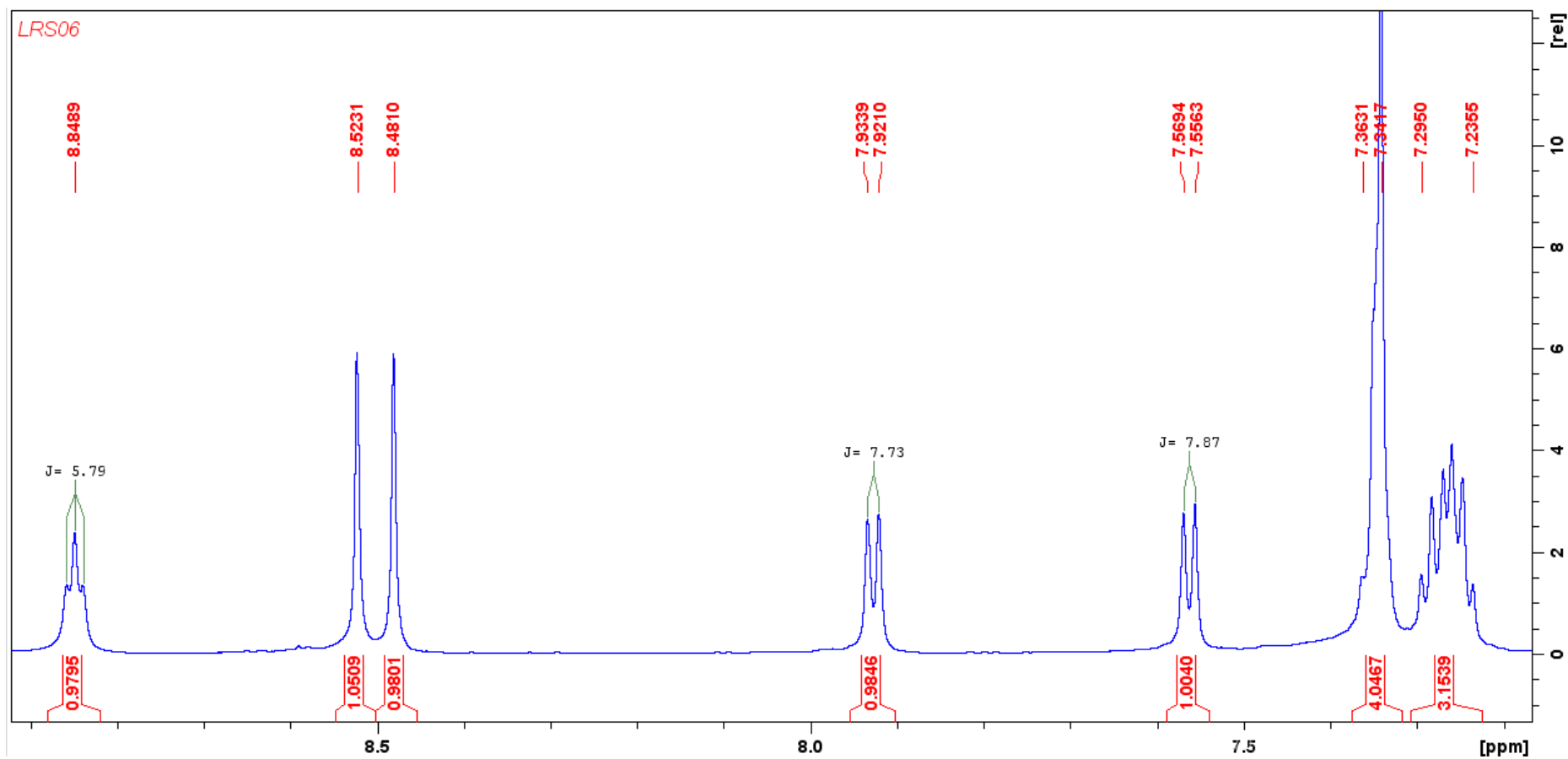


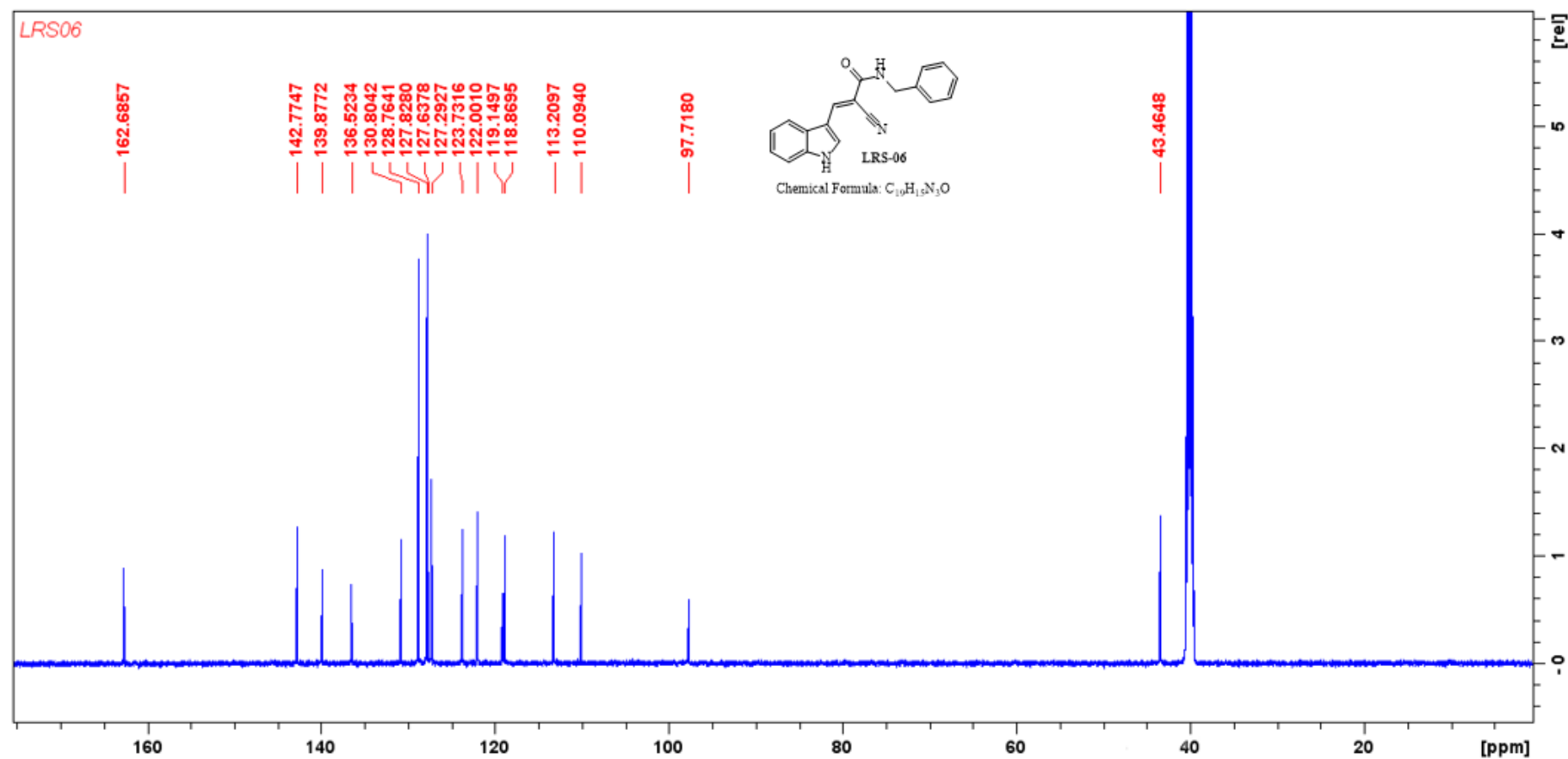


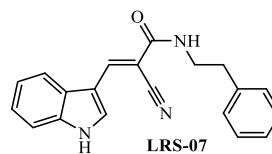
Chemical Formula: $C_{19}H_{15}N_3O$



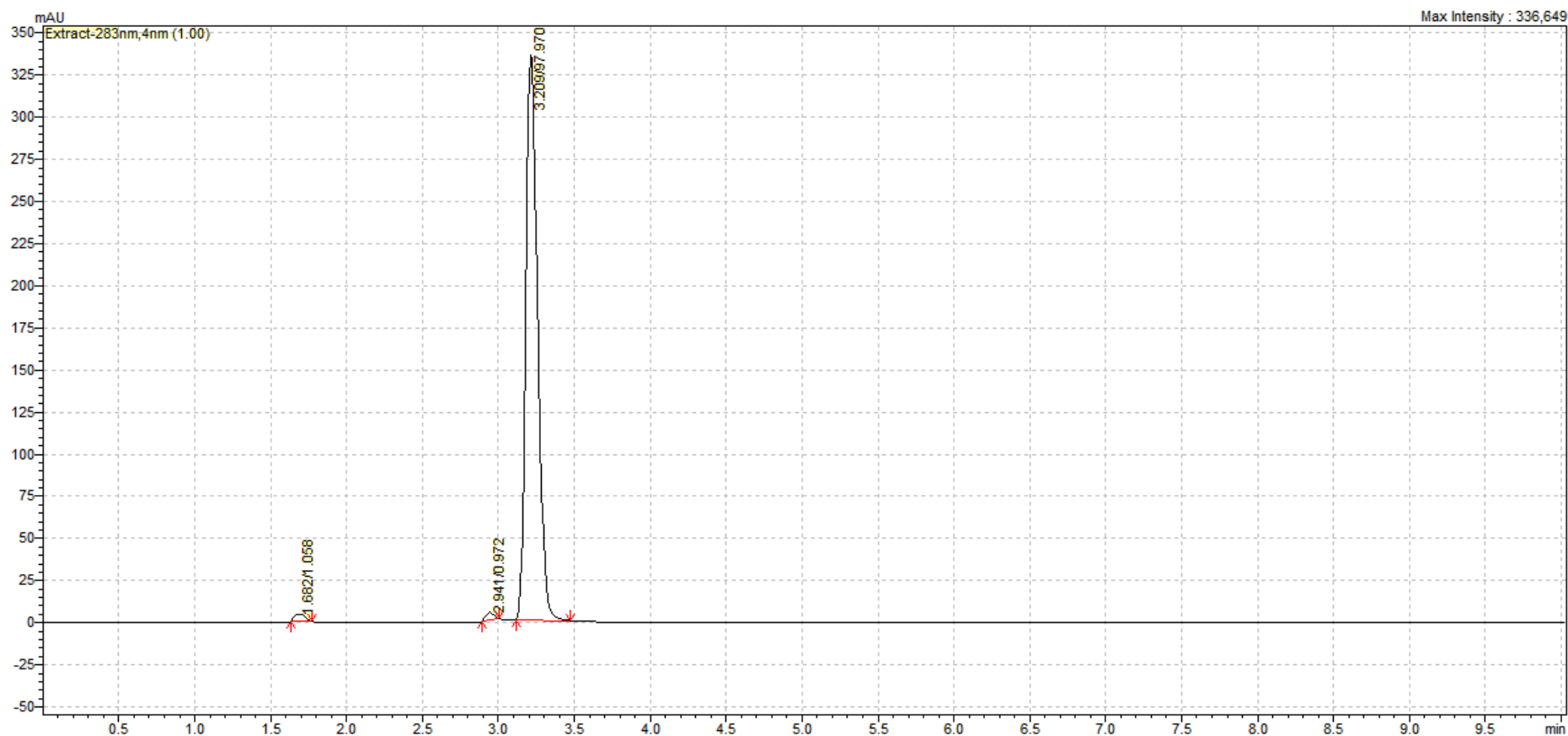


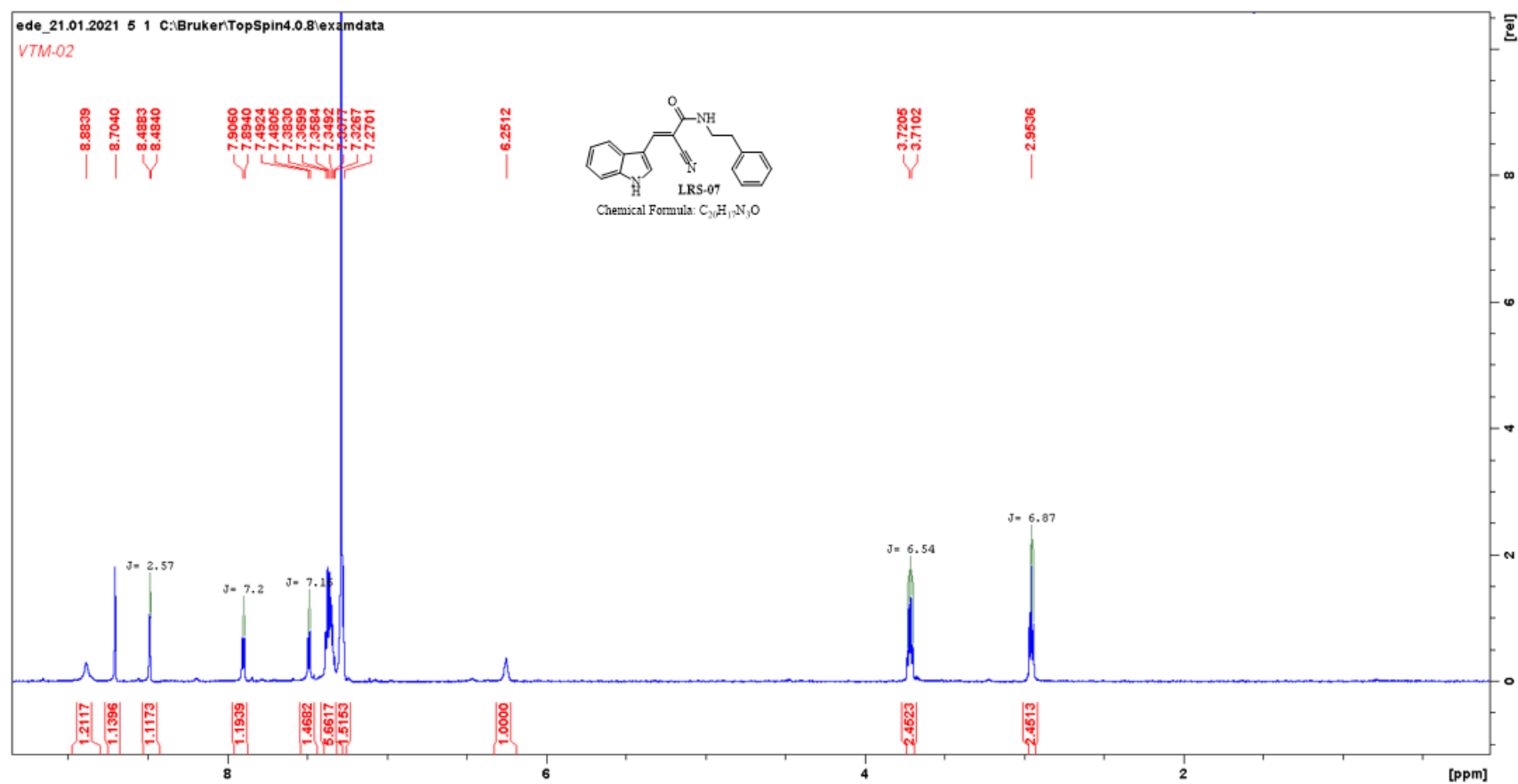






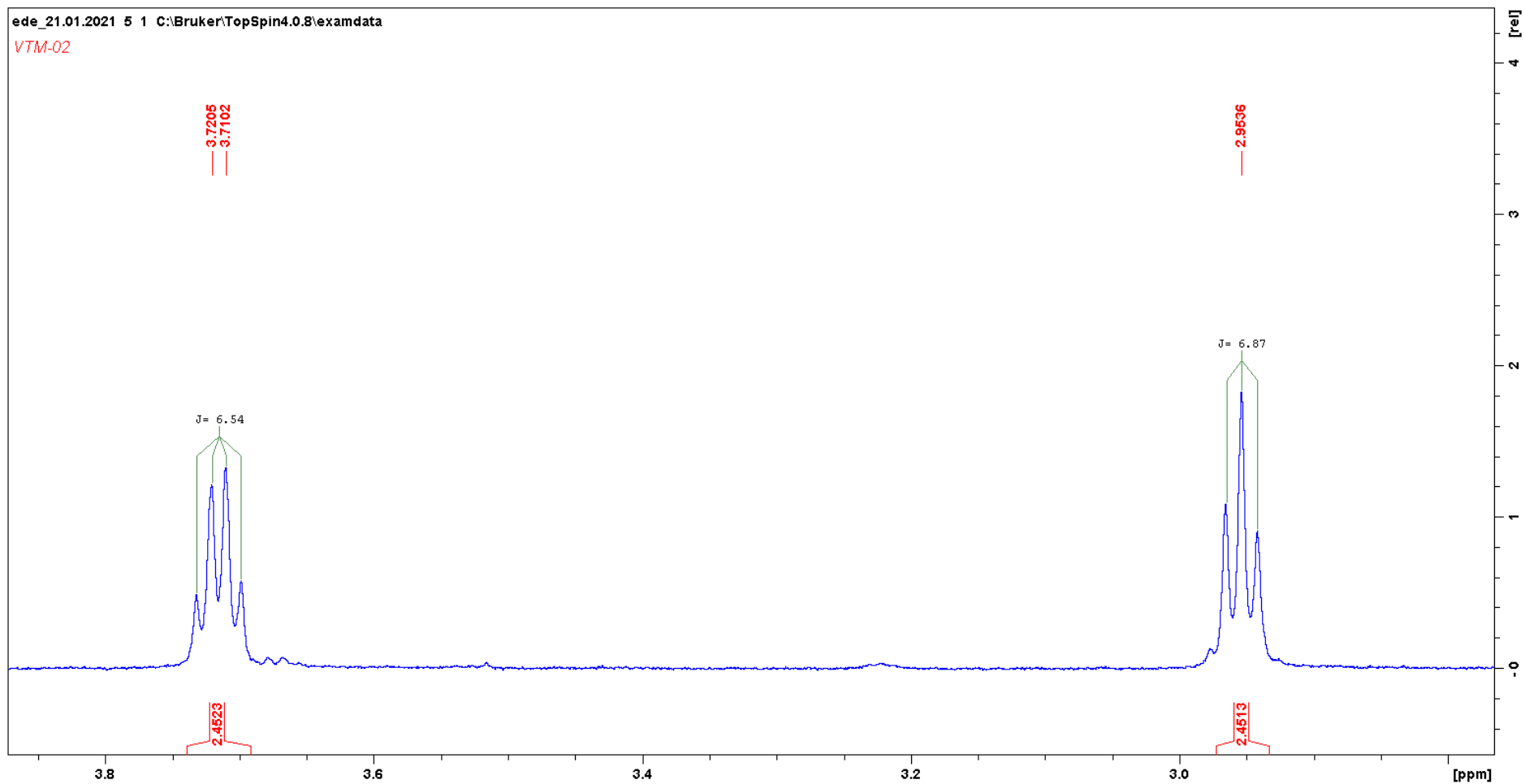
Chemical Formula: $C_{20}H_{17}N_3O$





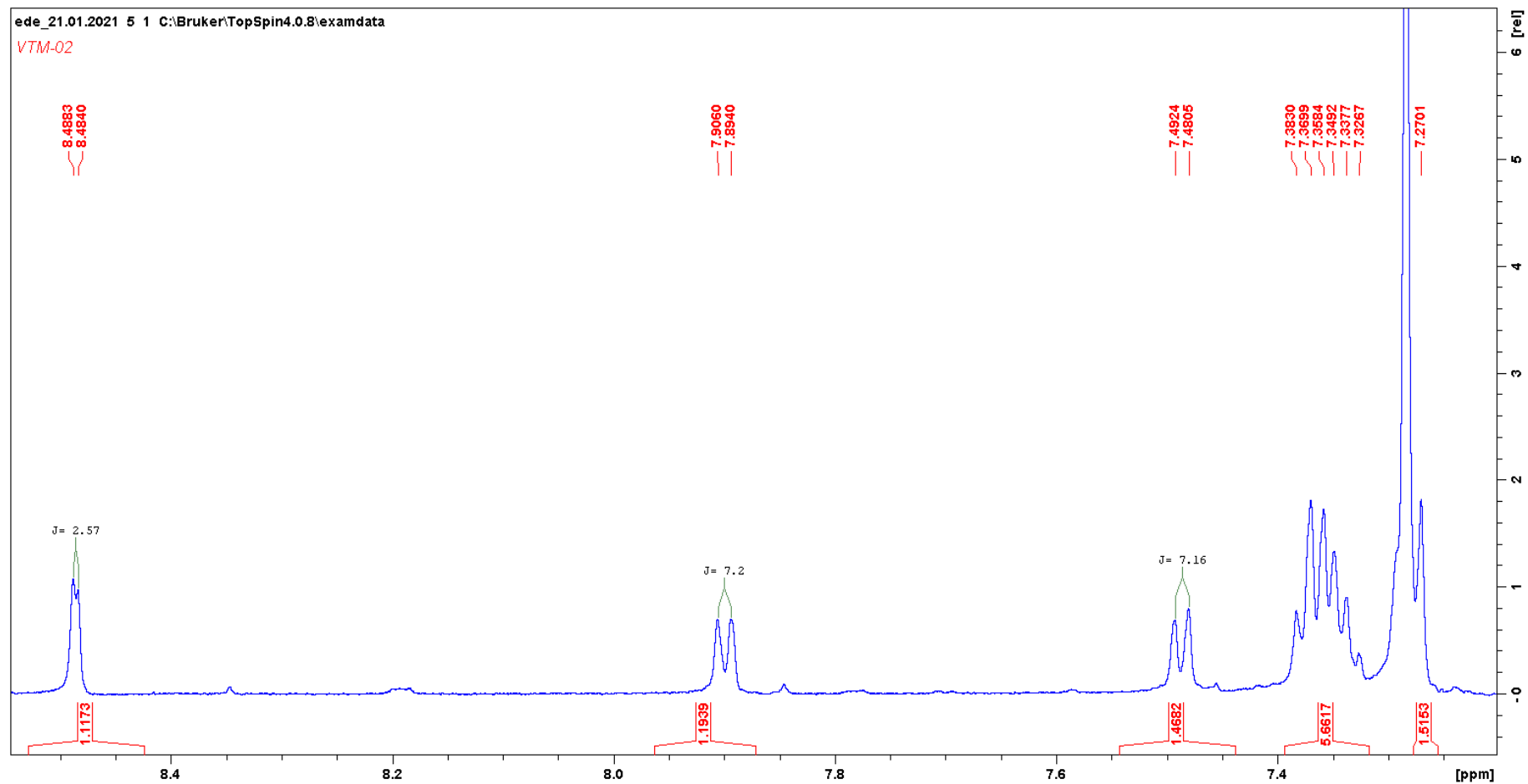
ede_21.01.2021 5 1 C:\Bruker\TopSpin4.0.8\examdata

