



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA – UFU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RENIEIDY FLÁVIA CLEMENTE DIAS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE DERIVADOS DE N-
ACIL-2 AMINOBENZOTIAZOL CONTRA O VÍRUS ZIKA**

UBERLÂNDIA

2023



**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE DERIVADOS DE N-
ACIL-2 AMINOBENZOTIAZOL CONTRA O VÍRUS ZIKA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Celso O. Rezende Júnior – Instituto de Química
(Orientador-UFU)

Prof. Dra. Angelina Almeida
(Examinadora-IFS)

Prof. Dr. Bruno Sacoman Torquato da Silva – Instituto de Química
(Examinador- UFU)

Prof. Dr. Marcos Pivatto
(Examinador- UFU)

Prof. Dr. Rafael Augusto Alves Ferreira
(Examinador- CRODA)

Uberlândia, 2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

D541 2023	<p>Dias, Renieidy Flávia Clemente, 1989- Síntese e avaliação do potencial biológico de derivados de N-acil-2-aminobenzotiazol contra o vírus Zika [recurso eletrônico] / Renieidy Flávia Clemente Dias. - 2023.</p> <p>Orientador: Celso de Oliveira Rezende Júnior. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.602 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Química. I. Rezende Júnior, Celso de Oliveira , 1987-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 54</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, 147, PPGQUI				
Data:	Quatorze de novembro de dois mil e vinte e três	Hora de início:	14h	Hora de encerramento:	19:30
Matrícula do Discente:	11923QMI009				
Nome do Discente:	RENIEIDY FLÁVIA CLEMENTE DIAS				
Título do Trabalho:	"Síntese e avaliação do potencial biológico de derivados de N-acil-2-aminobenzotiazol contra o vírus Zika"				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	"Planejamento e síntese de candidatos a fármacos"				

Reuniu-se, por webconferência, no link https://teams.microsoft.com/l/meetupjoin/19:ilKtWKPt9UW9lKvR1_NQaAKMskC1ykiU9ywr1mYuVwA1@thread.tacv2/1696629700950?context=%7B%22Tid%22:%22cd5e6d23-cb99-4189-88ab-1a9021a0c451%22,%22Oid%22:%22ecde213-61de-4c81-b9deef777fb029a7%22%7D, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: **Marcos Pivatto e Bruno Henrique Sacoman Torquato da Silva**, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia; **Angelina Maria de Almeida**, do Instituto Federal de Sergipe; **Rafael Augusto Alves Ferreira**, Croda do Brasil Ltda.; e **Celso de Oliveira Rezende Júnior**, orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidenta da mesa, **Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior**, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Celso de Oliveira Rezende Júnior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/11/2023, às 19:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Pivatto, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/11/2023, às 19:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Henrique Sacoman Torquato da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/11/2023, às 19:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Augusto Alves Ferreira, Usuário Externo**, em 14/11/2023, às 19:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelina Maria de Almeida, Usuário Externo**, em 14/11/2023, às 19:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4889105** e o código CRC **9531E8E4**.

DEDICATÓRIA

Para os meus pais, João Bosco e Rosineide, pelo amor e incentivo durante toda a minha trajetória acadêmica.

Para o meu irmão Caio Alesse e meu sobrinho Arthur Dias. Para o meu cachorro Napoleão (In memoriam) e meu labrador Dylan.

Para todos os meus amigos do peito pela amizade sincera.

Para as minhas inspirações na Química, Profa. Dra. Adriana Castro Pinheiro, Profa. Dra. Irene Teresinha Santos Garcia e o Prof. Dr. Fábio Augusto Amaral, que com afeto me ensinaram coisas importantes.

Para a UFRGS, a UFU, a UFPel e a Facultad de Química de la Universidad de la Habana por toda a alquimia aprendida e pelas oportunidades que me foram concedidas durante minha passagem pelas instituições, no período que compreendeu a Iniciação Científica até o meu Doutorado em Química.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Agradeço à FAPEMIG pela bolsa concedida.

Agradeço à CAPES e CNPq pelos auxílios financeiros.

Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia e todos os colaboradores que mantêm a infraestrutura do Campus Santa Mônica funcionando.

Agradeço meu orientador professor Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior.

Agradeço os colegas do LASFAR, especialmente, a Ana Clara, o Danilo, o Douglas e o Guilherme.

Agradeço ao Magayver, o técnico do Laboratório de Multiusuários, pela realização dos experimentos de RMN ^1H e ^{13}C .

Agradeço as professoras: Dra. Rafaela Salgado (UFMG) e a Dra. Ana Carolina (UFU) pelos experimentos biológicos realizados com o Zika vírus.

Agradeço os serviços e o zelo das secretarias Zeila e Mayta do Programa de Pós-Graduação em Química da UFU.

Agradeço a presença física e virtual dos meus colegas e amigos: Josiele Conrado, Janaína Couto, Matheus Ferreira, Gabriela Ciribelli, John Kennedy, Natália Medeiros, Ianka Nunes e Wanderson Roriz.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade.

RESUMO

O Zika vírus (ZIKV) é um flavivírus pertencente à família flaviridae, que é transmitido pela picada do vetor infectado, nesse caso, mosquito do gênero *Aedes aegypti*. Uma das estratégias para o desenvolvimento de novos antivirais é a inibição da protease NS2B-NS3, que é essencial para replicação viral. O trabalho aborda a síntese de 19 compostos inéditos derivados *N*-acil-2-aminobenzotiazol, com potencial atividade biológica contra o ZIKV. Os compostos foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir a replicação do ZIKV e a capacidade de inibir a protease NS2B-NS3 do ZIKV. O composto **33** foi o mais promissor da série de modificações realizadas no núcleo *p*-amino-benzamida, demonstrou uma eficácia significativa contra o ZIKV, com um valor EC₅₀ de 5,1 µM. Além disso, o composto apresentou um índice de seletividade de 25,1, o que sugere que ele é 25,1 vezes mais eficaz em inibir o ZIKV do que em causar efeitos tóxicos nas células hospedeiras. Outros resultados antivirais *in vitro* mostraram que os compostos **40** e **60** da série de modificações no núcleo sulfonamida e no núcleo benzotiazol, respectivamente, também apresentaram eficácia contra ZIKV, cerca de duas vezes maior que o composto **2** selecionado como *hit* inicial, apresentando ambos EC₅₀ próximo de 5 µM, apresentando índices de seletividade de 9,2 e 7,7, respectivamente, considerados como candidatos promissores. Desta forma, os compostos **33**, **40** e **60** foram selecionados e testados a 10 µM frente à inibição de replicação do replicon BHK-21-RepZIKV_IRES-Neo, expressando a redução de atividade luminescente da Renilla luciferase em 63,4%, 60,4% e 75,5%, respectivamente. Baseado nos ensaios de atividade antiviral com vírus e com replicon do ZIKV, os compostos mais promissores foram identificados como potenciais candidatos a inibir a protease NS2B-NS3, e portanto, foram submetidos a uma triagem secundária para confirmar a sua capacidade de inibir a enzima NS2B-NS3 do ZIKV, com objetivo de verificar o potencial alvo bioquímico. Os ensaios da triagem inicial com a NS2B-NS3 confirmaram que os compostos testados apresentaram atividade promíscua, não sendo confirmado a enzima NS2B-NS3 como um alvo bioquímico para o mecanismo de ação dessa classe química sintetizada. Os compostos que mais se destacaram na triagem inicial enzimática e nos ensaios de replicação do ZIKV, foram os compostos **2**, **32**, **40**, **41**, **48**, **59**, **60** e **65** submetidos a avaliação através de métodos computacionais em relação ao seu perfil ADME-tox (absorção, distribuição, metabolismo, excreção, toxicidade), apresentando propriedades favoráveis para candidatos a fármacos.

Palavras chaves: ZIKV; *N*-acil-2-aminobenzotiazol; -Neo; NS2B-NS3pro; ADME-tox.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is a flavivirus belonging to the flaviridae family, which is transmitted by the bite of the infected vector, in this case, the mosquito of the *Aedes aegypti* genus. One of the strategies for the development of new antivirals is the inhibition of the NS2B-NS3 protease, which is essential for viral replication. The work addresses the synthesis of 19 novel N-acyl-2-aminobenzothiazole derivatives, with potential biological activity against ZIKV. The compounds were evaluated for their ability to inhibit ZIKV replication and the ability to inhibit ZIKV's NS2B-NS3 protease. Compound **33** was the most promising of the series of modifications made to the p-amino-benzamide core, demonstrating significant efficacy against ZIKV, with an EC₅₀ value of 5.1 μ M. In addition, the compound showed a selectivity index of 25.1, suggesting that it is 25.1 times more effective in inhibiting ZIKV than in causing toxic effects in host cells. Other in vitro antiviral results showed that compounds **40** and **60** from the series of modifications to the sulfonamide core and the benzothiazole core, respectively, also showed efficacy against ZIKV, about twice as high as compound **2** selected as the initial hit, both presenting EC₅₀ close to 5 μ M, presenting selectivity indices of 9.2 and 7.7, respectively, considered as promising candidates. Thus, compounds **33**, **40** and **60** were selected and tested at 10 μ M against the inhibition of replication of the BHK-21-RepZIKV_IRES-Neo replicon, expressing a reduction in luminescent activity of Renilla luciferase by 63.4%, 60.4% and 75.5%, respectively. Based on the antiviral activity assays with ZIKV virus and replicon, the most promising compounds were identified as potential candidates to inhibit the NS2B-NS3 protease, and therefore, were subjected to a secondary screening to confirm their ability to inhibit the NS2B-NS3 enzyme of ZIKV, with the aim of verifying the potential biochemical target. The initial screening assays with NS2B-NS3 confirmed that the tested compounds showed promiscuous activity, not confirming the NS2B-NS3 enzyme as a biochemical target for the mechanism of action of this synthesized chemical class. The compounds that stood out the most in the initial enzymatic screening and in the ZIKV replication assays, were compounds **2**, **32**, **40**, **41**, **48**, **59**, **60** and **65** submitted to evaluation through computational methods in relation to their ADME-tox profile (absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity), presenting favorable properties for drug candidates.

Keywords: ZIKV; N-acyl-2-aminobenzothiazole; -Neo; NS2B-NS3pro; ADME-tox.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ACN: Acetonitrila

AcOEt: Acetato de etila

ADMETox: Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade

BBB: Barreira hematoencefalica

BHK21-RepZIKV: Célula renal de hamster bebê Célula renal de hamster bebê expressando o replicon do ZIKV

Boc₂O: Dicarbonato de di-terc-butila

BSA: Albumina sérica bovina

CC₅₀: Concentração citotóxica para redução de 50% da viabilidade celular

CHAPS: (3-((3-colamidopropil) dimetilamônio) -1-propanossulfonato)

CYP: Citocromo P-450

DMF: *N, N*-dimetilformamida

EC₅₀: representa a concentração do composto para qual 50% do efeito é observado

eq: Equivalente

GBS: Guillain-Barré

HTS: *do inglês High Throughput Screening*

IC₅₀: A concentração inibitória média

IS: Índice de seletividade

MTT: 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio

NS2B-NS3pro: Protease formado pelas proteínas não estruturais NS2B e NS3

P-gp: Glicoproteína-P

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

EDC: Cloridrato de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

HOBt: *N*-hidroxibenzotriazol

PAINS: Compostos de interferência do Pan-Assay

TPSA: Área de superfície polar total

Tris-HCl: Cloridrato de tris-(hidroximetil)aminometano

ZIKV: Zika vírus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Novos aspectos dos surtos contemporâneos do ZIKV.....	15
Figura 2 – O ciclo de vida do ZIKV.....	17
Figura 3 – Organização do genoma dos flavivírus.....	18
Figura 4 – Estrutura de cristal de raios-X da protease NS2B-NS3 do ZIKV em sua conformação cataliticamente ativa (código do PDB: 5LC0)	19
Figura 5 – Cronologia de desenvolvimento de um fármaco.....	20
Figura 6 – Estrutura química dos hits 1 e 2	20
Figura 7 – Anéis heterocíclicos.....	22
Figura 8 – Espectro RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) de 2	31
Figura 9 – Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz, DMSO-d ₆) de 2	32
Figura 10 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) de 38	38
Figura 11 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) de 38	39
Figura 12 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) de 46	44
Figura 13 – Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz, DMSO-d ₆) de 46	45
Figura 14 – Modificação no núcleo benzotiazol.....	49
Figura 15 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) de 58	51
Figura 16 – Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz, DMSO-d ₆) de 58	52
Figura 17 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) de 60	55
Figura 18 – Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz, DMSO-d ₆) de 60	56
Figura 19 – Estrutura química do derivado com grupo glicina.....	59
Figura 20 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) de 67	62
Figura 21 – Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz, DMSO-d ₆) de 67	63
Figura 22 – Relação estrutura química e atividade biológica para os compostos sintetizados no trabalho.....	67
Figura 23 – Efeito dos compostos na viabilidade das células BHK21-RepZIKV_IRES-Neo..	68
Figura 24 – Efeito dos compostos na viabilidade das células BHK21-RepZIKV_IRES-Neo e na replicação do ZIKV.....	69

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Reação de oxidação da luciferina pela luciferase.....	18
Esquema 2 – Análise retrossintética do hit 2 e derivados com modificações no núcleo central.....	27
Esquema 3 – Estratégia para síntese do <i>hit 2</i> e análogos.....	28
Esquema 4 – Mecanismo de acoplamento promovido por HOBt quando utilizado juntamente com EDC para obtenção de amidas.....	29
Esquema 5 – Síntese das amidas 38-41.....	36
Esquema 6 – Retrossíntese para a nova estratégia para a síntese de derivados com modificações no núcleo sulfonamida.....	41
Esquema 7 – Obtenção do intermediário sintético 42.....	42
Esquema 8 – Síntese das amidas 46-50.....	43
Esquema 9 – Síntese das amidas 57-58.....	50
Esquema 10 – Síntese das amidas 59 e 60.....	54
Esquema 11 – Síntese das amidas 67-72 pelas estratégias 1 e 2.....	60
Esquema 12 – Síntese dos compostos 19-21.....	81
Esquema 13 – Síntese dos compostos 2 a 33.....	83
Esquema 14 – Síntese dos compostos 38 a 41.....	85
Esquema 15 – Síntese dos compostos 46-48.....	88
Esquema 16 – Síntese do composto 57.....	91
Esquema 17 – Síntese do composto 58.....	92
Esquema 18 – Síntese do composto 50.....	93
Esquema 19 – Sínteses de 59 e 60.....	94
Esquema 20 – Sínteses de 67 e 68.....	95
Esquema 21 – Sínteses de 71 e 72.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Núcleo benzotiazol presente em compostos naturais e sintéticos com aplicações farmacêuticas.....	23
Tabela 2 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 2	33
Tabela 3 – Efeito de 2 , 32 e 33 na viabilidade das células Vero E6 e na infectividade do ZIKV.....	35
Tabela 4 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 38	40
Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 46	46
Tabela 6 – Efeito de 38-50 na viabilidade de células Vero E6 e na infectividade do ZIKV....	47
Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 58	58
Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 60	57
Tabela 9 – Efeito 2-60 na viabilidade de células Vero E6 e na infectividade do ZIKV.....	58
Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 67	64
Tabela 11 – Efeito de 65-72 na viabilidade de células Vero E6 e na infectividade do ZIKV.	66
Tabela 12 –Triagem inicial e determinação do IC50 contra NS2B-NS3 do ZIKV.....	71
Tabela 13 –Ensaio com a enzima NS2B-NS3pro do ZIKV.....	75
Tabela 14 –Propriedades ADME-tox dos compostos 32 a 65	78
Tabela 15 – Preparação das sulfonamidas 19-21	82
Tabela 16 – Preparação dos compostos 2-33	84
Tabela 17 – Formação de amidas 38-41	87
Tabela 18 – Obtenção dos compostos 46-48	87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Zika Vírus.....	13
1.2 Zika Vírus: biologia e ciclo de transmissão.....	14
1.3 Desenvolvimento de novos candidatos a fármacos.....	19
1.4 Derivados benzotiazóis.....	21
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Gerais.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1 Planejamento e síntese do hit e derivados com modificações no núcleo <i>p</i> -aminobenzamida.....	27
3.2 Resultados biológicos com modificação no núcleo <i>p</i> -aminobenzamida.....	34
3.3 Planejamento e síntese com modificações no núcleo sulfonamida.....	36
3.4 Resultados biológicos com modificação no núcleo sulfonamida.....	47
3.5 Síntese de compostos com modificação no núcleo benzotiazol.....	49
3.6 Resultados biológicos com modificação no núcleo benzotiazol.....	57
3.7 Novo planejamento de derivados com modificações no núcleo <i>p</i> -aminobenzamida.....	59
3.8 Resultados biológicos com modificação no núcleo <i>p</i> -aminobenzamida.....	65
3.9 Compostos que afetam as etapas de replicação da infecção por ZIKV.....	67
4.0 Resultados de Inibição Contra Enzima NS2B-NS2 do ZIKV.....	70
4.1 Análise in silico das propriedades ADME-tox.....	76
4 CONCLUSÃO	78
5 PARTE EXPERIMENTAL	80
5.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H) e Carbono (RMN ¹³ C)	80
5.2 Materiais e Solventes.....	80
5.3 Análise pelo SWISSADME.....	81
5.4 Síntese dos benzotiazóis.....	81
5.4.1 Procedimento geral para a preparação das sulfonamidas 19-21	81
5.4.2 Procedimento geral para a preparação dos compostos 2-33	83
5.4.3 Procedimento para a preparação dos compostos 38-41	85
5.4.4 Procedimento geral para a preparação dos compostos 46-48	88
5.4.5 Procedimento para a preparação dos compostos 57 e 58	91

5.4.6 Procedimento para a preparação dos compostos 50	93
5.4.7 Procedimento para a preparação dos compostos 59 e 60	94
5.4.8 Procedimento para a preparação dos compostos 67 e 68	95
5.4.9 Procedimento para a preparação dos compostos 71 e 72	97
5.5 Atividade antiviral dos benzotiazóis na replicação do ZIKV.....	98
5.5.1 Cultura de células.....	98
5.5.2 Ensaio do vírus.....	98
5.5.3 Ensaio de viabilidade celular	99
5.5.4 Ensaios Antivirais.....	99
5.5.5 Análise estatística	100
5.6 Ensaios Enzimáticos com NS2B-NS3.....	100
5.6.1 Expressão e purificação de NS2B-NS3pro	100
5.6.2 Ensaios enzimáticos com ZIKV NS2B-NS3pro	101
5.6.3 Ensaios enzimáticos com cruzaina	102
6 REFERÊNCIAS	103
7 ANEXOS	109

INTRODUÇÃO

1.1 ZIKA VÍRUS

Os patógenos virais apresentam uma grande ameaça à saúde humana em todo mundo, pois são organismos capazes de causar doenças em um hospedeiro. A organização mundial de saúde (OMS) em 2019, listou quatro infecções virais de dez doenças que apresentam risco global, são elas: vírus influenza, vírus ebola, vírus da imunodeficiência humana (HIV), e vírus da dengue (WHO, 2022). O estudo de sobrevivência do vírus e como ele se comporta no hospedeiro é fundamental para entender como prevenir a disseminação da doença, pois vírus emergentes e reemergentes, como os que causam Influenza, Ebola, Zika e, por último exemplo, o SARS-Cov-2, com a pandemia global de COVID-19, representam globalizadas ameaças catastróficas e demandam desafios extraordinários.

O Zika vírus (ZIKV) foi isolado pela primeira vez de um macaco *Rhesus* em 1947 na região da floresta Zika em Uganda (África oriental) pelos cientistas Dick, Kitchen e Haddow que trabalhavam numa área de alta incidência de febre amarela (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Em 1964, foi publicado pela primeira vez o relato em revista científica de infecção humana por ZIKV, cujos sintomas da doença foram relatados por um homem europeu de 28 anos que residiu em Uganda (SIMPSON, 1964).

Em 2007, começaram a surgir os primeiros casos de surto de ZIKV, na ilha de Yap e estados federados da Micronésia, estima-se que 73% da população tenha sido infectada com ZIKV (DUFFY *et al.*, 2009). Já entre 2013 e 2014, surgiram aproximadamente 32.000 casos suspeitos de infecção pelo Zika na polinésia francesa (AUBRY *et al.*, 2017).

No Brasil, o surto iniciou em meados de 2015, e logo em se espalhou para outros países da América do sul e América central. Entre 2015 e janeiro de 2018, o Brasil apresentou o maior número de infecções por ZIKV, com um total de 137.288 casos (SAMPAIO *et al.*, 2019).

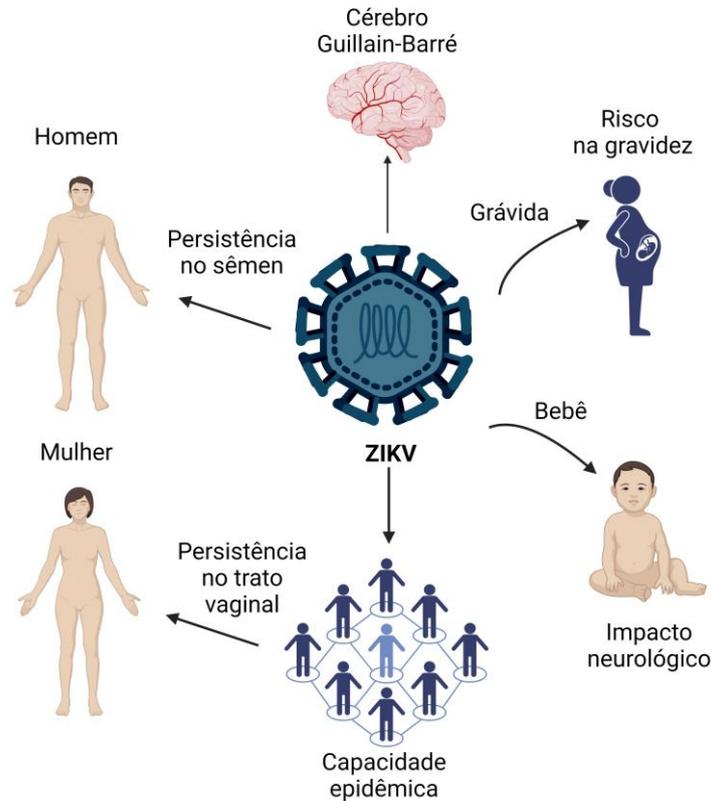
Esses surtos contemporâneos representam uma mudança dramática no fenótipo do ZIKV, de um vírus inofensivo que causava infecções isoladas, por vezes assintomáticas, para um vírus com potencial de causar doenças generalizadas.

Neste trabalho foi avaliado o ciclo de vida e transmissão do ZIKV para entender como a Síntese Orgânica e a Química Medicinal podem ser ferramentas importantes no planejamento e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para inibir a replicação do vírus.

1.2 ZIKA VÍRUS: BIOLOGIA E CICLO DE TRANSMISSÃO

O ZIKV é um membro da família *Flaviviridae* de vírus com envelope, nomeado em homenagem ao primeiro vírus humano a ser descoberto, o vírus da febre amarela (do latim: “*flavus*”) (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). Ele se enquadra no gênero flavivírus, que também inclui uma série de patógenos, como dengue (DENV), vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV), vírus do Nilo ocidental (WNV) e o vírus da febre amarela (YFV). O ZIKV é disseminado em ambos os ciclos silvestre e urbano através da picada das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (AYRES, 2016). O ZIKV já foi detectado em uma ampla variedade de fluidos corporais humanos como: sangue, urina, saliva, sêmen e secreção vaginal. Há relatos de casos em que a infecção por ZIKV ocorre através da transmissão sexual e esses estudos demonstraram a presença do ZIKV com mais de 100 dias após o ato sexual no organismo humano (PARDY; RICHER, 2019). Os sintomas podem ser apresentados como: erupção cutânea aguda, febre, artrite, conjuntivite, possível dor de cabeça e vômitos. O sintoma neurológico mais comum associado à infecção por ZIKV em adultos é a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) (Figura 1) (PARDY; RICHER, 2019), que é uma condição neurológica provocada pelo ataque dos anticorpos produzido pelo nosso organismo ao sistema nervoso periférico (bainha de mielina).

Figura 1-Novos aspectos dos surtos contemporâneos do ZIKV



Fonte: Autora (2023).

Dentro deste contexto é de suma importância compreender como ocorre a replicação do ZIKV e porque é tão importante saber sobre as proteínas não-estruturais do seu genoma, de modo que possamos desenvolver estratégias que atuam na replicação viral.

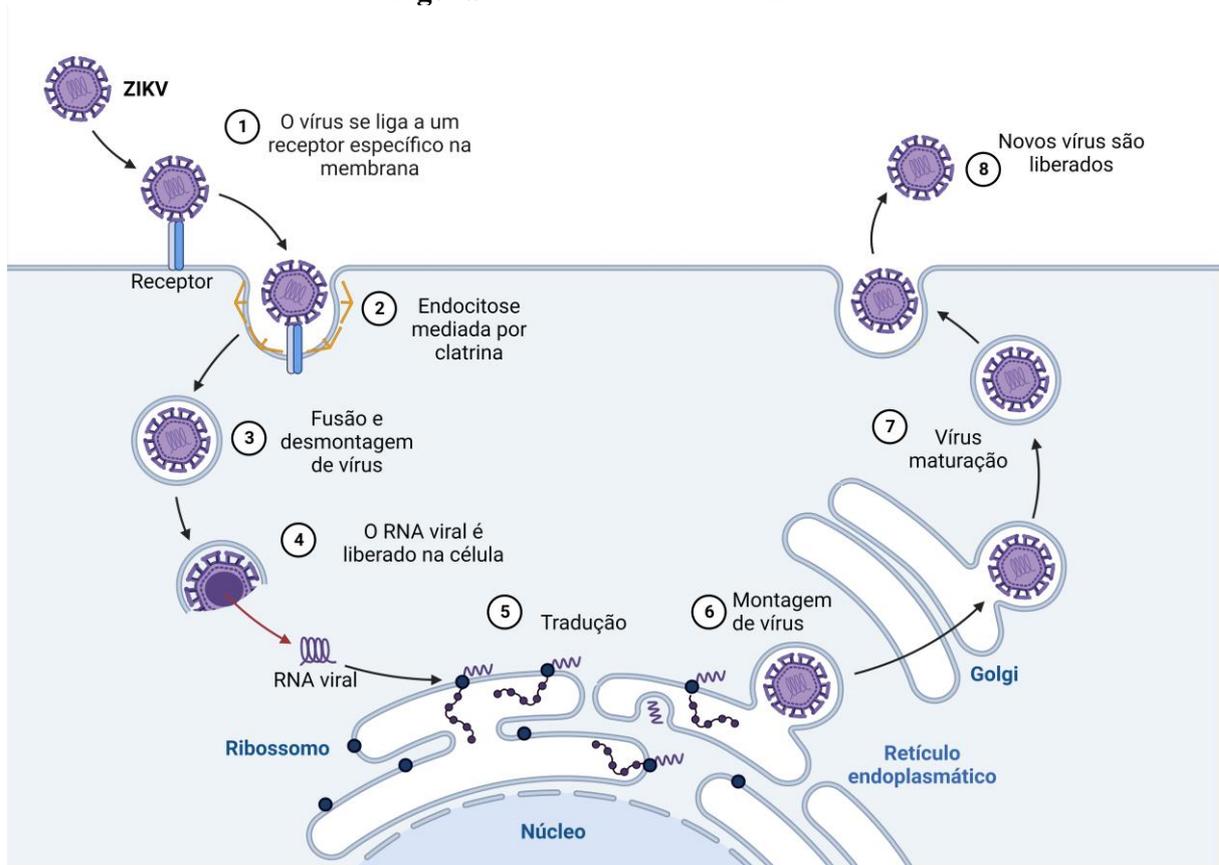
O modo de replicação de um vírus biológico pode ser explicado de forma análoga a um vírus de computador. Por exemplo, o vírus de computador faz cópias de si mesmo na memória de um computador e depois se transfere para outros computadores, isto é, da mesma forma que um vírus biológico, ele apenas carrega informações – instruções ou genes- e não possui metabolismo próprio, tornando-se um parasita por necessitar do maquinário celular de um hospedeiro para existir. Este é o princípio da estratégia de sobrevivência do ZIKV. Compreendido o modo de ação, vamos entender, a estrutura do RNA viral do Zika vírus.

O ZIKV contém um genoma de RNA de fita simples de sentido positivo com envelope. Durante o processo de infecção, as proteínas do envelope E do ZIKV, ligam-se aos receptores da célula hospedeira e a partícula viral é endocitada. As proteínas E facilitam a fusão do vírus

com a membrana endossômica, resultando na liberação do RNA viral no citoplasma da célula hospedeira. A tradução do genoma do RNA ocorre no retículo endoplasmático RE (Figura 2). O RNA é traduzido em uma única poliproteína que são clivadas pelas proteases hospedeiras e pelas proteases virais em três proteínas estruturais consideradas: cápsideo, C; pré-membrana, prM; envelope, Env; e são clivadas em outras sete proteínas não-estruturais (NS) divididas em: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 3). As proteínas estruturais são responsáveis pela formação da cápsula que envolve o material genético do vírus, são importantes para interação do vírus com as células hospedeiras, pois estão envolvidas no reconhecimento dos receptores celulares e são mediadoras da fusão da membrana viral com a membrana celular. Já as proteínas não-estruturais estão envolvidas na replicação e no processamento do RNA viral (TAN *et al.*, 2020).

A NS1 é uma glicoproteína que é secretada pelas células infectadas e que pode interagir com o sistema imune do hospedeiro, modulando a resposta inflamatória e gera novas partículas virais (RASTOGI *et al.*, 2016). NS2A tem funções diversas, como regular a transcrição do vírus, induzir a apoptose celular e facilitar a montagem e a liberação de novas partículas virais (XIE *et al.*, 2015). NS2B é um polipeptídeo que se associa com um fragmento N-terminal do polipeptídeo NS3 (NS3pro), formando uma protease de serina que cliva a poliproteína viral em seus componentes (DIOSA-TORO *et al.*, 2020). A NS3 contém atividade helicase que é responsável pela hidrólise de ligações peptídicas e está envolvida no processo de replicação do vírus, apresentando a tríade catalítica His51 - Asp75 - Ser135 (Figura 4) (SHIRYAEV *et al.*, 2023; VOSS; NITSCHKE, 2020). NS4A atua como cofator da NS3, facilitando a atividade enzimática e a NS4B é uma proteína transmembrana que induz a formação de vesículas no retículo endoplasmático, onde ocorre a replicação do RNA viral (KLAITONG, SMITH, 2021). A NS5 possui duas atividades enzimáticas: metiltransferase e RNA polimerase dependente de RNA (KLAITONG, SMITH, 2021). A metiltransferase modifica o RNA viral para facilitar a sua tradução e a RNA polimerase dependente cópia e multiplica o RNA viral dentro da célula infectada (WANG *et al.*, 2018).

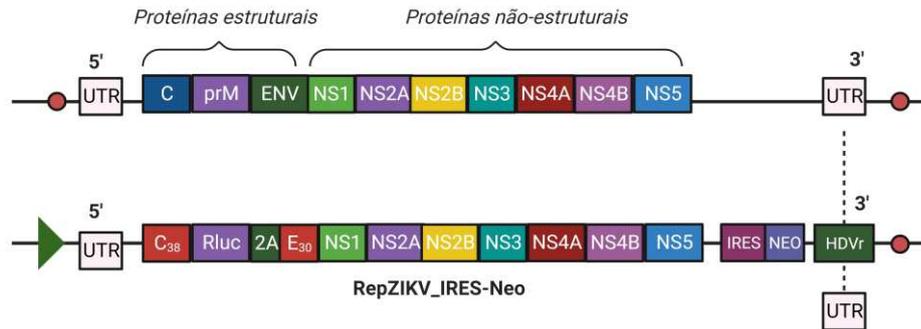
Figura 2- O ciclo de vida do ZIKV



Fonte: Autora (2023).

Uma ferramenta útil para estudo da replicação do ZIKV e para a triagem rápida e de alto rendimento de novos compostos antivirais é a linhagem BHK-21-REPZIKV-IRES-Neo, que contém um replicon do Zika vírus. Replicon é uma molécula de RNA que pode se replicar de forma autônoma nas células hospedeiras, sem produzir partículas virais, as proteínas estruturais são substituídas por um gene repórter *Renilla* luciferase (RLuc) ou uma proteína fluorescente. No Esquema 1 está representado como é feita a quantificação da replicação viral por meio da medição da emissão de luz do gene repórter (RLuc), que transformará a luciferina em oxiluciferina (BECHARA, STEVANI (2018). Além disso, possui o gene que codifica a resistência a neomicina sob o controle de um sítio interno de entrada do ribossomo (*Internal Ribosome Entry Site*, IRES) do vírus da encefalomiocardite (EMCV), e possui o gene de uma sequência de ribozima vírus da hepatite delta (Hepatitis delta vírus ribozyme - HDVr). Os efeitos inibitórios dos compostos na replicação do RNA viral podem ser facilmente avaliados medindo-se a redução dos sinais luminescentes ou fluorescentes (FERNANDES *et al.*, 2020). Um esquema do replicon de ZIKV utilizado neste trabalho está demonstrado na Figura 3.

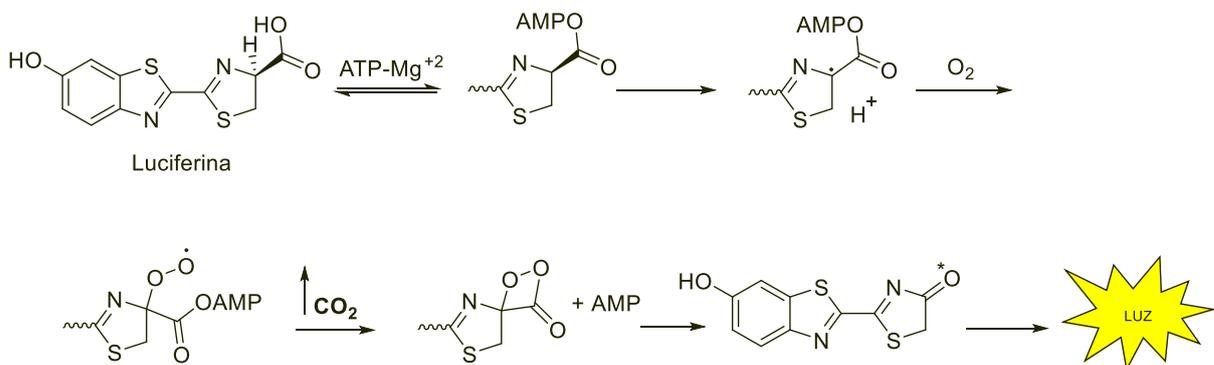
Figura 3- Organização do genoma dos flavivírus



Legenda: Cápside, C; pré-membrana, prM; envelope, Env.

Fonte: Autora (2023).

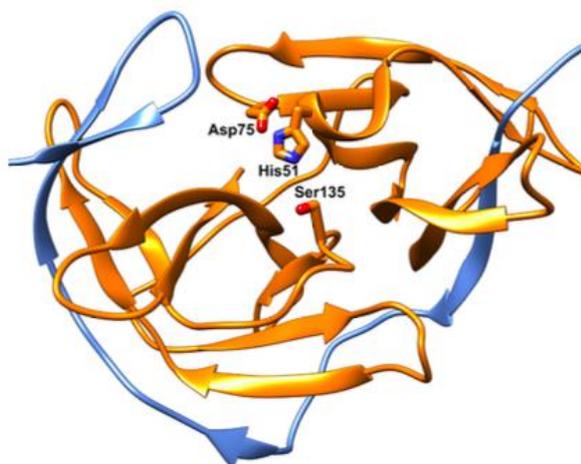
Esquema 1- Reação de oxidação da luciferina pela luciferase



Fonte: Adaptado de BECHARA, STEVANI (2018).

Legenda: A Luciferase é produzida durante a replicação do RNA do replicon, isto é, quanto maior for a produção de luciferase significa que menor foi a inibição das proteínas não-estruturais do replicon. O ensaio para quantificar a taxa de replicação viral foi realizado após 72h de incubação (tempo de contato entre o composto e replicon). Após 72h, foi adicionado o substrato luciferina para que toda a luciferase produzida pudesse transformar a luciferina, em oxiluciferina (Esquema 1). Essa transformação em oxiluciferina libera luz, que foi medida pelo equipamento Glomax promega.

Figura 4- Estrutura de cristal de raios-X da protease NS2B-NS3 do ZIKV em sua conformação cataliticamente ativa (código do PDB: 5LC0)



Legenda: NS2B é mostrada em azul e NS3 é mostrada em laranja. Resíduos da tríade catalítica são destacados.

Fonte: Adaptado de Voss e Nitsche (2020).

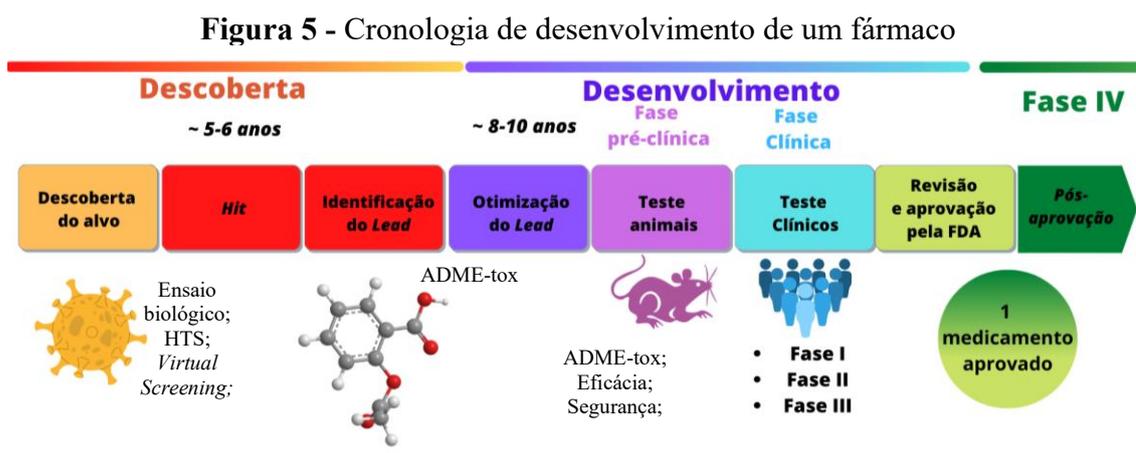
1.3 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS

O planejamento racional de candidatos a fármacos é de suma importância e exige conceitos fundamentais sobre potência, afinidade e seletividade para que haja a otimização, desenvolvimento e a pesquisa de processos para a preparação do protótipo. Com isso, os ensaios biológicos associados a química medicinal (Uma ciência que representa a intersecção entre a química e a farmácia, a qual investiga racionalmente um composto químico com potencial terapêutico) - é uma combinação eficaz no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica. O processo de descoberta de fármacos ilustrado na Figura 5 é constituído por duas principais fases: (i) descoberta e (ii) desenvolvimento clínico (DUELEN *et al.*, 2019).

Na etapa de descoberta, os pesquisadores buscam identificar e otimizar moléculas que possam interagir com um alvo molecular relacionado a uma doença. Essas moléculas são identificadas como ligantes (do inglês, *hits*) e são obtidas por triagens reais (por exemplo, biológicas ou bioquímicas), ou virtuais (métodos computacionais). Normalmente, na etapa de descoberta são identificadas moléculas de baixa potência e o objetivo principal é otimizar os parâmetros farmacodinâmicos como potência, seletividade e afinidade, para juntamente realizar a avaliação das propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, ADME-tox. Na etapa de desenvolvimento, os compostos otimizados

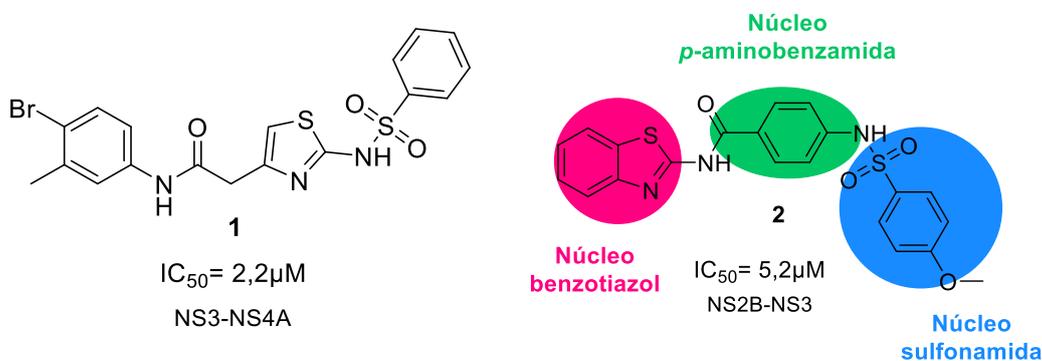
são elevados a categoria de compostos líderes (do inglês, *lead*), e são selecionados para passar por uma série de ensaios que envolve os estudos de farmacologia e toxicidade, que tem como objetivo principal testar a segurança e a eficácia de novos candidatos a fármacos no modelo *in vivo* animal (pré-clínica) até serem testados em humanos nas etapas clínicas (fase I, II e III) (GUIDO, ANDRICOPULO, OLIVA, 2010). Após a avaliação das propriedades farmacocinéticas e da atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, são geradas novas entidades químicas (NCE, do inglês *New Chemical Entities*) (LIMA, 2007), que após passarem pelos testes clínicos, serão registradas na última fase pelas agências reguladoras (Ex: FDA, do inglês, *Food and Drug Administration*) e ainda serão monitoradas por questão de segurança na etapa de farmacovigilância (Fase IV) (Figura 5).

A fase que o LASFAR (Laboratório de Síntese de Candidatos a Fármacos-UFU) se encontra é na etapa de descoberta. Baseado nessas informações, foi selecionado o *hit 2* (Figura 6) para realizar a otimização dos parâmetros prescritos para a fase inicial.



Fonte: A autora (2023).

Figura 6- Estrutura química dos hits 1 e 2



Fonte: Autora (2023).

Lee e colaboradores (2013), relataram que após realizar uma triagem por HTS (do inglês, *high throughput screening*) de mais de 40.000 compostos utilizando a enzima NS3-NS4A¹ do vírus da hepatite C (VHC), identificou o *hit 1* que apresentou IC₅₀ de 2,2 µM contra NS3-NS4A (Figura 6). A forte semelhança estrutural da região catalítica entre as proteases NS3-NS4A do VHC com a NS2B-NS3² do ZIKV, levou os autores a selecionarem 71 moléculas do trabalho anterior para serem testadas com a enzima NS2B-NS3. Desse estudo foram identificados 10 compostos com valor de IC₅₀ < 50 µM. Essa seleção, o *hit 2* (Figura 6), demonstrou IC₅₀ de 5,2 µM (LEE *et al.*, 2017).

Por este motivo, o composto **2** foi selecionado como *hit* neste trabalho onde foram propostas modificações químicas na sua estrutura, a fim de promover um estudo entre estrutura química e atividade biológica contra o ZIKV e a protease NS2B-NS3, e otimizar as propriedades farmacológicas. Modificações estruturais nos núcleos benzotiazol, *p*-aminobenzamida e sulfonamida do *hit 2* foi idealizada para avaliar quais substituintes ou grupos funcionais são farmacofóricos conforme ilustrado na Figura 6.

Uma vez que o grupo farmacofórico venha a ser identificado, podemos realizar outras modificações na estrutura química da série para promover melhorias farmacodinâmicas. A farmacodinâmica de um composto orgânico é uma característica que o químico orgânico precisa avaliar na hora de idealizar uma molécula, pois é fundamental que o fármaco possa atingir o seu objetivo quando está no meio biológico, que é interagir com alvo desejado.

1.4 DERIVADOS BENZOTIAZÓIS

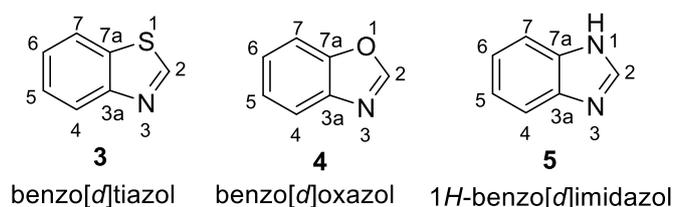
Os heterocíclicos desempenham um importante papel no planejamento de novos candidatos a fármacos (THOMAS *et al.*, 2011). Um composto heterocíclico é aquele que contém um anel cíclico formado por mais de um átomo, isto é, um anel formado apenas por carbono é chamado de anel homocíclico, se o anel contém outro átomo além de carbono como nitrogênio (N), enxofre (S) e oxigênio (O) é referido como heterocíclico. Em vários compostos, o benzeno é fundido com o sistema heterocíclico de cinco membros como o benzotiazol, benzoimidazol, benzoxazol que são selecionados devido à sua atividade farmacológica (Figura

¹ NS3-NS4A: É uma protease viral que é importante para o ciclo de vida de vários vírus, como da hepatite C. NS3/A4 apresenta no seu sítio catalítico a tríade formada pelos resíduos His57, Asp81 e Ser139, que são responsáveis pela clivagem da ligação peptídica.

² N2B-NS3: É uma protease serina que é responsável pela clivagem da poliproteína viral durante a etapa de replicação do vírus. A proteína NS3 é a principal responsável pela atividade catalítica da enzima.

7). Os benzotiazóis fazem parte de uma classe importante de heterociclos que funciona como um grupo núcleo para o desenho de novas moléculas. O sistema do anel benzeno está fundido à posição 3a e 7a do anel tiazol formando o benzotiazol que é planar.

Figura 7- Anéis heterocíclicos

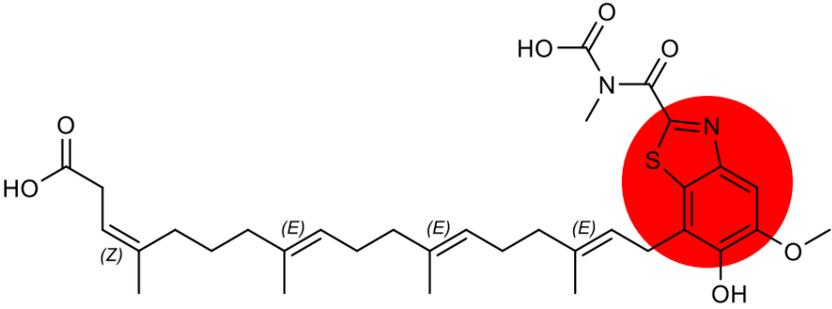
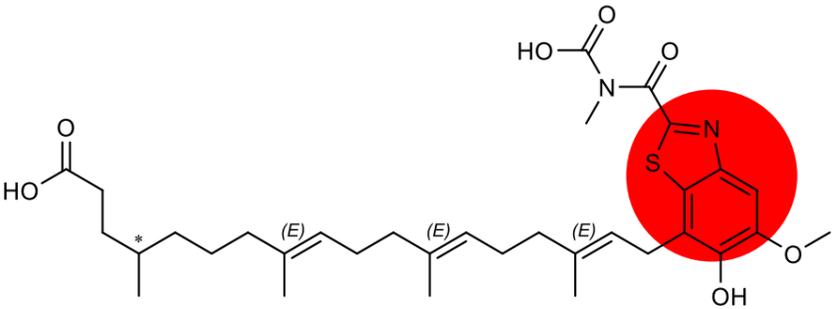
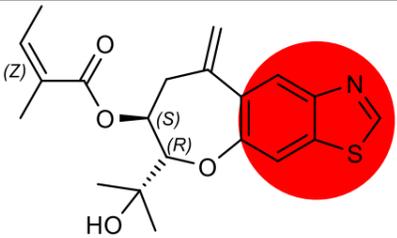
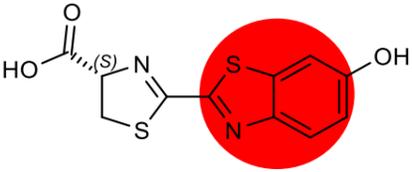
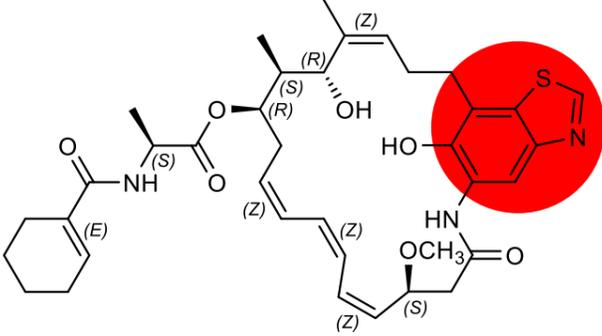


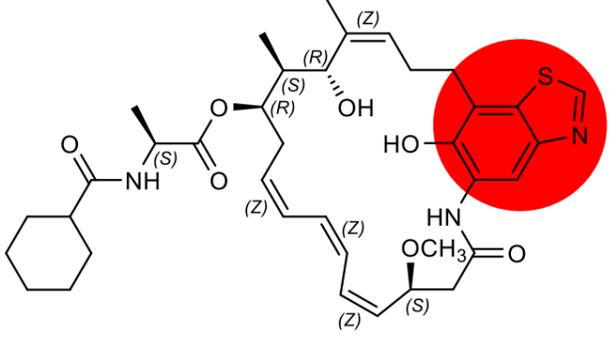
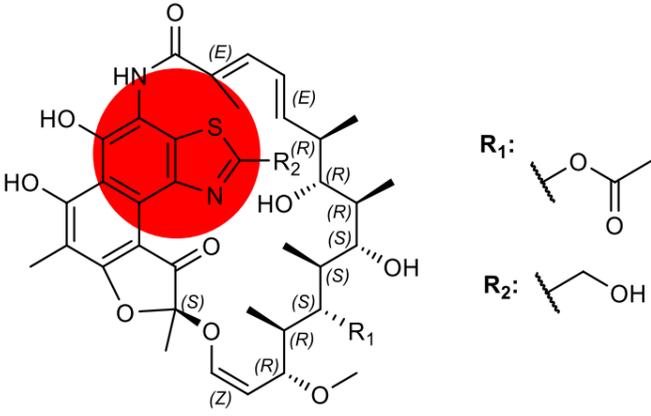
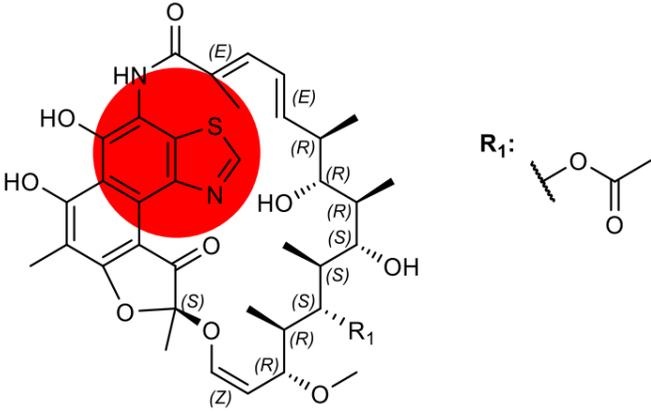
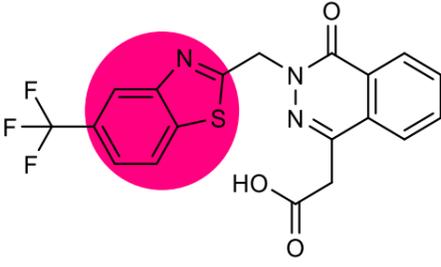
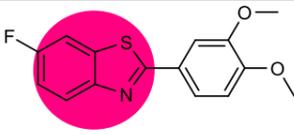
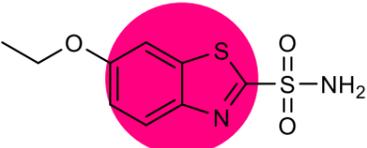
Fonte: Autora (2023).

Já se tem estudado esses anéis heterocíclicos (Figura 7) há alguns anos por estarem envolvidos em amplas atividades biológicas e terapêuticas conhecidas como: antimicrobiana, anticancerígena, anti-helmíntica, antidiabética, antituberculose, antitumoral, antitripanossomal, antiviral, analgésica, anti-inflamatória, antifúngica, antileishmania (GARCIA-BAEZ *et al.*, 2021). Alguns exemplos de moléculas bioativas que apresentam o núcleo benzotiazol na sua estrutura são os eritrazol A e B (**6** e **7**) (Tabela 1). Estas moléculas foram isoladas do extrato das cepas da bactéria gram-negativa *Eritobacter citreus* e apresentaram atividade antitumoral (HU; MACMILLAN, 2011). Outro exemplo de composto bioativo que contém o anel benzotiazol é o sesquiterpenóide do tipo bisabolano (**8**) encontrado nas raízes da *Ligularia dentate* (compositae), e na China a raiz da planta é usada como erva para facilitar a respiração, estimular o fluxo sanguíneo, reduzir a inflamação, aliviar a dor, parar a tosse e diminuir as secreções produzidas durante determinadas viroses (BABA; YAIOTA; KIKUCHI, 2007).