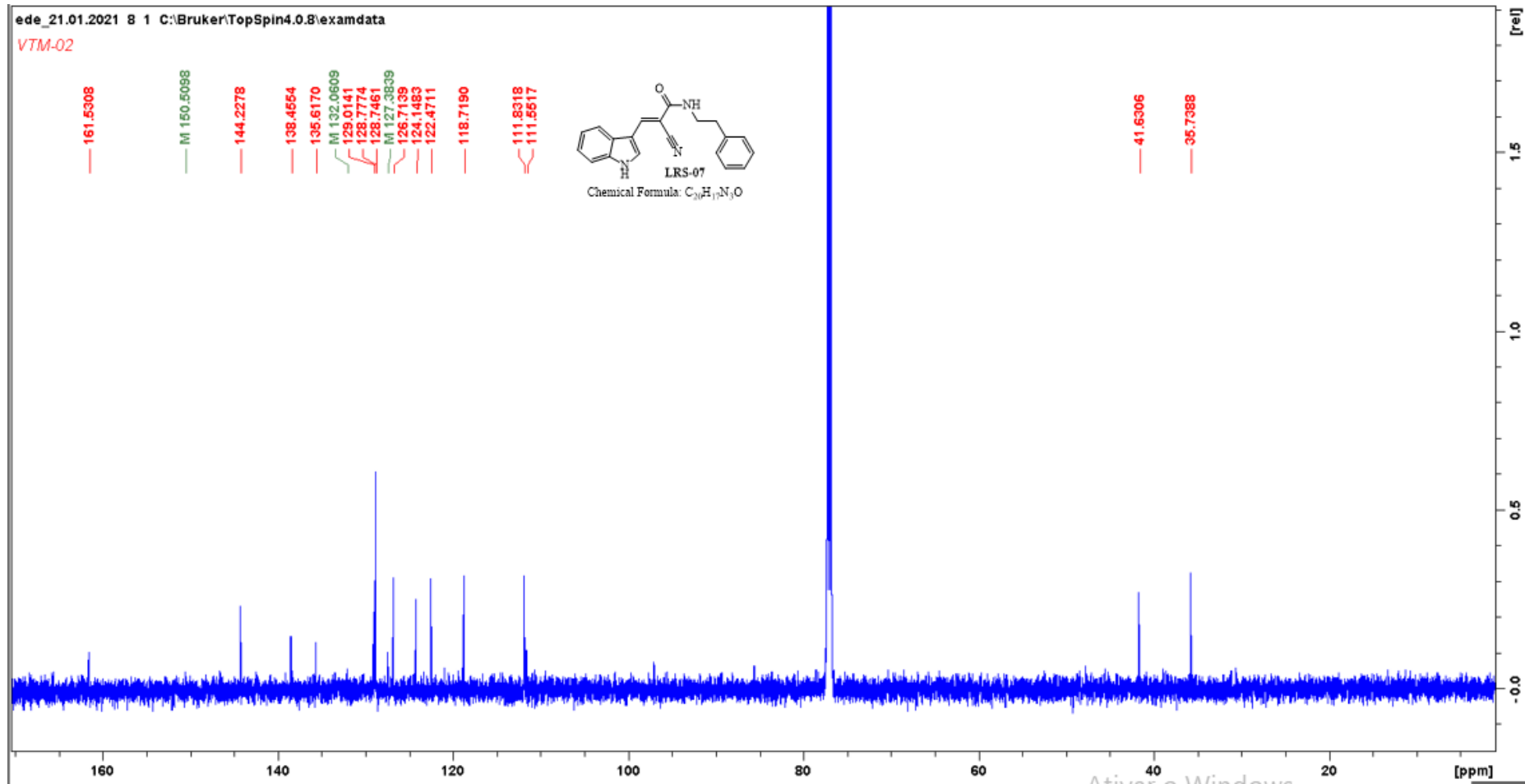
VTM-02

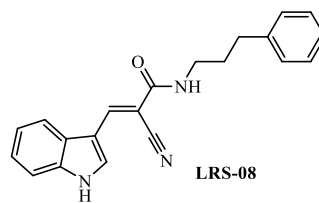


ede_21.01.2021 5 1 C:\Bruker\TopSpin4.0.8\examdata

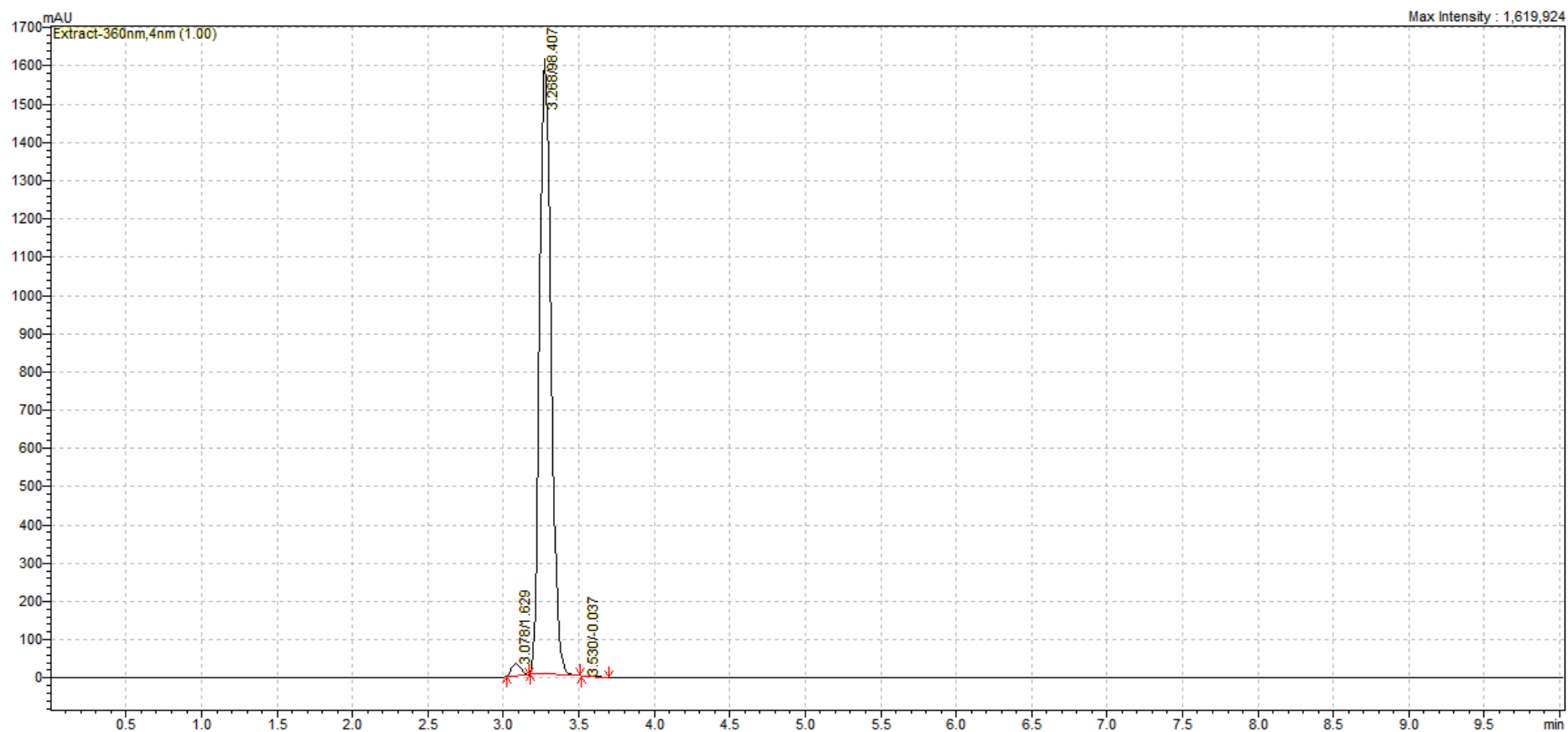
VTM-02

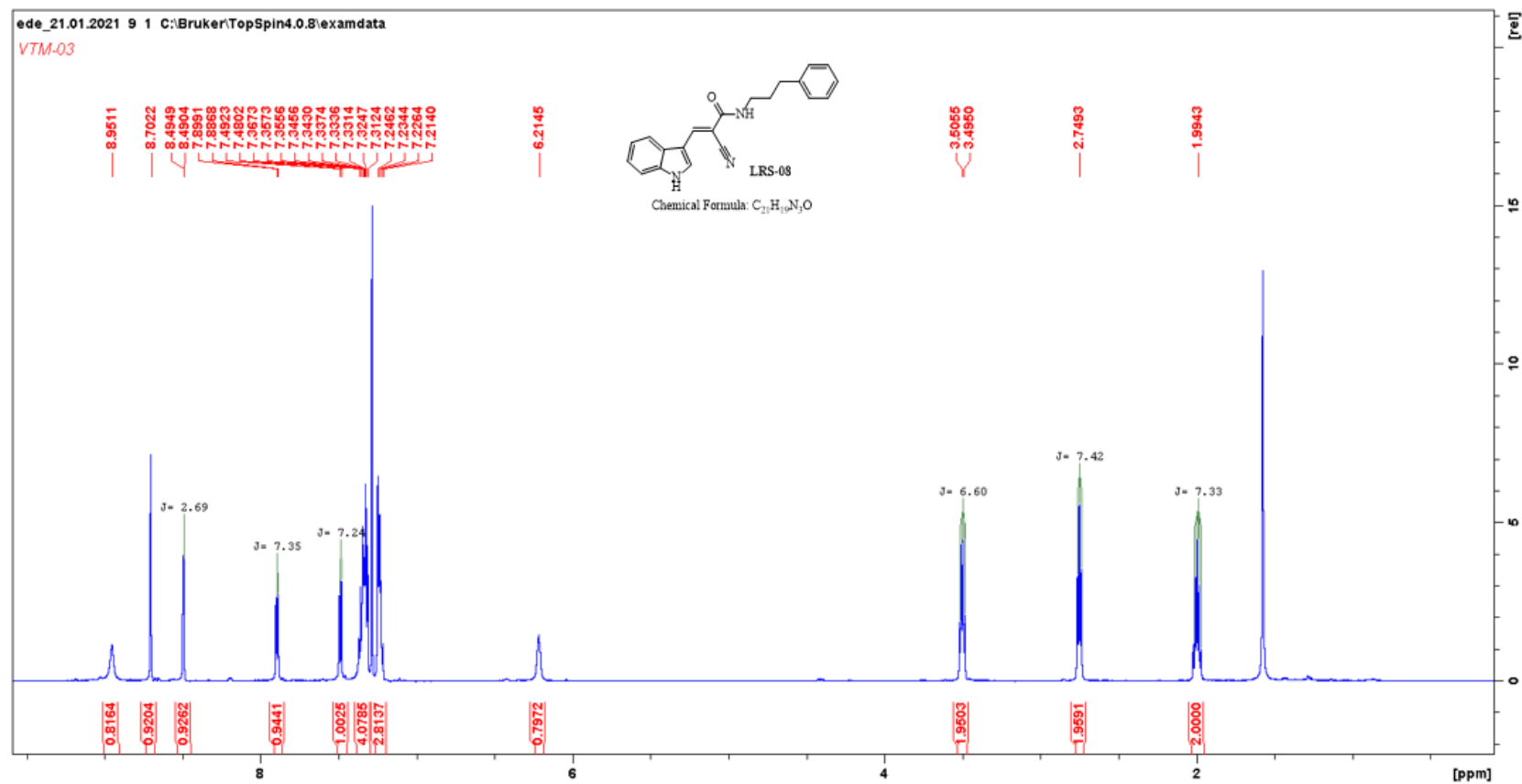






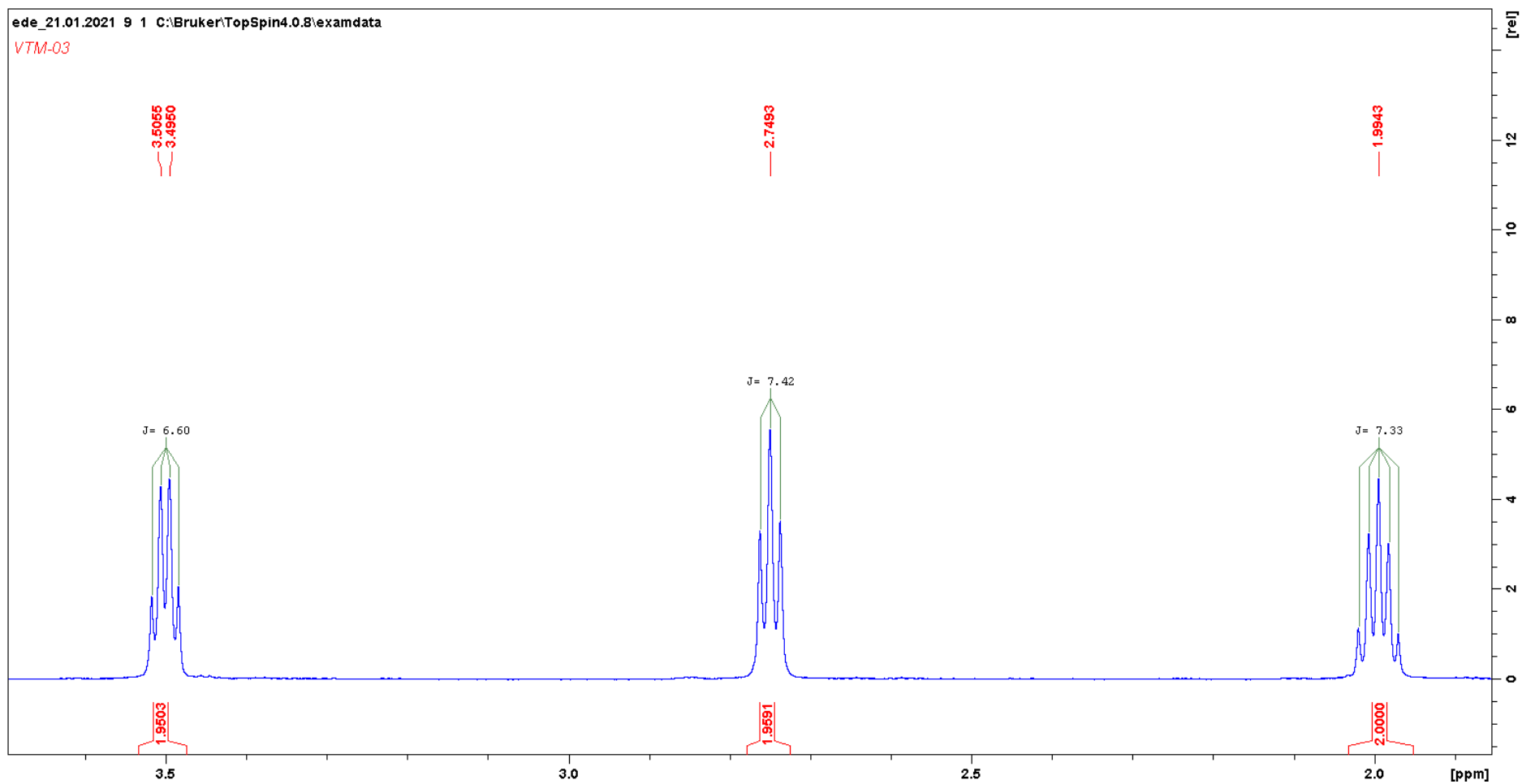
LRS-08

Chemical Formula: $C_{21}H_{19}N_3O$ 



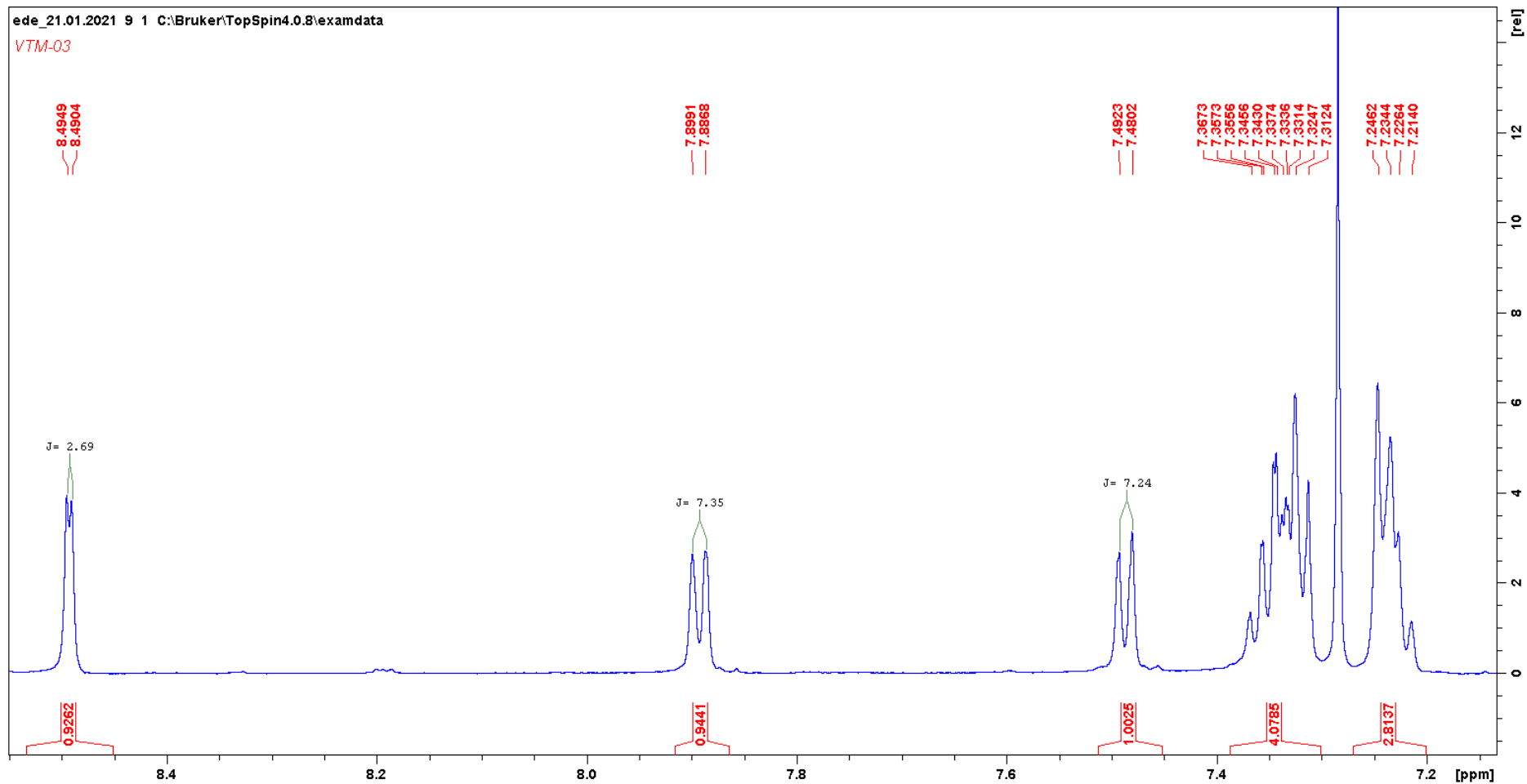
ede_21.01.2021 9 1 C:\Bruker\TopSpin4.0.8\examdata

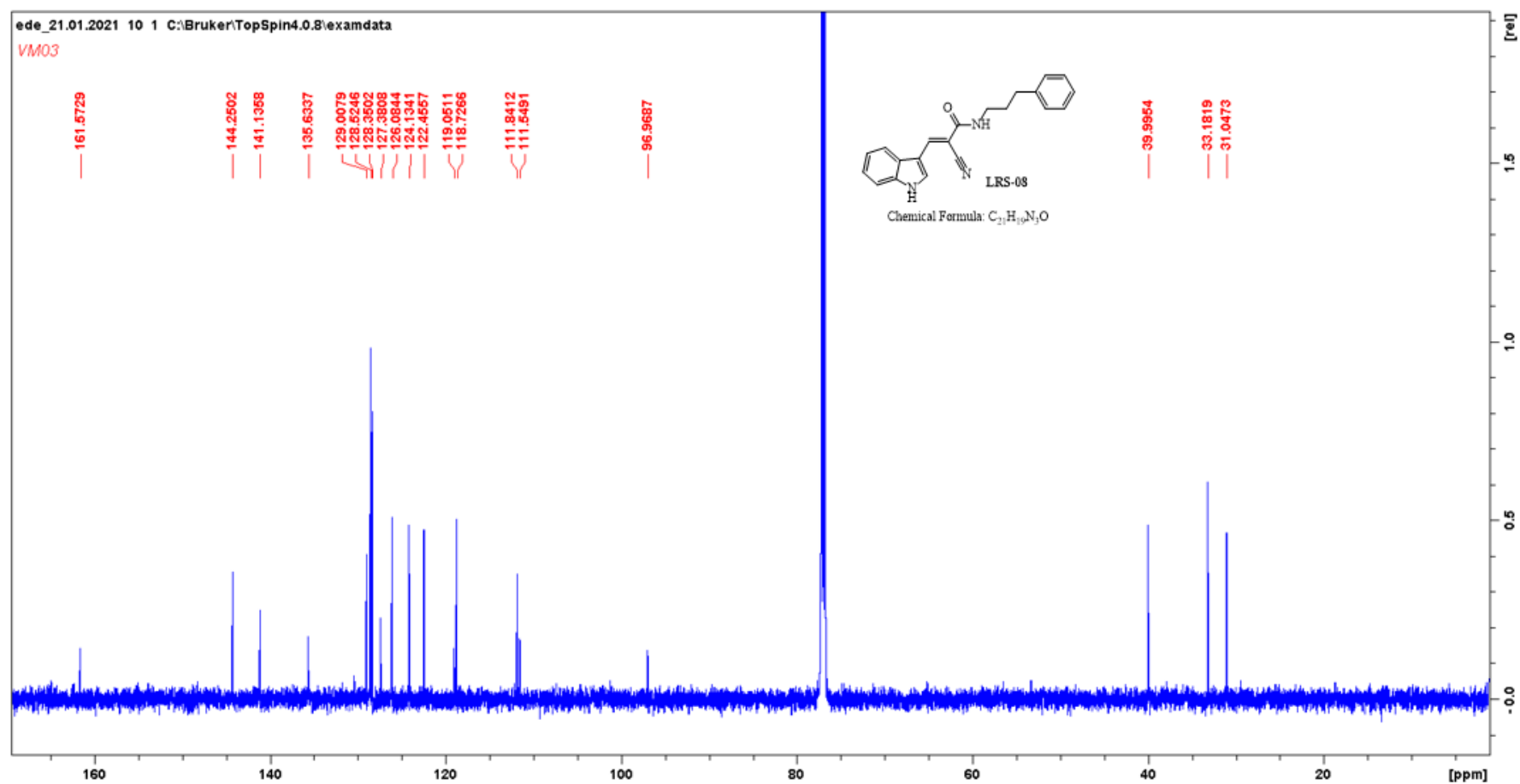
VTM-03

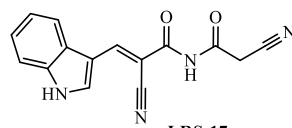
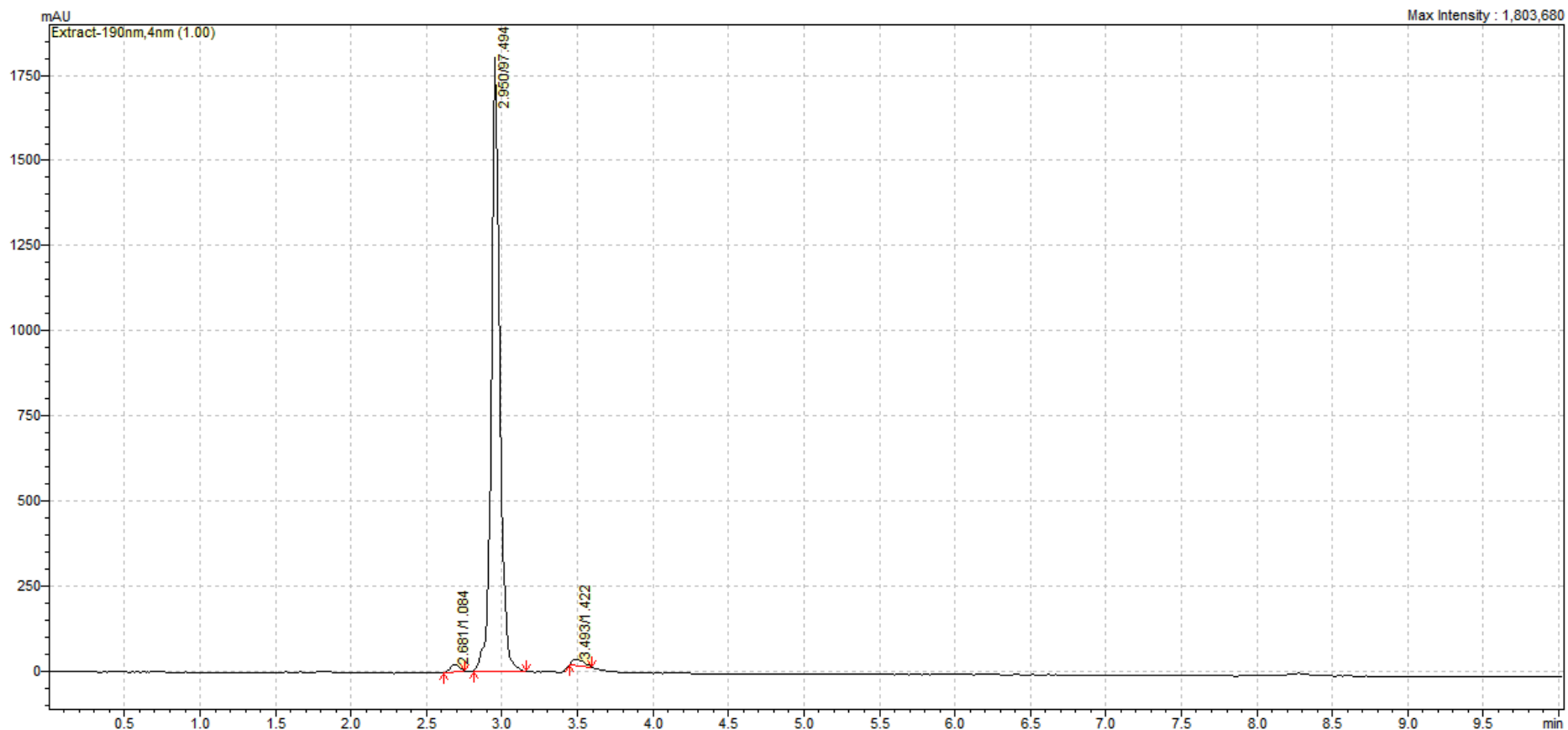


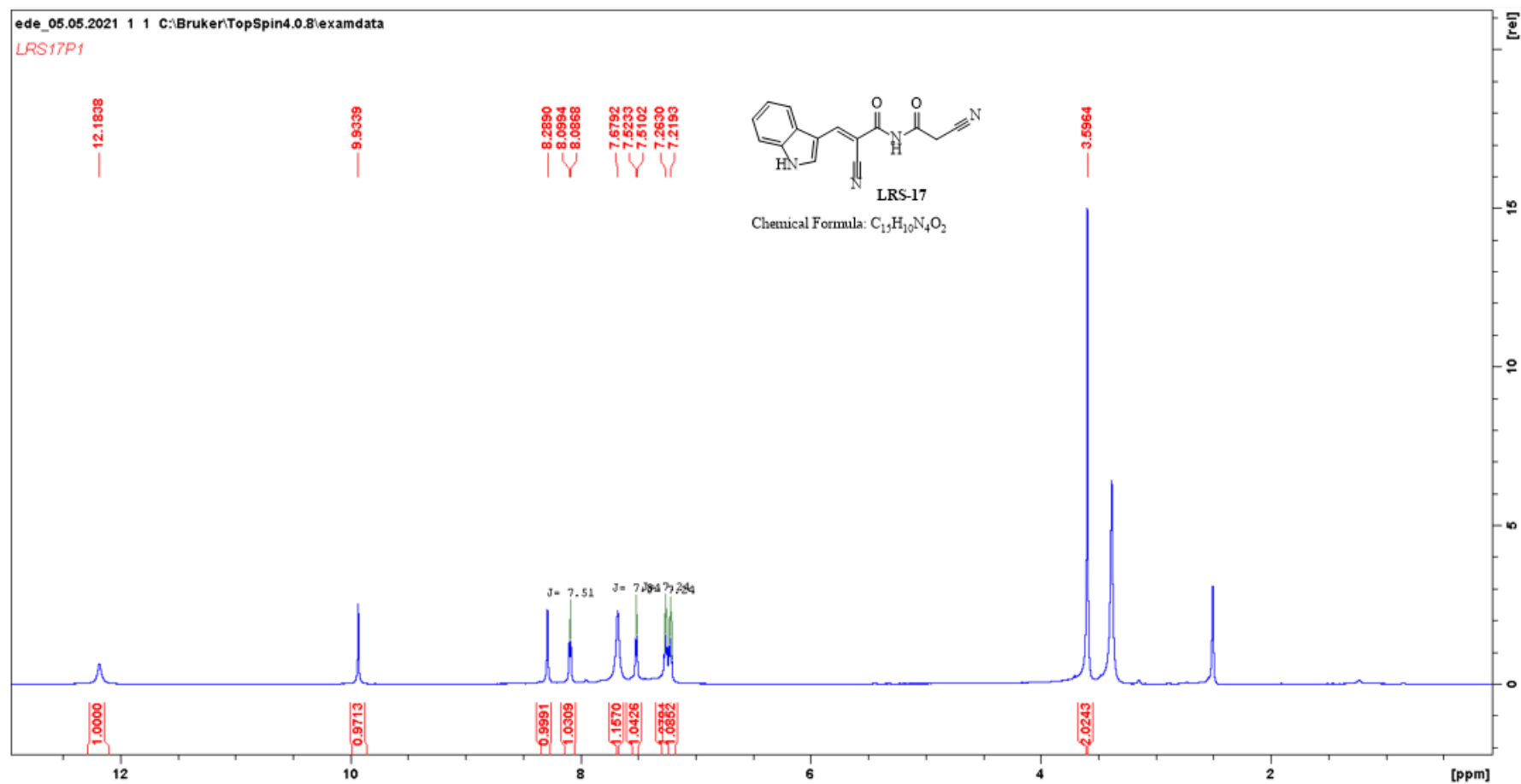
ede_21.01.2021 9 1 C:\Bruker\TopSpin4.0.8\examdata