Tabela 1- Núcleo benzotiazol presente em compostos naturais e sintéticos com aplicações farmacêuticas

Continua

Nº	Fonte	Espécie	Molécula	Atividade ou/aplicação biológica	Referência
6	Natural	<i>Erythrobacter</i> sp.	 <p>Eritrazol B</p>	Antitumoral	HU; MACMILLAN, 2011.
7	Natural	<i>Erythrobacter</i> sp.	 <p>Eritrazol A</p>	Antitumoral	HU; MACMILLAN, 2011.
8	Natural	<i>Ligularia dentata</i>	 <p>8β-angeloyloxy-5,10β-epoxythiazolo[5,4-a]biasabola-1,3,5,7(14)-tetraene-4,11-diol</p>	Erva medicinal reduz inflamação; alivia tosse; ajuda na respiração.	BABA; YAIOTA; KIKUCHI, 2007.
9	Natural	<i>Photinus pyralis</i> <i>Oplophorus gracilirostris</i>	 <p>D-luciferina</p>	Ensaio genéticos, ensaio bioquímicos, imageamento de tumores e infecções, dentre outros.	OLIVEIRA <i>et. al</i> , 2013; SYED; ANDERSON, 2021.
10	Natural	-	 <p>Tiazinotrienomicina F</p>	Antitumoral	HOSOKAWA <i>et. al</i> , 2000

11	Natural	-	 <p>Tiazinotrienomicina G</p>	Antitumoral	HOSOKAWA <i>et. al.</i> , 2000
12	Natural	<i>Nocardia mediterranea</i>	 <p>Rifamicina Q</p>	Antimicrobiano	CRICCHIO, ANTONINI, SARTORI, 1980; ADAMS <i>et al.</i> , 2021.
13	Natural	<i>Nocardia mediterranea</i>	 <p>Rifamicina P</p>	Antimicrobiano	CRICCHIO, ANTONINI, SARTORI, 1980; ADAMS <i>et al.</i> , 2021.
14	Sintético	-	 <p>Zopolrestat</p>	Usado no tratamento de diabetes	MYLARI <i>et. al.</i> , 1991.
15	Sintético	-	 <p>Riluzol</p>	Usado no tratamento de esclerose lateral amiotrófica (ELA)	ALZFORUM, 2022.
16	Sintético	-	 <p>GW610, NCS 721648</p>	Antitumoral	MORTIMER <i>et. al.</i> , 2006.
17	Sintético	-	 <p>Etozolamida</p>	Usado no tratamento de glaucoma; antibacteriano	ALERT-ONLINE, 2022.

Dando continuidade à série de exemplos, a D-luciferina (**9**) possui finalidades bioanalíticas nas áreas médicas (diagnósticos e estudos pré-clínicos de patologias como infecções bacterianas, virais e câncer) (OLIVEIRA *et al.*, 2013) – sendo o anel tiazol o principal responsável pela bioluminescência da molécula (TAKAKURA, 2021).

Compostos da classe das rifamicinas (**12 e 13**) (CRICCHIO, ANTONINI, SARTORI, 1980) (Tabela 1) são conhecidas por ser uma classe de antibiótico que demonstram propriedades antimicrobianas contra bactérias Gram-positivas e algumas bactérias Gram-negativas (ADAMS *et al.*, 2021) e as tiazinotrienomicinas (**10 e 11**) (HOSOKAWA *et al.*, 2000) são empregadas como antibiótico no tratamento do câncer. Essas estruturas químicas chamam atenção apresentarem o anel benzotiazol em destaque (Tabela 1).

Os benzotiazóis também podem ser encontrados como núcleo central em fármacos sintéticos, apresentando importantes atividades biológicas, como é caso do Zopolrestat (**14**) (MYLARI *et al.*, 1991) (Tabela 1) usado no tratamento de diabetes; o GW610 (**16**) que é um potente antitumoral (MORTIMER *et al.*, 2006), o Riluzol (**15**) (ALZFORUM, 2022) é utilizado no tratamento de esclerose lateral amiotrófica (ELA), medicamento aprovado pela FDA, sendo comercializado desde o final da década de 1990; A Etoxzolamida (**17**) é utilizada no tratamento de glaucoma, que também apresenta atividade contra a bactéria da tuberculose *Mycobacterium tuberculosis* (ALERT-ONLINE, 2022). Sendo assim, conhecendo a ampla atividade biológica dos benzotiazóis na literatura, foi planejado e sintetizado uma série de amidas contendo o núcleo benzotiazol, que são congêneres do *hit 2* (Figura 6) para serem avaliados no ensaio biológico contra a enzima NS2B-NS3 e contra o Zika vírus.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi sintetizar uma série de congêneres do *hit 2* e avaliar a capacidade de inibir a replicação do ZIKV e a enzima NS2B-NS3.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

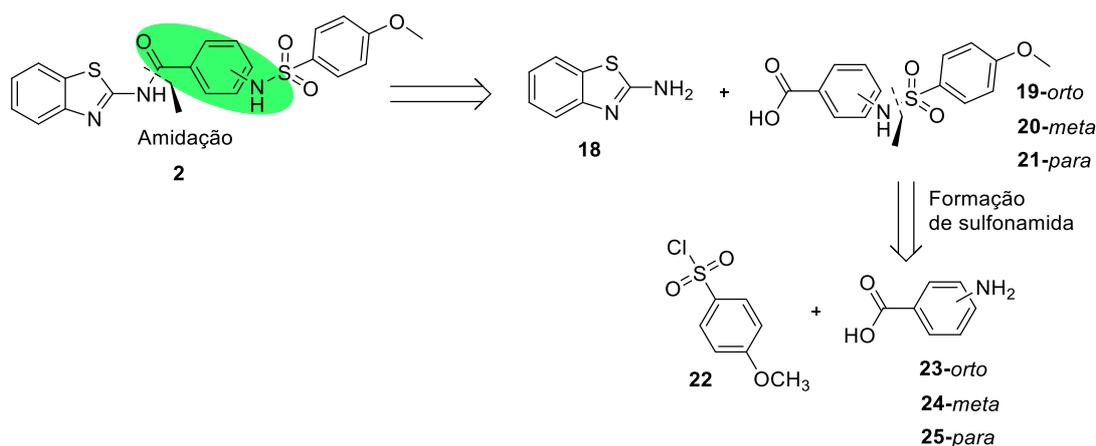
- a. Planejar e sintetizar derivados do *hit 2*;
- b. Caracterizar os compostos sintetizados por RMN ^1H e ^{13}C ;
- c. Determinar os parâmetros farmacodinâmicos de EC_{50} (potência) e de CC_{50} (citotoxicidade) para os compostos selecionados;
- d. Confirmar a inibição da replicação viral através da inibição da enzima NS2B-NS3 do ZIKV;
- e. Avaliar a relação entre estrutura química e atividade biológica frente ao vírus ZIKV.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PLANEJAMENTO E SÍNTESE DO *HIT* E DERIVADOS COM MODIFICAÇÕES NO NÚCLEO *P*-AMINOBENZAMIDA

O processo conhecido como análise retrossintética (Esquema 2) é utilizado no planejamento para obtenção de moléculas-alvo que consiste em analisar uma molécula de trás para frente, através dessa ferramenta conseguimos planejar a síntese do *hit 2* e seus análogos, identificando quais os precursores sintéticos são necessários. Os reagentes 2-amino-benzotiazol (18), ácido *p*-amino-benzóico (25), e o cloreto de para-metoxisulfonila (22) foram escolhidos para fazer parte da construção do escopo de moléculas pela acessibilidade e viabilidade sintética.

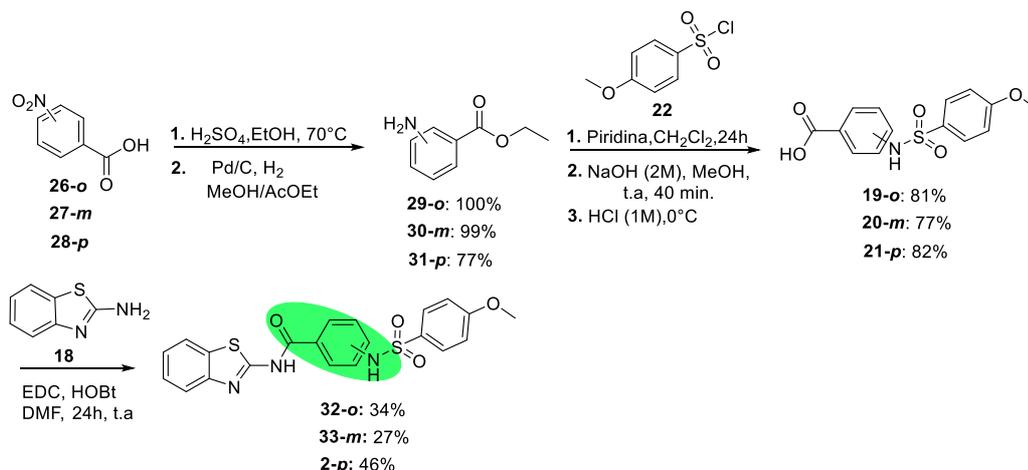
Esquema 2- Análise retrossintética do *hit 2* e derivados com modificações no núcleo central



Fonte: Autora (2023).

A síntese do *hit 2* inicia através de uma esterificação de fischer do ácido *p*-nitro-benzóico **28** (Esquema 3), em aquecimento a 70°C com H₂SO₄ e etanol. Na segunda etapa, acontece ocorre a hidrogenólise (redução do grupo nitro para amina), usando Pd/C e atmosfera de H₂(g), obtendo-se o produto **31** com rendimento de 77%. A próxima etapa foi a obtenção da sulfonamida **21** através de uma substituição nucleofílica, partindo-se de **31** através de uma reação com cloreto de 4-metóxi-benzenosulfonila **22**, usando piridina como base e diclorometano como solvente. Na etapa 2, ocorre a hidrólise do éster com uma solução de NaOH (2M) e a formação de um sal do ácido carboxílico.

Esquema 3- Estratégia para síntese do *hit 2* e análogos



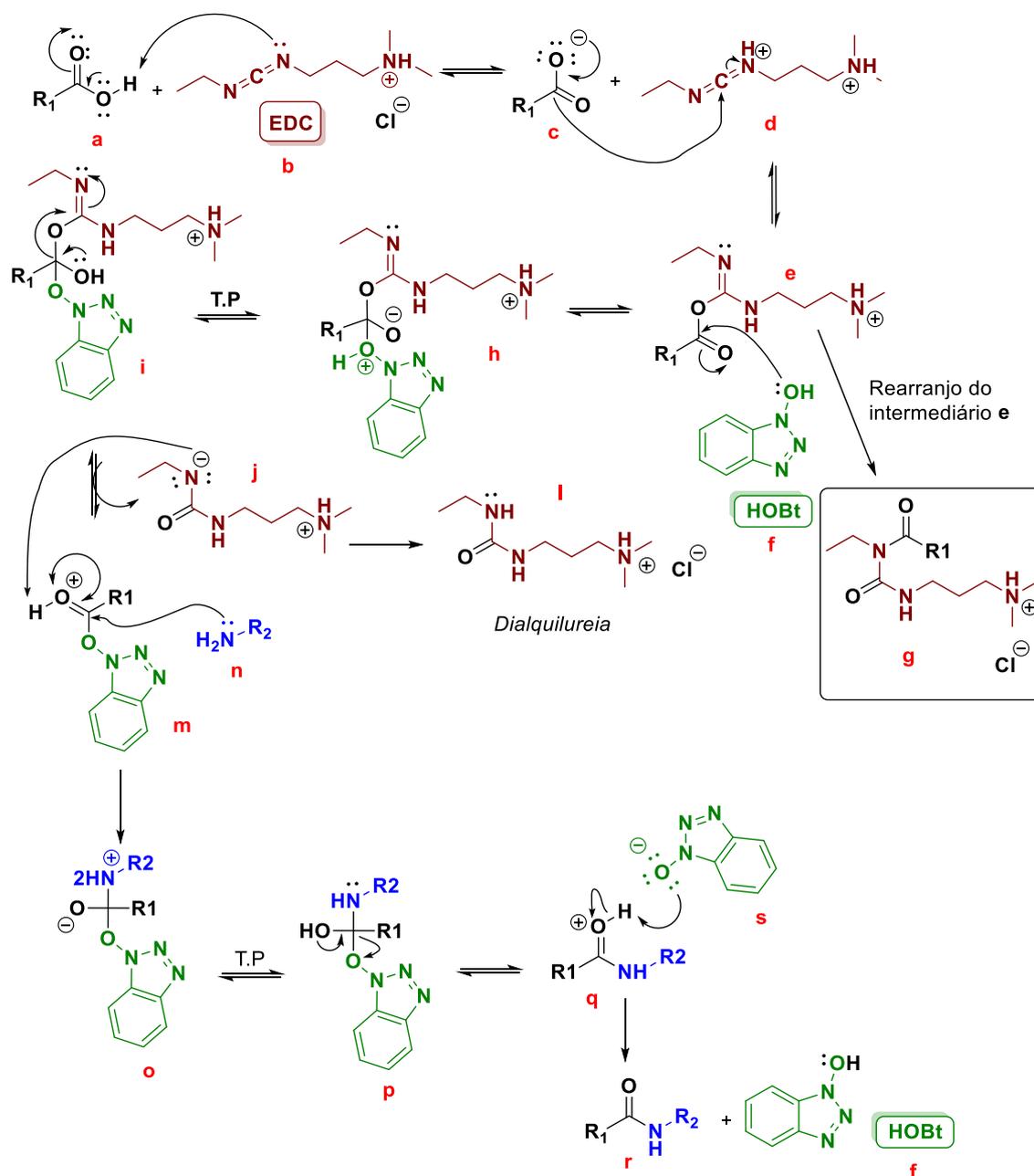
Na etapa 3, foi realizada a acidificação da reação com uma solução de HCl (1M) para regenerar o ácido carboxílico e formar o produto **21** com 82% de rendimento.

A sulfonamida **21** foi utilizada com o 2-amino-benzotiazol **18** para gerar o *hit 2*, usando a condição experimental com EDC, HOBt, DMF e temperatura ambiente do Esquema 3. A rota sintética para obtenção de *hit 2* foi bem-sucedida seguimos a mesma metodologia como modelo para obtenção dos análogos **32** e **33** (Esquema 3), obtidos com 34 e 27% de rendimento, respectivamente. Todas as etapas reacionais foram monitoradas por CCD e reveladas por U.V no comprimento de 254 nm.

Neste trabalho foi investigado o uso de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), utilizado juntamente com o auxiliar 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBt), o mecanismo da reação entre esses dois agentes de acoplamento pode ser visualizado no Esquema 4.

A reação começa com ativação do ácido carboxílico **a**. A primeira etapa começa com o ataque nucleofílico da carbodiimida **b** do EDC ao hidrogênio do ácido carboxílico **a**, formando os intermediários **c** e **d**. O uso de HOBt diminui a formação do intermediário não-reativo N-acil-ureia **g**. Isso permite a obtenção de um intermediário ativado-O-acil-isoureia **m**. O HOBt **f** realiza um ataque nucleofílico no intermediário **e**, formando o intermediário tetraédrico **h**, que após transferência de próton forma **i**, que elimina a dialquilureia **l** e forma o éster ativado **m**. Em seguida, há uma substituição acílica, onde a amina **n** ataca o carbono carbonílico do éster ativado, formando o intermediário tetraédrico **o**, por fim, após a transferência de próton forma o intermediário **p**, gerando a eliminação de **s**. O nucleofilo **s** vai capturar um próton de **q**, gerando o produto de amidação **r** e regenerando o HOBt no final (MONTALBETTI, FALQUE, 2005).

Esquema 4- Mecanismo de acoplamento promovido por HOBt quando utilizado juntamente com EDC para obtenção de amidas



Fonte: Autora (2023).

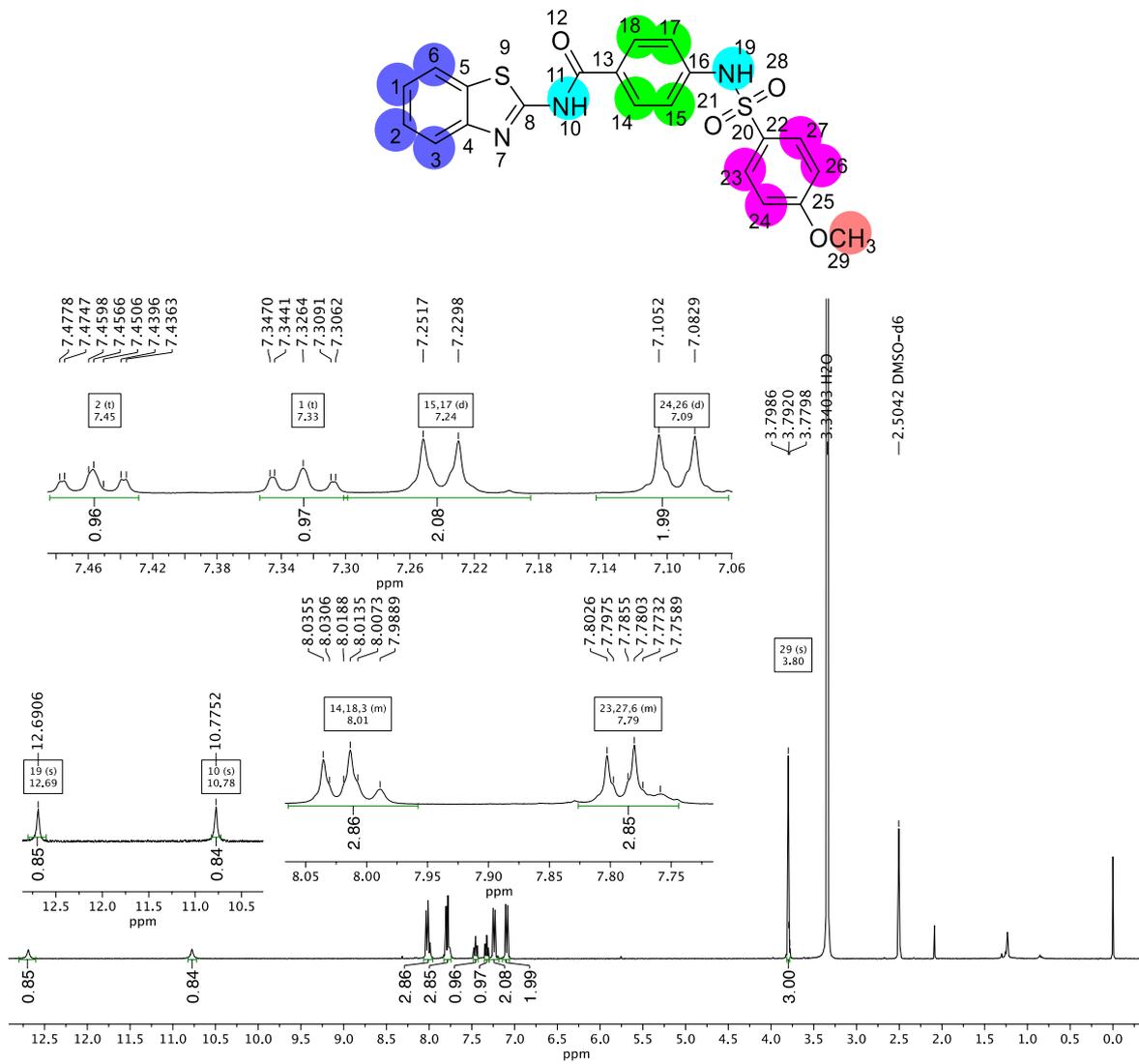
O *hit 2* foi escolhido para detalhar a elucidação estrutural utilizando os espectros de RMN ^1H (Figura 8) e ^{13}C (Figura 9) (Tabela 2). No espectro de RMN de ^1H (Figura 8), podemos visualizar um singlete em δ 3,80 característicos de uma metóxila ($-\text{OCH}_3$). Na região de sinais referentes aos hidrogênios aromáticos são observados dupletos referentes aos H-24 e H-26 (δ 7,09, $J = 8,9$ Hz) e aos H-15 e H-17 (δ 7,24, $J = 8,8$ Hz). Ainda são observados na região

aromática tripletos (t) referentes aos H-2 (δ 7,33, $J = 7,7\text{Hz}$) e H-1 (δ 7,45, $J = 7,6\text{ Hz}$), e são observados multipletos (m) referentes aos hidrogênios H-27, H-23 e H-6 (δ 7,79) e aos H-18, H-14 e H-6 (δ 8,01).

No deslocamento de δ 10,78 aparece um singlete que foi correlacionado com o H ligado ao grupo amida. No deslocamento de δ 12,69 aparece um singlete referente ao H ligado ao grupo sulfonamida (Figura 8). O grupo funcional sulfonamida é comumente evidente nos deslocamentos químicos entre δ 10-12 no espectro de RMN de ^1H (TUCZAN; MEDWICK, 1972).

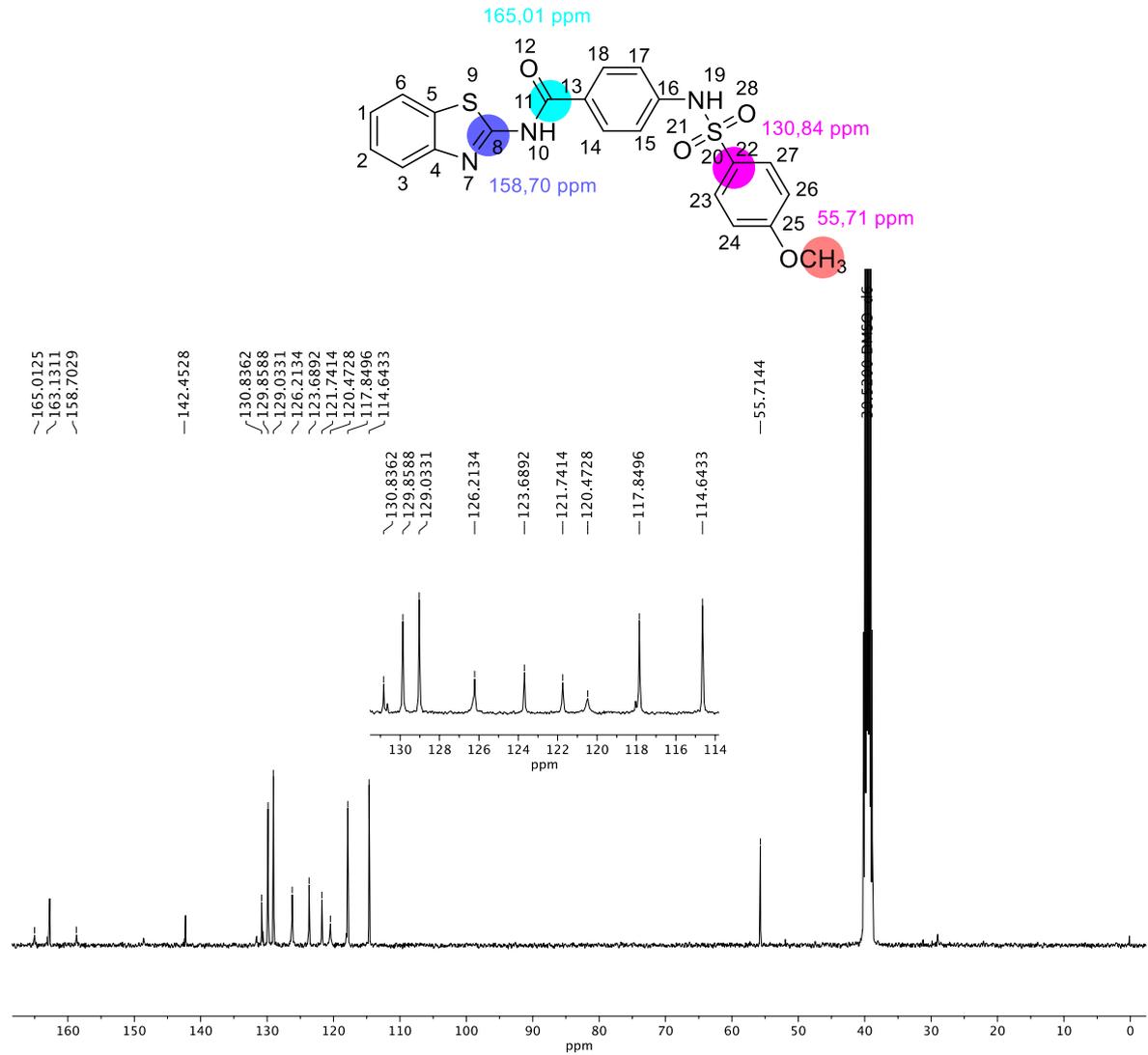
O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 9), o sinal em δ 55,71 foi correlacionado com a metóxila ($-\text{OCH}_3$). O deslocamento de δ 165,01 é do carbono da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) que aparece como o mais desblindado no espectro de RMN ^{13}C . Os carbonos equivalentes C-24 e C-26 aparecem em δ 114,64, C-15 e C-17 aparecem em δ 117,85, C-14 e C-18 aparecem em δ 129,03 e C-23 e C-27 aparecem em δ 129,86. Os demais sinais estão agrupados na Tabela 2.

Figura 8- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **2**



Fonte: Autora (2023).

Figura 9- Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **2**



Fonte: Autora (2023).

Tabela 2– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 2

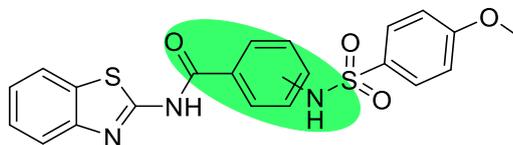
Posição	δ RMN de ^1H				δ RMN de ^{13}C	
	(ppm) ^a	Mult. ^b	I ^c	<i>J</i> (Hz) ^c	Posição	(ppm) ^a
1	7,45	t	1H	7,7	1	123,69
2	7,33	t	1H	7,6	2 e 13	126,21
3 e 14,18	8,1	m	3H	-	3	120,47
6 e 23,27	7,79	m	3H	-	4 e 14,18	129,03
10	12,69	s	1H	-	5 e 16	142,45
15,17	7,24	d	2H	8,8	6	121,74
19	10,78	s	1H	-	8	158,70
24,26	7,09	d	2H	8,9	11	165,01
29	3,80	s	3H	-	15, 17	117,85
					22	130,04
					23,27	129,86
					24,26	114,64
					25	163,13
					29	55,71

^aDeslocamentos químicos em ppm; ^bMult= multiplicidade; ^c integral; ^dconstantes de acoplamento em Hz

3.2 RESULTADOS BIOLÓGICOS COM MODIFICAÇÃO NO NÚCLEO P-AMINOBENZAMIDA

Os ensaios de viabilidade celular e inibição da replicação do ZIKV foram realizados pela professora Dra. Ana Carolina Jardim da Universidade Federal de Uberlândia em seu grupo de pesquisa. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é ensaio realizado para avaliar se a substância química a qual pretende-se testar pode ou não danificar a célula viva. Diante disto, o parâmetro ao qual pode ser testado a citotoxicidade é a viabilidade celular. A viabilidade celular foi determinada por meio da técnica MTT. Esta técnica baseia-se na medida do dano induzido pela substância testada no metabolismo celular de glicídeos, usualmente através da atividade de desidrogenases. As reações com o MTT são usadas com a finalidade de verificar a atividade de desidrogenases presentes em células viáveis (MAGALHÃES; THÁ; LEME, 2018).

Os resultados obtidos de viabilidade celular e inibição da replicação do ZIKV estão agrupados na Tabela 3, e mostra apenas os resultados com as modificações realizadas inicialmente no núcleo *p*-aminobenzamida. A viabilidade celular e a inibição da replicação do ZIKV foram investigadas para os compostos nas concentrações de 10 μM e 2 μM empregando células Vero E6 infectadas ou não infectadas com ZIKVPE₂₄₃ (Tabela 3) para identificar os perfis farmacológicos mais promissores e determinar a metade da concentração efetiva máxima (EC₅₀) e metade da concentração citotóxica máxima (CC₅₀). Foi considerado como perfil farmacológico promissor aqueles compostos que inibiram mais de 60% da replicação do ZIKV e mantiveram mais de 30% da viabilidade celular na mesma concentração (10 ou 2 μM). Os ensaios demonstraram EC₅₀ de 11,2 μM e CC₅₀ de 13,3 μM para o composto **2**, isto é, o *hit 2* apresentando uma baixa seletividade para inibir o ZIKV (Tabela 3). O composto **33**, com a modificação na posição meta foi menos citotóxico do que o composto **2** (EC₅₀ de 5,1 μM vs 11,2 μM ; e CC₅₀ de 127,9 μM vs 13,3 μM , respectivamente), indicando um melhor perfil farmacológico com um índice seletivo (IS) de 25,1. Já o composto **32**, com a modificação na posição orto, apresentou uma baixa taxa de inibição de replicação do ZIKV, não tendo o EC₅₀ e CC₅₀ determinado.

Tabela 3- Efeito de **2**, **32** e **33** na viabilidade das células Vero E6 e na infectividade do ZIKV

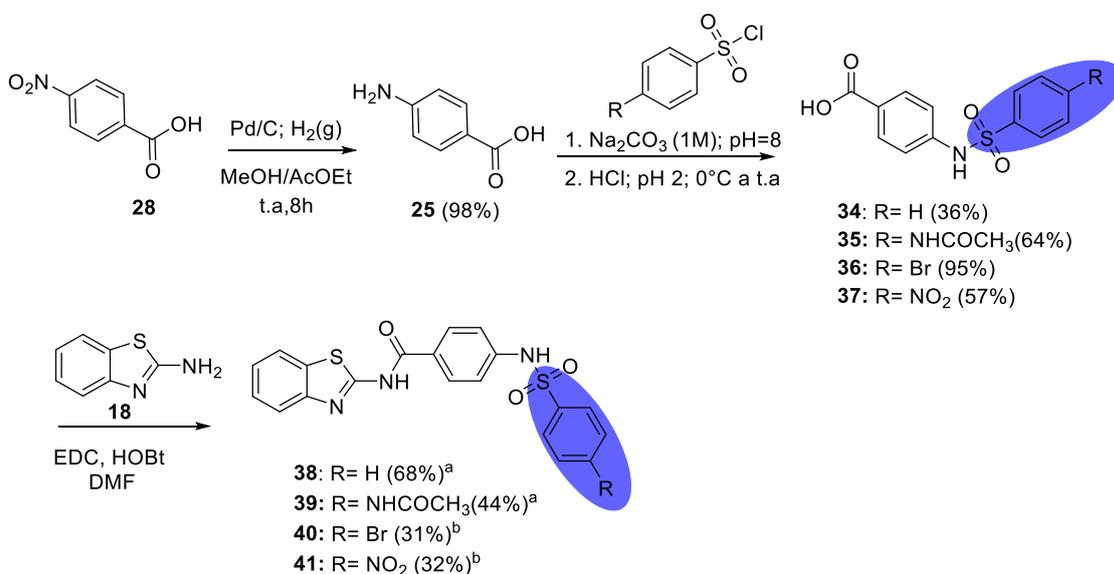
Comp.	Posição	Conc. (µM)	Viabilidade celular ^a (%)	Inibição da replicação ^b (%)	EC ₅₀ ^c (µM)	CC ₅₀ ^d (µM)	SI
32	<i>orto</i>	10	104,1	1	N. D	N. D	N.
		2	98,5	5,4			D
33	<i>meta</i>	10	17,7	87,5	5,1 ± 0,4	127,9 ± 39	25,1
		2	79,3	72,9			
2	<i>para</i>	10	94,8	74,4	11,1 ± 0,5	13,3 ± 5	1,2
		2	88,7	10,8			

Comp.: Composto; Conc.: Concentração; N.D: Não-determinado; I.S: índice de seletividade = CC₅₀/IC₅₀. ^aEfeito dos compostos na viabilidade das células Vero E6; ^bEfeito dos compostos na infectividade do ZIKV em células Vero E6. ^cValor EC₅₀ (µM) para a inibição do ciclo replicativo ZIKV_{PE243}. ^dValor CC₅₀ (µM) medido em células Vero E6. Os valores relatados são a média de três experimentos independentes, cada um medido em triplicata (valores de P < 0,05).

3.3 PLANEJAMENTO E SÍNTESE COM MODIFICAÇÕES NO NÚCLEO SULFONAMIDA

As posições relativas para e meta demonstraram ser as mais promissoras apresentando mais de 70% de redução da replicação viral nas concentrações de 10 μM e 2 μM , respectivamente (Tabela 3). Com isso foi planejado a exploração de modificação no núcleo sulfonamida, fixando o núcleo *p*-aminobenzamida com orientação relativa em para, a fim de avaliar os efeitos eletrônicos desta transformação, e o impacto desta transformação na atividade biológica. Portanto, a síntese dos análogos do *hit* 2 (**38-41**) está descrita no Esquema 5, dar-se pelo 2-amino-benzotiazol (**18**) e as sulfonamidas (**34-37**), utilizando EDC e HOBt.

Esquema 5- Síntese das amidas 38-41



Legenda: condição: 24h, t.a.^a; 48h, t.a.^b

Diferente do que foi descrito anteriormente, os passos para as sínteses dos intermediários **34-37** (Esquema 5) foram modificados com o objetivo de reduzir os números de etapas para obtenção dos produtos **38-41**. Portanto, ao invés da síntese iniciar com a esterificação de Fischer do ácido amino-benzóico, iniciou-se com a hidrogenólise para redução do grupo nítro.

A reação de redução do ácido 4-nítro-benzóico **28**, foi realizada usando H₂(g) e Pd/C, para obtenção do composto **25**, cujo rendimento foi de 98%. A próxima etapa, foi a obtenção das sulfonamidas **34-37** através de uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2).

O ácido 4-amino-benzóico **25** e os cloretos de sulfonilas com diferentes substituintes foram adicionados a um sistema contendo Na_2CO_3 para formação de um sal de ácido carboxílico na primeira etapa e, na etapa 2, adicionou-se HCl , para regenerar o ácido carboxílico e, obter por fim, as sulfonamidas **34-37** com 36-95% de rendimento.

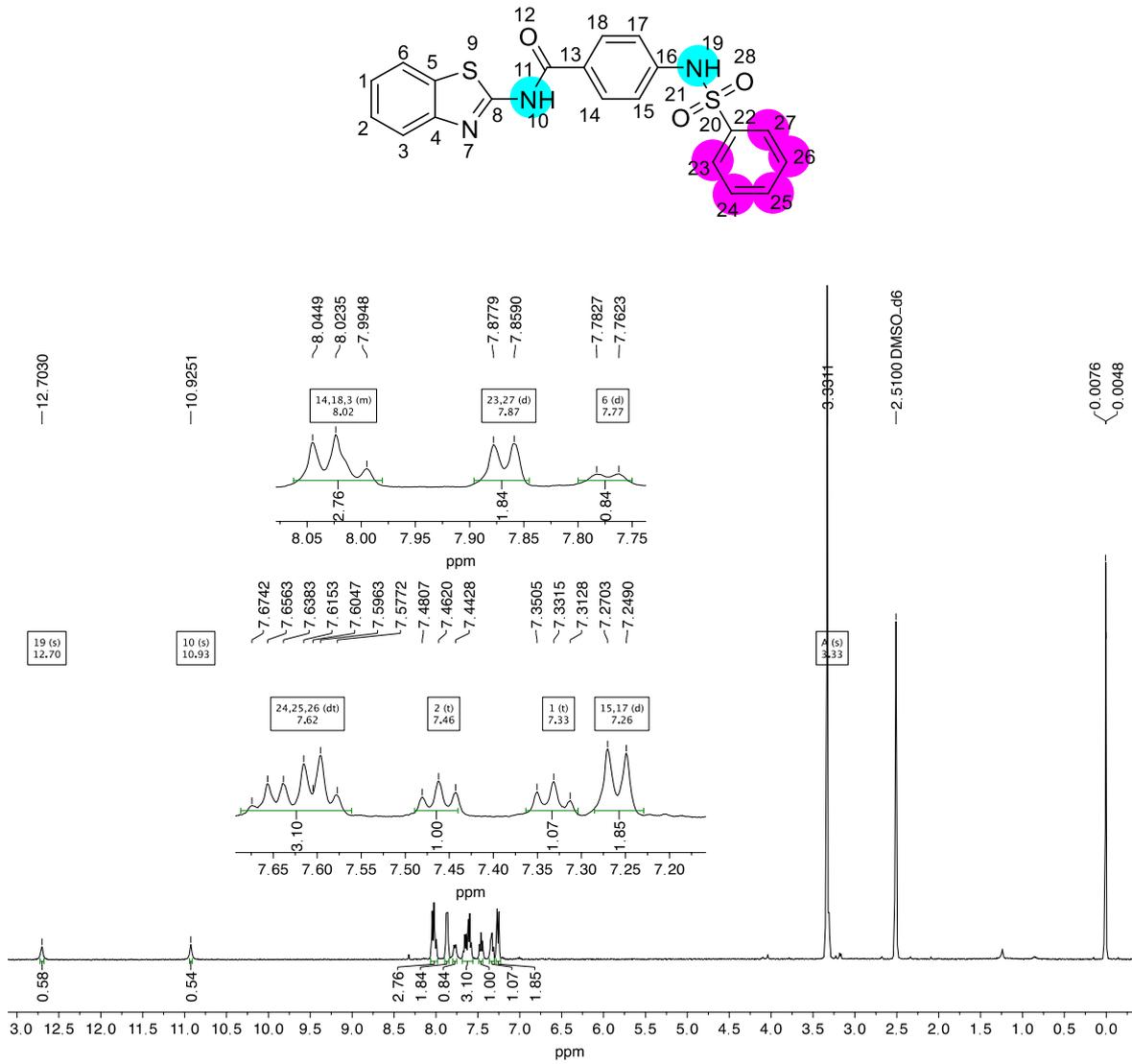
A partir das sulfonamidas **34-37** e o 2-amino-benzotiazol **18** (Esquema 5), os compostos **38-41** foram obtidos através de uma reação de acoplamento para formação da ligação amida utilizando EDC e HOBt com 32-68% de rendimento.

O composto **38** foi escolhido para fazer a atribuição dos sinais no espectro de RMN ^1H (Figura 10) e ^{13}C (Figura 11) e Tabela 4.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 10) da molécula **38**, os H-1 e H-2 continuam como tripletos (δ 7,33, $J = 7,5$ Hz; δ 7,46, $J = 7,6$ Hz) e os H-23 e H-27 (δ 7,87 $J = 10,6$ Hz) e aos H-15 e H-17 (δ 7,26, $J = 8,5$ Hz) continuam como dubletos. Os H-24, H-25 e H-26 (δ 7,62) aparecem como duplos tripletos e os H-14, H-18 e H-3 (δ 8,02) aparecem como multipletos. Os deslocamentos em δ 12,70 e δ 10,92 permanecem como singletos (s), que são referentes ao H da sulfonamida e da amida, respectivamente.

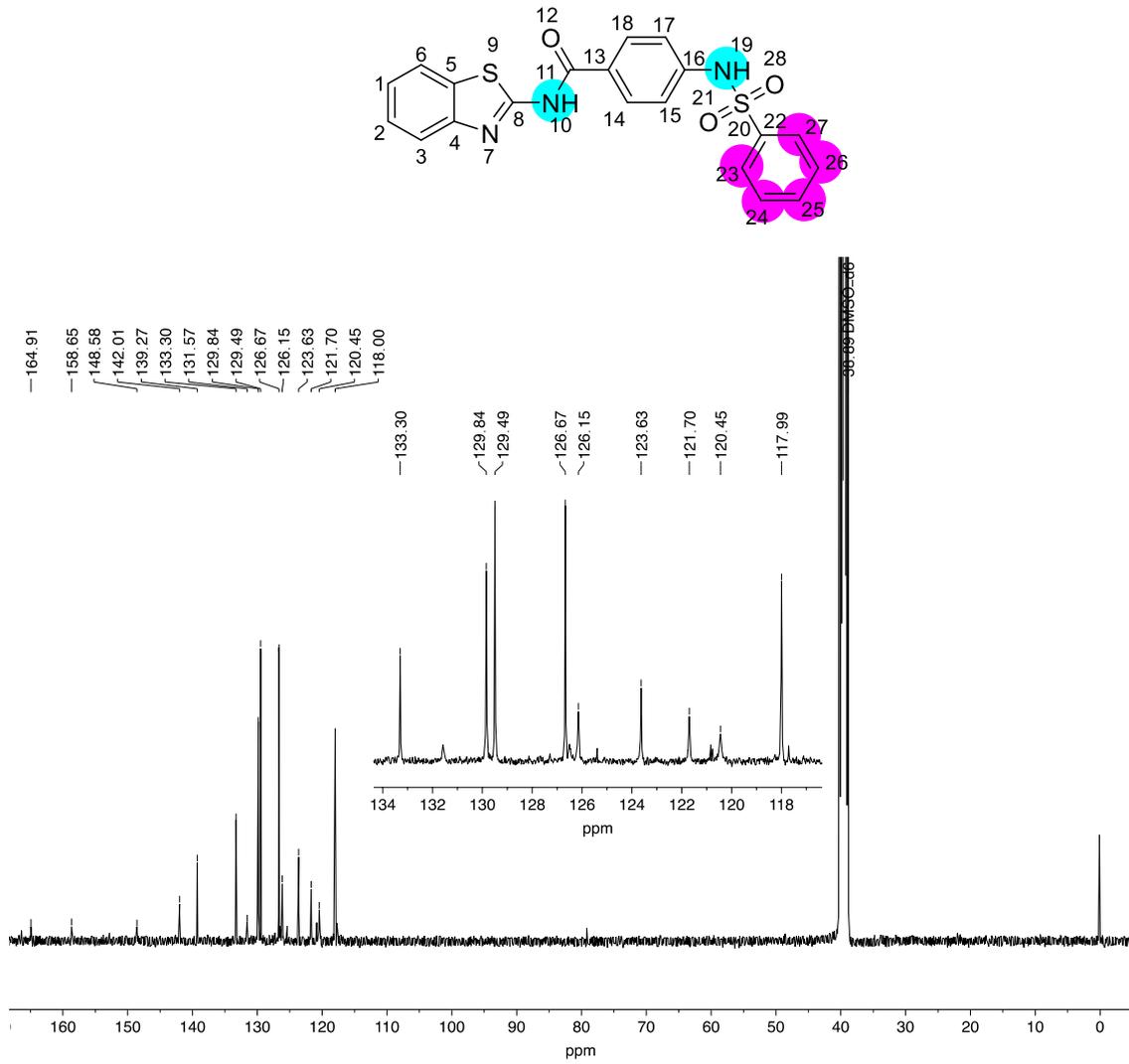
No espectro de RMN de ^{13}C da Figura 11 em δ 164,91 está correlacionado ao deslocamento do carbono do grupo carbonila. Na sequência, os sinais equivalentes dos carbonos dos anéis aromáticos aparecem em C-23 e C-27 (δ 126,67), C-24 e C-26 (δ 129,49), C-14 e C-18 (δ 129,84), C-15 e C-17 (δ 118,00). Na tabela 4, estão agrupados os demais sinais (δ) de RMN ^1H e ^{13}C para o composto **38**.

Figura 10- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de **38**



Fonte: A autora.

Figura 11- Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **38**



Fonte: A autora.

Tabela 4– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **38**

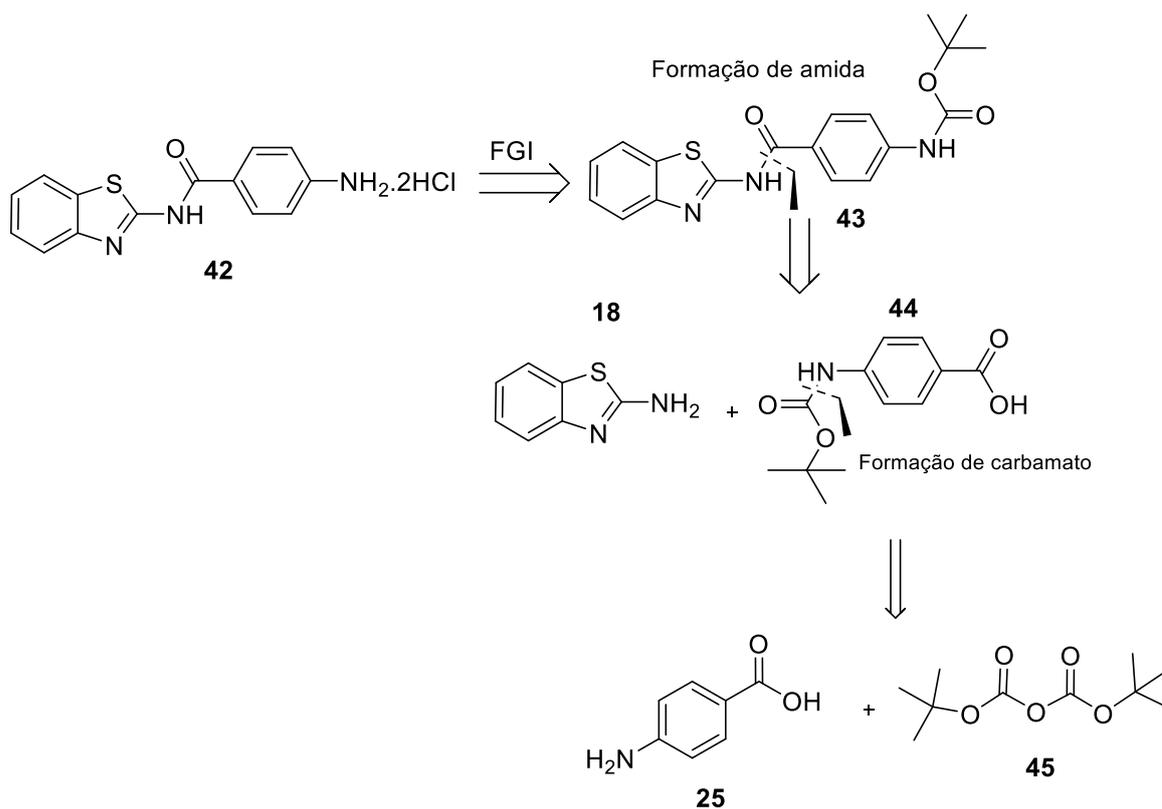
Posição	δ RMN de ^1H				δ RMN de ^{13}C	
	(ppm) ^a	Mult. ^b	I ^c	<i>J</i> (Hz) ^c	Posição	(ppm) ^a
1	7,33	t	1H	7,5	1	123,63
2	7,46	t	1H	7,6	2 e 13	126,15
3, 14 e 18	8,02	m	3H	-	3	120,45
6	7,77	d	1H	8,2	4	131,57
10	10,92	s	1H	-	5	148,58
15,17	7,26	d	2H	8,5	6	121,70
19	12,70	s	1H	-	8	158,65
23,27	7,86	d	2H	7,7	11	164,91
24,25,26	7,71 – 7,55	dt	3H	-	14 e 18	19,84
					16	142,01
					15 e 17	118
					22	139,27
					23 e 27	126,67
					24 e 26	129,49
					25	133,29

^aDeslocamentos químicos em ppm; ^bMult= multiplicidade; ^cintegral; ^dconstantes de acoplamento em Hz.

Os compostos **38-41** foram obtidos de maneira eficiente utilizando a estratégia reacional do Esquema 5, porém a última etapa reacional, a reação de amidação, foi de difícil purificação para todos os análogos, necessitando a realização de cromatografia em coluna flash e experimentos longos, devido à proximidade dos fatores de retenção entre os produtos e as aminas de partida em todos os sistemas de eluentes testados. Dessa forma, foi planejado uma nova rota sintética que apresentasse menores dificuldades nos processos de purificação.

A partir de uma análise retrossintética da molécula **42**, realizando a sua interconversão na molécula **43**, consegue-se realizar 1 desconexão para chegar nos precursores **18** e **44** (Esquema 6). A partir de uma nova desconexão da molécula **44**, que origina os precursores **25** e **45**, foi possível propor a síntese do intermediário sintético **42** (Esquema 6).

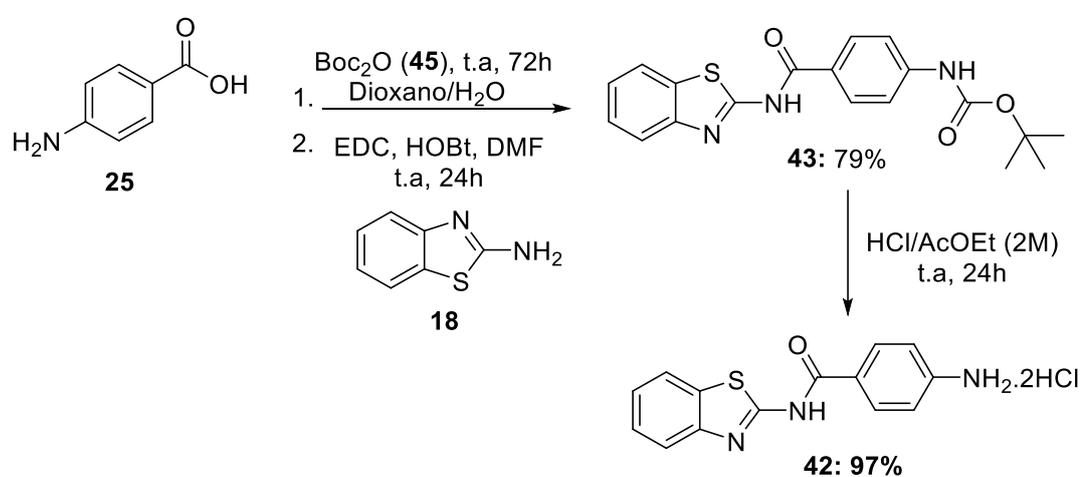
Esquema 6- Retrossíntese para a nova estratégia para a síntese de derivados com modificação no núcleo sulfonamida



Legenda: FGI: Desconexão e interconversão de grupos funcionais (FGI).

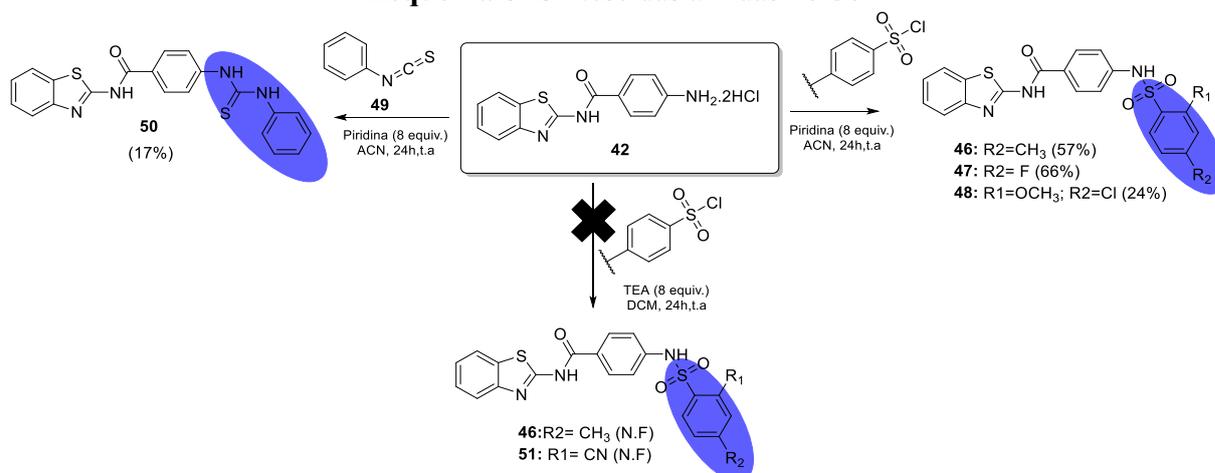
A nova estratégia passa pela formação do intermediário **43** descrito no Esquema 7, para chegar na obtenção do intermediário chave **42**, para obter as amidas **46** a **50** (Esquema 8). O intermediário chave **42** foi sintetizado, partindo-se do composto **43** (Esquema 7). O composto **43** foi obtido a partir do intermediário **44** e **18** (Esquema 6) através de uma reação de acoplamento mediada por EDC/HOBt demonstrada no Esquema 7. Já para a síntese do intermediário **44**, partiu-se, do ácido 4-aminobenzóico **25** e do di-terc-butildicarbamato (Boc₂O) **45** (Esquema 6 e 7).

Esquema 7- Obtenção do intermediário sintético 42



A tentativa de síntese dos compostos **46-51** pela condição experimental com trietilamina (TEA) e diclorometano (DCM) como solvente não gerou o produto almejado (Esquema 7). Em contrapartida, ao verificar outras metodologias na literatura (DAS *et al.*, 2018), foi optado por mudar a base e o solvente a fim de melhorar a solubilidade da reação e facilitar o acesso até o substrato da reação – o intermediário **42**- usando piridina.