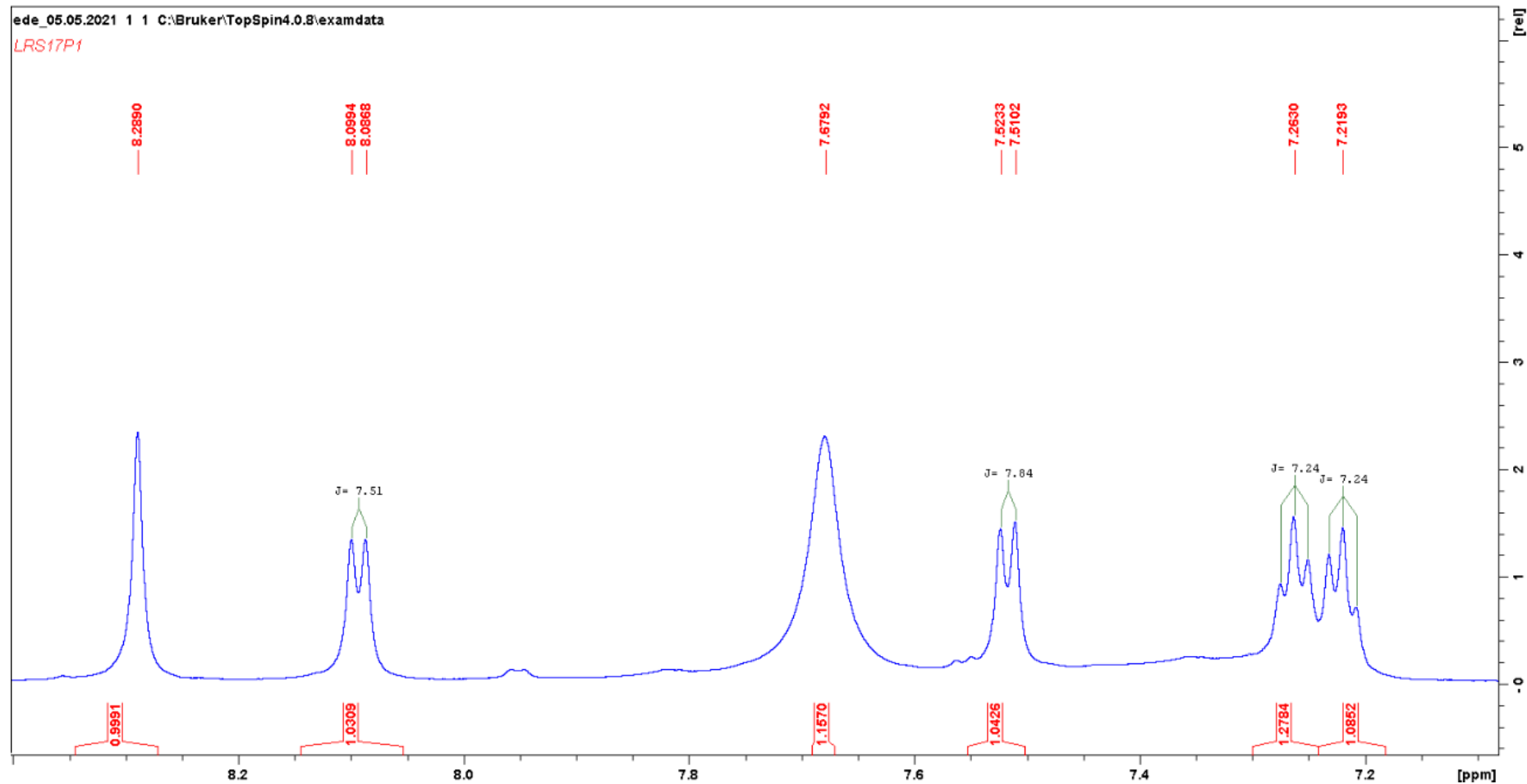
VTM-03

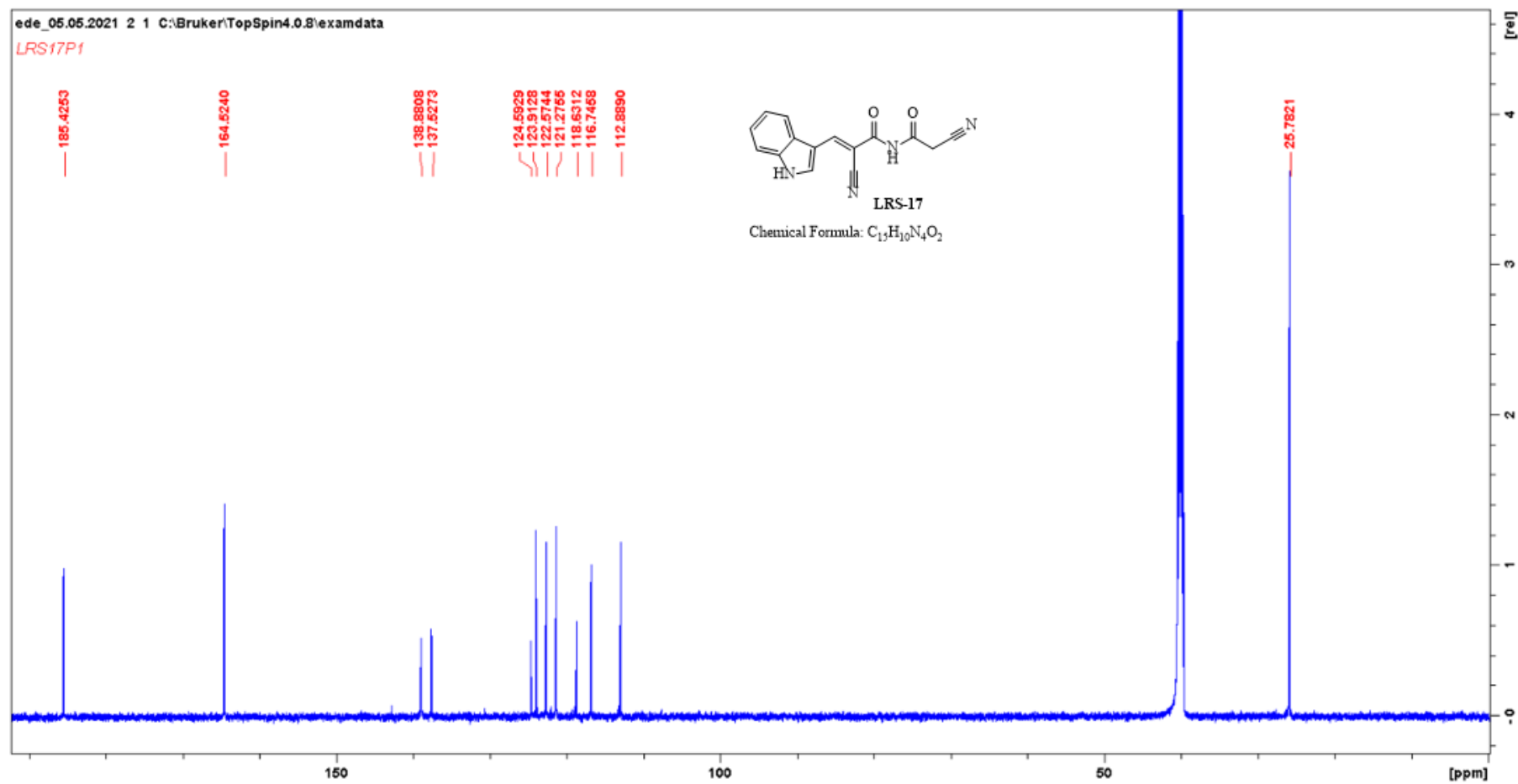


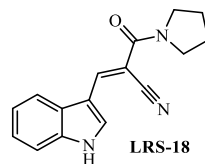
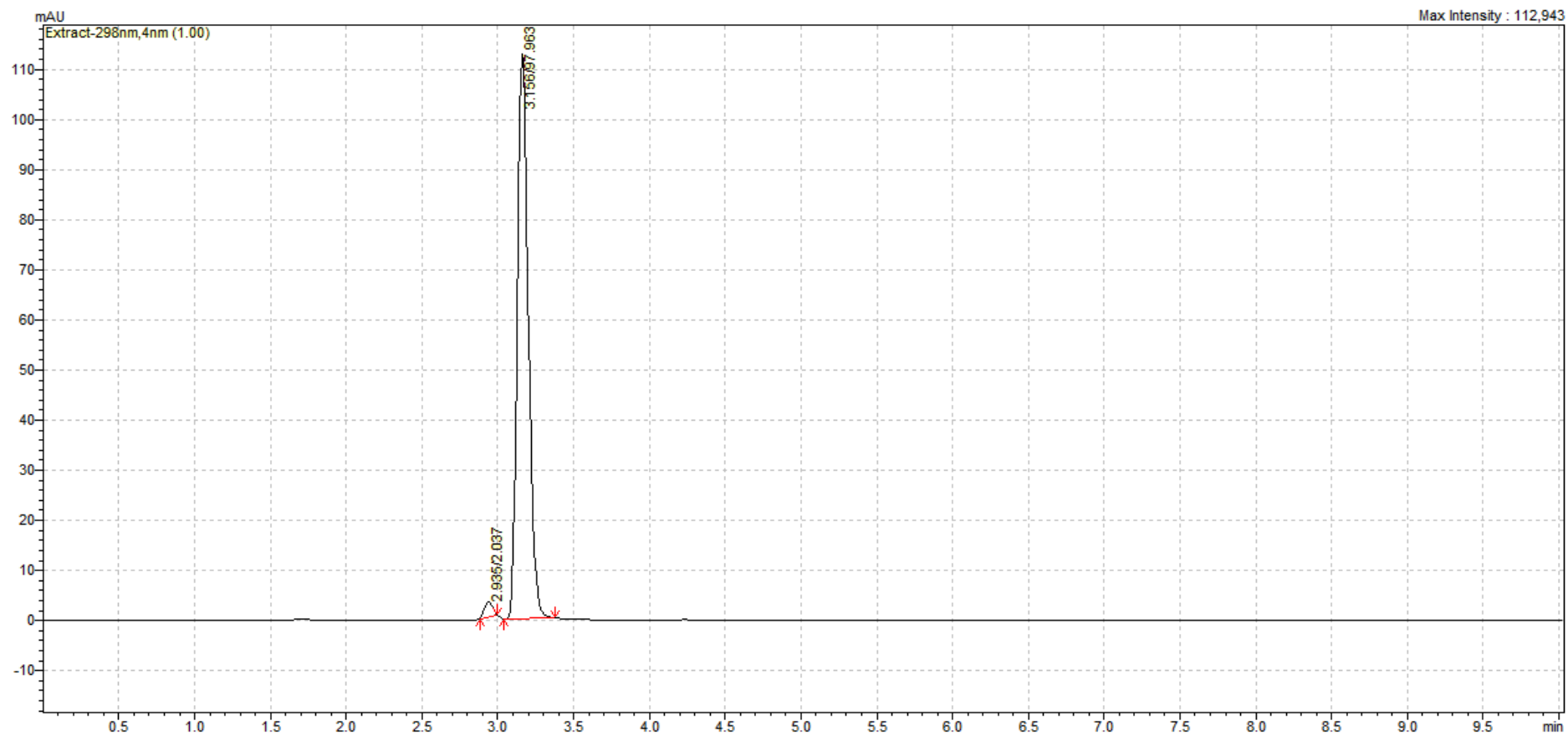


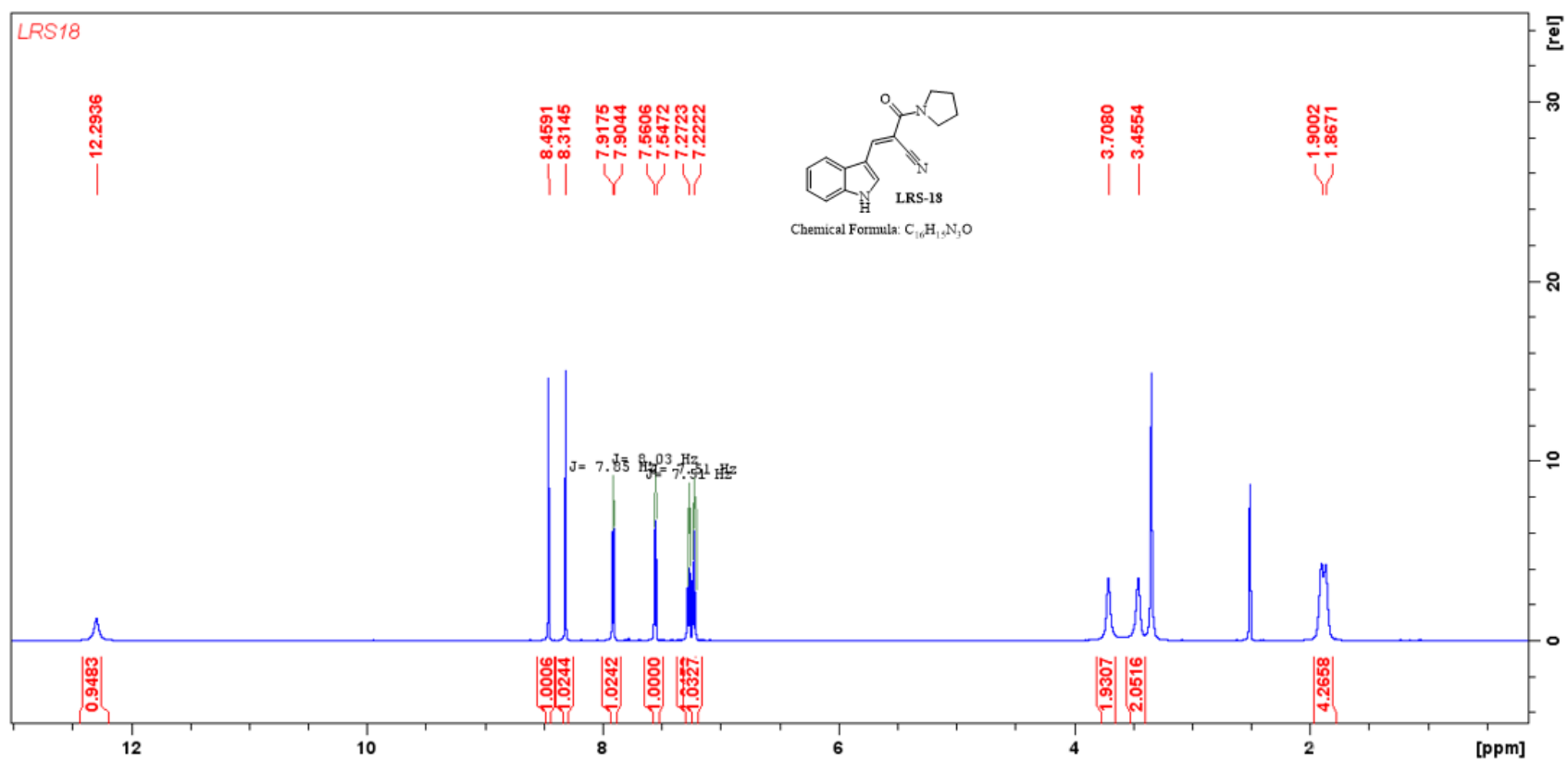
**LRS-17**Chemical Formula: $C_{15}H_{10}N_4O_2$ 

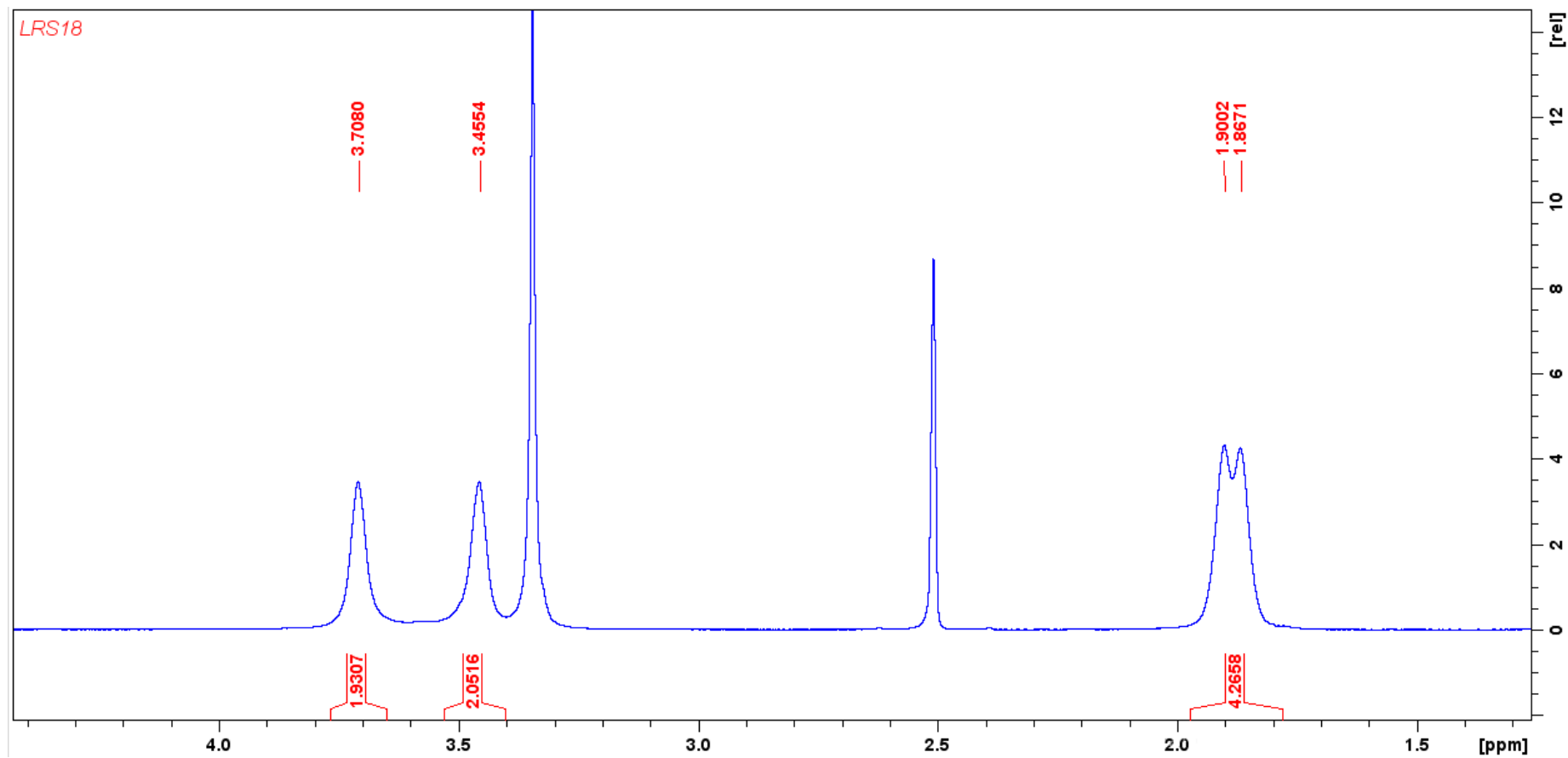


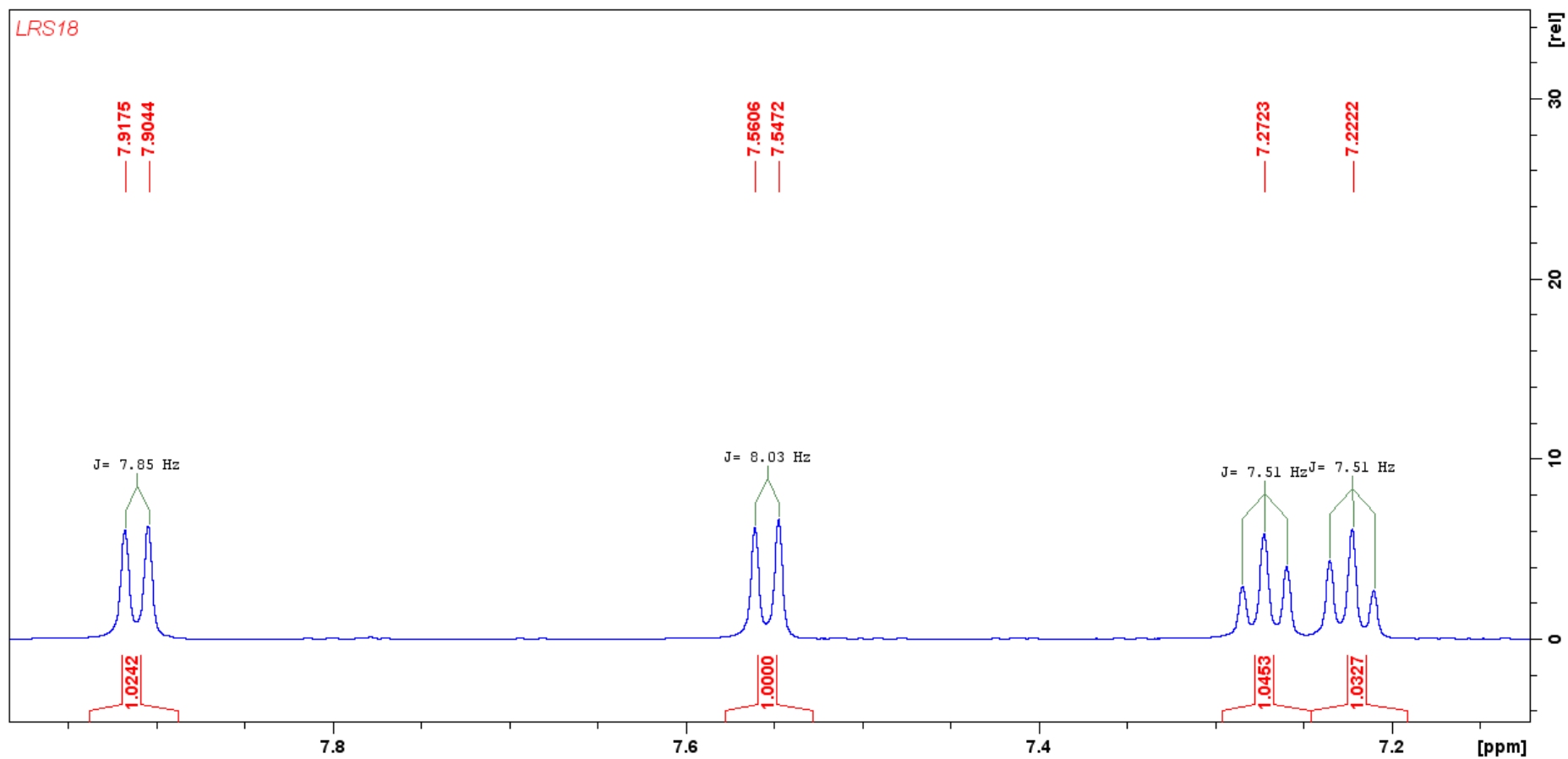


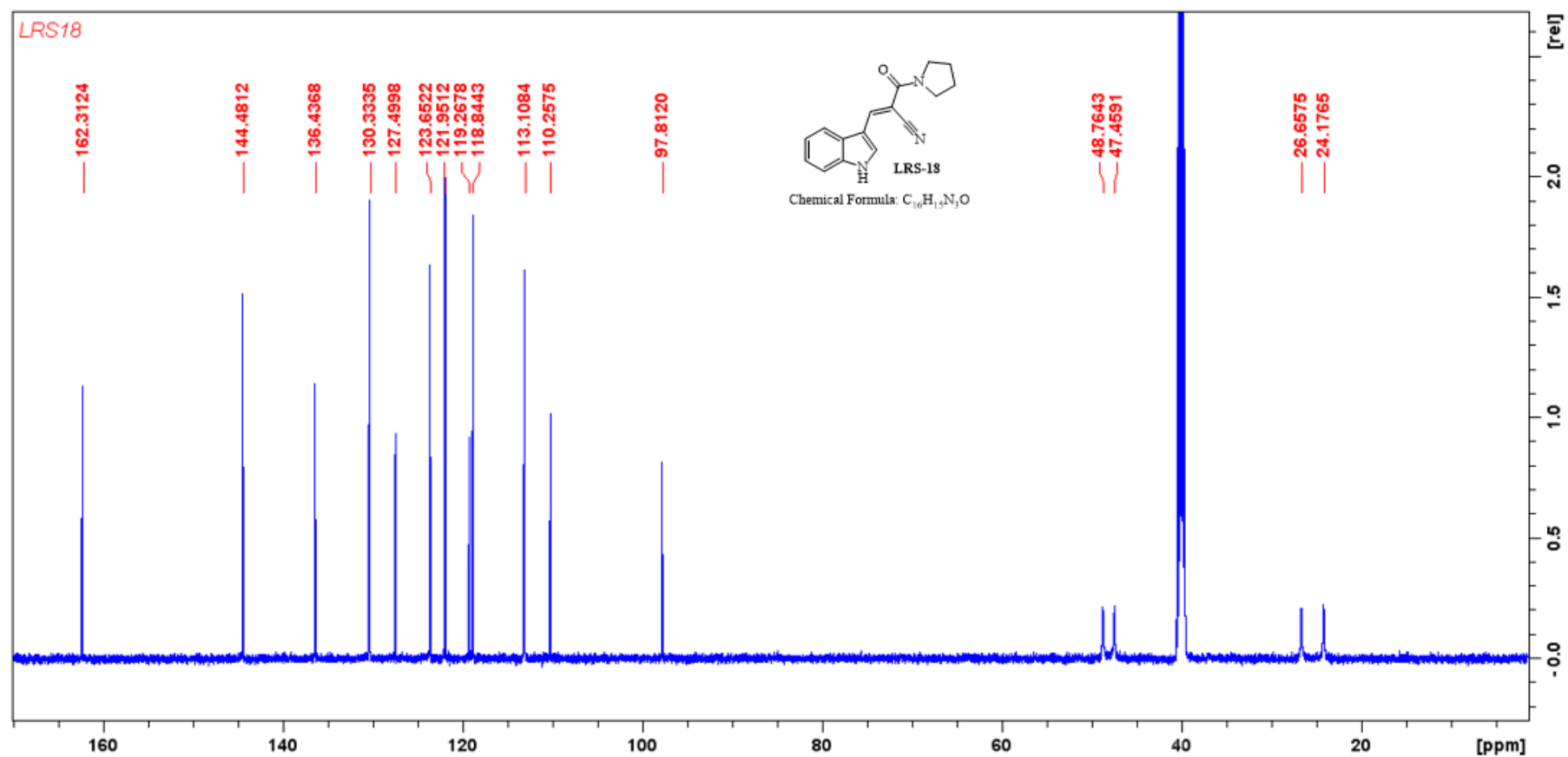


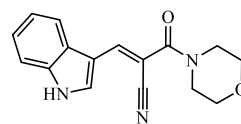
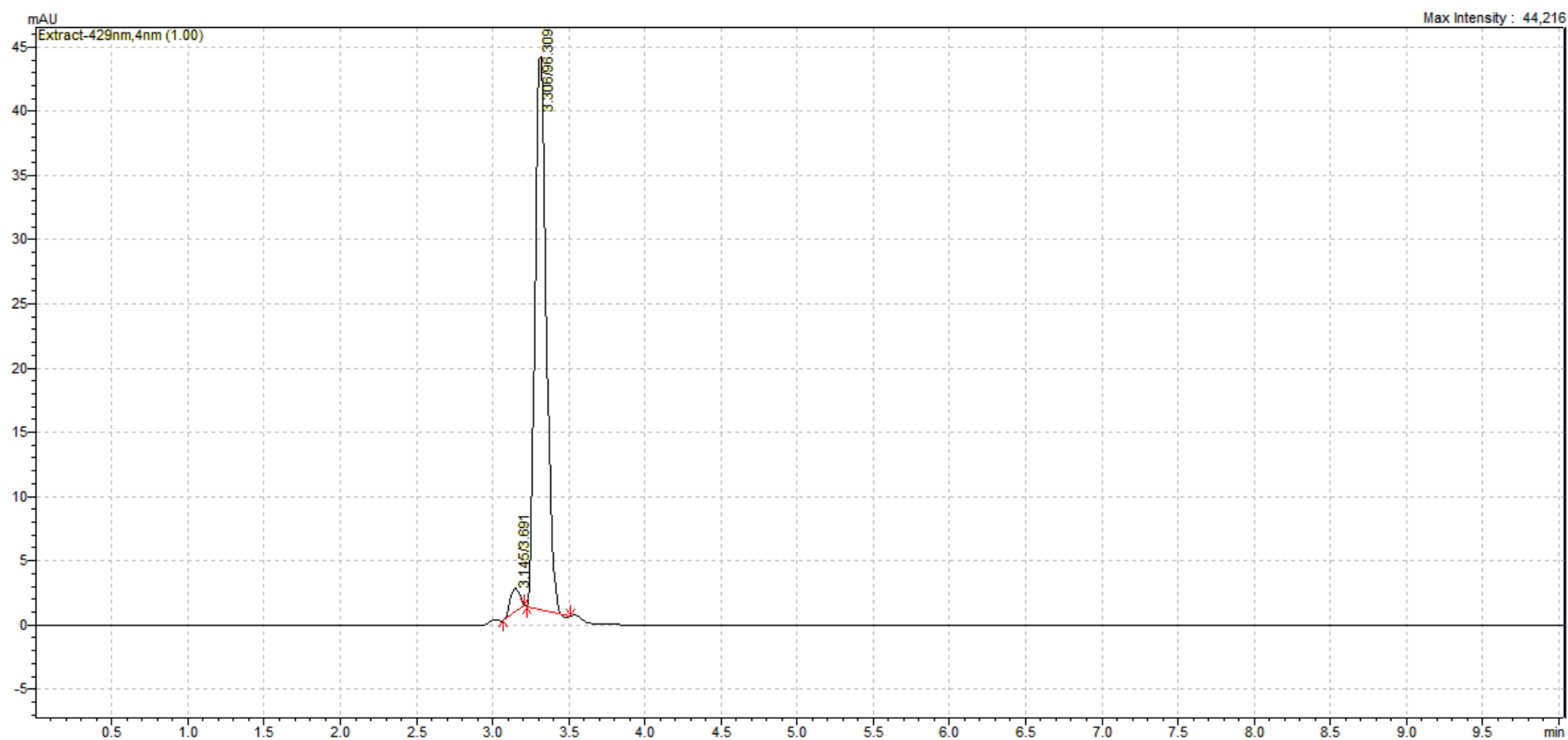
**LRS-18**Chemical Formula: $C_{16}H_{15}N_3O$ 

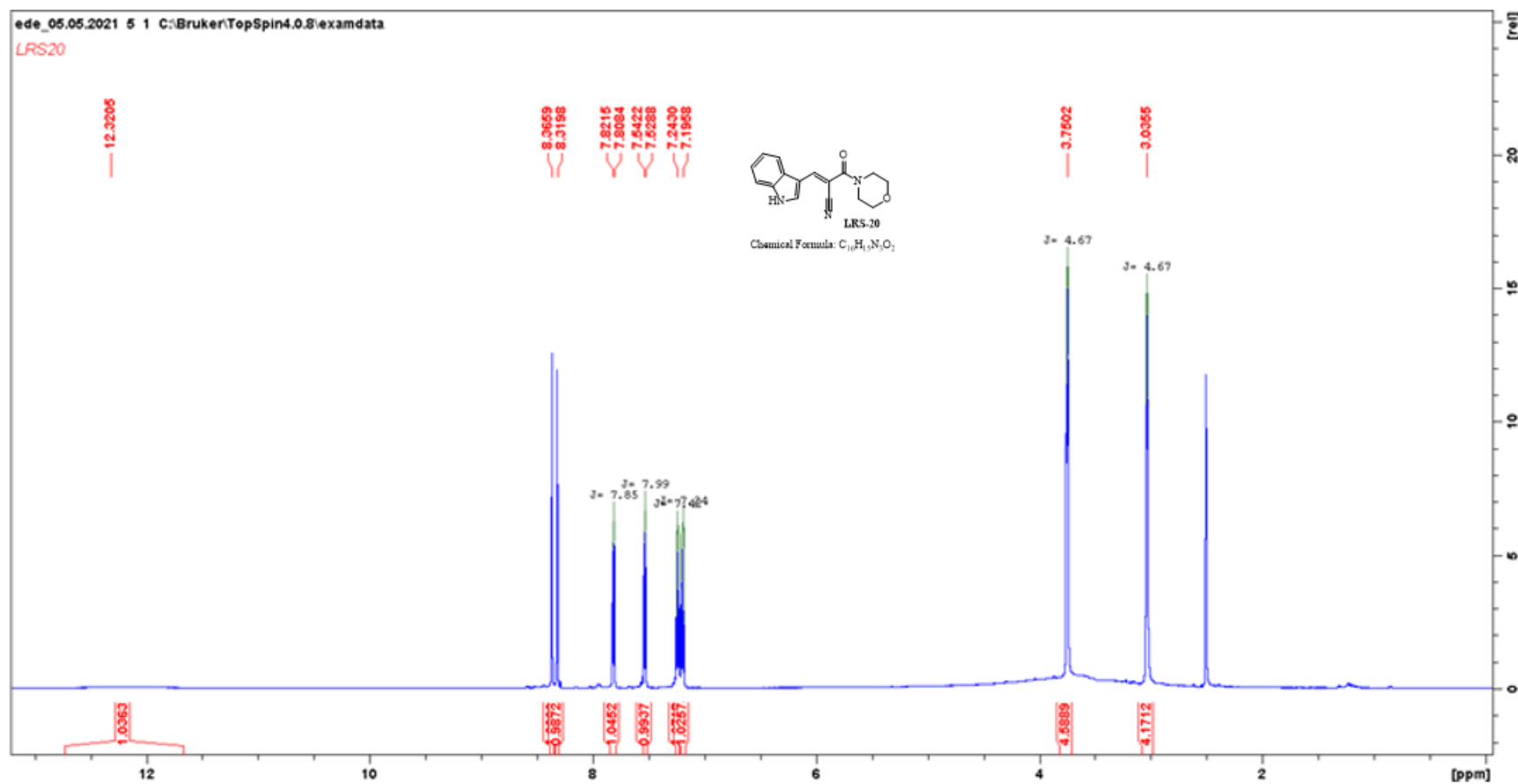


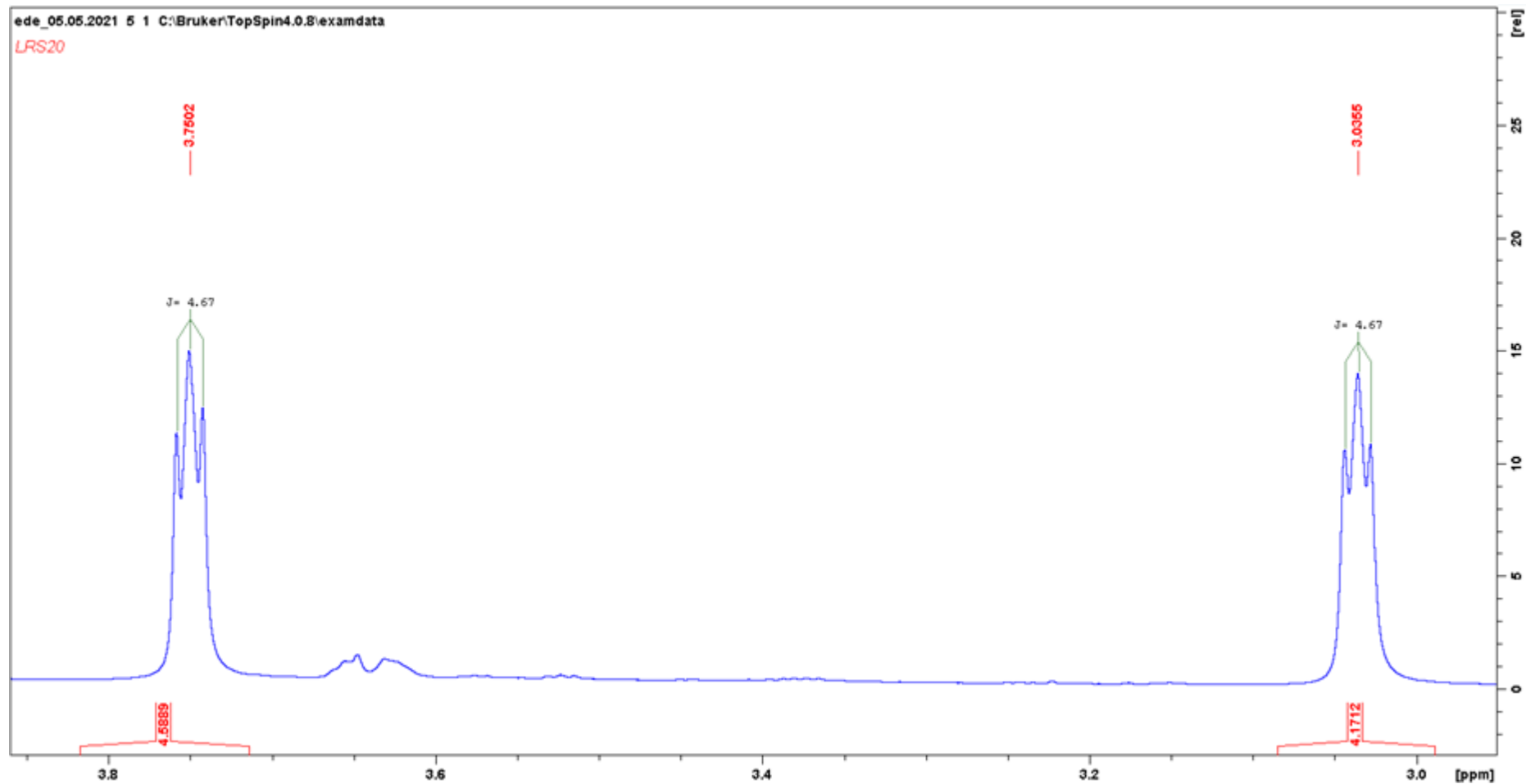


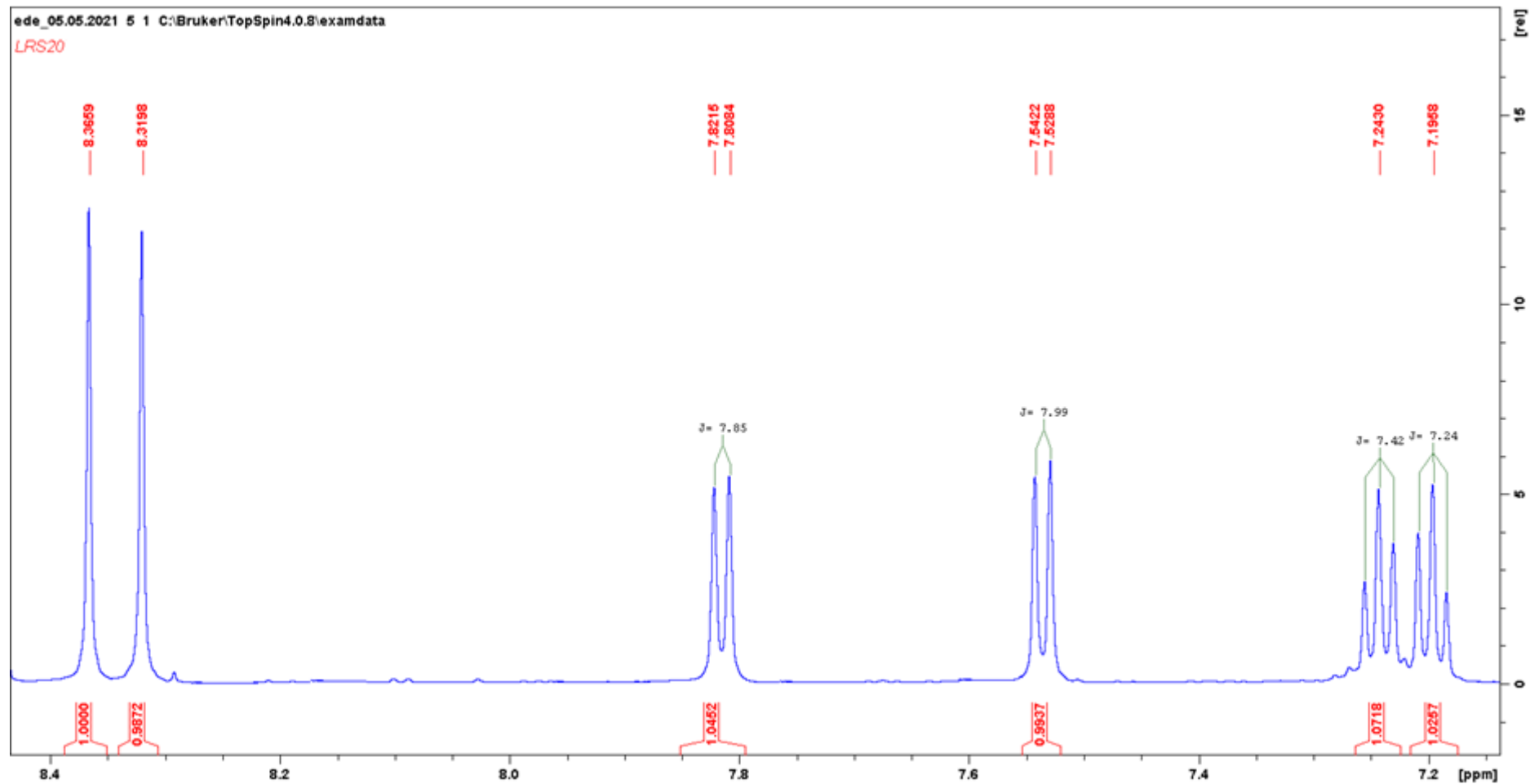


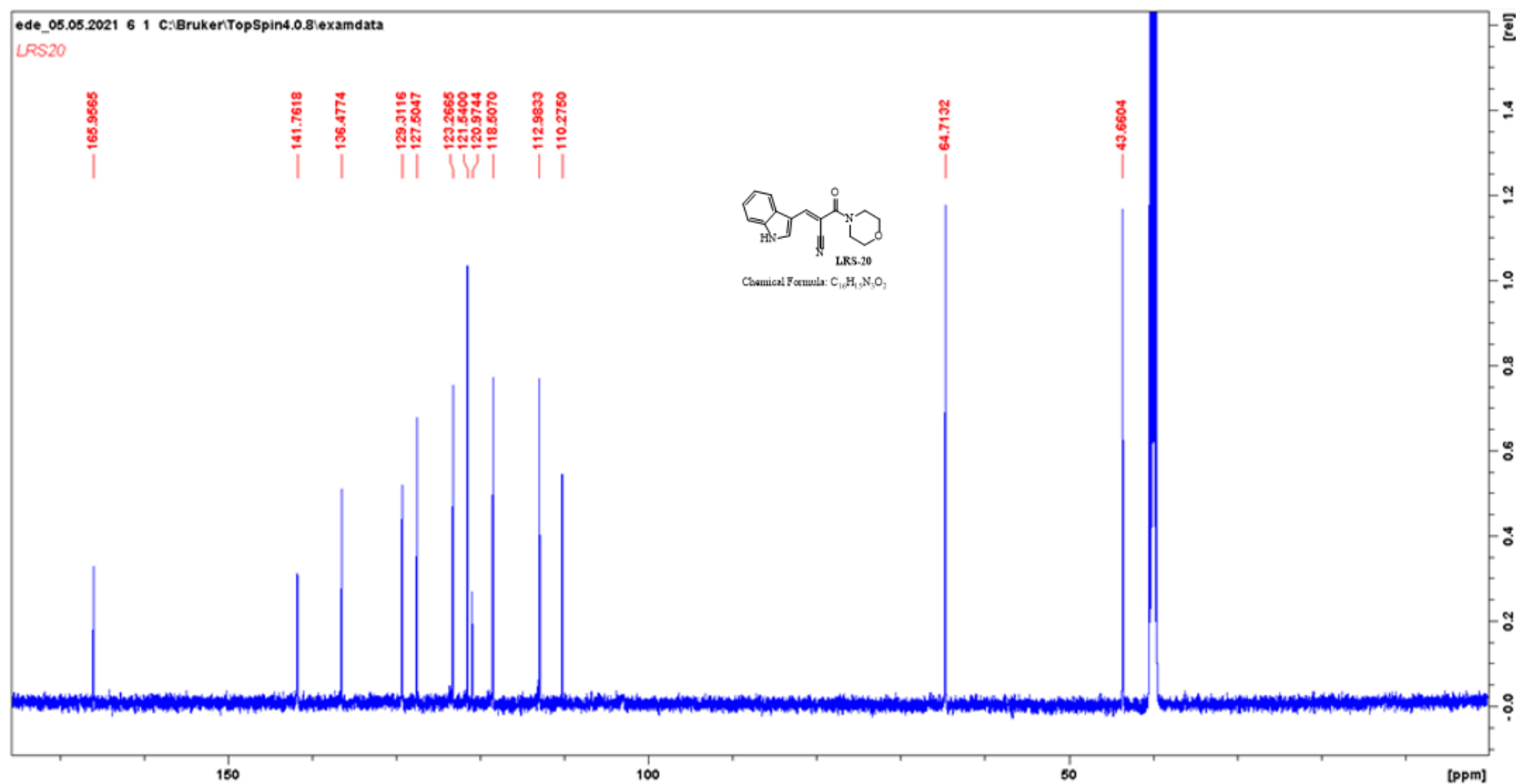


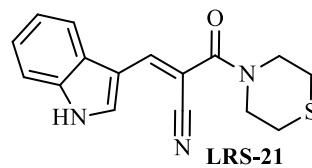
**LRS-20**Chemical Formula: $C_{16}H_{15}N_3O_2$ 