Esquema 8- Síntese das amidas 46-50

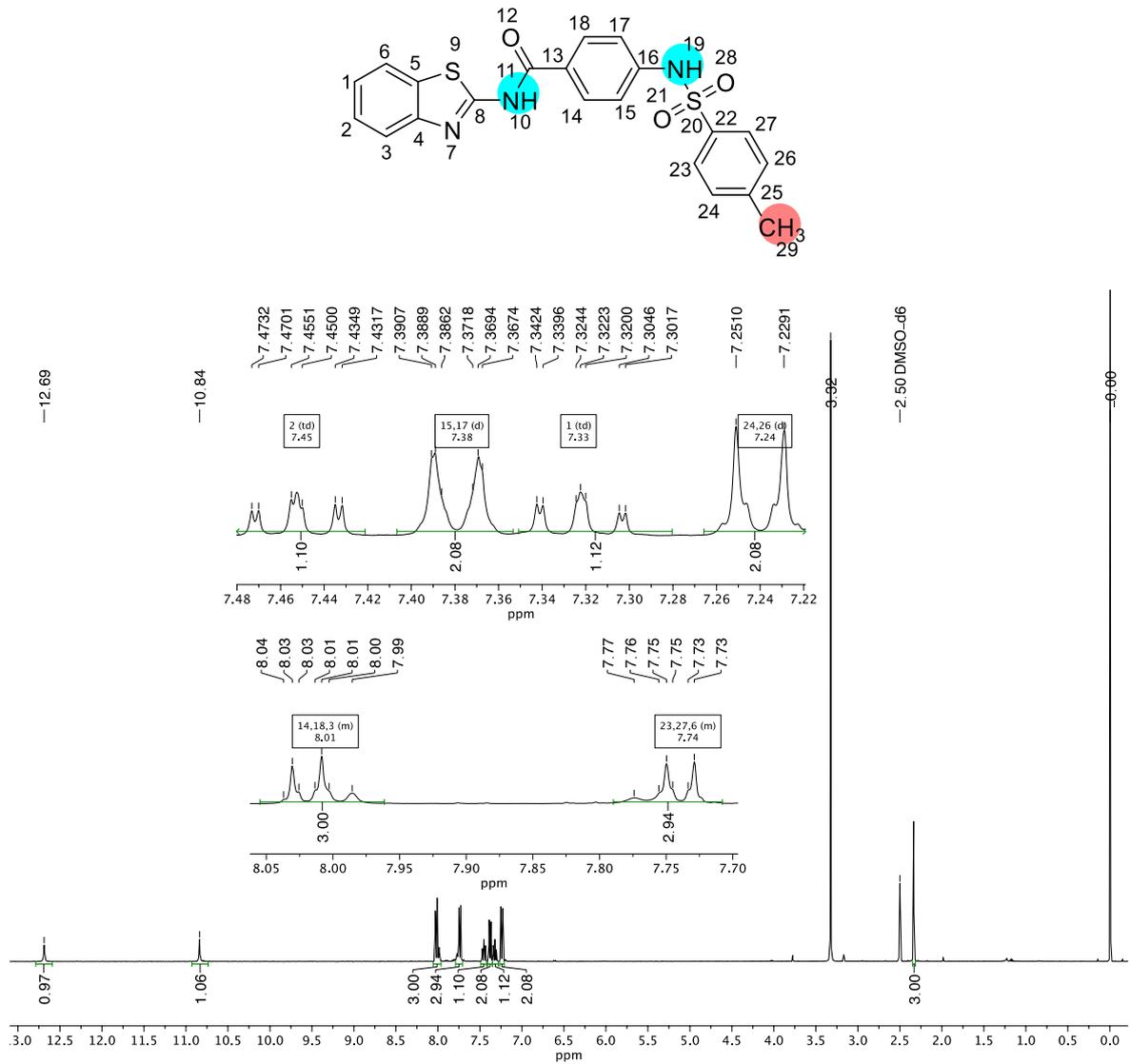


Legenda: N.F: Não formado

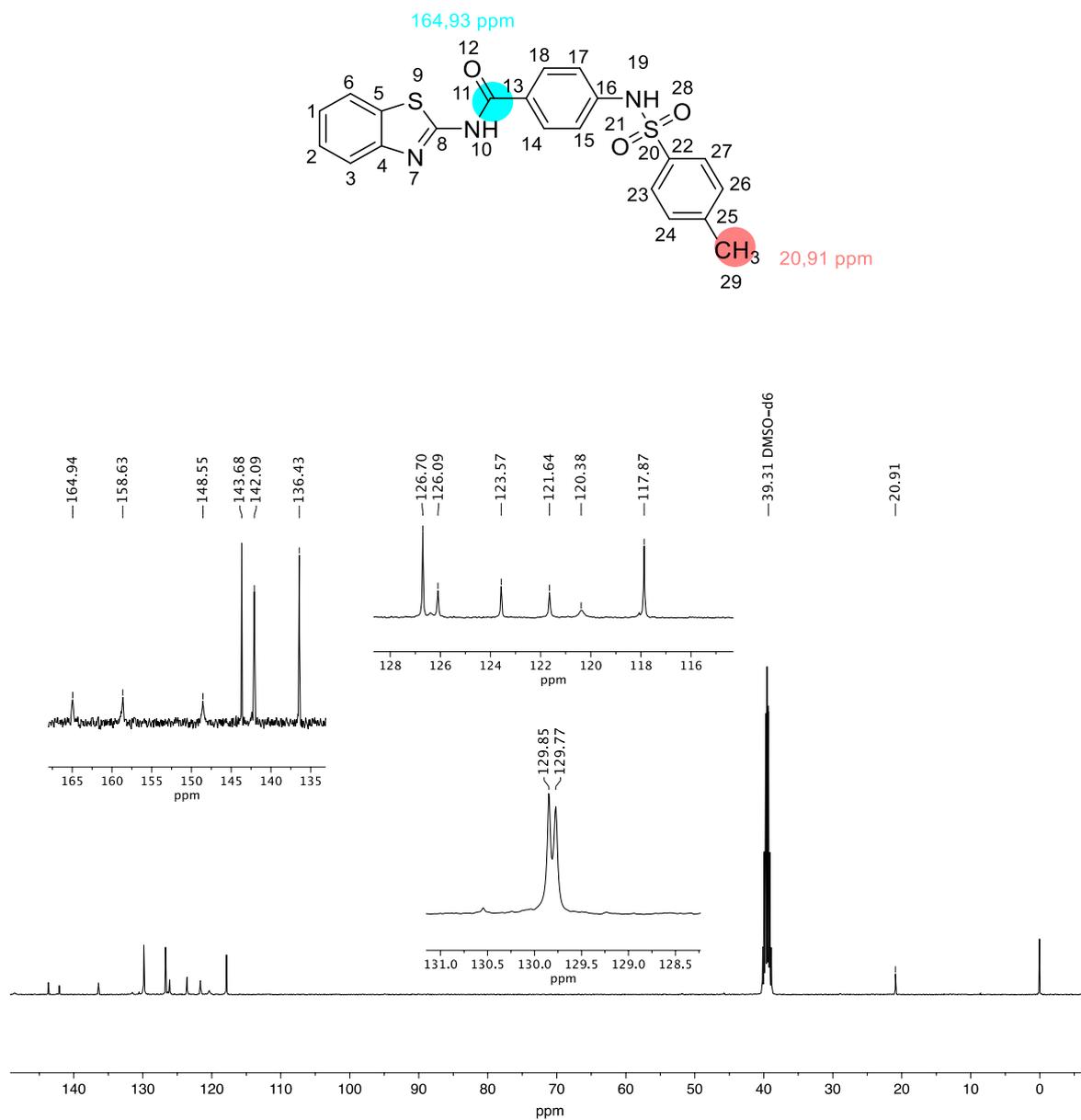
Diante disto outra possibilidade de condição experimental foi avaliada para obtenção das amidas **46-50** (Esquema 8), partindo-se do cloridrato **42** utilizando piridina como base, acetonitrila (ACN) como solvente, tempo de reação de 24 horas, e usando o cloreto de sulfonila para formação das sulfonamidas nos compostos **46**, **47** e **48**, com 57%, 66% e 24% de rendimento, respectivamente. Outra síntese utilizando o cloridrato **42** foi com o precursor isotiocinato de fenila **49** para formação da tioureia no composto **50**, obtida com 17% de rendimento. O composto **46** foi escolhido para fazer a atribuição dos sinais no espectro de RMN ¹H (Figura 12) e RMN ¹³C (Figura 13) e Tabela 5. No RMN ¹H (Figura 12), em δ 2,34 aparece um singlete (s) atribuído a CH₃ (sinal mais blindado do espectro) do composto **46**. Na região dos aromáticos, os dubletos (d) são referentes aos H-15 e H-17 (δ7,38, d, J = 8,9 Hz, 2H) e aos hidrogênios H-24 e H-26 (δ7,24, d, J = 8,5 Hz, 2H). Os triplos dubletos (td) são referentes aos hidrogênios H-1 (δ 7,33, td, J = 7,5 Hz, 1H) e H-2 (δ7,45, td, J = 7,2 Hz, 1H). Os multipletos (m) são referentes aos hidrogênios H-23, H-27 e H-3 (δ7,74), e H-14, H-18 e H-6 (δ8,01).

No espectro de RMN de ¹³C da Figura 13 aparece em δ164,94 aparece o deslocamento referente ao carbono da carbonila. Na sequência, os sinais equivalentes dos carbonos dos anéis aromáticos aparecem em C-15 e C-17 (δ 117,87), C-14 e C-18 (δ 129,77), C-23 e C-27 (δ126,70), C-24 e C-26 (δ 129,85). Na Tabela 3, estão agrupados os demais sinais (δ) de ¹H e ¹³C para o composto **46**.

Figura 12- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 46



Fonte: Autora (2023).

Figura 13- Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **46**

Fonte: Autora (2023).

Tabela 5– Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 46

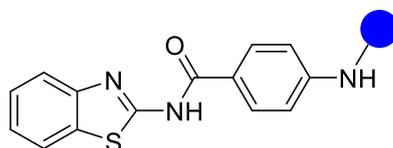
Posição	δ RMN de ^1H				δ RMN de ^{13}C	
	(ppm) ^a	Mult. ^b	I ^c	<i>J</i> (Hz) ^c	Posição	(ppm) ^a
1	7,33	td	1H	7,5	1	126,09
2	7,45	td	1H	7,2	2	123,57
3, 14 e 18	8,04-7,96	m	3H	-	3	120,38
6, 23 e 27	7,74	m	3H	-	4, 24 e 26	129,85
10	10,84	s	1H	-	5	148,55
15,17	7,38	d	2H	8,9	6	121,64
19	12,69	s	1H	-	8	158,63
24,26	7,24	td	2H	8,5	11	164,93
					13, 23 e 27	126,70
					14, 18	129,77
					15,17	117,87
					16	142,09
					22	136,43
					25	143,68
					29	20,91

^aDeslocamentos químicos em ppm; ^bMult= multiplicidade; ^c integral; ^dconstantes de acoplamento em Hz.

3.4 RESULTADOS BIOLÓGICOS COM MODIFICAÇÃO NO NÚCLEO SULFONAMIDA

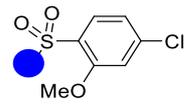
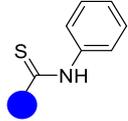
Conforme mencionado anteriormente, foi fixada a posição relativa para no núcleo *p*-aminobenzamida e foi trocado o substituinte metóxi do núcleo sulfonamida por diferentes grupos variando os efeitos estéricos e eletrônicos (Tabela 6). Os compostos **38**, **40** e **47**, com hidrogênio, bromo e flúor na posição para do núcleo sulfonamida, respectivamente, apresentaram inibição da replicação viral superior a 50% a 10 μM , mas também apresentaram alto nível de citotoxicidade (viabilidade celular inferior a 41%).

Tabela 6- Efeito de **38-50** na viabilidade de células Vero E6 e na infectividade do ZIKV



Continua

Comp.	Grupo substituído	Conc. (μM)	Viabilidade celular ^a (%)	Inibição da replicação ^b (%)	EC ₅₀ ^c (μM)	CC ₅₀ ^d (μM)	I.S
38		10	17,7	82,6	ND	ND	ND
		2	85,9	44,7			
39		10	72,3	25,8	ND	ND	ND
		2	98,1	0,9			
40		10	22,7	75,7	5,0 \pm 0,8	45,8 \pm 9	9,2
		2	97,0	69,1			
41		10	99,7	72,1	7,5 \pm 0,4	30,2 \pm 3	4,0
		2	101,0	0			
46		10	19,5	83,0	ND	ND	ND
		2	70,6	5,5			
47		10	40,4	54,7	ND	ND	ND
		2	93,6	15,3			

48		10	17,5	100,0	10,7 ± 1	23,9 ± 5	2,2
		2	44,0	64,5			
50		10	29,0	73,6	ND	ND	ND
		2	96,0	9,4			

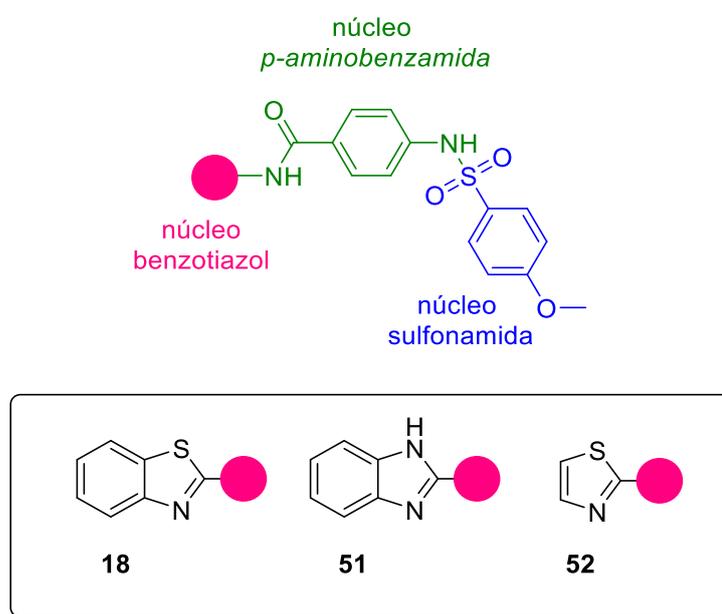
Comp.: Composto; Conc.: Concentração; N.D: Não determinado; I.S: Índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50} . ^aEfeito dos compostos na viabilidade das células Vero E6. ^bEfeito dos compostos na infectividade do ZIKV em células Vero E6. ^cValor EC_{50} (μ M) para a inibição do ciclo replicativo ZIKV_{PE243}. ^dValor CC_{50} (μ M) medido em células Vero E6. Os valores relatados são a média de três experimentos independentes, cada um medido em triplicata (valores de $P < 0,05$).

O composto com grupo nitro **41** a 2 μ M não inibiu o vírus. Os compostos **39**, **46**, **47** e **50** a 2 μ M apresentaram baixo nível de inibição do vírus (< 26%). No entanto, **40** apresentou um bom perfil a 2 μ M (69,1% de inibição do ZIKV e 97% de viabilidade celular), um EC_{50} de 5,0 μ M e CC_{50} de 45,8 μ M, o que corresponde a um I.S de 9,2. O **48** apresentou perfil mais promissor baseado na inibição da replicação do ZIKV em 2 μ M (64,5%), sendo selecionados para avaliação de EC_{50} e CC_{50} (EC_{50} de 10,7 μ M, CC_{50} de 23,9 μ M e I.S de 2,2). O composto **50** apresentou um bom nível de inibição a 10 μ M, mas também apresentou uma viabilidade celular menor de 30%. O composto **41** a 10 μ M, reduziu 72,1% da replicação viral e apresentou viabilidade celular de 99,7%, tendo EC_{50} de 7,5 μ M e CC_{50} de 30,2 μ M, apresentando I.S de 4,0. Portanto, a melhor potência e seletividade foram de **40**, **41** e **48** em comparação ao *hit 2* indicam que os grupos retiradores de elétrons no núcleo sulfonamida são preferidos para inibir o ZIKV.

3.5 SÍNTESE DE COMPOSTOS COM MODIFICAÇÃO NO NÚCLEO BENZOTIAZOL

Na sequência, foram planejadas as modificações estruturais no núcleo benzotiazol destacado na Figura 14, mantendo os núcleos *p*-aminobenzamida destacado em verde e mantendo o núcleo sulfonamida destacado em azul. As amins **51** e **52** substituíram o núcleo benzotiazol a fim de complementar o estudo de relação estrutura química e atividade biológica, avaliando assim a influência desses grupos nas extremidades das moléculas (Figura 14).

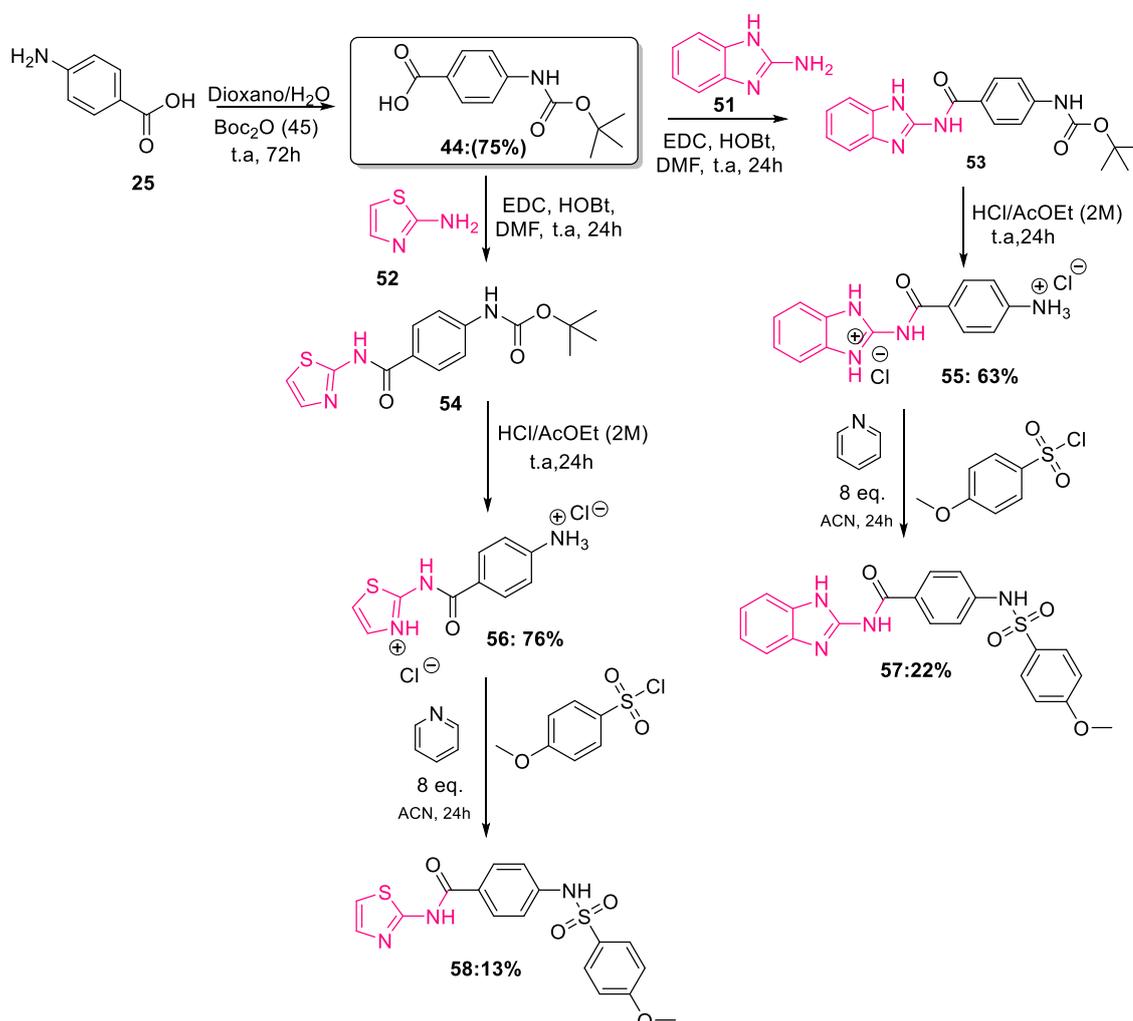
Figura 14- Modificação no núcleo benzotiazol



Fonte: Autora (2023).

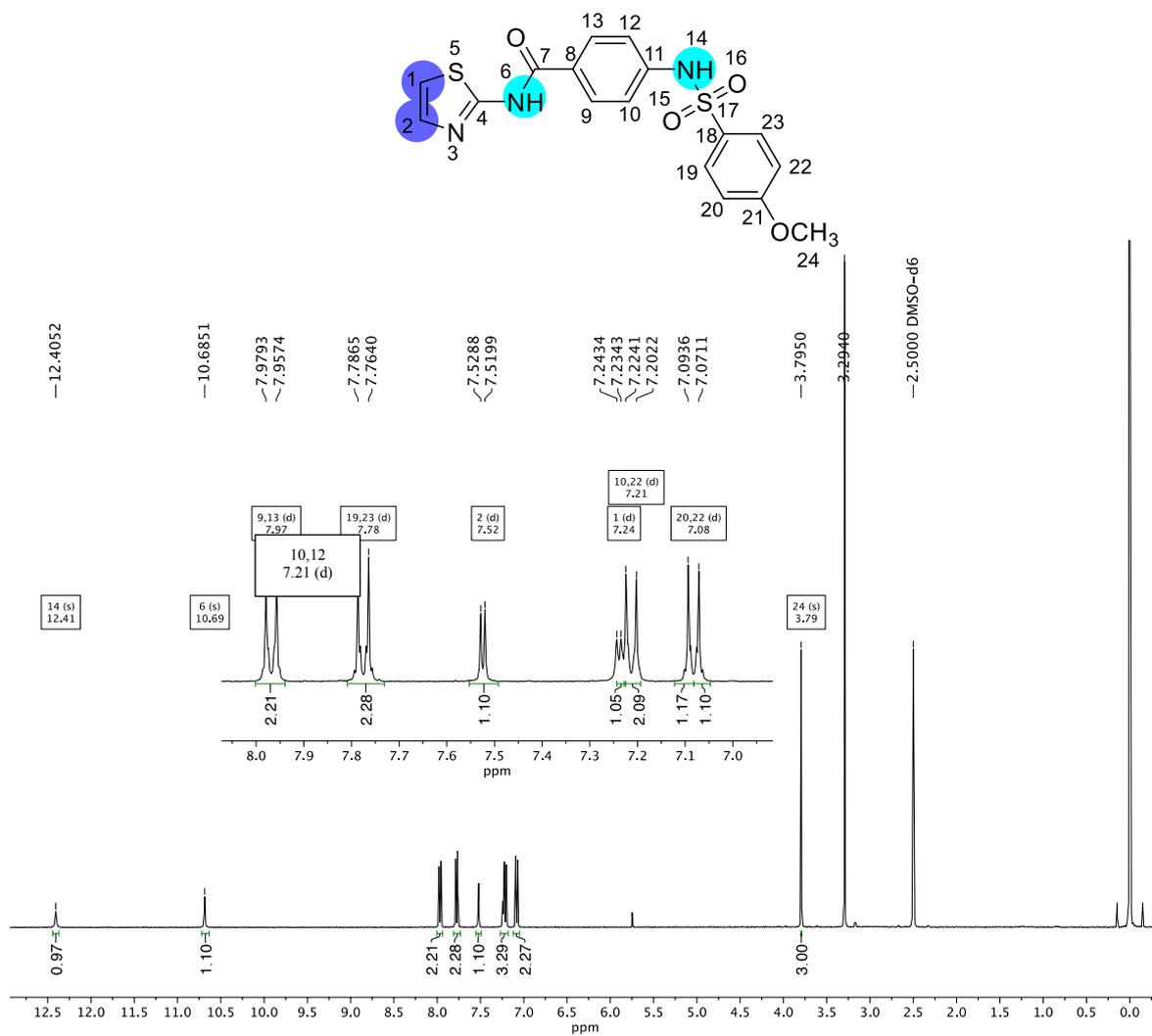
Para obtenção de **57** e **58**, descrito no Esquema 9, partiu-se do ácido 4-amino-benzóico **25**, realizando uma primeira etapa com proteção com terc-butildicarbamato e, na segunda etapa, uma reação de acoplamento com EDC/HOBt utilizando 2-amino-benzoimidazol (**51**) e 2-amino-tiazol (**52**), respectivamente, para gerar intermediário **55** (63%) e **56** (76%) utilizando a condição experimental com piridina como base e acetonitrila como solvente para gerar os produtos da reação **57** e **58** com 22% e 13% de rendimento, respectivamente.