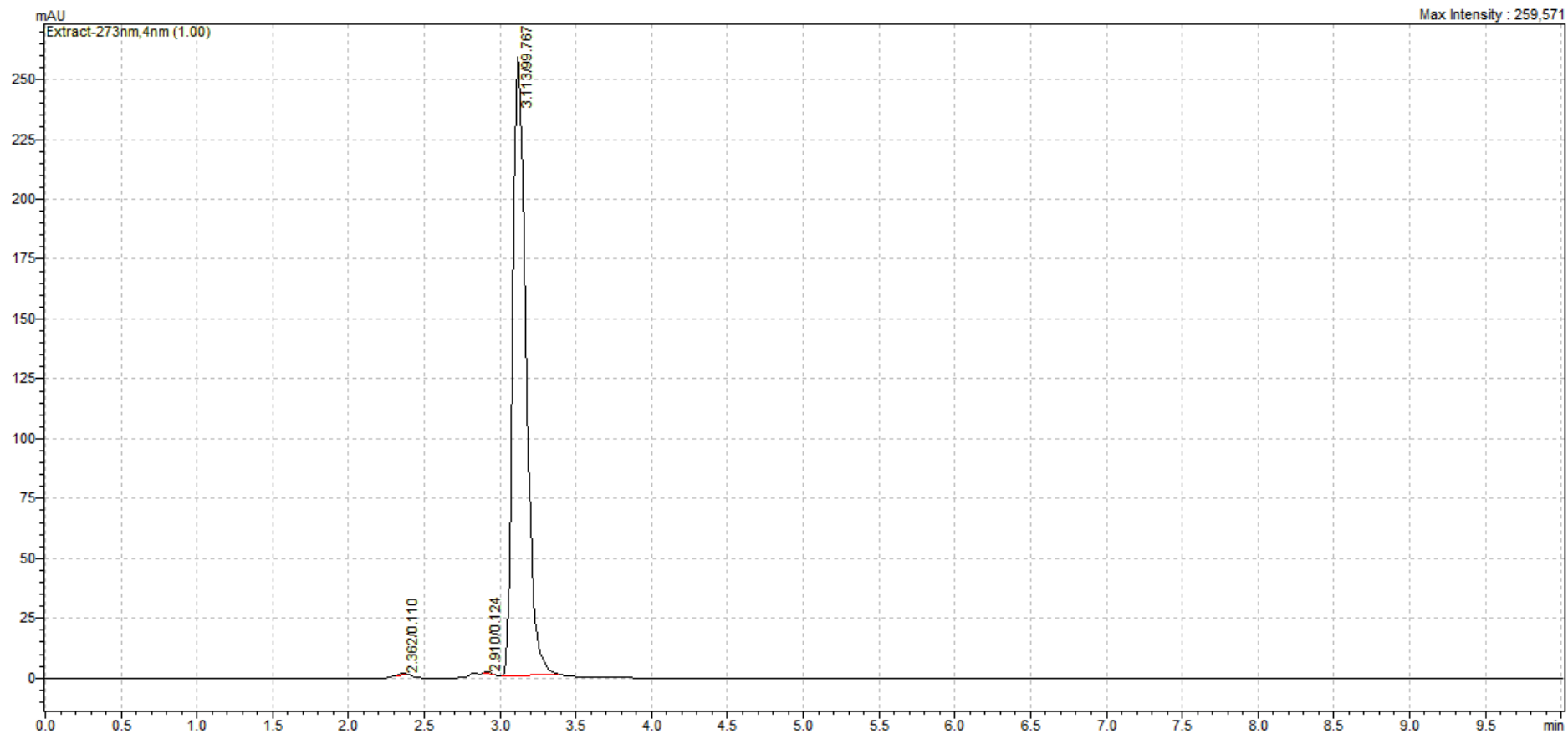


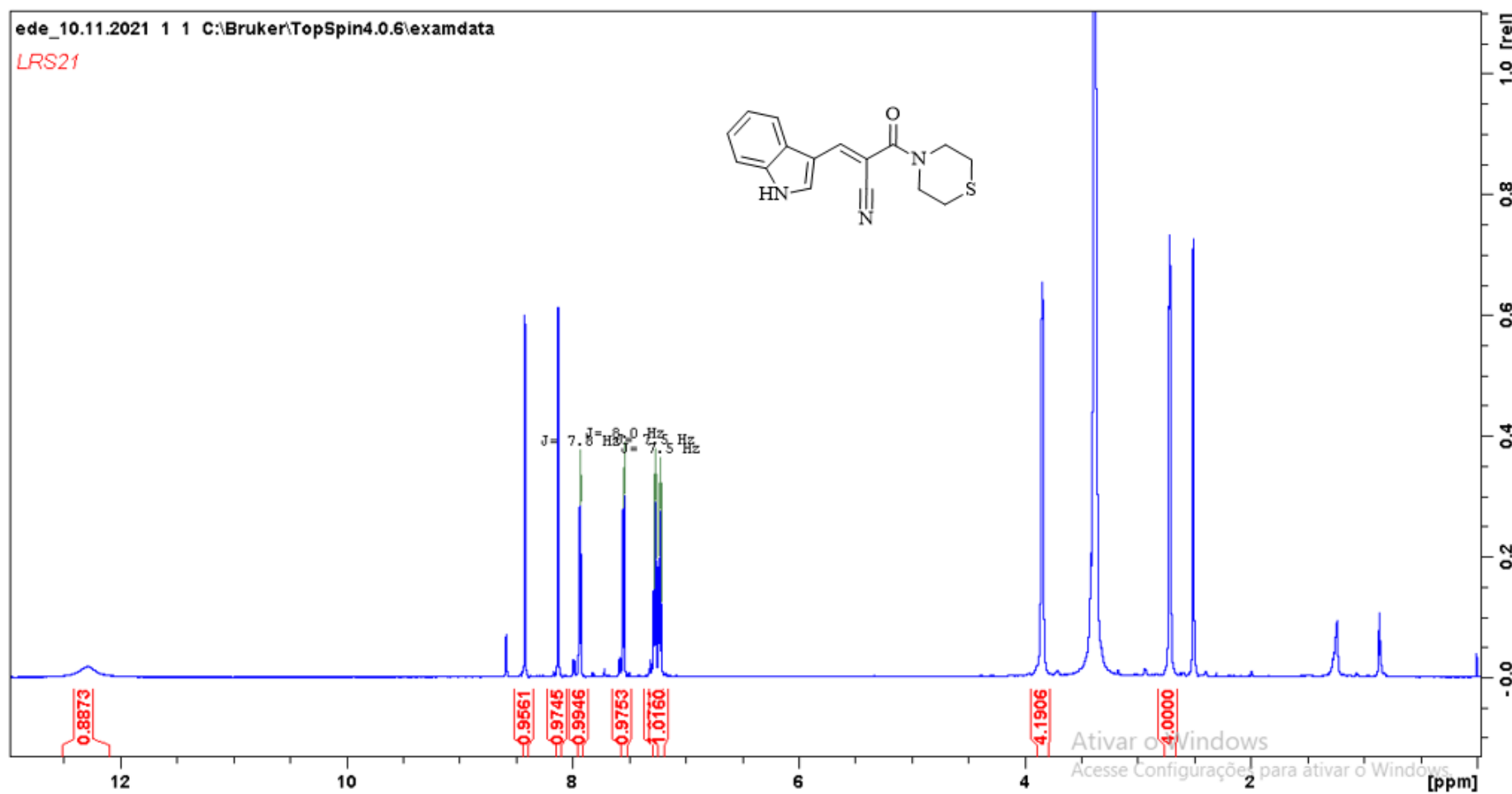


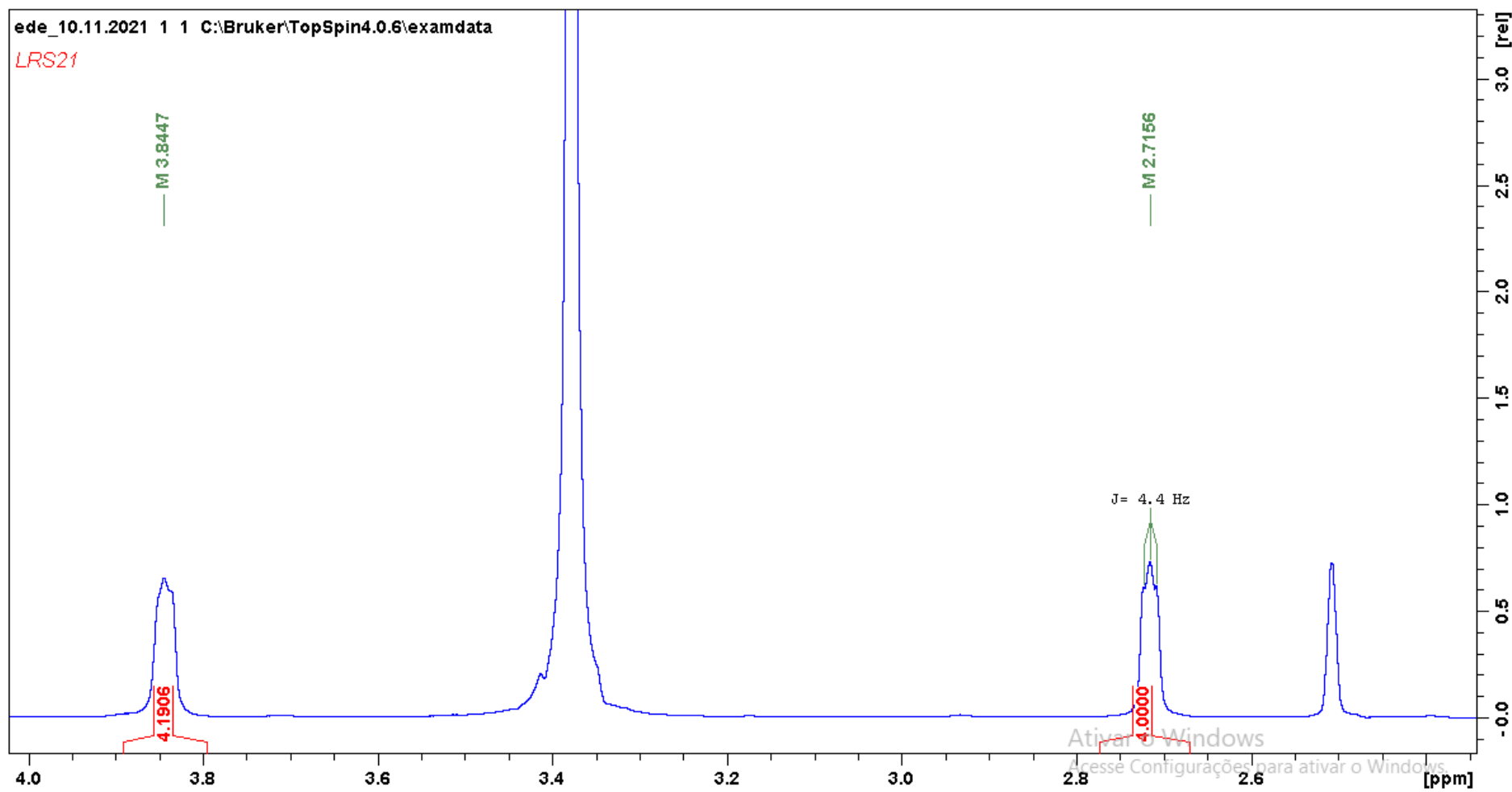


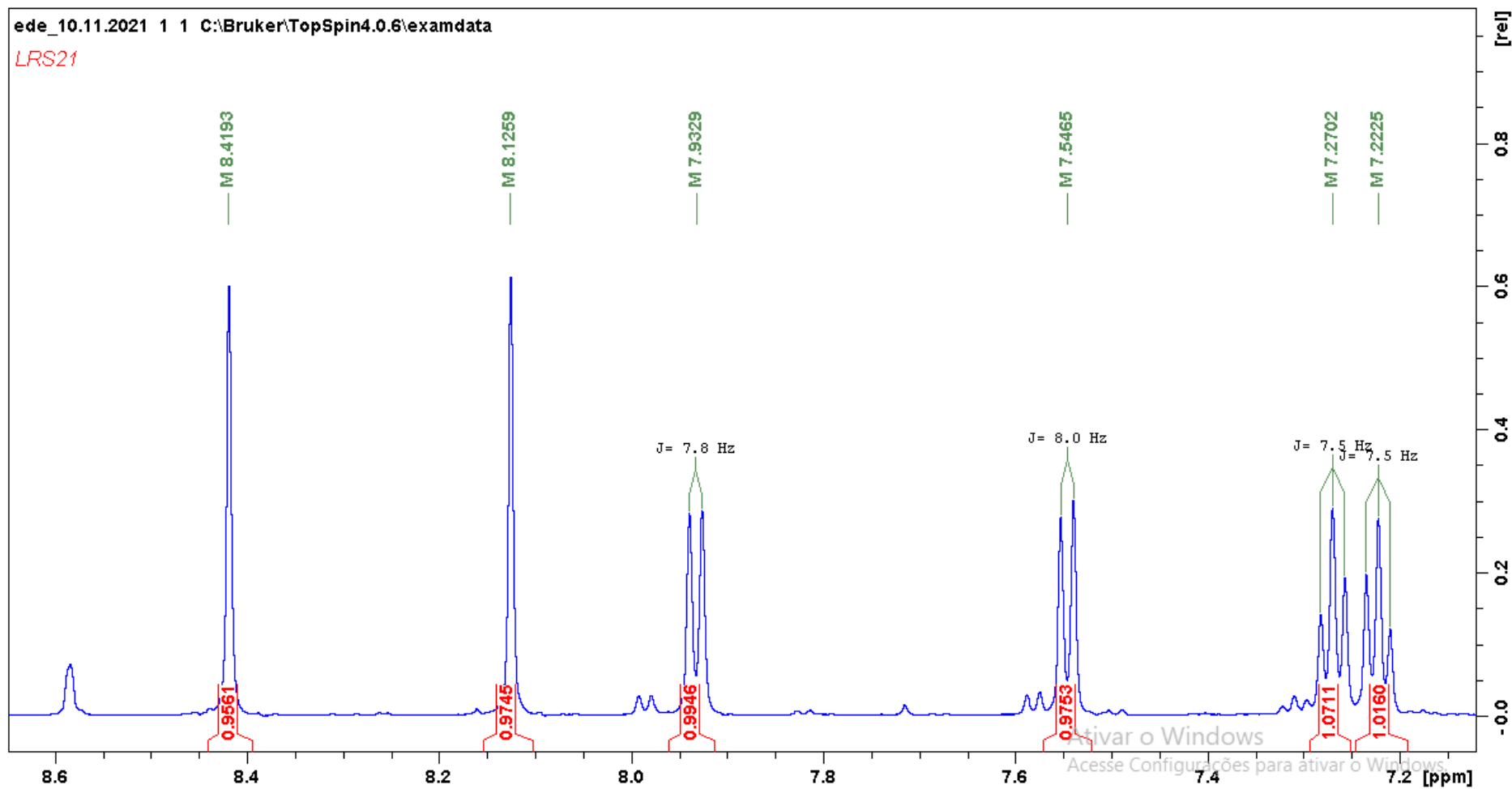


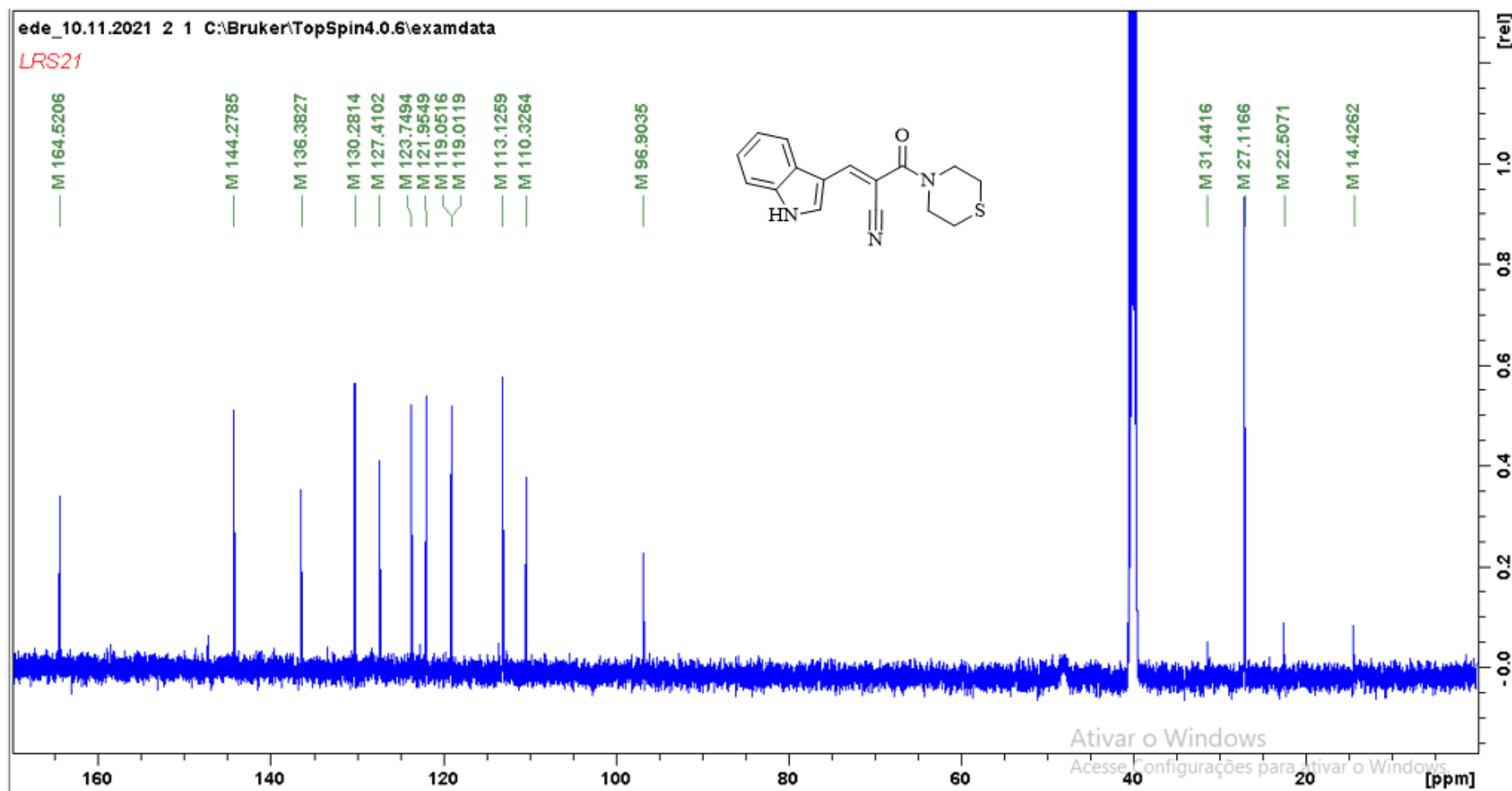
Chemical Formula: $C_{16}H_{15}N_3OS$

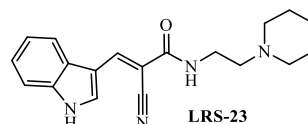




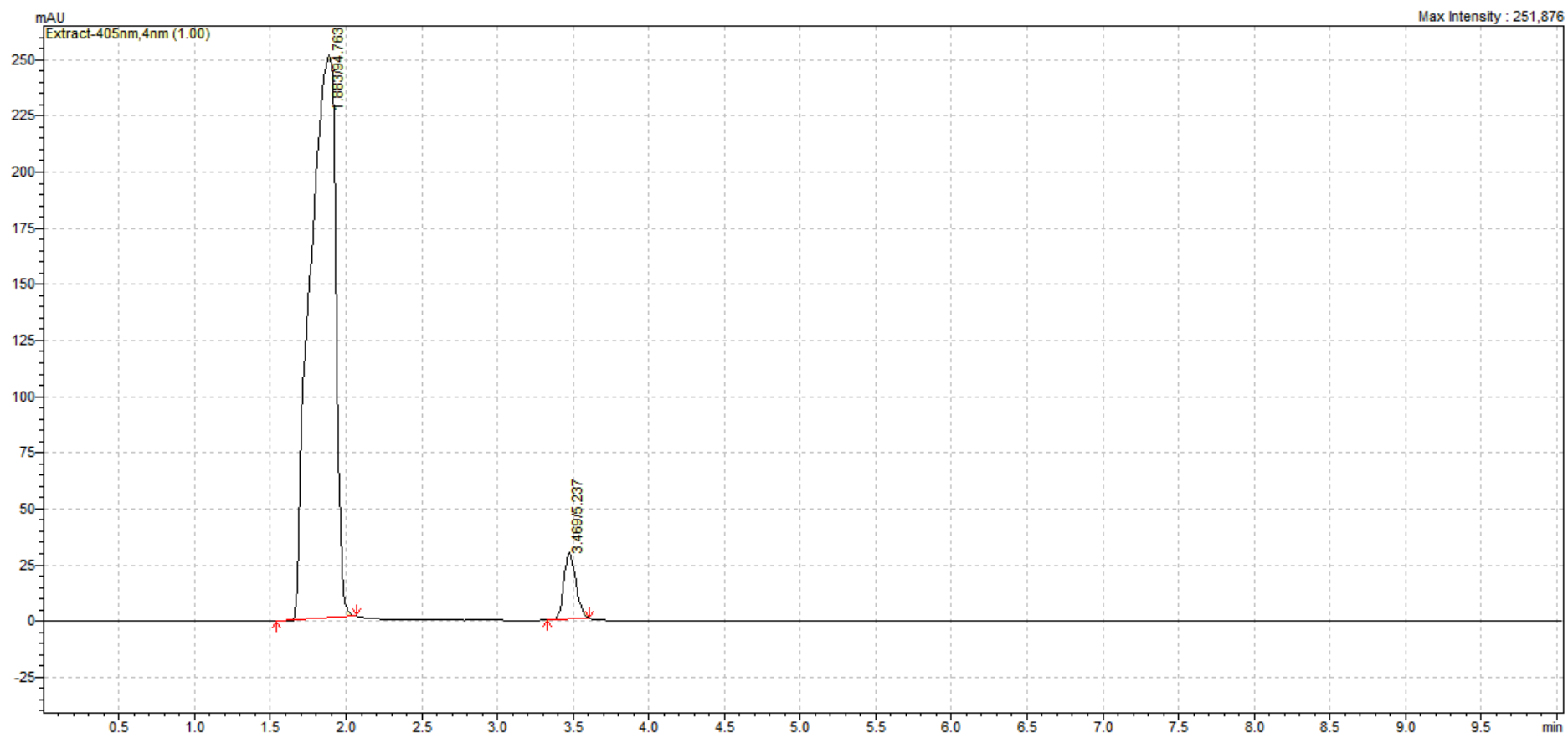


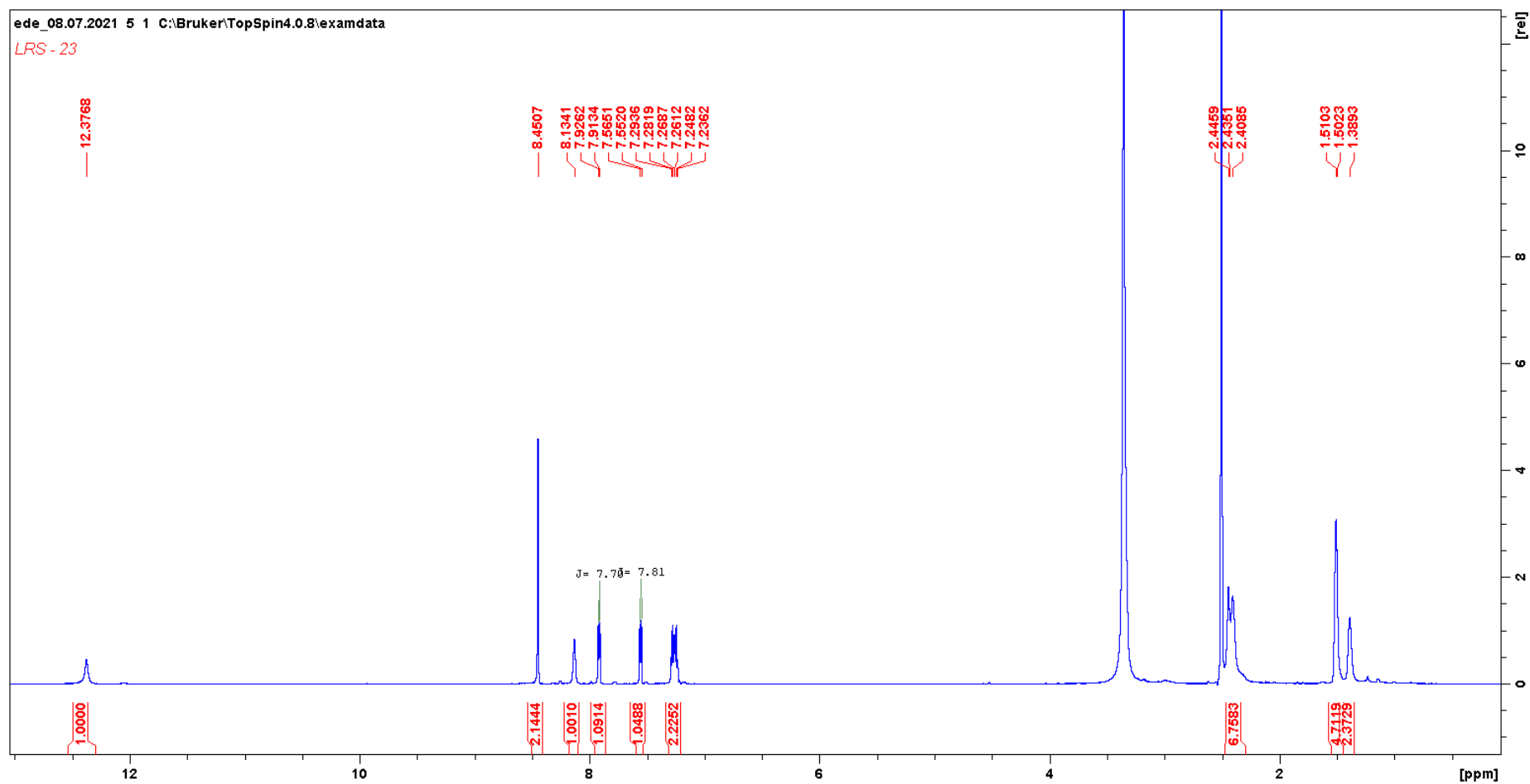