Esquema 9- Síntese das amidas 57-58

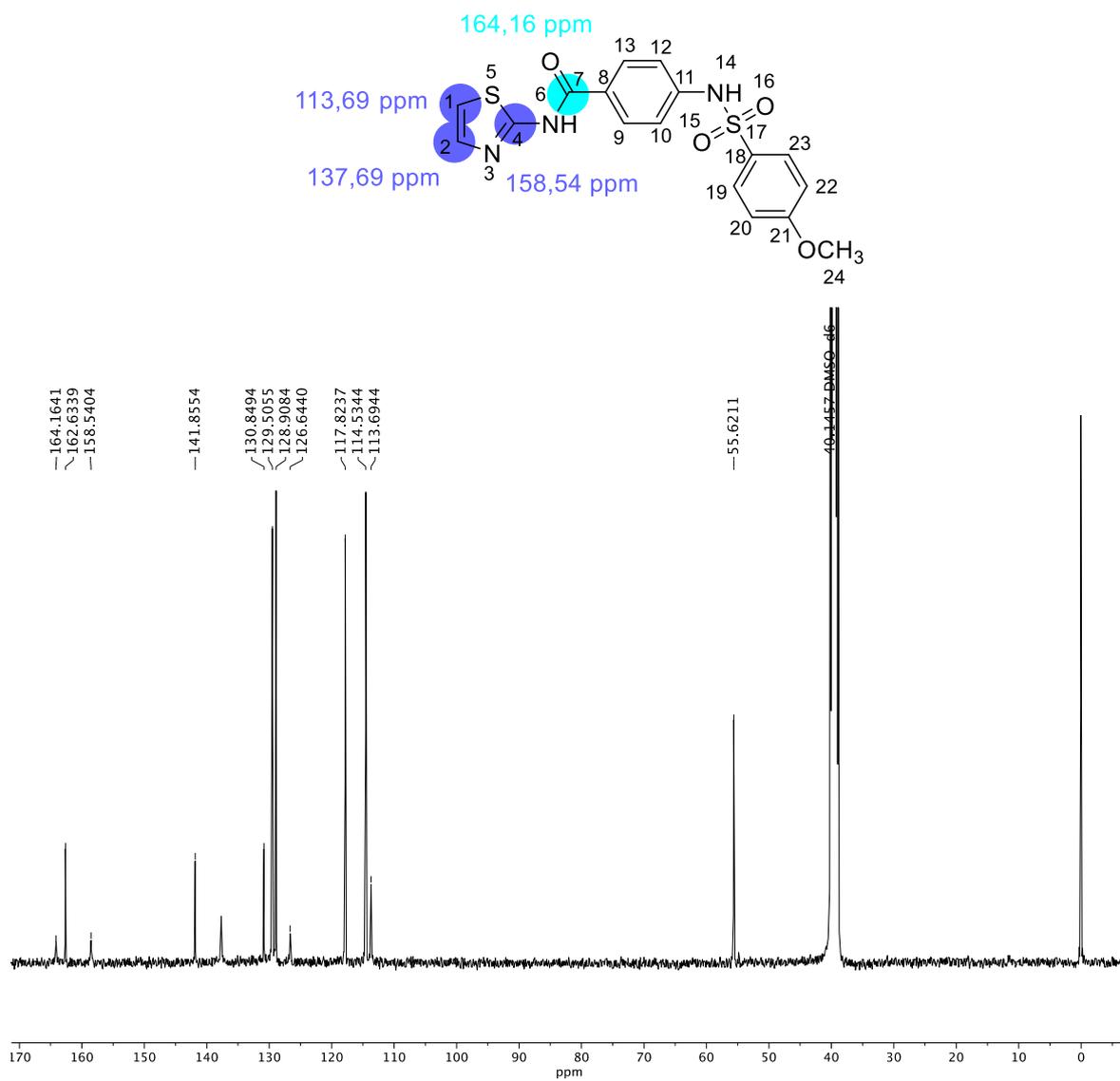


No RMN ^1H (Figura 15), na região dos aromáticos aparecem dubletos (d) relacionados aos hidrogênios H-19 e H-23 (δ 7,78, d, $J = 9,0$ Hz, 2H), H-20, H-22 (δ 7,08, d, $J = 9,0$ Hz, 2H), e H-9, H-13 (δ 7,97, d, $J = 8,8$ Hz, 2H). Os duplos dubleto (dd) são referentes H-10, H-12, (δ 7,22, d, $J = 8,8$, H). O carbono da carbonila no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 16) aparece em δ 164,16, e os demais deslocamentos químicos para o composto **58** pode ser conferido na Tabela 7.

Figura 15-Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **58**



Fonte: A autora

Figura 16- Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **58**

Fonte: A autora

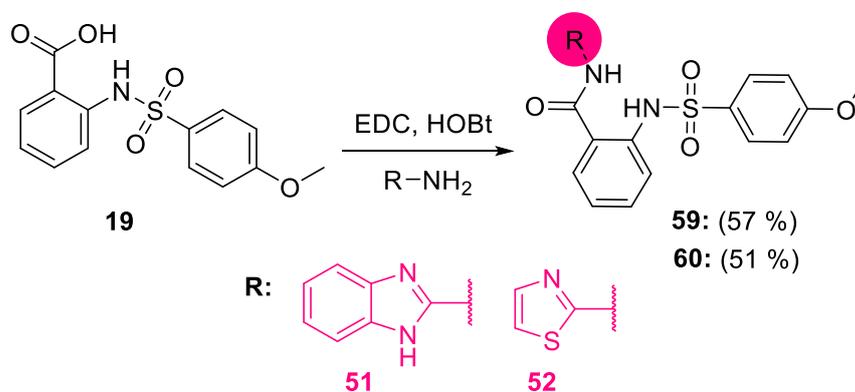
Tabela 7- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **58**

Posição	δ RMN de ^1H				δ RMN de ^{13}C	
	δ_{H} (ppm) ^a	Mult. ^b	I ^c	<i>J</i> (Hz) ^c	Posição	(ppm) ^a
1	7,24	d	1H	3,6	1	113,69
2	7,52	d	1H	3,6	2	137,69
6	10,69	s	1H	---	4	158,54
9,13	7,97	d	2H	8,8	7	164,16
10,12	7,22	dd	3H	4,0	8	126,64
					9,13	128,91
14	12,41	s	1H	---	10,12	117,82
19,23	7,78	d	1H	9,0	11	141,86
20,22	7,08	d	2H	9,0	18	128,90
					19,23	129,51
					20,22	114,53
					21	162,23
					24	158,54

^a Deslocamentos químicos em ppm; ^b Mult= multiplicidade; ^c integral; ^d constantes de acoplamento em Hz.

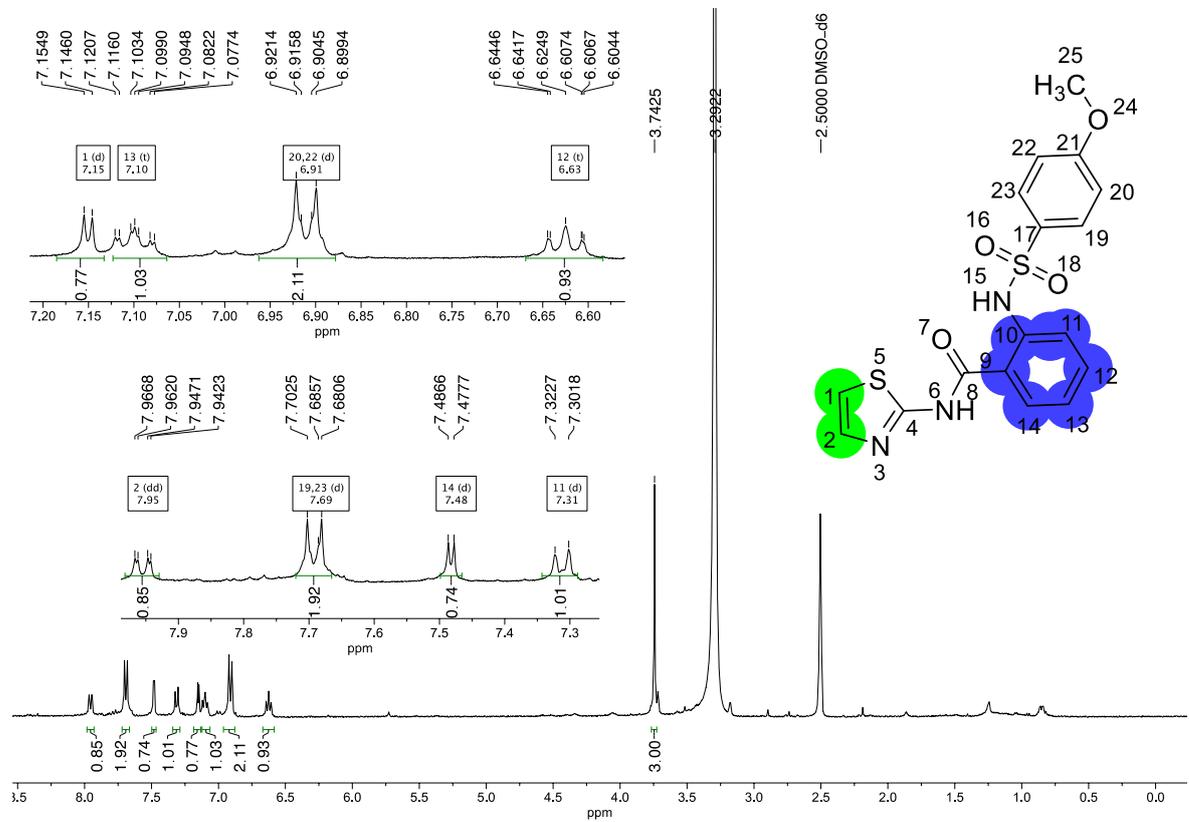
Também foi realizado o planejamento de outros análogos do *hit 2* com modificações no núcleo *p*-aminobenzamida e no núcleo benzotiazol destacados no Esquema 10. Partiu-se do ácido carboxílico **19** preparado anteriormente, do 2-amino-benzoimidazol **51** ou do 2-amino-benzotiazol **52**, juntamente com EDC, HOBT e temperatura de 100°C, durante 48h. As amidas **59** e **60** foram obtidas com 57% e 51% de rendimento, respectivamente.

Esquema 10- Síntese das amidas 59 e 60

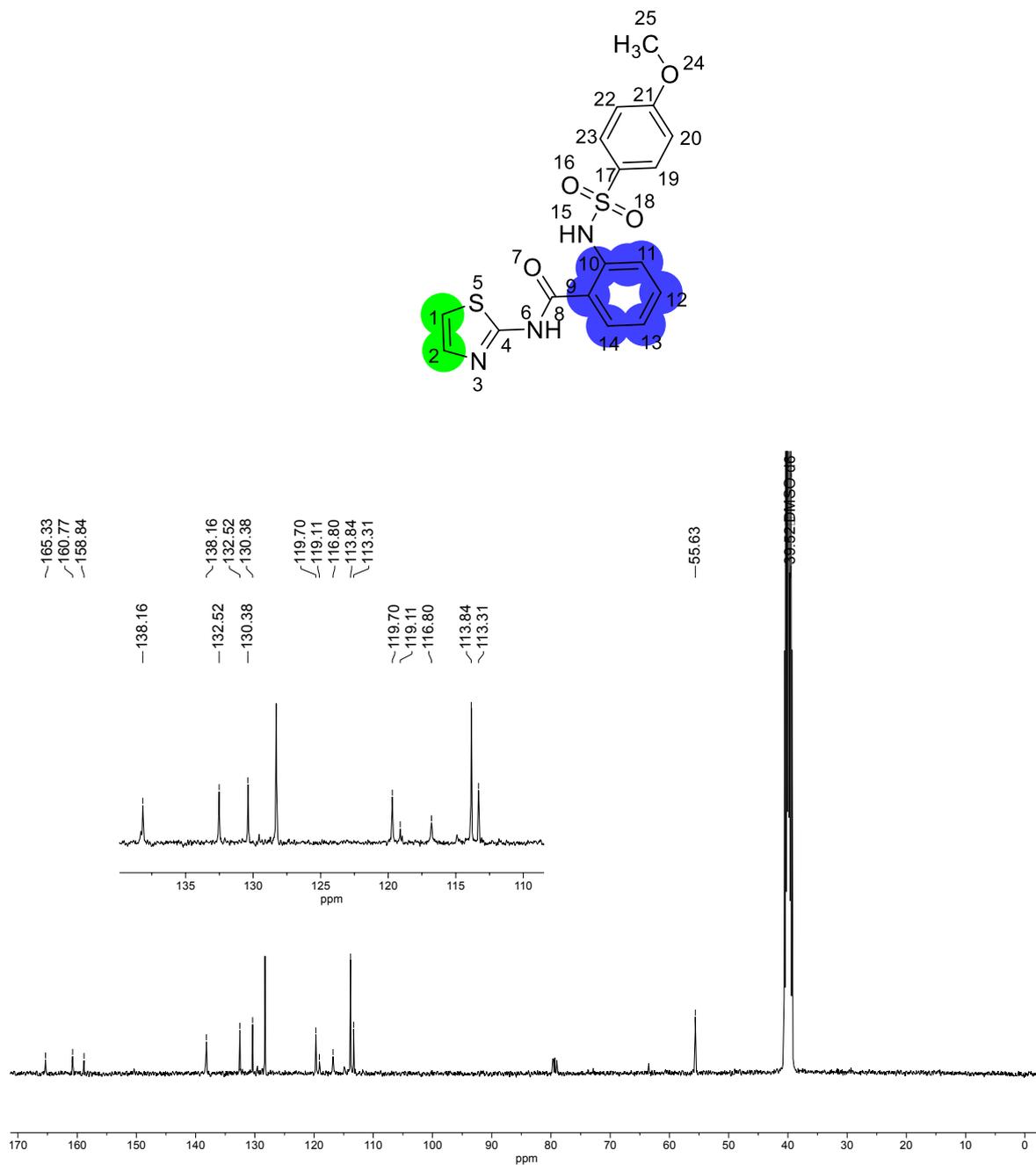


O composto **60** (Esquema 10), foi escolhido para fazer a atribuição dos principais deslocamentos no espectro de RMN ^1H (Figura 17) e RMN ^{13}C (Figura 18) e Tabela 8. A região dos aromáticos, os dubletos aparecem em δ 7,61 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H) referente aos H-19 e H-23, em δ 7,48 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H) referente ao H-14, em δ 7,31 (d, $J = 8,5$, 1,2 Hz, 1H) referente H-11, δ 7,15 referente ao H-1 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H), δ 6,91 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H) referente H-20 e H-22. O duplo dubleto aparece em δ 7,95 (dd, $J = 7,9$, 1,8 Hz, 1H) referente ao H-2. Os tripletos aparecem em δ 7,10 (t, $J = 8,6$, 1H) referente H-13 e δ 6,63 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H) referente H-12. Os demais deslocamentos químicos (δ) podem ser visualizados na Tabela 8.

Figura 17-Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de **60**



Fonte: A autora

Figura 18-Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **60**

Fonte: A autora

Tabela 8- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **60**

Posição	δ RMN de ^1H				δ RMN de ^{13}C	
	(ppm) ^a	Mult. ^b	I ^c	<i>J</i> (Hz) ^c	Posição	(ppm) ^a
1	7,15	d	1H	3,5	1	118,66
2	7,95	dd	1H	1,8	4	158,39
6	-	-	-	-	8	164,88
11	7,31	d	1H	8,5	9	129,93
12	6,63	t	1H	7,4	10	137,71
13	7,10	t	1H	7,5	11	112,86
14	7,48	d	1H	3,6	12,17	132,06
15	---	---	---	---	13	116,34
19, 23	7,69	d	2H	8,8	14	119,24
20,22	6,91	d	2H	8,9	19,23	127,84
25	3,74	s	3H	-	21	160,31
					20,22	113,39
					25	55,18

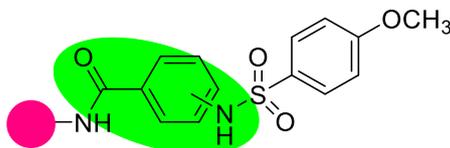
^a Deslocamentos químicos em ppm; ^b Mult= multiplicidade; ^c integral; ^d constantes de acoplamento em Hz.

3.6 RESULTADOS BIOLÓGICOS COM MODIFICAÇÃO NO NÚCLEO BENZOTIAZOL

A substituição no núcleo benzotiazol do *hit 2* por benzimidazol e tiazol, compostos **57** e **58**, respectivamente, houve diminuição na taxa de inibição do ZIKV (Tabela 9), sendo menor que 30%, não tendo EC₅₀ e CC₅₀ determinado. Para melhorar a inibição anti-ZIKV desses compostos, foram avaliados os derivados benzimidazol (**59**) e tiazol (**60**) com substituintes na posição relativa orto ao núcleo *p*-aminobenzamida, apresentando até 100% de inibição na maior concentração testada (Tabela 9). Após avaliação de EC₅₀ e CC₅₀, composto **59** apresentou potência moderada (EC₅₀ de 33,9 μM), enquanto o composto **60** apresentou uma melhora na potência (EC₅₀ de 5,0 μM), CC₅₀ de 38,7 μM e I.S de 7,7.

A troca do benzotiazol pelo tiazol e a mudança na posição relativa orto em relação ao, melhor ao núcleo *p*-aminobenzamida melhorou a seletividade cerca de 6 vezes mais em relação ao *hit* 2 (EC₅₀ de 11,1µM, CC₅₀ de 13,3 µM e IS de 1,2), conforme mostra a Tabela 9.

Tabela 9- Efeito de 2-60 na viabilidade de células Vero E6 e na infectividade do ZIKV



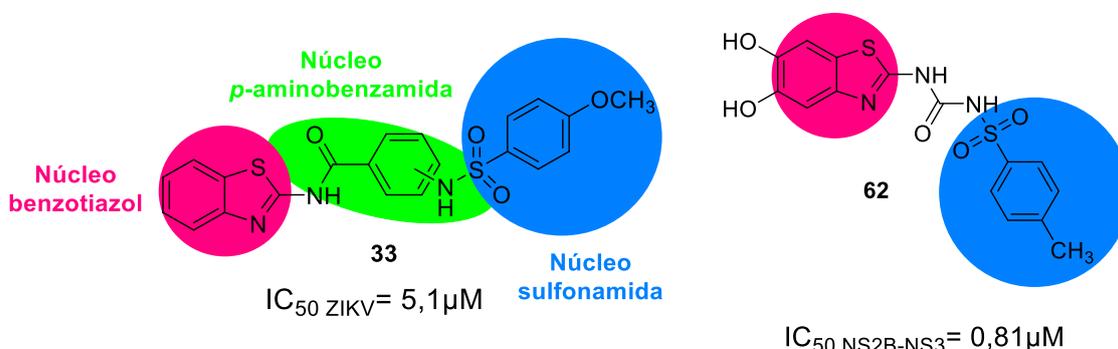
Comp.	Núcleo	Posição relativa	Conc. (µM)	Viabilidade celular ^a (%)	Inibiç. da replicação ^b (%)	EC ₅₀ ^c (µM)	CC ₅₀ ^d (µM)	SI
2		<i>para</i>	10	94,8	74,4	11,1 ± 0,5	13,3 ± 5	1,2
			2	88,7	10,8			
57		<i>para</i>	10	25,9	0	ND	ND	ND
			2	93,1	0			
58		<i>para</i>	10	98,9	16,1	ND	ND	ND
			2	95,7	4,9			
59		<i>orto</i>	10	19,9	98,8	33,9 ± 1	56,5 ± 11	1,7
			2	33,5	97,6			
60		<i>orto</i>	10	34,8	100,0	5,0 ± 0.6	38,7 ± 10	7,7
			2	36,2	68,6			

Comp.: Composto; Conc.: Concentração; N.D: Não determinado; I.S: Índice de seletividade = CC₅₀/IC₅₀. ^aEfeito dos compostos na viabilidade das células Vero E6. ^bEfeito dos compostos na infectividade do ZIKV em células Vero E6. ^c Valor EC₅₀ (µM) para a inibição do ciclo replicativo ZIKV_{PE243}. ^d Valor CC₅₀ (µM) medido em células Vero E6. Os valores relatados são a média de três experimentos independentes, cada um medido em triplicata (valores de P <0,05).

3.7 NOVO PLANEJAMENTO DE DERIVADOS COM MODIFICAÇÕES NO NÚCLEO *P*-AMINOENZAMIDA

Dando continuidade a modificação no núcleo *p*-amino-benzamida, seguimos com uma nova série de moléculas derivadas a partir da glicina (Figura 19) inspirado no trabalho de Millies e colaboradores (2019) para continuar a investigação estrutura química e atividade biológica, já que o composto **33** que apresentou uma atividade contra ZIKV de $5,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$ é o composto que apresenta uma modificação no núcleo central.

Figura 19- Estrutura Química do derivado com grupo glicina



A escolha do composto **62** (Figura 19), que apresenta IC₅₀ de 0,81 μM, foi baseada pela similaridade com a estrutura química do *hit* **33** tendo o benzotiazol como heterocíclico principal, o núcleo sulfonamida fixado, e a modificação sendo realizada no núcleo *p*-amino-benzamida (Figura 19).

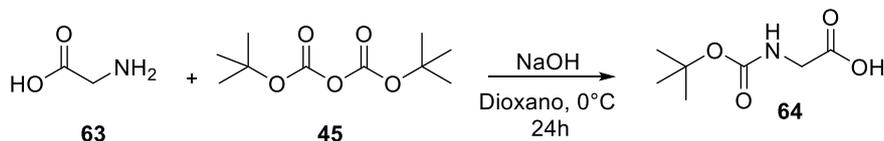
A glicina na molécula pode conferir diversas vantagens em termos de estrutura, função, interação e atividade biológica, sendo assim ter vários efeitos sobre as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Por exemplo, a glicina pode aumentar a solubilidade em água, diminuir a lipofilicidade, reduzir a toxicidade, melhorar a biodisponibilidade e modular a potência e a seletividade dos compostos (Dvorak *et al.*, 2015).

Para obtenção de um dos análogos do *hit* **33** (Esquema 11), partiu-se da glicina **63**, protegendo-a com terc-butildicarbamato **45** para obter a Gli-Boc **64** com 100% de rendimento. O composto **64** foi reagido com o amino-benzotiazol **18**, EDC, e HOBT para obtenção do composto **65** com 26% de rendimento. O **65** foi utilizado para obtenção de **66** cujo rendimento

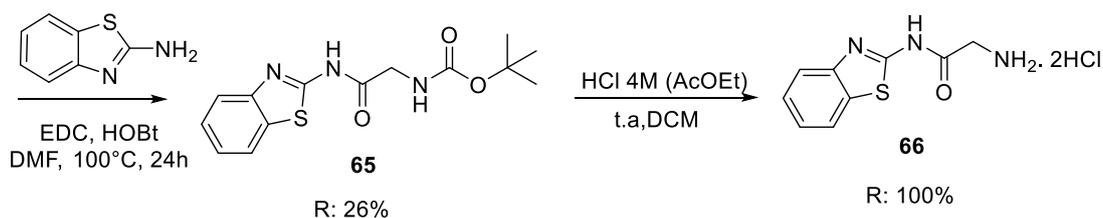
foi de 100%. O composto **66** foi aplicado na síntese para obtenção das amidas **67-68**, que foram obtidas entre 15-54%, seguindo o total de 4 etapas sintéticas.

Esquema 11- Síntese das amidas **67-72** pelas estratégias 1 e 2

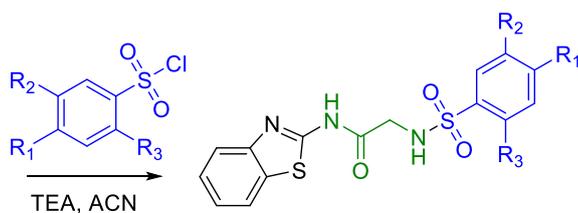
Estratégia 1



R: 100%



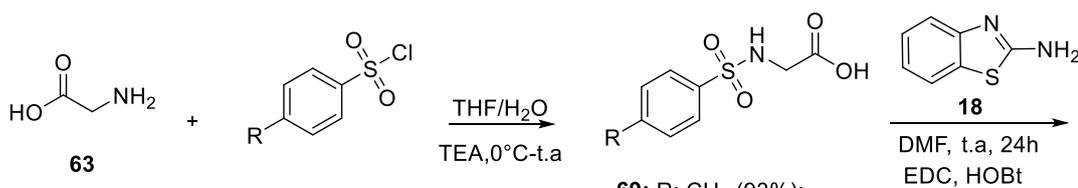
R: 100%



67: R1: OCH₃ (54%);

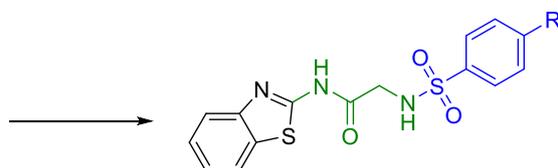
68: R2 e R3: OCH₃ (15%);

Estratégia 2



69: R: CH₃ (93%);

70: R: F (86%);



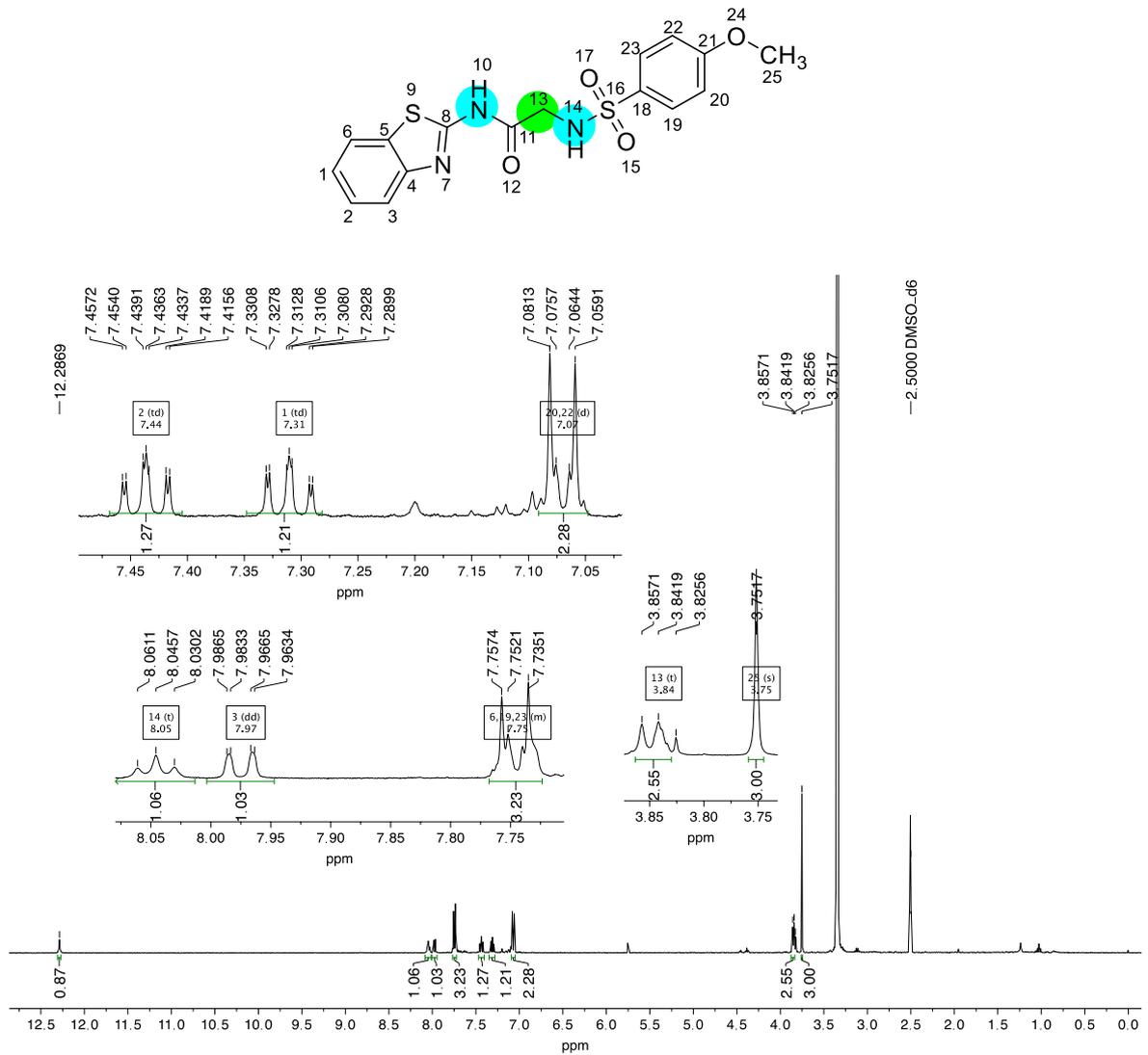
71: R: CH₃ (45%);