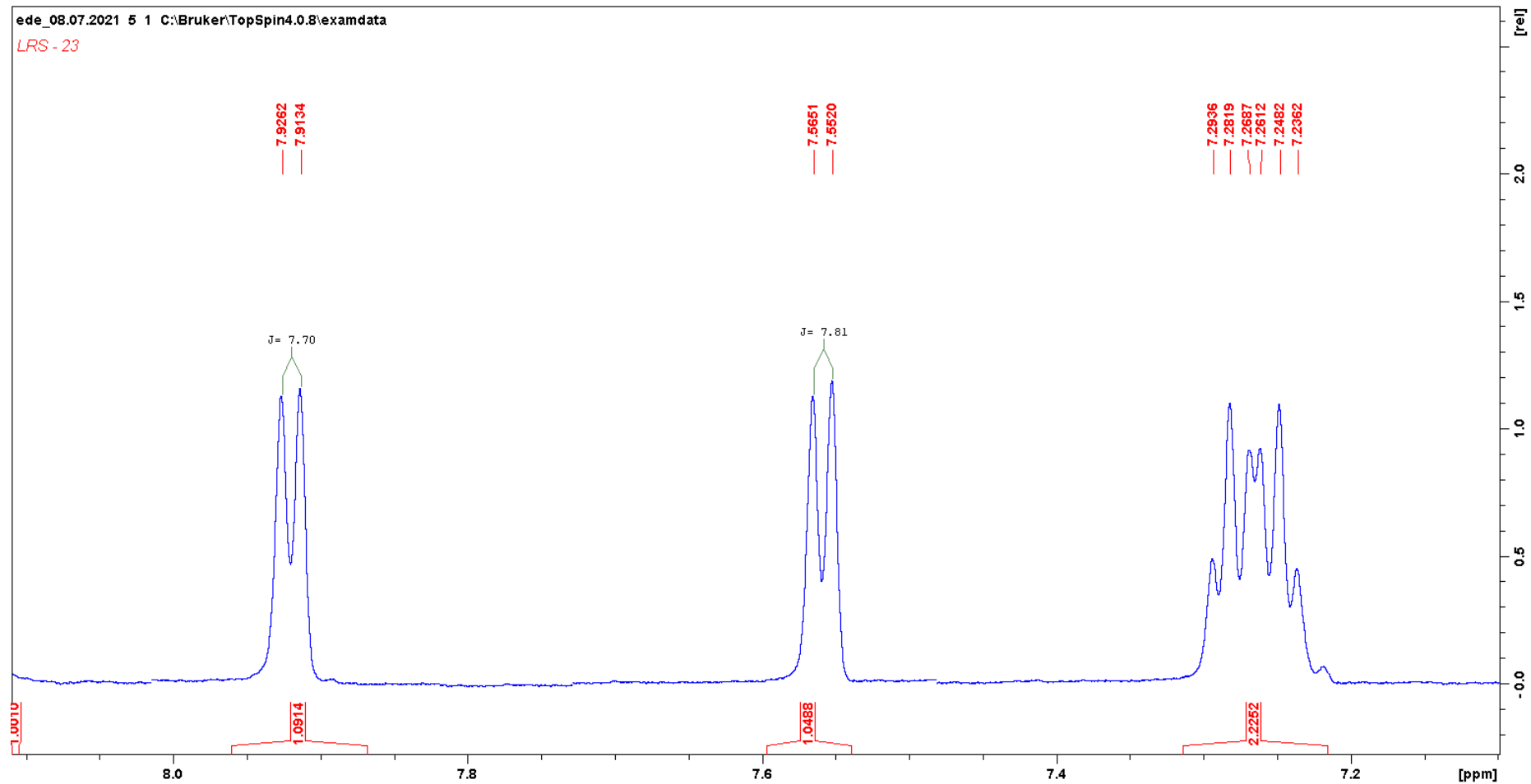


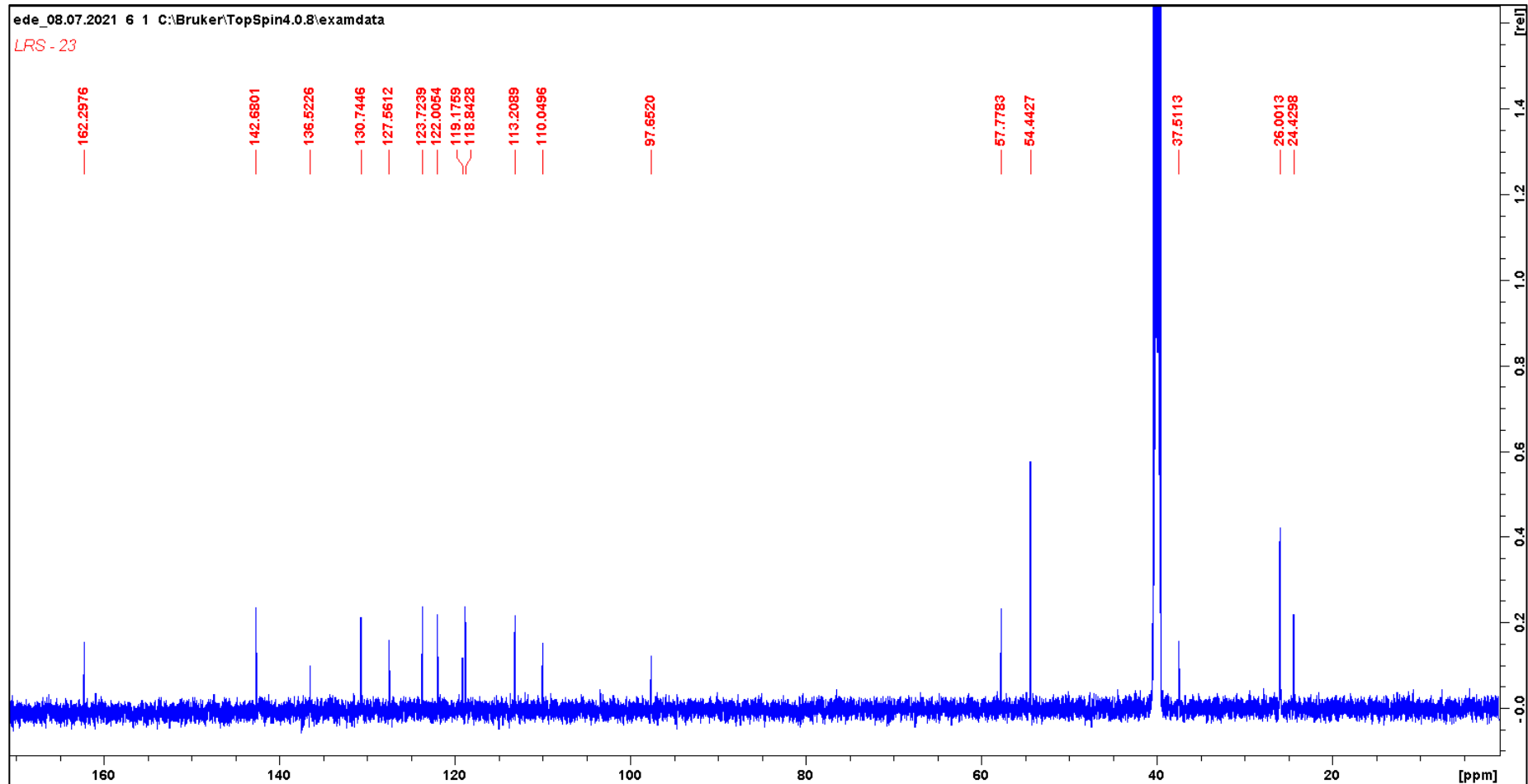


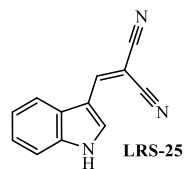
Chemical Formula: C₁₉H₂₂N₄O



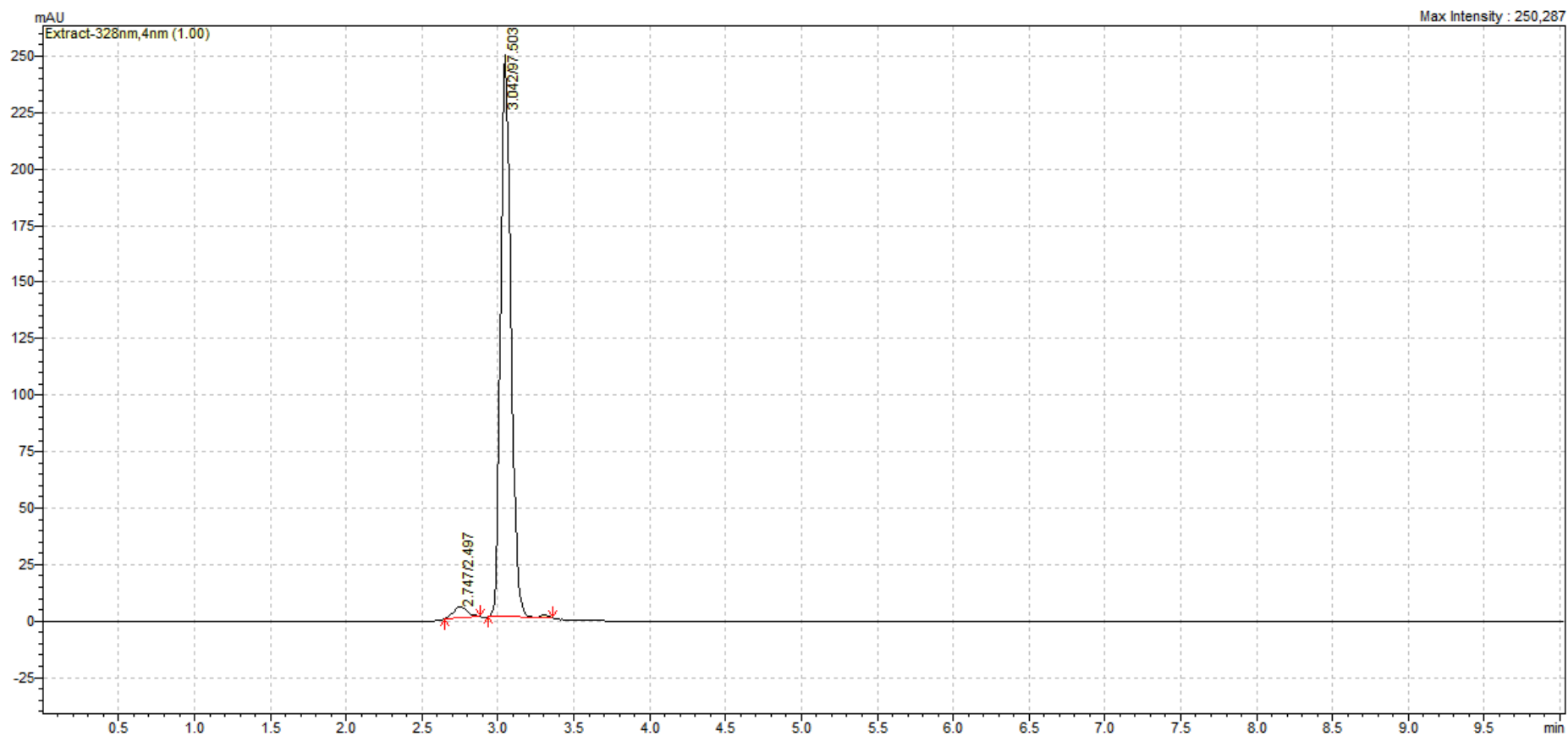


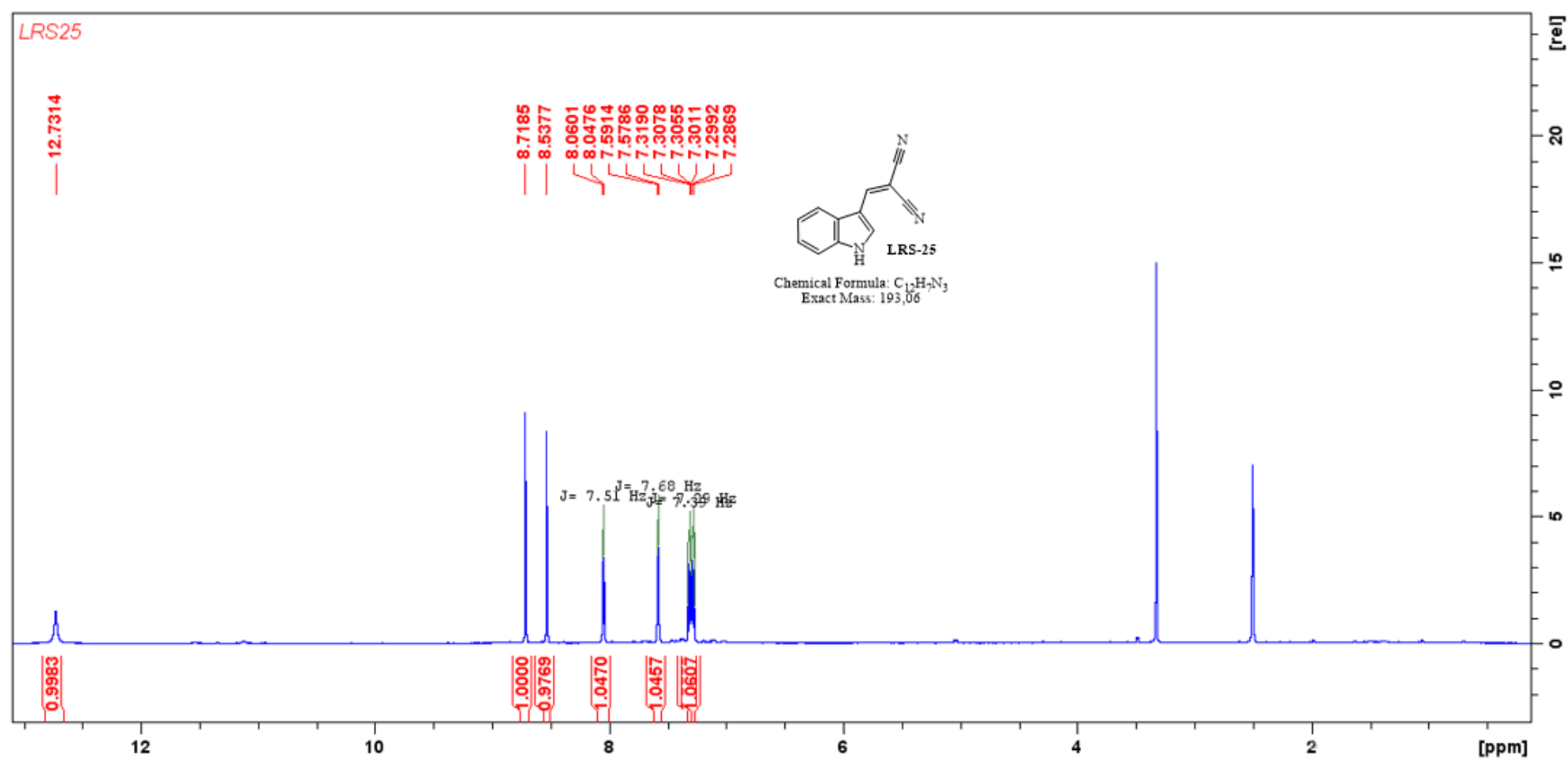


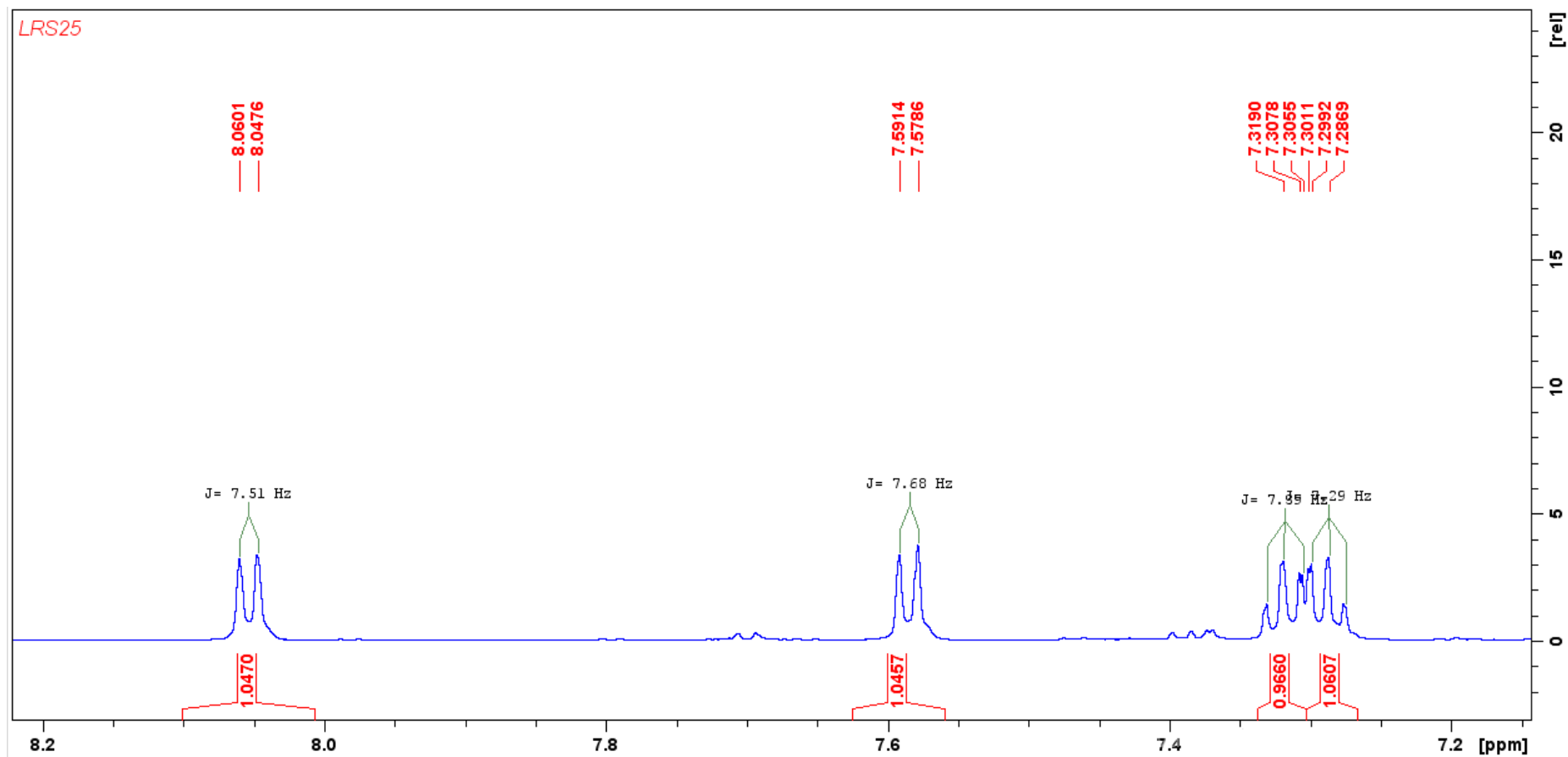


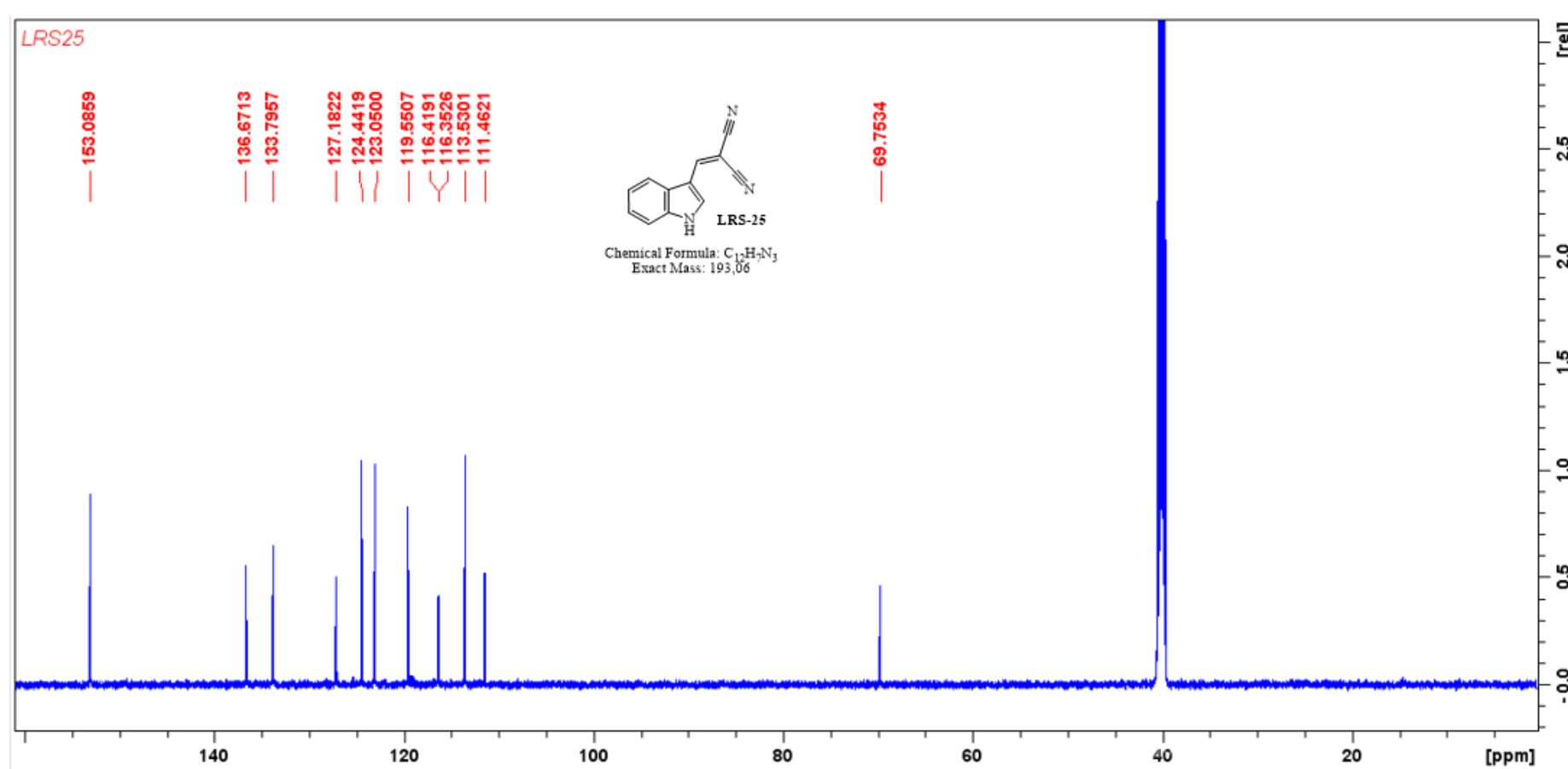


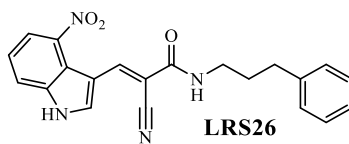
LRS-25
Chemical Formula: C₁₂H₇N₃
Exact Mass: 193,06