72: R: F (52%);

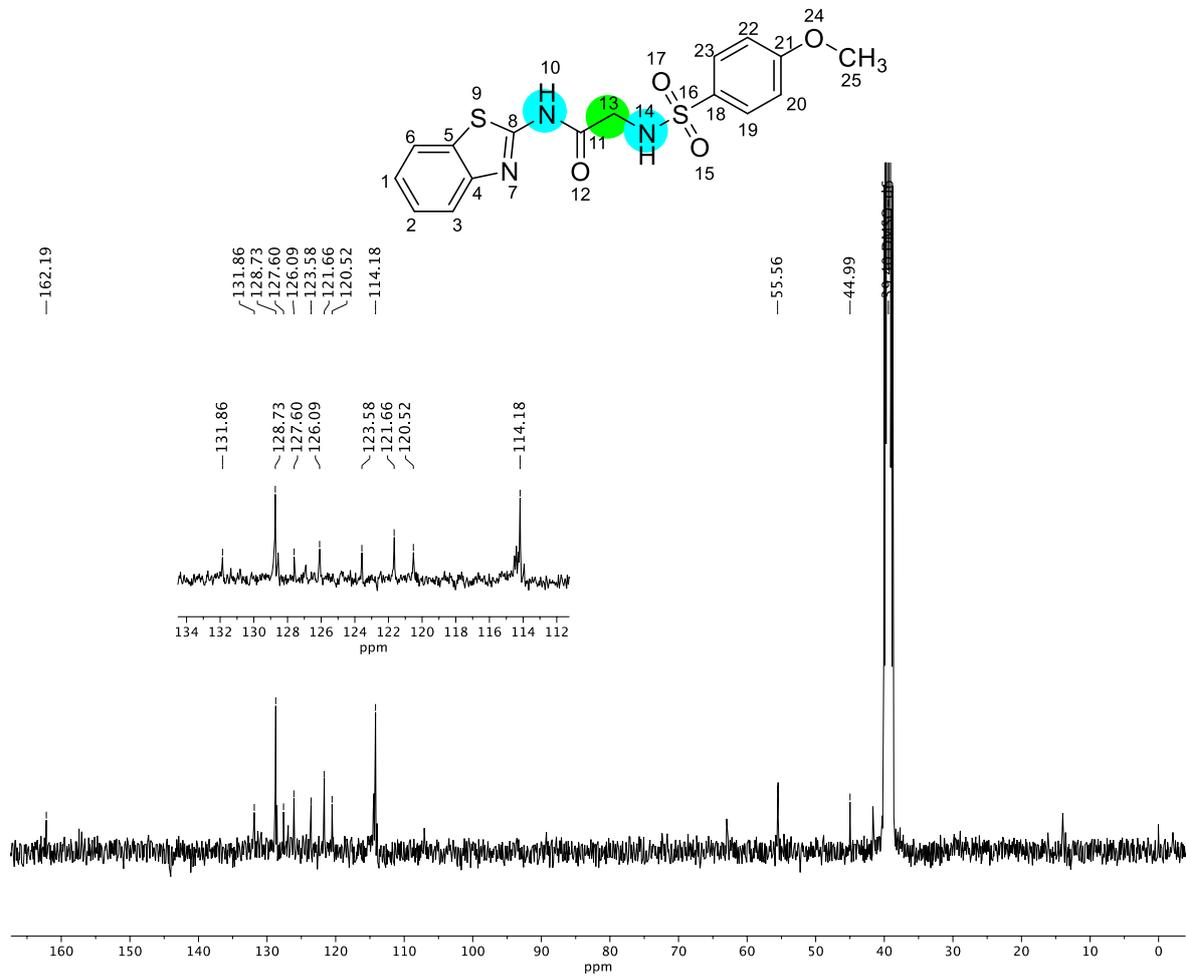
O composto **67** foi elucidado por RMN ^1H (Figura 20) e ^{13}C (Figura 21) e Tabela 10. No espectro de RMN de ^1H (Figura 20), podemos visualizar o desdobramento em δ 3,75 e δ 3,85 referentes a CH_3 (**25**) e ao CH_2 (**13**), respectivamente. Na região dos aromáticos aparecem dubletos (d) referentes aos H-20, H-22 (δ 7,07 $J = 8,9$ Hz, 2H) e aos H-6, H-19 e H-23 (δ 7,75, $J = 6,8$ Hz, 3H). Um duplo dubleto (dd) referente ao H-3 (δ 7,97, $J = 7,5$ Hz, 1H). Os triplos dubletos (td) são referentes aos H-1 (δ 7,31, $J = 8,0$ Hz, 1H) e ao H-2 (δ 7,44, $J = 8,0$ Hz, 1H). Na região δ 8,05 aparece um tripleto (t) referente ao H-14 da sulfonamida, e em δ 12,28 aparece um singleto (s) referente ao H-10 da amida.

No RMN ^{13}C (Figura 21), os principais sinais observados em δ 162,19 referente ao C-11. Em δ 44,99 aparece o sinal referente ao C-13, e posteriormente, o δ 55,56 referentes C-24. Os demais sinais da molécula **67** podem ser conferidos na Tabela 10.

Figura 20- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **67**



Fonte: A autora.

Figura 21-Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **67**

Fonte: A autora.

Tabela 10- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **67**

Posição	δ RMN de ^1H				δ RMN de ^{13}C	
	(ppm) ^a	Mult. ^b	I ^c	<i>J</i> (Hz) ^c	Posição	(ppm) ^a
1	7,43	td	1	8,0	1	126,09
2	7,31	td	1	8,0	2	123,58
3	7,97	d	1	7,5	3	121,66
6,19,23	7,73	dd	3	6,8	4	127,60
10	8,04	s	1	---	5,19,23	128,73
13	3,85	d	2	6,1	6	120,82
14	12,98	s	1	---	8,21	162,19
20,22	7,07	d	2	8,9	11	-
25	3,75	s	3	-	18	131,86
					20,22	114,18
					25	55,56

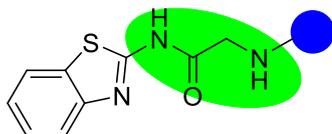
^a Deslocamentos químicos em ppm; ^b Mult= multiplicidade; ^c integral; ^d constantes de acoplamento em Hz.

3.8 RESULTADOS BIOLÓGICOS COM MODIFICAÇÃO NO NÚCLEO *P*-AMINOBENZAMIDA

A introdução de um grupo glicina no núcleo central gerou os compostos **65**, **66** e **67** (Tabela 11). Os compostos **67** e **68** apresentaram viabilidade celular >80%, no entanto, considerando a substituição do grupo *p*-amino-benzamida pela glicina não foi vantajoso para a atividade biológica, visto que a introdução do grupo glicina levou a diminuição na taxa de inibição do ZIKV. Já os compostos **71** e **72** não tiveram seu EC₅₀ determinado, apesar de apresentarem uma boa viabilidade celular a 2 µM, tiveram baixíssima inibição do ZIKV nessa mesma concentração. O composto **72** também chegou a apresentar viabilidade celular <30% a 10 µM.

Entretanto, o composto **65**, um composto intermediário para a síntese de **66** e **67**, apresentou cerca de 57% de inibição do ZIKV e 60,1% de viabilidade celular a 10 µM. Este composto apresentou EC₅₀ e CC₅₀ de 17,0 e 79,0 µM, respectivamente, com I.S de 4,6. A potência moderada do **65** e a baixa citotoxicidade indicam este composto como um sucesso promissor para futuras investigações contra o ZIKV, especialmente avaliando a troca do grupo Boc, um grupo lipofílico e sensível em meio ácido, por outros grupos lipofílicos e mais estáveis.

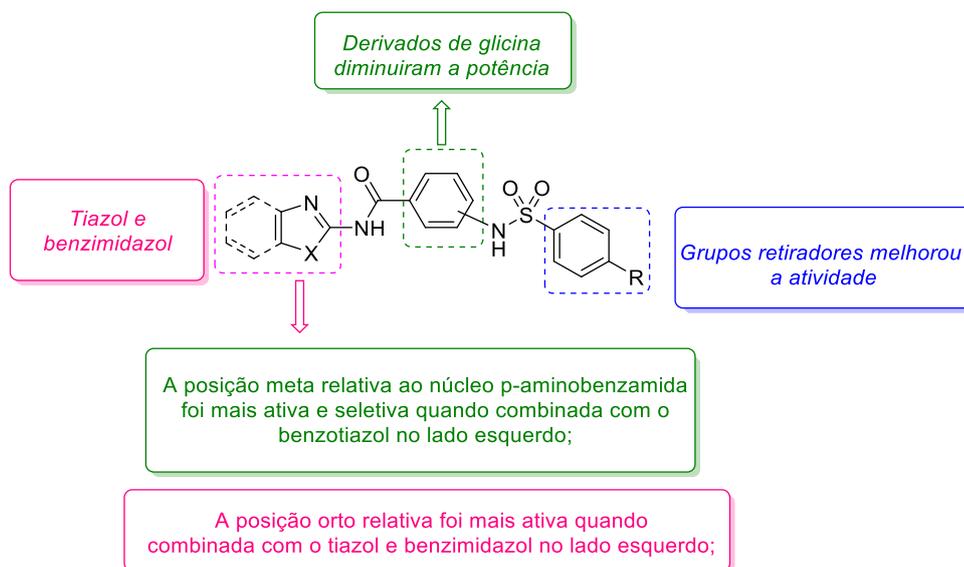
Após a síntese e avaliação biológica (atividade anti-ZIKV e citotoxicidade) dos 19 novos compostos do trabalho, foi possível estabelecer uma análise de SAR (Figura 22). As substituições do benzotiazol no lado esquerdo por tiazol e benzimidazol foram vantajosas para derivados com posição relativa orto em relação ao núcleo *p*-aminobenzamida (central). Os derivados substituídos na posição relativa meta ao anel central foram mais ativos e seletivos quando combinados com benzotiazol no lado esquerdo. A introdução de derivados de glicina no núcleo central diminuiu a taxa inibição do ZIKV. A substituição do grupo metóxi do anel benzenossulfonil por grupos retiradores de elétrons melhorou a potência.

Tabela 11- Efeito de **65-72** na viabilidade de células Vero E6 e na infectividade do ZIKV

Comp.	Grupo substituído	Conc. (µM)	Viabilidade Celular ^a (%)	Inibição da replicação do ZIKV ^b (%)	EC ₅₀ ^c (µM)	CC ₅₀ ^d (µM)	I.S
65		10	60,1	56,5	17 ± 1	79 ± 18	4,7
		2	104,1	18,9			
67		10	82,7	0	ND	ND	ND
		2	104,3	0			
68		10	101,8	7,9	ND	ND	ND
		2	112,3	8,3			
71		10	74,4	27,9	ND	ND	ND
		2	101,2	6,8			
72		10	26,5	65,1	ND	ND	ND
		2	95,6	15,9			

Comp.: Composto; Conc.: Concentração; ND: Não determinado; I.S: Índice de seletividade = CC_{50}/IC_{50} . ^aEfeito dos compostos na viabilidade das células Vero E6. ^bEfeito dos compostos na infectividade do ZIKV em células Vero E6. ^cValor EC₅₀ (µM) para a inibição do ciclo replicativo ZIKV_{PE243}. ^dValor CC₅₀ (µM) medido em células Vero E6. Os valores relatados são a média de três experimentos independentes, cada um medido em triplicata (valores de P < 0,05).

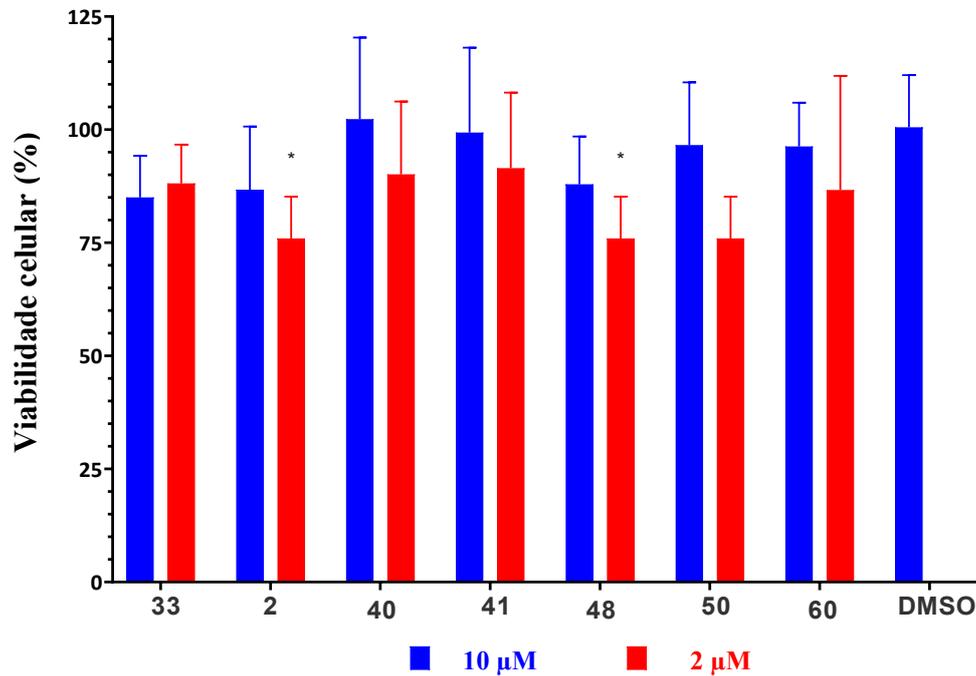
Figura 22- Relação estrutura química e atividade biológica para os compostos sintetizados no trabalho



3.9 COMPOSTOS QUE AFETAM AS ETAPAS DE REPLICAÇÃO DA INFECÇÃO POR ZIKV

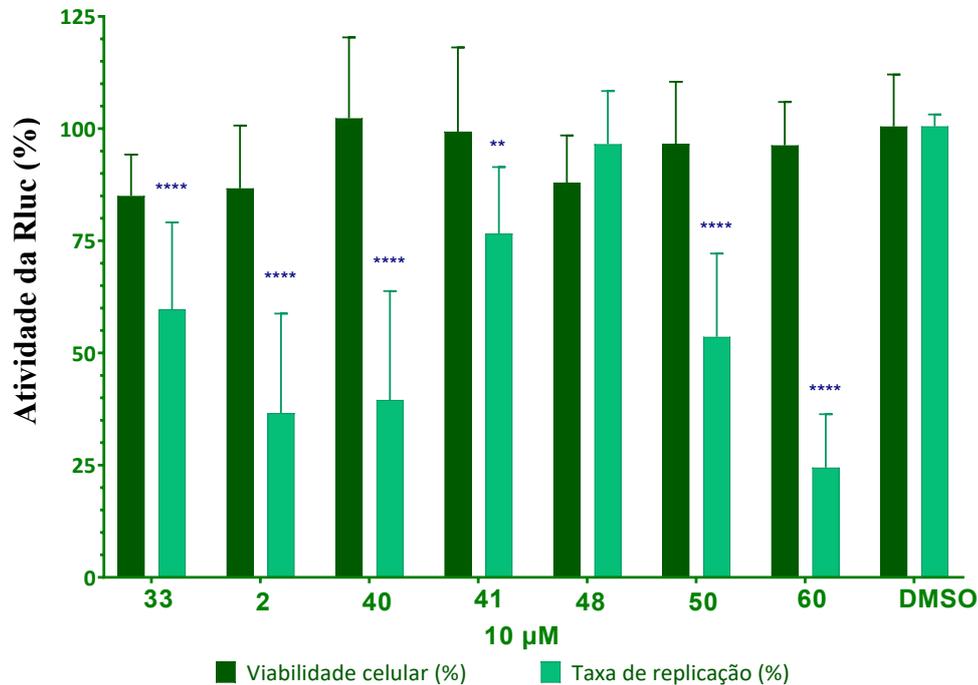
O papel da Renilla luciferase é servir como marcador bioluminescente que permite monitorar a infecção viral em tempo real e identificar potenciais compostos antivirais baseado nos ensaios celulares com a linhagem replicon repórter de ZIKV, a BHK-21-RepZIKV_IRES-Neo. A medida da atividade deste repórter permite a avaliação do efeito dos compostos no processo de replicação, bem como no processo de produção e tradução dos RNAs subgenômicos. O tratamento de células BHK21-RepZIKV_IRES-Neo com os compostos **33**, **2**, **40**, **41**, **48**, **59** e **60** a 10 μM reduziu a expressão da Luciferase Renilla em 63,4%, 40,3%, 60,4%, 23,4%, 3,4%, 46,4% e 75,5 %, respectivamente, sem afetar a viabilidade celular (Figura 23 e 24). Os compostos mais ativos contra ZIKVPE₂₄₃ foram **33**, **40** e **60** ($EC_{50} \sim 5 \mu\text{M}$) também foram os compostos mais capazes de reduzir a replicação viral em células Rluc-ZIKV (inibição superior a 60% a 10 μM). Tomados em conjunto, estes dados sugerem que estes compostos inibem potencialmente a infecção, interferindo no funcionamento das proteínas não estruturais do ZIKV, tais como NS2B-NS3pro.

Figura 23- Efeito dos compostos na viabilidade das células BHK21-RepZIKV_IRES-Neo



Legenda: Células BHK21-RepZIKV_IRES-Neo foram tratadas com cada composto a 10 e 2 μM. Após 72h, o meio com composto foi removido e substituído por meio fresco com MTT a 1 mg/mL e incubado por 30 min. Após a incubação, o meio foi removido e os cristais solubilizados com DMSO. As células sobreviventes foram medidas por absorvância (490 nm). DMSO foi usado como controle não tratado. São mostrados os valores médios de três experimentos independentes, cada um medido em triplicata, incluindo o desvio padrão. (*) P < 0,05.

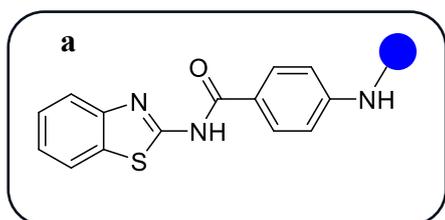
Figura 24- Efeito dos compostos na viabilidade das células BHK21-RepZIKV_IRES-Neo e na replicação do ZIKV



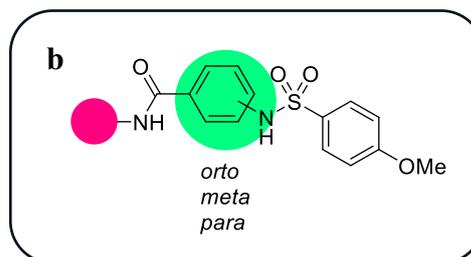
Legenda: Células BHK21-RepZIKV_IRES-Neo foram tratadas com cada composto na concentração não citotóxica mais alta (10 µM). Após 72 horas, as células foram lisadas e um ensaio Renilla-luciferase foi realizado para avaliar a replicação do ZIKV. A viabilidade celular foi avaliada tratando células BHK21-RepZIKV_IRES-Neo com os compostos nas concentrações específicas. Após o tratamento, o meio com composto foi removido e substituído por meio com MTT a 1 mg/mL e incubado por 30 min. Após a incubação, o meio foi removido e os cristais solubilizados com DMSO. As células sobreviventes foram medidas por absorvância (490 nm). DMSO foi usado como controle não tratado. São mostrados os valores médios de três experimentos independentes, cada um medido em triplicado, incluindo o desvio padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,001$ e (****) $P < 0,0001$.

4.0 RESULTADOS DE INIBIÇÃO CONTRA ENZIMA NS2B-NS3 DO ZIKV

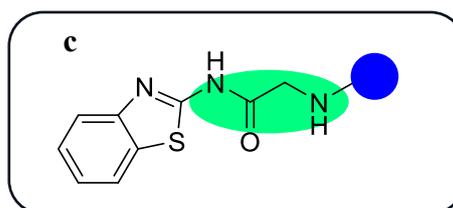
Ensaio enzimáticos contra o ZIKV NS2B-NS3pro foram realizados para avaliar a inibição desta enzima como um possível mecanismo de ação dos compostos mais potentes contra o ZIKV descobertos neste estudo (Tabela 12). Além disso, compostos com inibição reduzida do ZIKV e/ou viabilidade celular reduzida também foram testados para identificar potenciais inibidores para otimizações futuras. A atividade enzimática foi medida com um ensaio fluorométrico e os compostos foram testados após 10 min de pré-incubação com a enzima e sem este período de pré-incubação. Alguns dos compostos mais promissores contra o ZIKV, **33**, **2**, **40**, **41** e **48** mostraram baixa inibição da enzima NS2B-NS3pro a 100 μM , sugerindo que a ação contra o ZIKV ocorre através de outra via (Tabela 12). Por outro lado, quatro compostos inibiram a atividade da protease em pelo menos 50% (**32**, **50**, **59** e **60**). Os derivados benzimidazol e tiazol (**59** e **60**) apresentaram valores de IC_{50} de 8,0 e 26,0 μM , respectivamente, contra a enzima. Ambos os compostos contêm um padrão de substituição orto no núcleo p-amino-benzamida, o que sugere que a posição relativa orto pode atuar como inibidores potentes por apresentarem uma estrutura planar e aromática que se encaixa no sítio da enzima, formando interações de empilhamento do tipo pi-pi com os resíduos HIS51 e ASP75, demonstrando afinidade e especificidade pela enzima.

Tabela 12- Triagem inicial e determinação do IC₅₀ contra NS2B-NS3 do ZIKV

n°: 2, 38, 39, 40, 41, 46, 47, 48, 50



n°: 32, 33, 57, 58, 59, 60

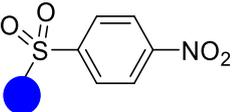
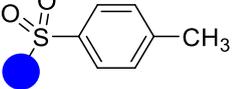
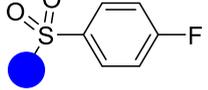
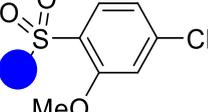
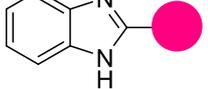
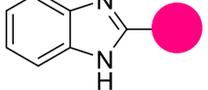
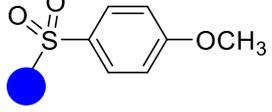
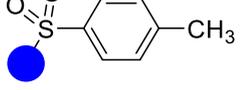
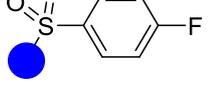


n°: 67,71,72

- Núcleo benzotiazol
- Núcleo sulfonamida

Continua

Compostos	Núcleos destacados em ^{a, b e c}	% de inibição ZIKV NS2B-NS3pro		IC ₅₀ (μM)
		Sem incubação [] 100 μM	Com incubação [] 100 μM	
N° 2		38 ± 13	32 ± 11	ND
32 <i>orto</i>		92 ± 12	100	24 ± 2
33 <i>meta</i>		2 ± 4	11 ± 10	ND
38		20 ± 21	28 ± 19	ND
39		44 ± 9	57 ± 14	ND
40		7 ± 7	4 ± 3	ND

41		30 ± 26	39 ± 21	ND
46		20 ± 11	28 ± 21	ND
47		22 ± 13	27 ± 13	ND
48		3 ± 4	5 ± 7	ND
50		46 ± 13	100	8 ± 0.5
57 <i>para</i>		ND	43 ± 10	ND
58 <i>para</i>		ND	7 ± 6	ND
59 <i>orto</i>		62 ± 26	100	8 ± 3
60 <i>orto</i>		62 ± 15	100	26 ± 7
67		ND	62 ± 12	ND
71		ND	21 ± 14	ND
72		ND	43 ± 15	ND

ND: Não determinado; *Compostos mais potentes e seletivos contra ZIKV; os valores reportados referem-se à média e ao desvio padrão, calculados com base em dois experimentos independentes, em triplicatas.

Compostos que interferem em vários ensaios são conhecidos como PAINS, do inglês *Pan-assay interference compounds*. Esses compostos costumam dar falsos positivos em ensaios bioquímicos, pois reagem de forma inespecífica com diversos alvos biológicos, em vez de afetar somente um alvo desejado. Os PAINS podem formar agregados com as proteínas ou enzimas que são alvos dos ensaios, alterando sua conformação e atividade. Esses agregados podem ser insolúveis ou solúveis, dependendo da concentração e das condições do meio. Os agregados insolúveis podem precipitar no ensaio e os agregados solúveis podem interferir na ligação do substrato ou do inibidor com alvo, aumentando ou diminuindo a atividade enzimática (BAELL, WALTERS, 2014).

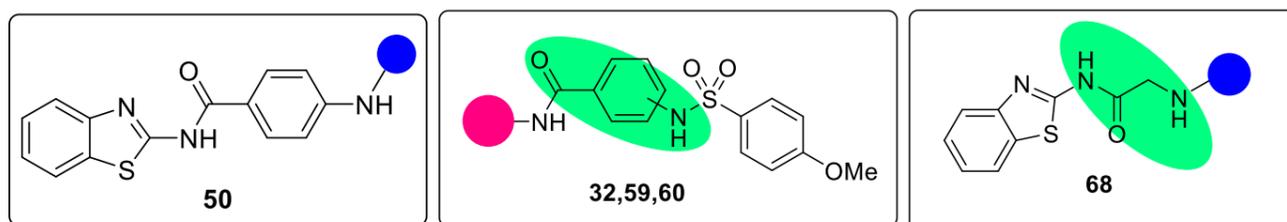
O ensaio de BSA é uma técnica que utiliza a albumina sérica bovina (BSA) como proteína modelo para avaliar a capacidade de um composto químico de formar agregados proteicos. Outro ensaio utilizado para identificar compostos agregadores é o teste pela cruzaina protease, enzima essencial para o parasita *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de chagas. A inibição da cruzaina por compostos agregadores pode levar a falsos positivos, o ensaio realizado é para detectar a inibição não específica pela enzima (JADHAV *et al.*, 2010). Outra estratégia eficaz para prevenir a agregação é a adição de detergentes, em muitos casos, a adição de detergentes pode reverter a modulação inespecífica de proteínas por agregação. O detergente mais popular no que diz respeito à agregação é o triton X-100, que é frequentemente utilizado na concentração de 0,01% (v/v), sendo um ponto de partida para identificar compostos agregadores (AULD, INGLESE, DAHLIN, 2017).