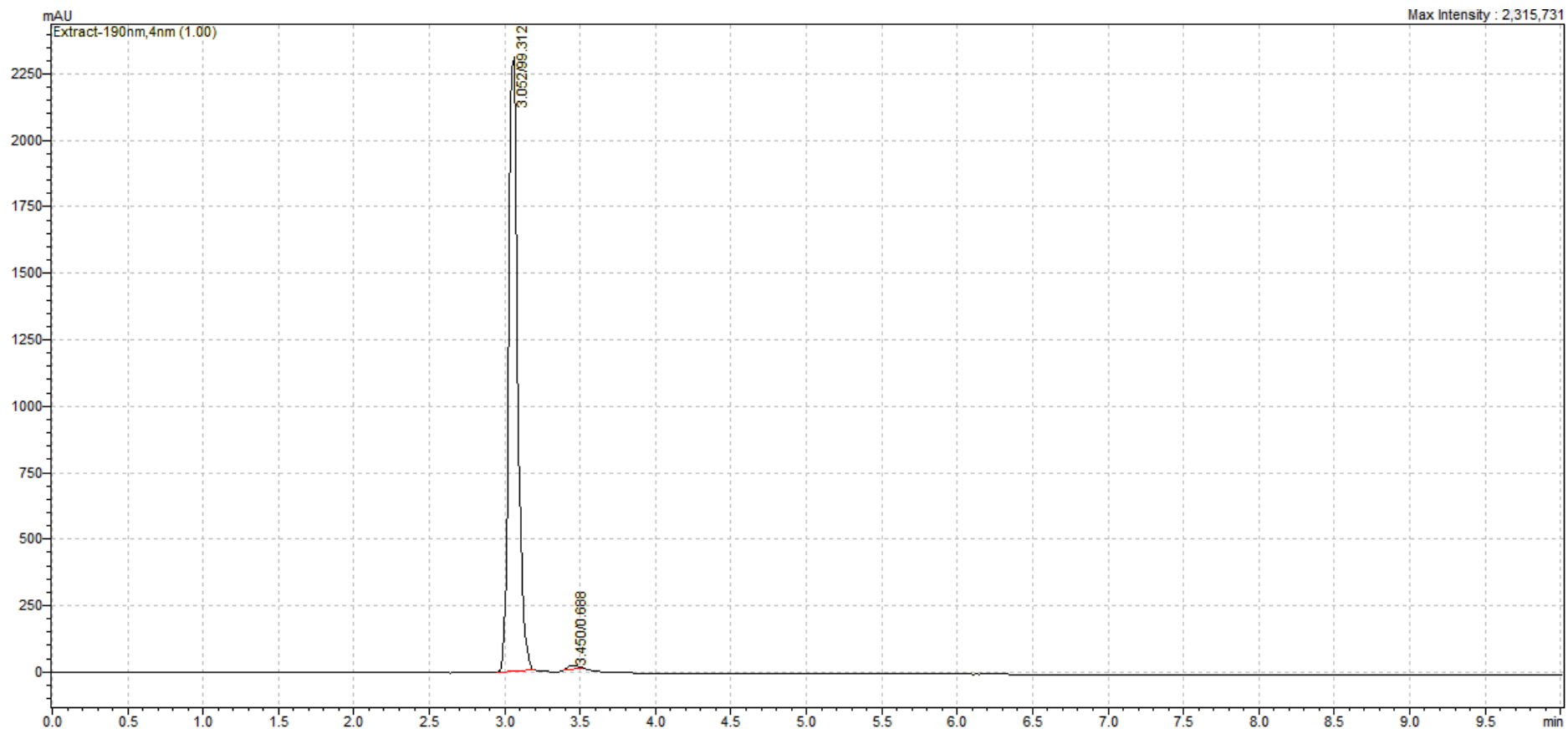


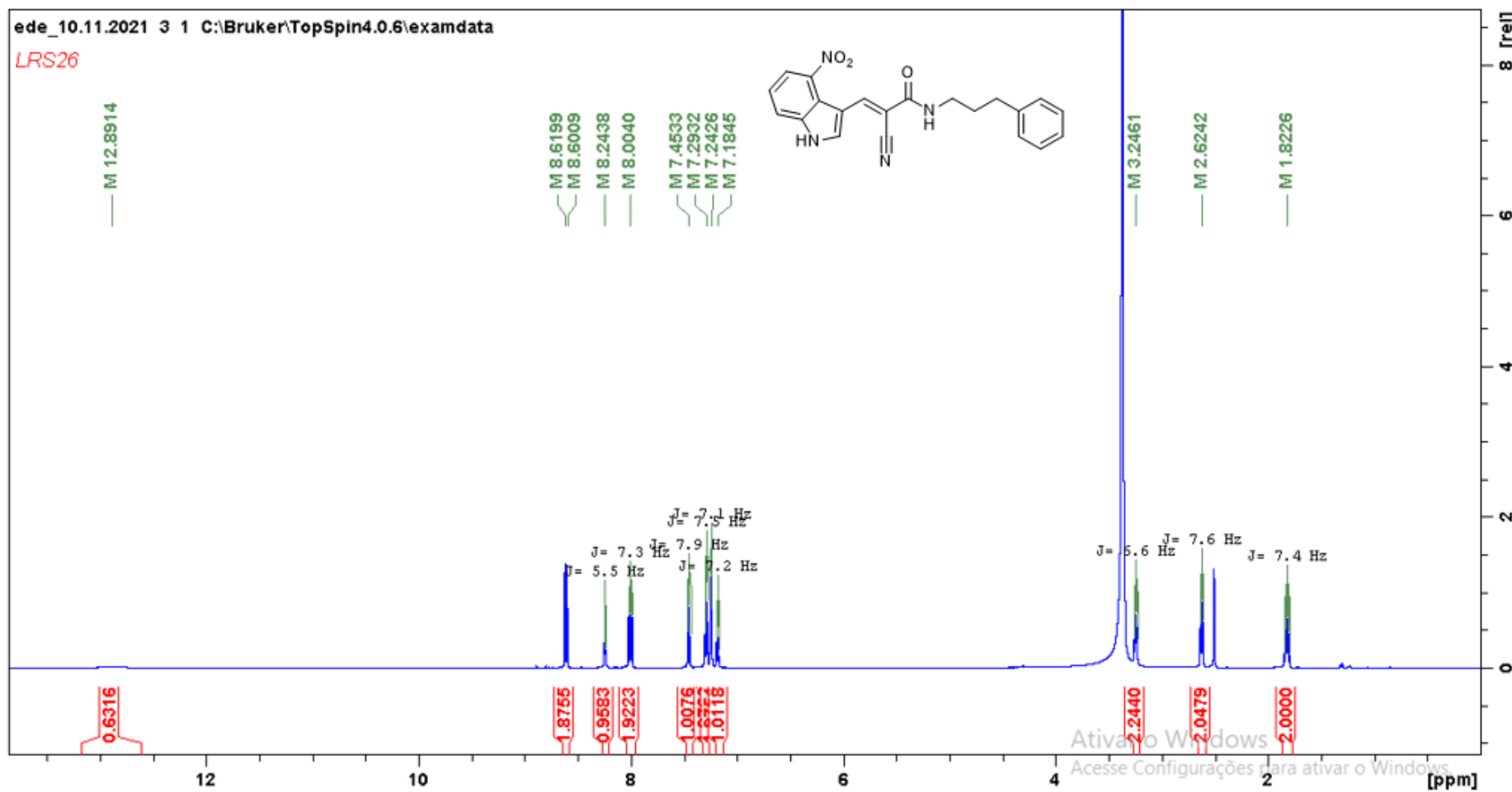


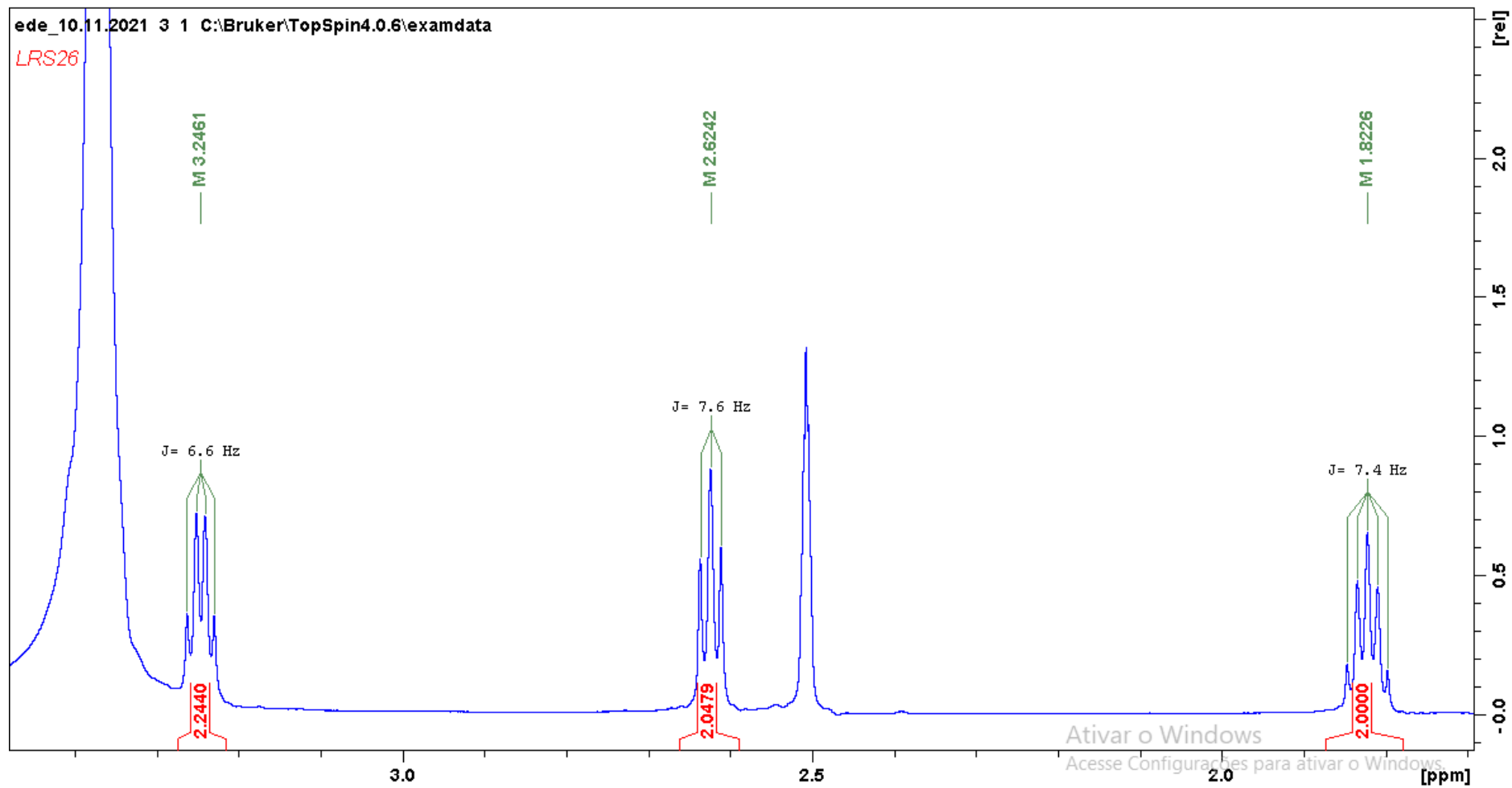




Chemical Formula: $C_{21}H_{18}N_4O_3$

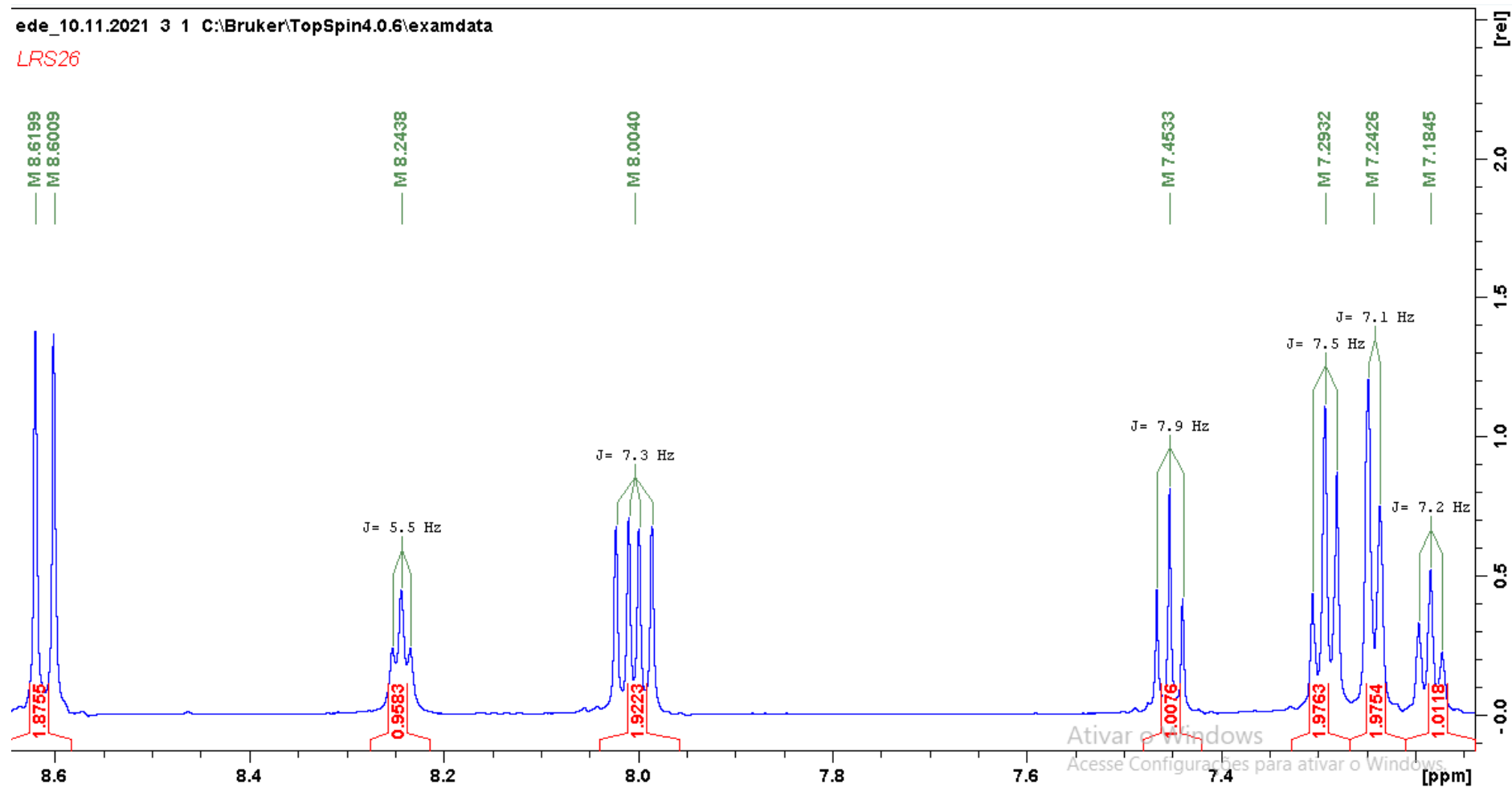


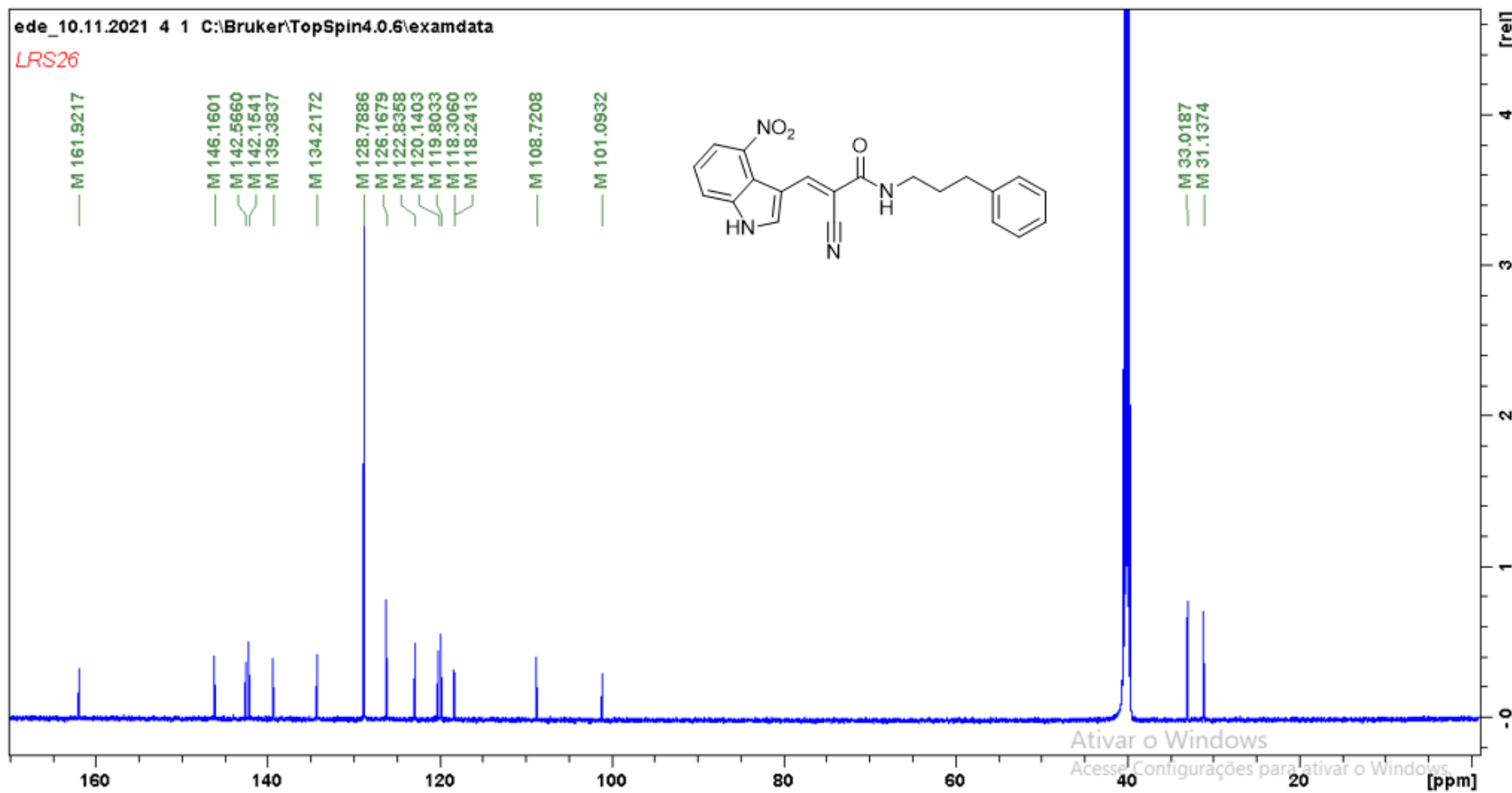


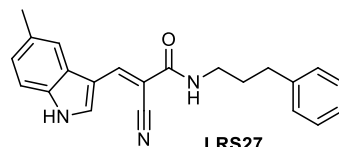
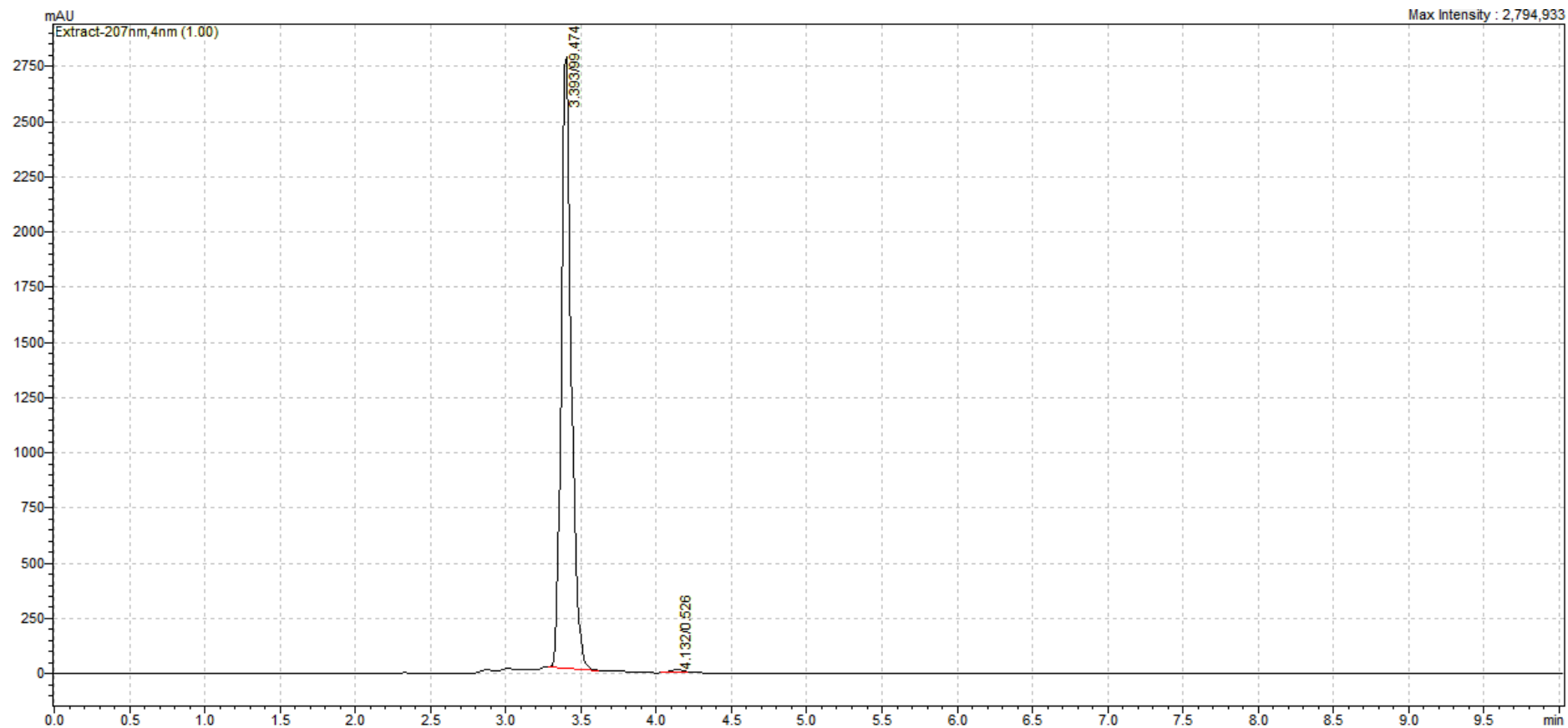


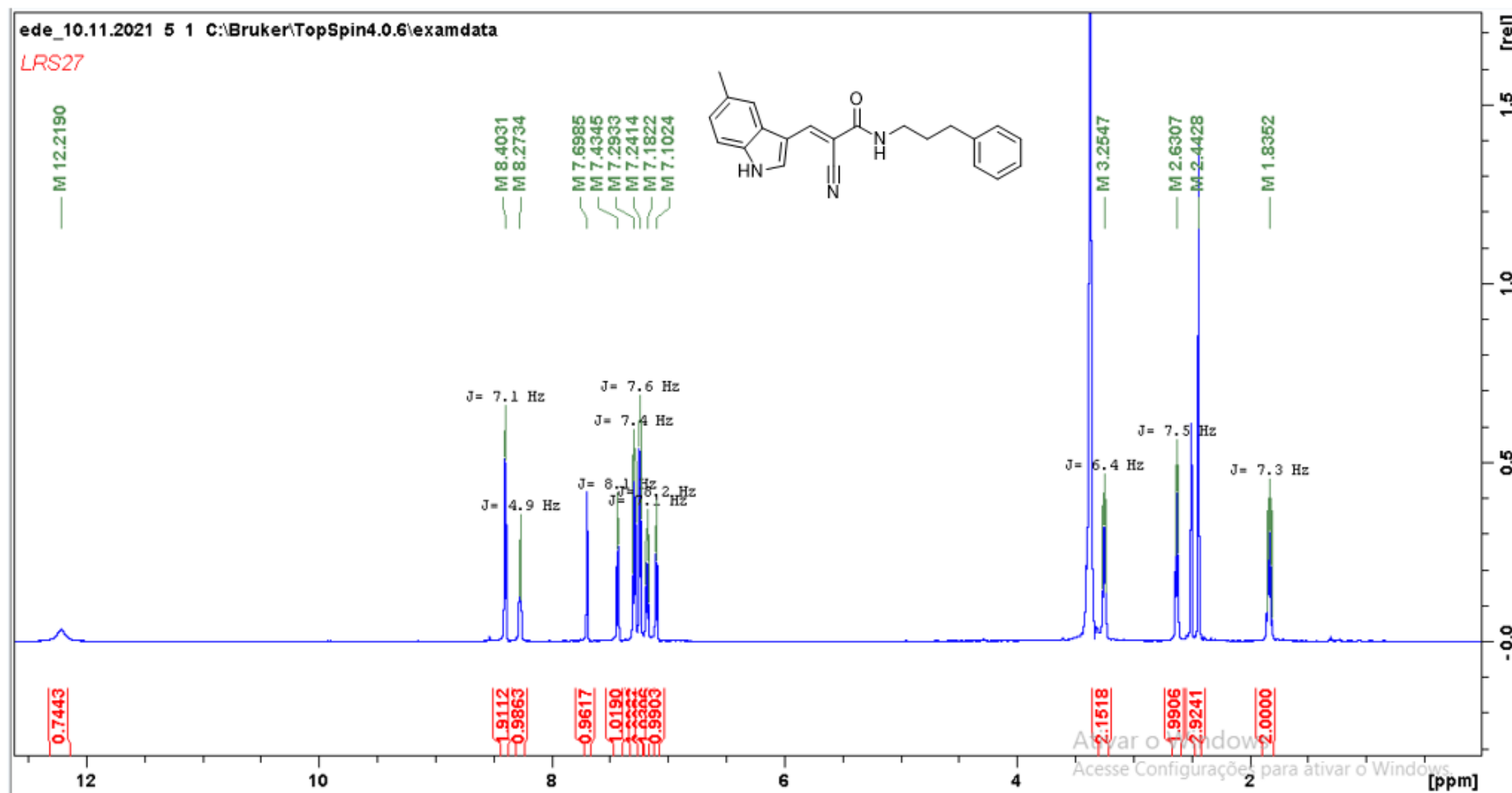
ede_10.11.2021 3 1 C:\Bruker\TopSpin4.0.6\examdata

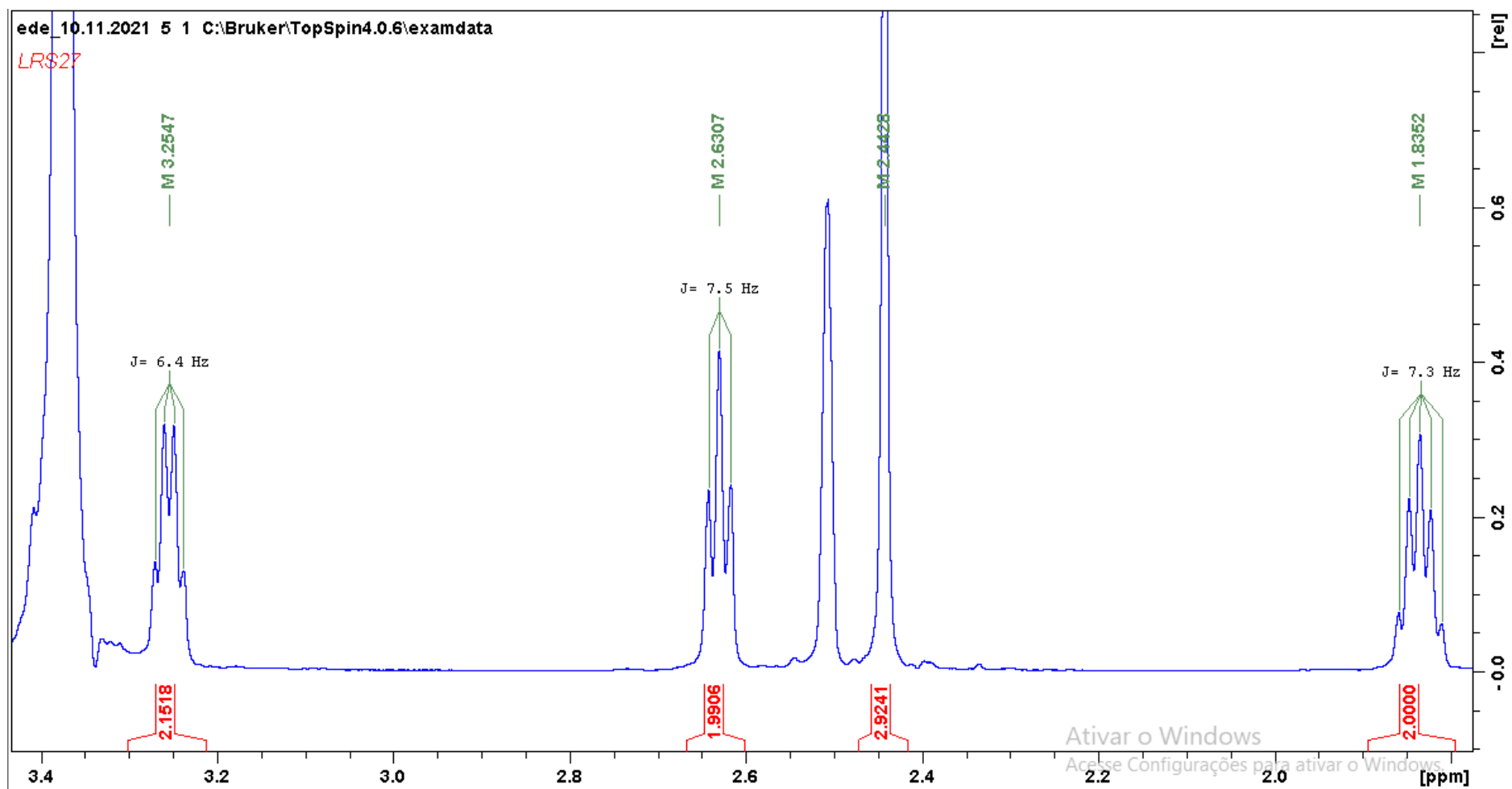
LRS26

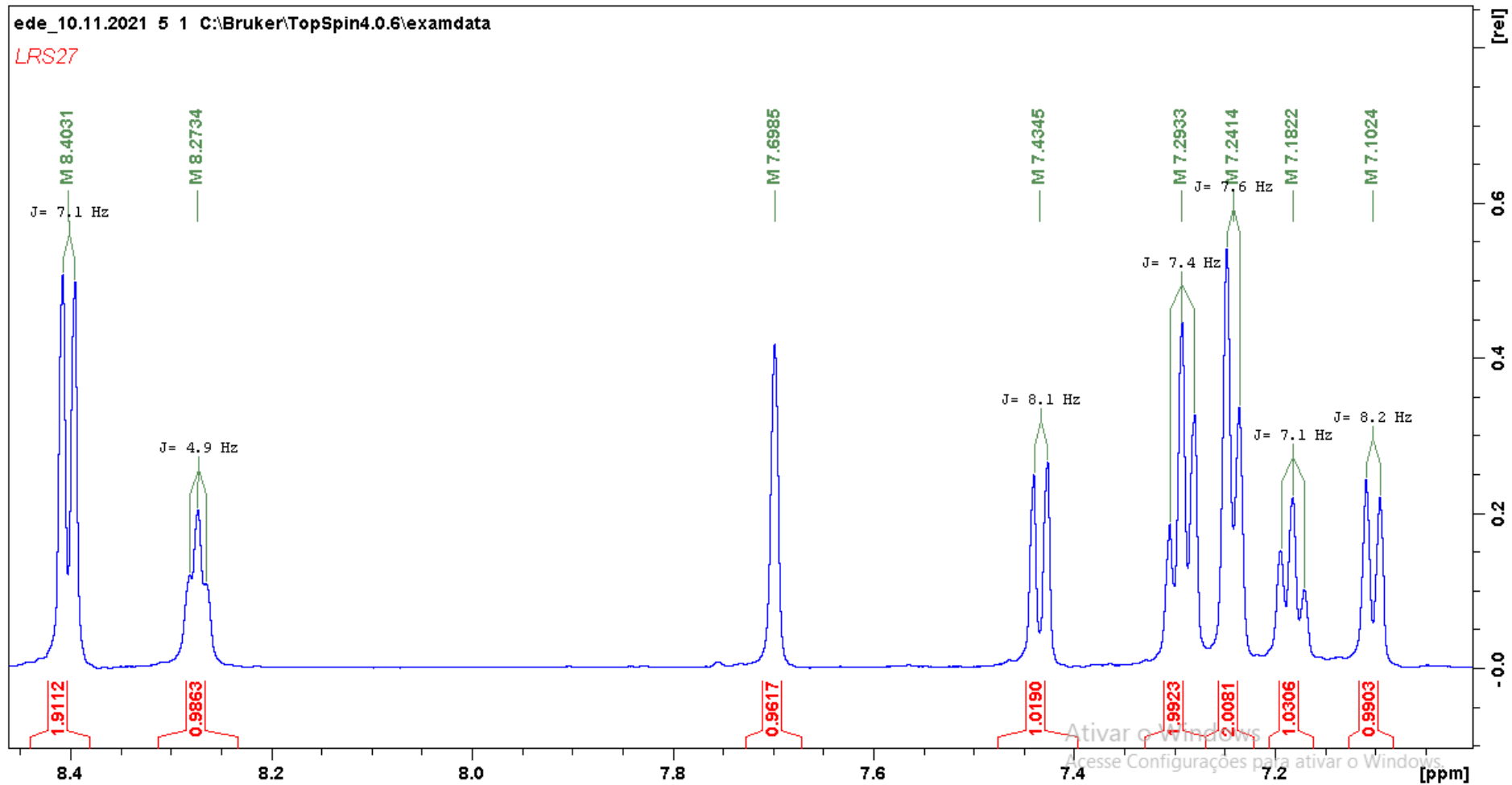


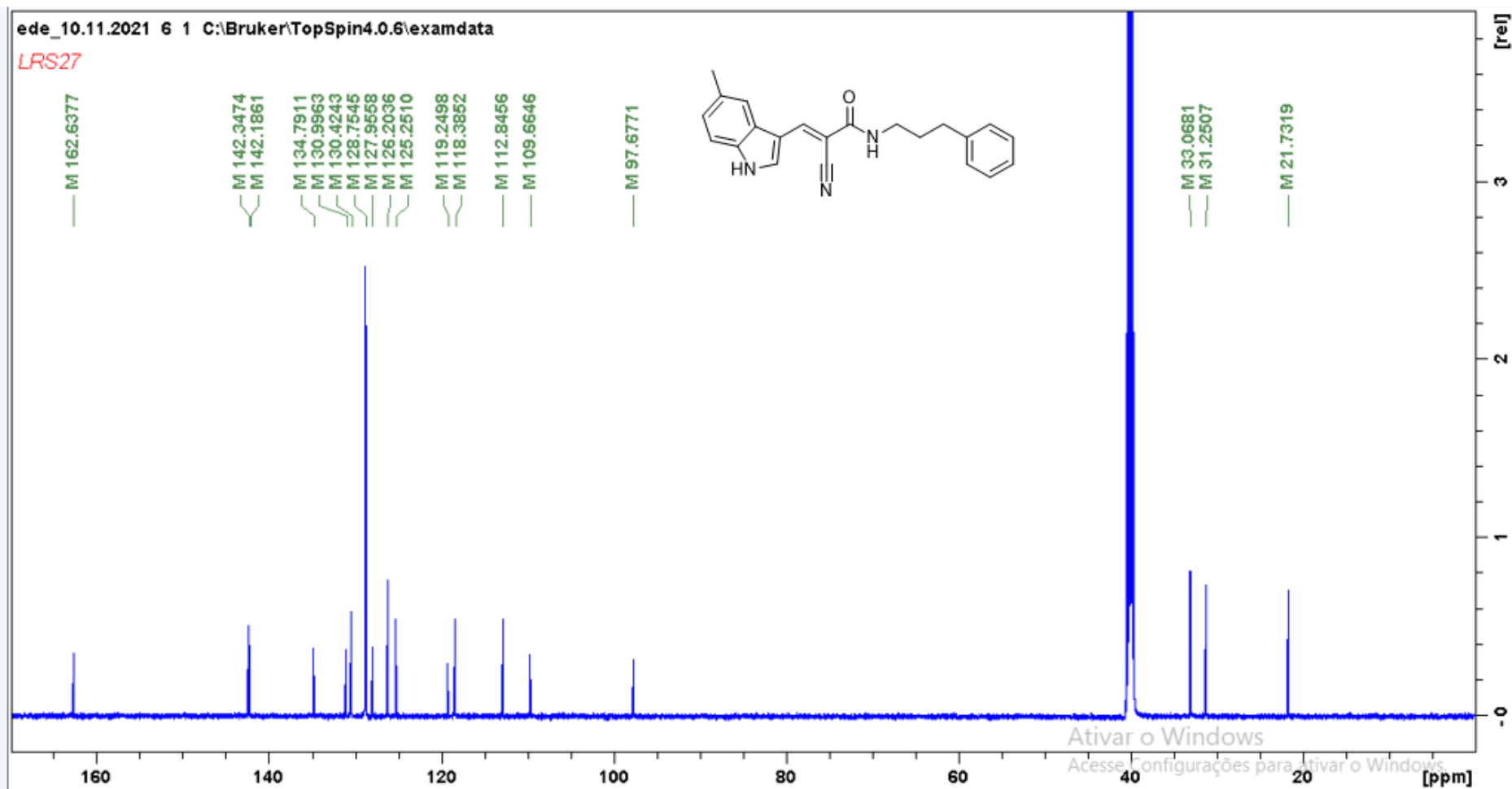


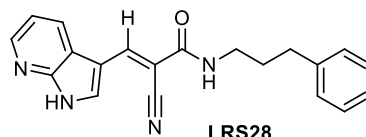
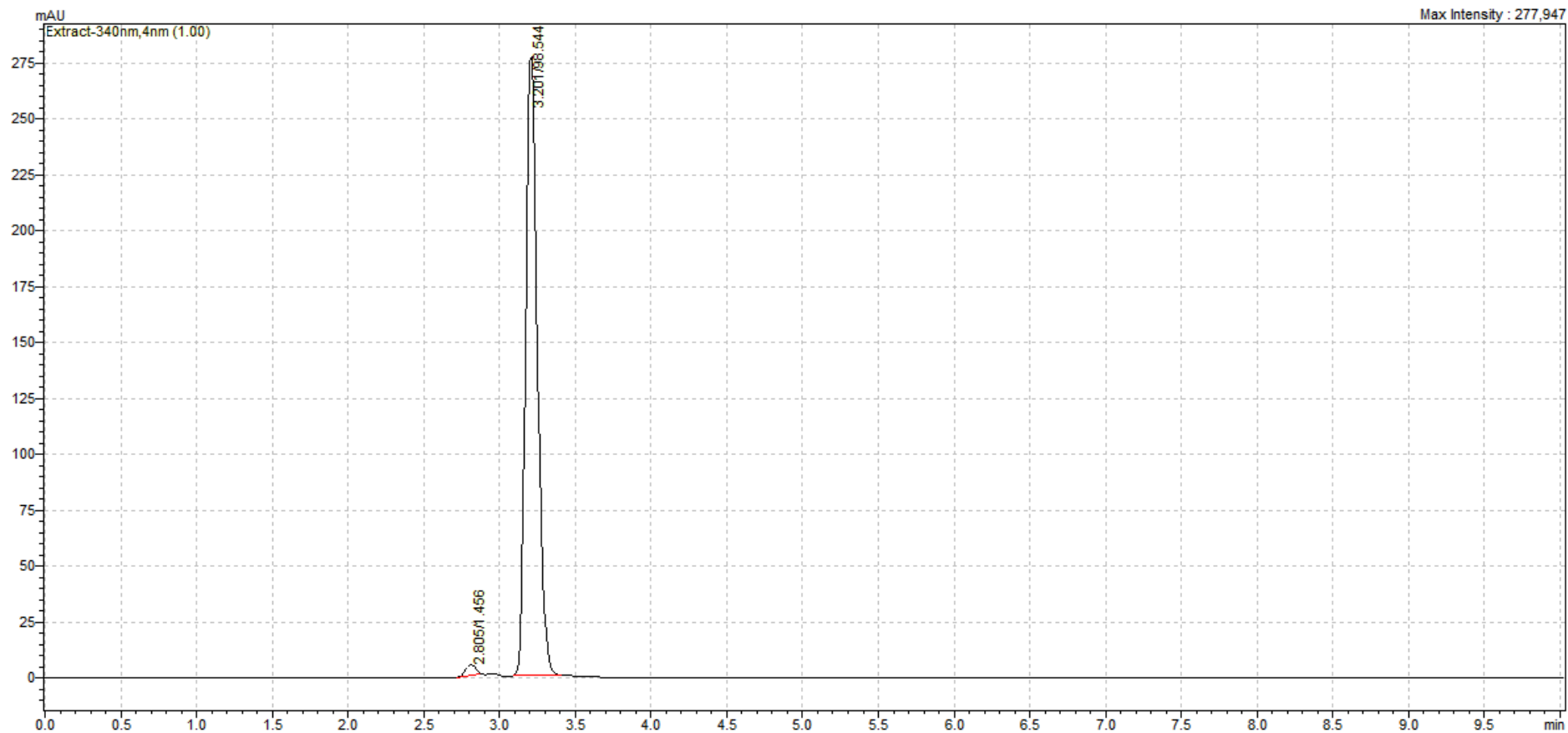
**LRS27**Chemical Formula: $C_{22}H_{21}N_3O$ 

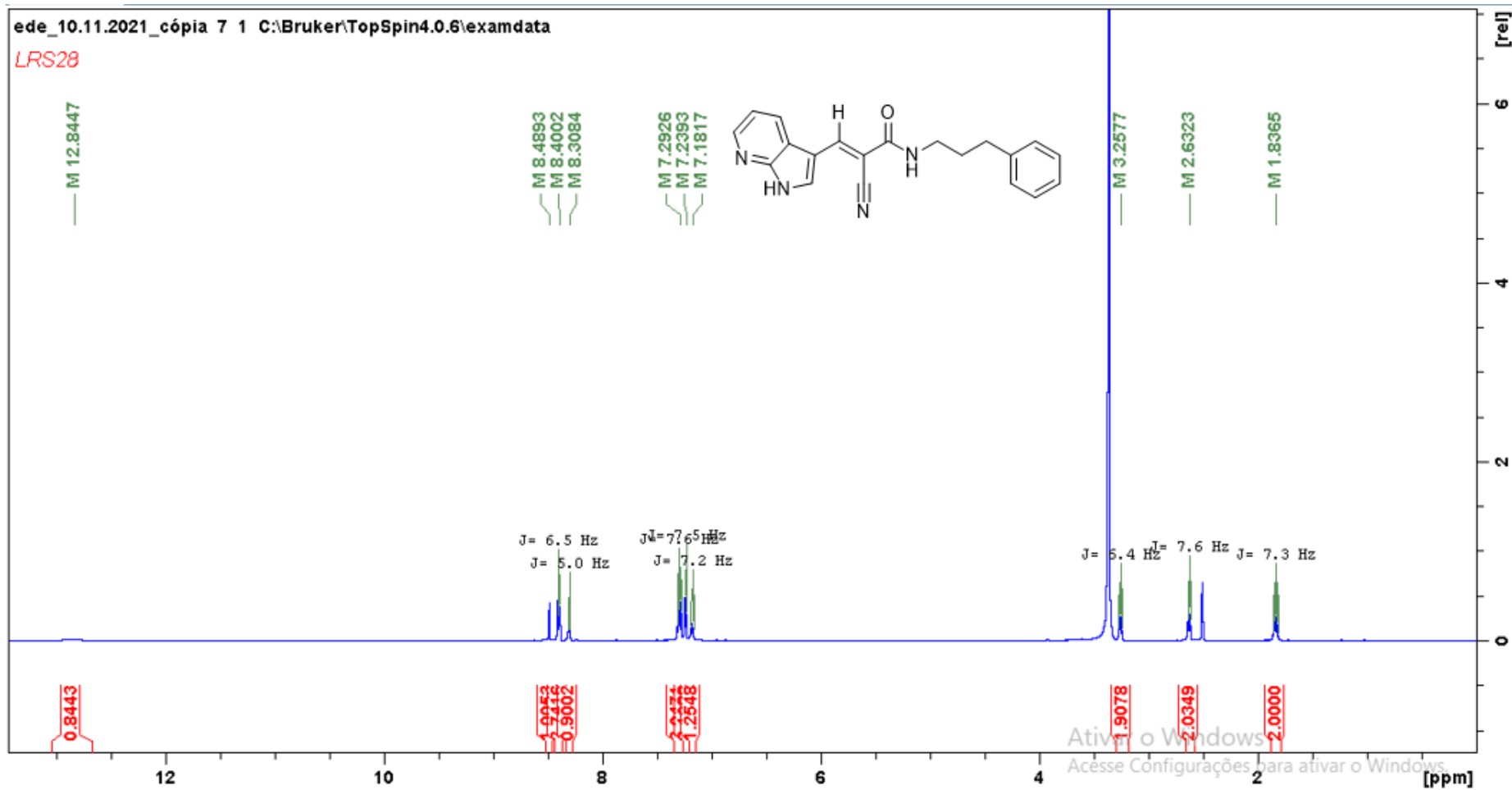


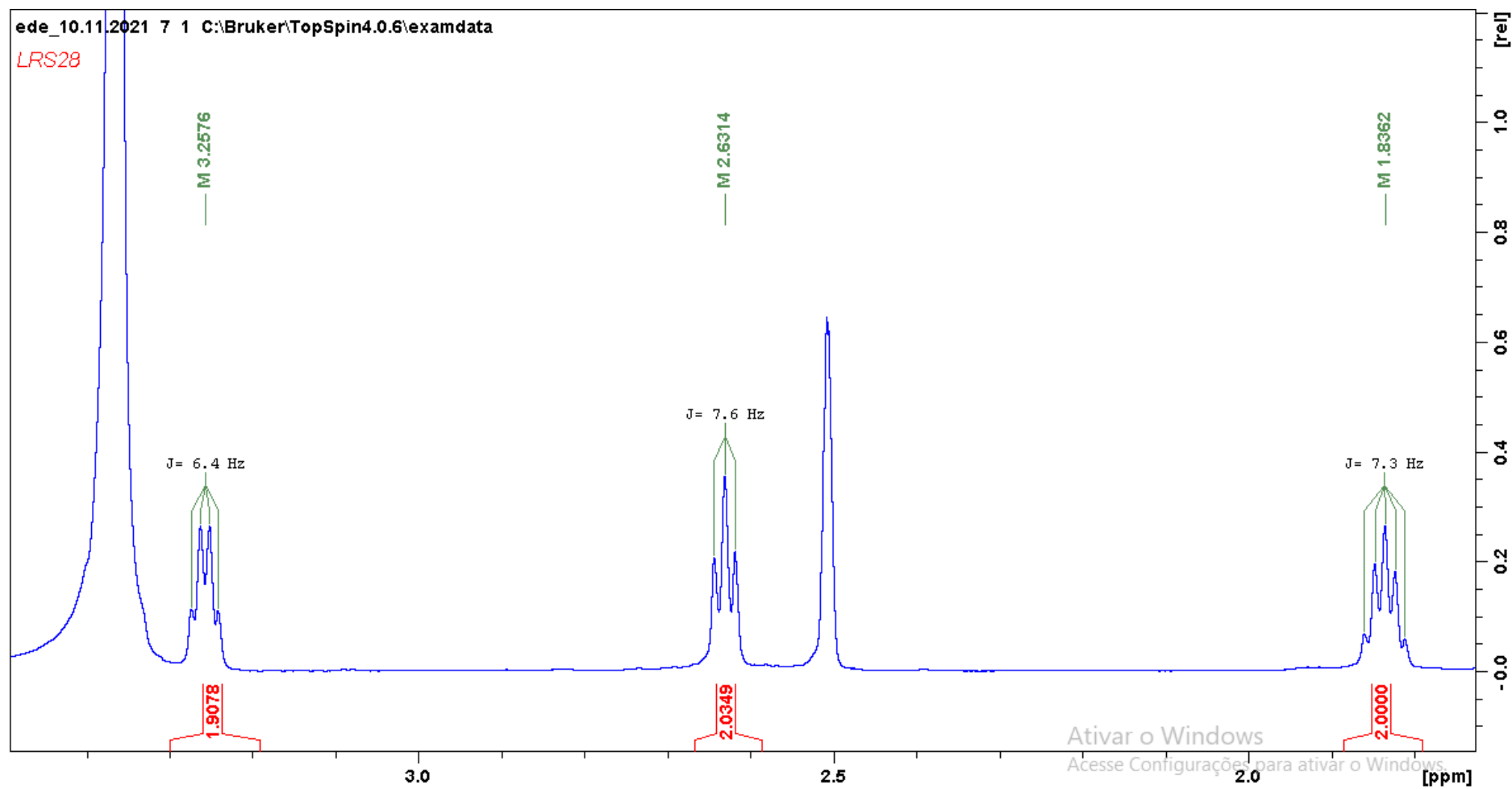


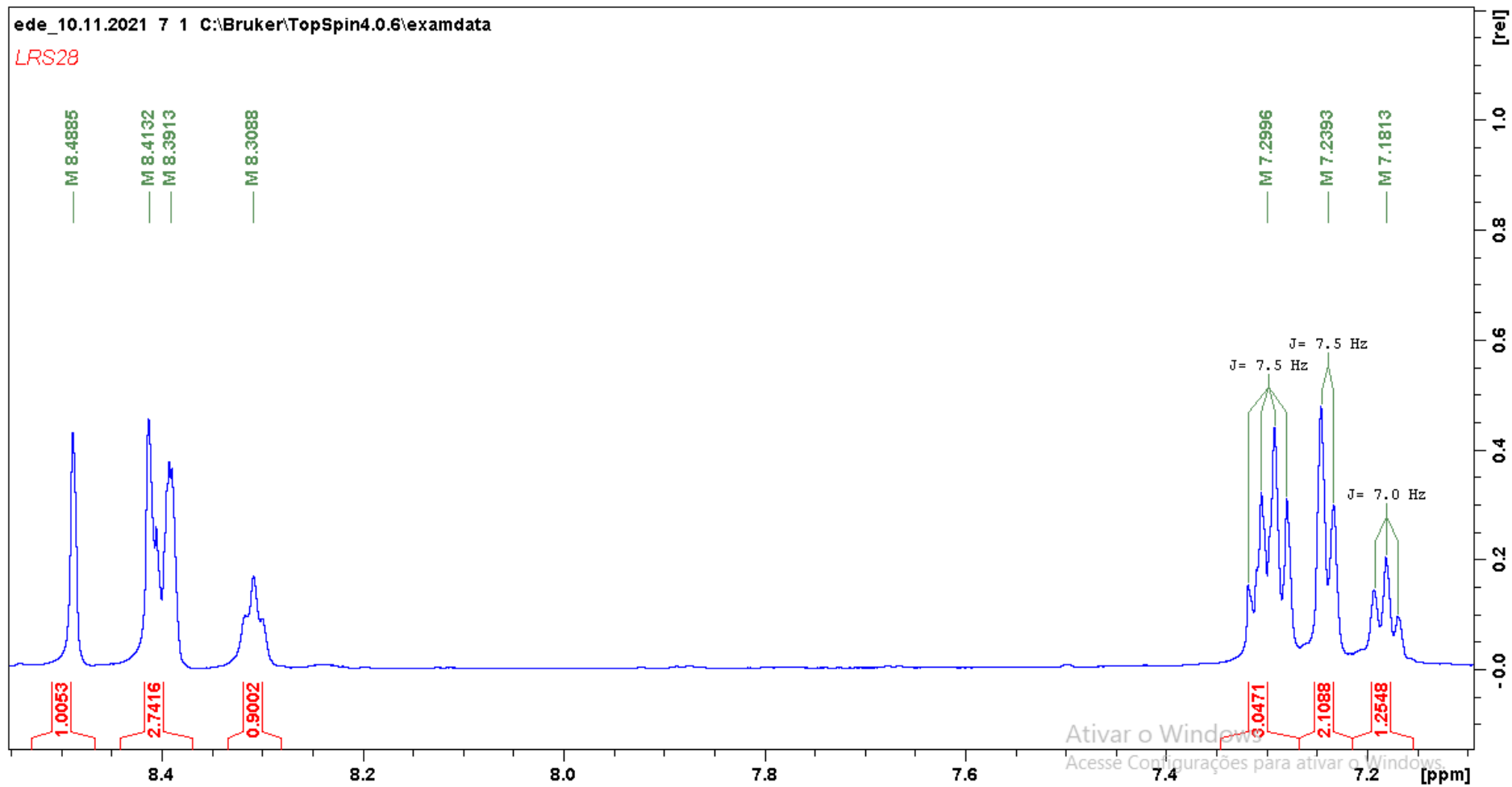


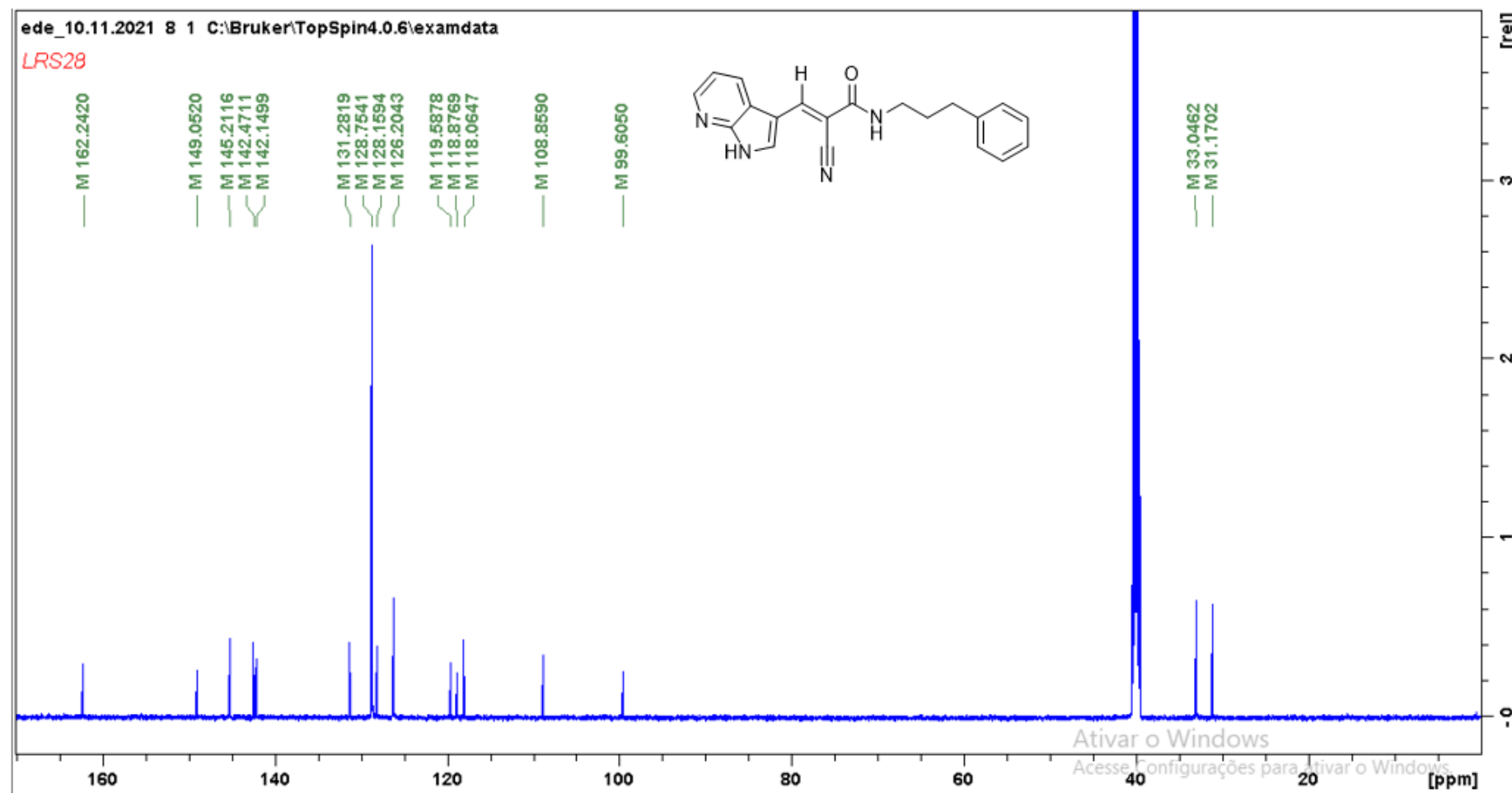


**LRS28**Chemical Formula: $C_{20}H_{18}N_4O$ 









ANEXO B – Artigos Publicados e/ou Aceitos

Bioorganic & Medicinal Chemistry 28 (2020) 115745



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Druggable targets from coronaviruses for designing new antiviral drugs



Leandro Rocha Silva^{a,b}, Paulo Fernando da Silva Santos-Júnior^a, Júlia de Andrade Brandão^c,
Letícia Anderson^{c,d}, Ênio José Bassi^c, João Xavier de Araújo-Júnior^{a,e}, Sílvia Helena Cardoso^b,
Edeildo Ferreira da Silva-Júnior^{a,b,*}

^a Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Moura Avenue, Maceió 57072-970, Brazil

^b Laboratory of Organic and Medicinal Synthesis, Federal University of Alagoas, Campus Arapiraca, Manoel Severino Barbosa Avenue, Arapiraca 57309-005, Brazil

^c 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 Moura Avenue, Maceió 57072-970, Brazil

^d CESMAC University Center, Cônego Machado Street, Maceió 57051-160, Brazil

^e Laboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Moura Avenue, Maceió 57072-970, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
SARS-CoV
SARS-CoV-2
MERS-CoV
Medicinal chemistry
Molecular modelling

ABSTRACT

Severe respiratory infections were highlighted in the SARS-CoV outbreak in 2002, as well as MERS-CoV, in 2012. Recently, the novel CoV (COVID-19) has led to severe respiratory damage to humans and deaths in Asia, Europe, and Americas, which allowed the WHO to declare the pandemic state. Notwithstanding all impacts caused by Coronaviruses, it is evident that the development of new antiviral agents is an unmet need. In this review, we provide a complete compilation of all potential antiviral agents targeting macromolecular structures from these Coronaviruses (*Coronaviridae*), providing a medicinal chemistry viewpoint that could be useful for designing new therapeutic agents.

REVIEW ARTICLE

Inhibiting the “Undruggable” RAS/Farnesyltransferase (FTase) Cancer Target by Manumycin-related Natural Products

Leandro Rocha Silva¹ and Edeildo Ferreira da Silva-Júnior^{1,*}

¹*Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Lourival Melo Mota Avenue, 57072-970, Maceió – Brazil*

ARTICLE HISTORY

Received: October 15, 2020
Revised: January 20, 2021
Accepted: January 26, 2021

DOI:
10.2174/0929867328666210315123848

Abstract: Cancer is an uncontrolled cell growth that can generate diverse types of cancer, in which these will also present a different behavior in the face of pharmacological treatment. These cancers' types are found in one of the three categories, leukemias (also named lymphomas), carcinomas, and sarcomas. In general, cancer's pathogenesis is associated with three genetic mutations, where could emerge from oncogenes, tumor suppressor genes, and/or genes responsible for regulating DNA replication. The term “undruggable” is frequently related to the difficulty to design drugs to specific targets, such as MYC, MYB, NF- κ B, and RAS family of proteins. This last comprises more than 140 proteins, and these are responsible for 30% of mutations in human cancers. Also, there are three ras genes transcribed in human cells, called H-, K-, and N-ras oncogenes. Still, the RAS proteins (farnesyltransferase (FTase) and geranylgeranyltransferase (GGTase) enzymes) perform essential steps in post-translational modification of eukaryotes cells, such as (1) the farnesylation of the cysteine residue at the C-terminal tetrapeptide CAAX; (2) proteolytic cleavage of the three C-terminal AAX oligopeptide; and (3) carboxymethylation of the new C-terminal prenylated cysteine. Thus, the inhibition of this undruggable RAS family of proteins has been considered a promising alternative to design new anticancer agents since they are responsible for many types of human cancers. Then, the manumycin A (obtained from the *Streptomyces parvulus* Tü64) and its analogs (epoxyquinol core with or without their southern and eastern side chains; and dihydroxycyclohexenones core) have been described as promising FTase inhibitors, which have demonstrated their benefits against several types of cancer. In this review, a complete introduction about cancer and its relation with RAS proteins is provided, as well as, the prenylation mechanism of the cysteine residue is discussed in detail. Posteriorly, studies involving manumycin-related compounds are described, showing some synthetic routes for obtaining them and utilizing these natural products in monotherapies or combined therapies with other anticancer drugs.

REVIEW ARTICLE

Targeting Chikungunya Virus Entry: Alternatives for New Inhibitors in Drug Discovery

Leandro Rocha Silva^{1,2}, Érica Erlanny da Silva Rodrigues^{1,3}, Jamile Taniele-Silva⁴,
Leticia Anderson^{4,5}, João Xavier de Araújo-Júnior^{1,3}, Ênio José Bassi⁴ and
Edeildo F. da Silva-Júnior^{1,3,*}

¹Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil; ²Laboratory of Organic and Medicinal Synthesis, Federal University of Alagoas, Campus Arapiraca, Manoel Severino Barbosa Avenue, Arapiraca 57309-005, Brazil; ³Laboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil; ⁴IMUNOREG – Immunoregulation Research Group, Laboratory of Research in Virology and Immunology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Campus AC. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil; ⁵CESMAC University Center, Cônego Machado Street, Maceió 57051-160, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: December 31, 2020
Revised: April 06, 2021
Accepted: May 11, 2021

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 are 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 into assisting the drug discovery process. Moreover, several naturals, 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 complementary 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.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Computer-aided design of 1,4-naphthoquinone-based inhibitors targeting cruzain and rhodesain cysteine proteases

Leandro Rocha Silva^{a,b}, Ari Souza Guimarães^{a,b}, Jadiely do Nascimento^b,
Igor José do Santos Nascimento^a, Elany Barbosa da Silva^c, James H. McKerrow^c,
Sílvia Helena Cardoso^b, Edeildo Ferreira da Silva-Júnior^{a,*}

^a Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil

^b Laboratory of Organic and Medicinal Synthesis, Federal University of Alagoas, Campus Arapiraca, Manoel Severino Barbosa Avenue, Arapiraca 57309-005, Brazil

^c Center for Discovery and Innovation in Parasitic Diseases, Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Naphthoquinone
Drug design
Cysteine protease
MM-PBSA
DFT

ABSTRACT

Chagas disease and Human African Trypanosomiasis (HAT) are caused by *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* parasites, respectively. Cruzain (CRZ) and Rhodesain (RhD) are cysteine proteases that share 70% of identity and play vital functions in these parasites. These macromolecules represent promising targets for designing new inhibitors. In this context, 26 CRZ and 5 RhD 3D-structures were evaluated by molecular redocking to identify the most accurate one to be utilized as a target. Posteriorly, a virtual screening of a library containing 120 small natural and nature-based compounds was performed on both of them. In total, 14 naphthoquinone-based analogs were identified, synthesized, and biologically evaluated. In total, five compounds were active against RhD, being three of them also active on CRZ. A derivative of 1,4-naphthoquinonepyridin-2-ylsulfonamide was found to be the most active molecule, exhibiting IC_{50} values of 6.3 and 1.8 μ M for CRZ and RhD, respectively. Dynamic simulations at 100 ns demonstrated good stability and do not alter the targets' structures. MM-PBSA calculations revealed that it presents a higher affinity for RhD (-25.3 Kcal mol⁻¹) than CRZ, in which van der Waals interactions were more relevant. A mechanistic hypothesis (via C3-Michael-addition reaction) involving a covalent mode of inhibition for this compound towards RhD was investigated by covalent molecular docking and DFT B3LYP/6-31 + G* calculations, exhibiting a low activation energy ($\Delta G^\ddagger$) and providing a stable product (ΔG), with values of 7.78 and -39.72 Kcal mol⁻¹, respectively; similar to data found in the literature. Nevertheless, a reversibility assay by dilution revealed that JN-11 is a time-dependent and reversible inhibitor. Finally, this study applies modern computer-aided techniques to identify promising inhibitors from a well-known chemical class of natural products. Then, this work could inspire other future studies in the field, being useful for designing potent naphthoquinones as RhD inhibitors.

REVIEW ARTICLE

Multi-Target Approaches of Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) and its Derivatives Against Influenza Viruses

Leandro Rocha Silva¹ and Edeildo Ferreira da Silva-Júnior^{1,*}

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

ARTICLE HISTORY

Received: October 10, 2021
Revised: December 13, 2021
Accepted: December 30, 2021

DOI:
10.2174/1568026622666220127112056

Abstract: Influenza viruses (INFLU), the *Orthomyxoviridae* family, are mainly transmitted among humans via aerosols or droplets from the respiratory secretions. However, fomites could be a potential transmission pathway. Annually, seasonal INFLU infections account for 290-650 thousand deaths worldwide. Currently, there are two classes of approved drugs to treat INFLU infections, being neuraminidase (NA) inhibitors and blockers of matrix-2 (M2) ion channel. However, cases of resistance have been observed for both chemical classes, reducing the efficacy of treatment. The emergence of influenza outbreaks and pandemics calls for new antiviral molecules that are more effective, and that could overcome the current resistance to anti-influenza drugs. In this context, polyphenolic compounds are found in various plants, and these have displayed different multi-target approaches against diverse pathogens. Among these, green tea (*Camellia sinensis*) catechins, in special epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG), have demonstrated significant activities against the two most relevant human INFLU, subtypes A and lineages B. In this sense, EGCG has been found to be a promising multi-target agent against INFLU since it can act inhibiting NA, hemagglutination (HA), RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), and viral entry/adsorption. In general, the lack of knowledge about potential multi-target natural products prevents an adequate exploration of them, increasing the time for developing multi-target drugs. Then, this review aimed to compile most relevant studies showing the anti-INFLU effects of EGCG and its derivatives, which could become antiviral drug prototypes in the future.

Keywords: Natural product, EGCG, Antiviral, Influenza, Multi-target, Nature-based compounds.

1. INTRODUCTION

Influenza viruses (INFLUs) are orthomyxoviruses (*Orthomyxoviridae* family) responsible for causing acute respiratory illness that could vary from sore throat, mild febrile disease ($\geq 38^\circ\text{C}$) along with body aches and cough (usually dry) to severe pneumonia, which could be aggravated by bacterial infection [1, 2]. In general, INFLUs that infect humans are mainly transmitted person to person, mostly by aerosols or droplets from the respiratory secretions of an infected individual [1]. Often, fomites or even animals can be a transmission source [1]. Typically, INFLUs lead to seasonal influenza epidemics, commonly during winter in temperate climates

4.0-8.8 per 100,000 human beings [4, 5]. Therefore, globally these annual epidemics are estimated to be about 3-5 million severe illnesses [5]. There are four types of seasonal INFLUs, being A, B, C, and D [5]. However, only INFLU-A, which infects a wide range of avian and mammalian hosts, and INFLU-B, which infects almost exclusively humans, circulate and cause seasonal epidemics of diseases in modern society, since INFLU-C has a low incidence and does not represent a health problem, while INFLU-D primarily affects cattle and there are no reported cases of infection or illness in humans [5, 6]. Influenza A and B are the most virulent strains being the cause of numerous health and economic dis-

ANEXO C – Escrita em andamento

Bioorg. Med. Chem. XX (2021) XXXXX



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Fragment-based design of α -cyanoacrylates and α -cyanoacrylamides targeting Dengue and Zika NS2B/NS3 proteases

Gabriel Gomes Vilela ^{a,b,1}, Wadja Feitosa dos Santos Silva ^{a,b,1}, Leandro Rocha Silva ^{a,b}, Hannah Maus ^c, Stefan Josef Hammerschmidt ^c, João Xavier de Araújo-Júnior ^b, Tanja Schirmeister ^c, Edeildo Ferreira da Silva-Júnior ^{a,b,*}

^a Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Lourival Melo Mota Avenue, AC. Simões campus, 5587072-970, Alagoas, Maceió, Brazil.

^b Laboratory of Medicinal Chemistry, Institute of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alagoas, Lourival Melo Mota Avenue, AC. Simões campus, 5587072-970, Alagoas, Maceió, Brazil.

^c Institute of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Johannes Gutenberg-University, Staudingerweg 5, 55128 Mainz, Germany.

* Corresponding author: Silva-Júnior, E.F.; email: edeildo.junior@iqb.ufal.br; Tel.: +55-82-9-9610-8311

¹ Authors contributed equally.