Considerando os conceitos apresentados para os compostos agregadores, foram realizados testes adicionais para verificar a especificidade do inibidor (Tabela 13). Como dito anteriormente, este detergente tem efeito disruptivo, podendo causar uma diminuição na inibição em concentrações mais elevadas, sugerindo uma inibição inespecífica pelos agregados (FENG *et al.*, 2007). Em vários estudos, foi realizado ensaios em três concentrações de detergente Triton X-100 (0,1, 0,01, 0,001%) e foi observado 0,001% era uma concentração baixa o suficiente para permitir a formação de agregados e, ao mesmo tempo, proporcionar melhor estabilidade enzimática durante o ensaio (ASSIS *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2021). No entanto, para os quatro inibidores NS2B-NS3pro do ZIKV aqui identificados (compostos **32**, **50**, **59** e **60**), foi observado uma diminuição da inibição de pelo menos 50% quando comparado à triagem inicial na concentração mais baixa de Triton X-100 (0,001%) (Tabela 13), indicando uma sensibilidade muito alta ao detergente.

Assim, foi realizado um segundo ensaio confirmatório, na presença de albumina sérica bovina (BSA). Após a pré-incubação de agregadores com concentrações elevadas de BSA, esta proteína satura a capacidade de ligação dos agregados. Conseqüentemente, a adição da enzima alvo após esta etapa resulta em diminuição da inibição, quando comparada com ensaios na ausência de BSA (MCGOVERN *et al.*, 2002). Para este ensaio, foi avaliado as concentrações de compostos próximas aos seus valores de IC₅₀ (Tabela 13). Após a pré-incubação dos compostos com alta concentração de BSA (1 mg/mL), observamos redução da inibição protéica, fornecendo evidência adicional de agregação. Também comparamos a inibição de proteínas pelos compostos em concentrações enzimáticas variadas, usando a concentração usual (0,2 nM) e uma concentração 10 vezes maior (2 nM). Para inibidores específicos, é esperado que esta variação na concentração da enzima não afete significativamente a sua atividade (MCGOVERN *et al.*, 2002). No entanto, a inibição da enzima diminuiu em pelo menos 35% com o aumento da concentração da enzima.

Finalmente, foi avaliado diretamente a promiscuidade dos compostos contra a cruzaina, uma cisteína protease não relacionada ao vírus Zika NS2B-NS3pro. Os compostos foram avaliados em concentrações próximas aos seus valores IC₅₀ contra NS2B-NS3pro. Os compostos **32**, **50** e **59** apresentaram inibição superior a 50%, evidência de inibição promíscua. No total, estes dados fornecem evidências conclusivas de que todos os compostos ativos contra o ZIKV NS2B-NS3pro são agregadores coloidais. Assim, a atividade antiviral dos compostos não está relacionada com a inibição desta protease.

Tabela 13- Ensaio com a enzima NS2B-NS3-pro do ZIKV



Comp.	Núcleo	% Inibição do ZIKV NS2B/NS3 ^a								
		100 μ M			IC ₅₀ (μ M)	Concentração do composto próxima ao seu IC ₅₀				% Inibição da cruzaina ^e
		Sem ^b incubação	Com incubação	Triton X-100 0,001 % ^c		[] tested ^d	BSA	[ZIKV NS2B/NS3pro] = 0,2 nM	[ZIKV NS2B/NS3pro] = 2 nM	
32		100	92 \pm 12	53 \pm 6	24 \pm 2	50	20 \pm 14	39 \pm 8	25 \pm 8	96 \pm 6
50		99 \pm 8	46 \pm 13	46 \pm 4	8 \pm 0,5	10- 12,5	12 \pm 16	15 \pm 17	9 \pm 8	72 \pm 31
59 <i>orto</i>		100	62 \pm 26	42 \pm 11	8 \pm 3	10- 12,5	8 \pm 12	62 \pm 9	16 \pm 10	58 \pm 11
60 <i>orto</i>		100	62 \pm 15	24 \pm 6	26 \pm 7	25	5 \pm 8	43 \pm 5	20 \pm 7	20 \pm 8
68		93 \pm 5	51 \pm 18	12 \pm 0,5	24 \pm 12	25	11 \pm 12	28 \pm 6	12 \pm 8	3 \pm 3

Todos os resultados representam a média de pelo menos dois experimentos independentes e seus respectivos desvios padrão. ^a Tampão: Tris-HCl 10 mM pH 8,5, glicerol a 20% e CHAPS 1 mM. ^b Pré-incubação a 37 °C por 10 minutos. ^c Tampão: Tris-HCl 10 mM, pH 8,5, glicerol a 20% e Triton X-100 a 0,001%. ^d para os compostos **50** e **59**, a concentração de 10 μ M foi aplicada apenas para os ensaios de BSA. Para o ensaio variando concentração de NS2B/NS3pro e inibição de cruzaina, a concentração utilizada foi de 12,5 μ M. ^e Tampão: acetato de sódio 0,1 M pH 5,5, β -mercaptoetanol 10 mM. Os compostos foram avaliados na mesma concentração empregada em ensaios confirmatórios para ZIKV NS2B/NS3pro.

4.1 ANÁLISE IN SILICO DAS PROPRIEDADES ADME-tox

Os métodos de química medicinal combinados com o ensaio biológico são uma combinação eficaz no desenvolvimento de novos candidatos a medicamentos com atividade biológica. A predição das propriedades farmacocinéticas dos compostos é de grande importância, pois constitui um pilar para o entendimento de propriedades como Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADME-tox).

Considerando a Regra dos cinco de Lipinski, a boa molécula candidata deve satisfazer as regras incluídas: Peso molecular (PM) ≤ 500 (g/mol), LogP ≤ 5 , número de doadores de ligação de H ≤ 5 (HD), e número de aceptadores de ligação de H ≤ 10 (HA) (LIPINSKI *et al.*, 1997).

A regra de Ghose é definida como segue: $160 \leq PM \leq 480$, $-0,4 \leq WLogP \leq 5,6$; $40 \leq$ Refratividade molar ≤ 130 e $20 \leq$ átomos ≤ 70 (GHOSE *et al.*, 1999).

A Regra de Veber é definida como: Ligações rotativas ≤ 10 ; TPSA ≤ 140 (VEBER *et al.*, 2002).

A Regra de Egan é definida como: WLOGP $\leq 5,88$; TPSA $\leq 131,6$ (EGAN *et al.*, 2000).

A Regra de Muegge é definida como: $200 \leq MW \leq 600$, $-2 \leq XLOGP \leq 5$; TPSA ≤ 157 ; HA ≤ 10 ; HD ≤ 5 ; Ligações rotativas ≤ 15 ; número de anéis ≤ 7 ; número de carbonos > 4 ; número de heteroátomos > 1 (MUEGGE *et al.*, 2001).

Considerando a apresentação das regras, na Tabela 14 se encontram reunidas as informações dos parâmetros farmacocinéticos dos compostos **32** a **65**, que foi realizado um estudo através do software online SwissADME ([SwissADME](#)).

Os compostos avaliados pelo software, nenhum violou a regra de Linpinski, mas mostraram violação de alguma das regras citadas, de Veber, de Ghose ou Egan para TPSA ou WlogP, conforme mostrado na Tabela 14. O alto valor de TPSA (TPSA $\geq 140 \text{ \AA}^2$) indica baixa penetração em ambientes hidrofílicos, enquanto esses baixos valores de TPSA (TPSA $\leq 60 \text{ \AA}^2$) devem facilmente indicar penetração em ambientes hidrofílicos. A previsão *in silico* também mostrou baixa absorção gastrointestinal para maioria dos compostos avaliados, com exceção dos compostos **59** e **65**. Além disso, os compostos de **32** a **65**, nenhum apresentaram capacidade de permeabilidade, ou seja, não apresentaram facilidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BBB). A permeação da BBB é uma propriedade importante, uma vez que é uma condição desejável para alcançar as células infectadas pelo ZIKV.

Outra ponto importante para a biodisponibilidade é se os compostos são substratos inibidores de glicoproteína P (P-gp), uma vez que o transporte por P-gp é um mecanismo comum de efluxo de fármacos através de membranas biológicas. A Tabela 14, mostra que nenhum dos compostos apresentou ser substratos de P-gp indicando um perfil favorável, com uma baixa probabilidade de resistência a medicamentos através desse mecanismo. Finalmente, prevê-se que a maioria dos compostos inibem as principais enzimas do citocromo P₄₅₀ (CYP) envolvidas no metabolismo dos medicamentos, o que sugere possíveis interações medicamentosas com medicamentos metabolizados por essas isoformas.

Tabela 14- Propriedades ADME-tox dos compostos **32 a 65**

Predição das propriedades	Compostos							
	32	2	40	41	48	59	60	65
Farmacocinética								
Absorção GI ^a	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	alta	baixa	alta
BHE ^b	não	não	não	não	não	não	não	não
Substrato P-gp ^c	não	não	não	não	não	não	não	não
Inibidor CYP1A2 ^d	não	não	sim	sim	não	sim	sim	sim
Inibidor CYP2C19 ^d	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Inibidor CYP2C9 ^d	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Inibidor CYP2D6 ^d	sim	sim	sim	não	não	sim	sim	sim
Inibidor CYP3A4 ^d	sim	sim	sim	não	sim	sim	sim	não
^eDrug-likeness								
Lipinski	0	0	0	0	0	0	0	0
Ghose	0	0	0	0	1 (WLOGP :5.6)	0	0	0
Veber	0	0	0	1 (TPSA > 140)	0	0	0	0
Egan	1 (TPSA > 131,6)	1 (TPSA > 131,6)	0	1 (TPSA > 131,6)	1 (TPSA > 131,6)	0	1 (TPSA > 131,6)	0
Muegge	0	0	0	1 (TPSA > 150)	0	0	0	0
Alertas								
PAINS	0	0	0	0	0	0	0	0
Brenk	0	0	0	1	0	0	0	0

^aG.I: Gastro intestinal; ^bBHE: Barreira Hematoencefálica; ^cP-gp: Glicoproteína-P; ^dCYP: Citocromo; ^eDrug-likeness: Semelhança de fármacos.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, o composto **2** foi avaliado como candidato a inibir o vírus ZIKV demonstrando uma potência cujo EC_{50} foi de 11,1 μ M e I.S =2. Sendo assim, o *hit 2* foi otimizado e essa otimização preliminar mostrou que a posição *meta* em relação ao núcleo *p*-amino-benzamida foi a mais promissora, gerando o análogo **33**, cujo EC_{50} foi de 5,1 μ M e I.S= 25,1. Além disso, o núcleo benzotiazol apresenta diversas atividades biológicas conhecidas na literatura como anticâncer, antiinflamatória, antibacteriana, antidepressiva, entre outras, e demonstrou ser importante a sua fixação como grupo farmacofórico.

Baseado nas informações anteriores, foram realizadas novas modificações nos núcleos benzotiazol, aril e sulfonamida do *hit* inicial **2** o qual gerou dezenove novos derivados que foram testados com o ZIKV.

Com a modificação no núcleo sulfonamida, o composto **40** foi o mais promissor da série, com EC_{50} de 5,0 μ M e I.S de 9,2. A influência de grupos retiradores de elétrons na posição *para* do anel se confirmaram como a mais potente em relação aos substituintes doadores na mesma posição.

Já com as modificações no núcleo benzotiazol, o composto **60** foi o mais promissor com EC_{50} de 5,0 μ M e I.S de 7,7.

Com base nos resultados no núcleo *p*-aminobenzamida da série da glicina, o composto **65** foi o mais promissor com EC_{50} de 17,1 μ M e I.S de 4,7.

A triagem inicial realizada com a enzima NS2B-NS3 do ZIKV, apresentaram os compostos mais potentes, o **50** (com modificação no núcleo sulfonamida) e o **59** (com modificação no núcleo benzotiazol), ambos com IC_{50} de 8,0 μ M.

Para identificar se os compostos testados com a NS2B-NS3 na triagem inicial estavam formando agregados foram realizados ensaios com Triton-X, com BSA e com a enzima cruzaina, a fim de promover um filtro seletivo para os potenciais inibidores da protease NS2B-NS3 do ZIKV. O conjunto de ensaios realizados permitiram concluir que os benzotiazóis testados não são inibidores específicos da NS2B-NS3, e assim outro mecanismo de ação deve estar contribuindo para a diminuição da atividade antiviral.

A análise ADME-tox indicou que os compostos **2,32,41,48,60** apresentaram baixa absorção na previsão *in silico*. Os compostos **2, 32, 40, 41,48, 59, 60 e 65** não apresentaram capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Todos os compostos não apresentaram ser inibidores da glicoproteína P. A maioria dos compostos não inibiram alguma isoforma do citocromo P₄₅₀. Os compostos **2, 32, 40, 41, 48, 59, 60 e 65** nenhum violaram a regra de

Lipinski. Somente o composto **48** violou a regra de Ghose pelo log de P. O composto **41** violou a regra de Veber e a regra de Muegge pela TPSA. O composto **40**, **59** e **65** não violaram a regra de Egan.

Dentro deste contexto, é possível inferir que o composto mais promissor da série de modificações foi o composto **33**, apresentando orientação meta em relação ao núcleo *p*-amino-benzamida, sendo destaque em dois parâmetros farmacodinâmicos: como a potência (EC₅₀ de 5, 1µM) e o índice de seletividade maior que 10. O índice de seletividade maior que 10 indica que o composto é um candidato promissor na categoria de *hit*.

A partir da análise *in silico* realizada pelo software *SwissADME* é possível sugerir melhorias para série benzotiazóis a fim de melhorar a absorção gastrointestinal, introduzindo grupos hidrofóbicos ou amentando a flexibilidade molecular, para aumentar a permeabilidade através da membrana celular, além disso, propor utilizar sistemas como nanopartículas ou outros agentes potencializadores da absorção, para proteger os compostos da degradação no trato gastrointestinal e aumentar a sua biodisponibilidade também é outra alternativa.

A potência antiviral e a boa seletividade relatadas neste trabalho indicam que esta série de *N*-acil-2-aminobenzotiazol é promissora no tratamento de doenças associadas ao ZIKV. Estudos futuros sobre estes compostos deverão incluir também a avaliação do seu perfil farmacocinético e um estudo *in vivo* num modelo de doença por ZIKV.

Em suma, infecções por ZIKV são uma preocupação de saúde global atual devido ao risco de microcefalia em recém-nascidos e a síndrome de Guillain-Barré em adultos. Como não há agentes contra ZIKV aprovado e não há estratégias de vacinação disponíveis é importante a identificação de novos candidatos a inibir a atividade viral do ZIKV.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Carbono (RMN ^{13}C)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram registrados nos espectrômetros Bruker Ascend 400 (400 MHz para RMN de ^1H e 101 MHz para RMN de ^{13}C) do Laboratório de Multiusuários do Instituto de Química da UFU. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou dimetilsulfóxido ($\text{DMSO-}d_6$) contendo TMS (tetrametilsilano) como padrão interno e acondicionadas em tubo de 5 mm. Os deslocamentos químicos foram mostrados em ppm vs. SiMe_4 , e determinados por referência a partir dos picos de solvente residual.

As multiplicidades dos sinais de RMN de ^1H foram abreviados da seguinte forma: d – dubleto; dd - dubleto duplo; m - multiplete; s -singleto; t - triplete; td - triplete duplo. Os valores das constantes de acoplamento foram medidos diretamente nos espectros de RMN de ^1H utilizando o programa MestReNova, versão 12. Os prótons trocáveis não foram observáveis em alguns espectros de RMN. A espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) foi medida utilizando ionização por electrospray (ESI) (Bruker Daltonics Corporation, Q-TOF geometria Impact II, do Laboratório da LaBioMass da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os espectros de RMN e HRMS estão disponíveis no ANEXO.

5.2 Materiais e Solventes

Para a cromatografia em camada delgada (CCD) sílica gel Aldrich (35-70 *mesh*) ou sílica gel Macherey-Nagel (230-400 *mesh*). A cromatografia analítica em camada fina foi realizada em folhas de cromatografia de alumínio impregnadas com sílica gel 60 F254 (Sigma-Aldrich) e a revelação da placa foi obtida utilizando luz UV (254 nm) e/ou atmosfera de iodo. Os reagentes e solventes utilizados foram produtos analiticamente puros e/ou destilados e secos para seu uso nas sínteses. Trietilamina (Et_3N), dimetilformamida (DMF), etanol (EtOH) foram secos em peneira molecular. Acetato de Etila (AcOEt), Hexano (Hex), Metanol (MeOH), e Diclorometano (DCM) foram destilados antes do uso. Os demais solventes foram utilizados sem tratamento prévio.

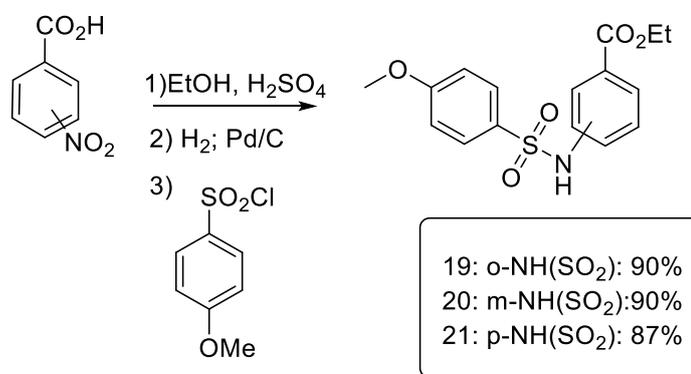
5.3 Análise pelo SWISSADME

A análise *in silico* pelo SWISSADME é uma forma de avaliar as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacológicas de um ou mais compostos de interesse para o descobrimento de fármacos. O software prevê parâmetros de solubilidade, permeabilidade, regra dos cinco de Lipinski, toxicidade, interação com proteínas plasmáticas, metabolismo, transporte, entre outros. A ferramenta é útil para desenvolver novos candidatos a fármacos, pois permite filtrar as moléculas com maior potencial farmacológico e menor risco toxicológico, reduzindo o tempo e o custo do processo de descobrimento de fármacos.

5.4 Síntese dos benzotiazóis

5.4.1 Procedimento geral para a preparação das sulfonamidas **19-21**

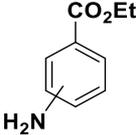
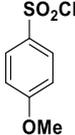
Esquema 12- Síntese dos compostos **19-21**



A uma solução de ácido nitrobenzóico (1g; 5,98mmol) em etanol anidro (15 mL) foram adicionadas 10 gotas de H₂SO₄. A reação foi agitada à 70°C durante 72 horas e resfriada. O consumo de ácido nitrobenzóico foi monitorado por CCD, AcOEt/hexano = 7:3, UV254nm). A reação foi tratada pela solução sat. aq. NaHCO₃ (3x 10 mL) e extraída usando AcOEt (3x 20 mL). A fase orgânica foi separada, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente foi removido e a pressão reduzida. O produto bruto não necessitou ser purificado por coluna cromatográfica, resultando no produto éster. Para redução do composto nitro obtido na etapa 1 foi utilizado 4,71 mmol do éster de partida, utilizado Pd/C (50 mg; 10 mmol%), o balão foi coberto com balão de

hidrogênio e agitado por 12 horas em temperatura ambiente até a conversão completa do material de partida (conforme monitorado por CCD, AcOEt/hexano = 7:3). A mistura de reação foi filtrada através de uma almofada de celite e o solvente foi removido a pressão reduzida, resultando na amina correspondente. Uma solução de aminobenzoato de etila dissolvida em diclorometano (5mL), com uma mistura de piridina e cloreto de 4-metoxibenzenossulfonila foi agitada durante 24 horas à temperatura ambiente. O progresso da reação foi monitorado por CCD, AcOEt/hexano = 7:3). A mistura de reação foi lavada com solução sat. aq. de NH₄Cl (20mL), extraído com AcOEt (3 × 15mL) e seca com Na₂SO₄ anidro, filtrado e evaporado sob pressão reduzida, resultando nas sulfonamidas correspondentes do Esquema 12. As quantidades de cada reagente estão listadas na Tabela 15.

Tabela 15- Preparação das sulfonamidas 19-21

Composto		[mmol]		[mmol]	Piridina [mL]	Rend. %
	[mg]		[mg]			
19	100	0,605	150	0,726	0,3	90
20	200	1,21	375	1,82	0.6	90
21	300	1,82	375	1,82	0.9	87

Rend. %= Rendimento.

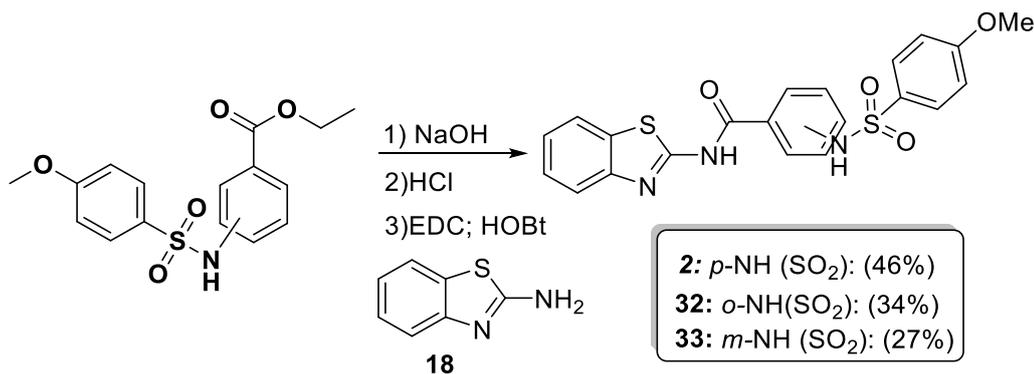
19-orto: Sólido laranja; **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 10,62 (s, 1H), 7,91 (ddd, *J* = 8,0, 1,7, 0,5 Hz, 1H), 7,81 – 7,74 (m, 2H), 7,67 (ddd, *J* = 8,4, 1,1, 0,5 Hz, 1H), 7,43 (dddd, *J* = 8,4, 7,3, 1,7, 0,4 Hz, 1H), 7,02 (ddd, *J* = 8,0, 7,3, 1,2 Hz, 1H), 6,89 – 6,84 (m, 2H), 4,32 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,80 (s, 3H), 1,35 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). **RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃):** δ 167,83, 163,11, 140,63, 134,31, 131,11, 129,43, 122,75, 119,21, 116,29, 114,14, 61,56, 55,55, 14,12.

20-meta: Sólido marrom claro. **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 8,08 (dt, *J* = 7,6, 1,4 Hz, 1H), 8,03 (dd, *J* = 22,6, 9,9 Hz, 2H), 7,98 (td, *J* = 1,6, 0,8 Hz, 1H), 7,70 (ddd, *J* = 8,1, 2,3, 1,2 Hz, 1H), 7,63 (ddd, *J* = 24,2, 7,9, 0,6 Hz, 1H), 7,20 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 4,67 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,68 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H).

21-Para: Sólido amarelo pálido. **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 7,92 (d, *J* = 13,4 Hz, 2H), 7,76 (d, *J* = 9,1, 2,1 Hz, 2H), 7,12 (d, *J* = 12,5 Hz, 2H), 6,90 (d, *J* = 8,8, 2,1 Hz, 2H), 4,33 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,83 (s, 3H), 1,36 (t, *J* = 16,3, 7,0, 3,6 Hz, 3H). **RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃):** δ 166,37, 163,64, 141,38, 141,27, 131,51, 129,93, 119,55, 114,83, 61,21, 55,67, 29,98, 14,93.

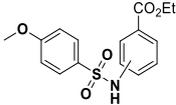
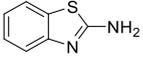
5.4.2 Procedimento geral para a preparação dos compostos 2-33

Esquema 13- Síntese dos compostos 2 a 33



Partindo-se do ácido carboxílico do Esquema 13 (Tabela 16), a primeira etapa é realizada a formação do sal de ácido carboxílico com 10 eq. da solução de NaOH (2 M). A reação foi agitada durante 40 minutos. Após a conclusão da reação (monitorada por CCD AcOEt /hexano = 7:3, UV-254nm), o pH foi ajustado em 2-3 usando solução de HCl (1M) em banho de gelo a 0°C. Os precipitados formados foram filtrados em funil de vidro sinterizado, lavados várias vezes com água destilada, dissolvidos em metanol, seco com Na₂SO₄ anidro, filtrado em papel e evaporado sob pressão reduzida, resultando nos ácidos carboxílicos correspondentes do Esquema 13 (Tabela 16). Para reação de acoplamento de amida, uma mistura de compostos ácido carboxílico, 2-amino-benzotiazol, EDC e HOBt em DMF (0,5 mL) agitado por 24 horas em temperatura ambiente ou 80°C. Após a adição de água (5 mL), o precipitado resultante foi filtrado e purificado por cromatografia flash (AcOEt/hexano = 7:3) para dar **2** a **33**. As quantidades de cada reagente estão listadas na Tabela 16.

Tabela 16- Preparação dos compostos 2-33

Composto ^[a]	 [mg]	[mmol]	 [mmol]	EDC		HOBt		Rend. %
				[mmol]	[mmol]	[mmol]	[mmol]	
32^b	60	0,195	24,4	0,163	0,211	0,016	34	
33^c	78	0,250	38,0	0,250	0,304	0,329	27	
2^c	50	0,162	24,4	0,162	0,211	0,162	46	

^[a] obtido à 80°C; ^[b] obtido à temperatura ambiente.

2: Sólido branco; **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 12,69 (s, 1H), δ 10,78 (s, 1H), δ 8,02-8,04 (m, 3H), δ 7,85 – 7,73 (m, 3H), δ 7,46 (td, *J* = 1,3 Hz 1H), δ 7,33 (td, *J* = 1,1 Hz, 1H), δ 7,24 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), δ 7,09 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), δ 3,80 (s, 3H). **RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 165,01, 163,13, 158,70, 142,45, 130,84, 129,86, 129,03, 126,21, 123,69, 121,74, 120,47, 117,85, 114,64, 55,71. **HRMS (ESI⁺)**: calc. para [M + Na]⁺ = 462,0553 *m/z*, encontrado: [M + Na]⁺ = 462,0536 *m/z*, erro = 3,68 ppm. Fórmula molecular: C₂₁H₁₇N₃O₄S₂.

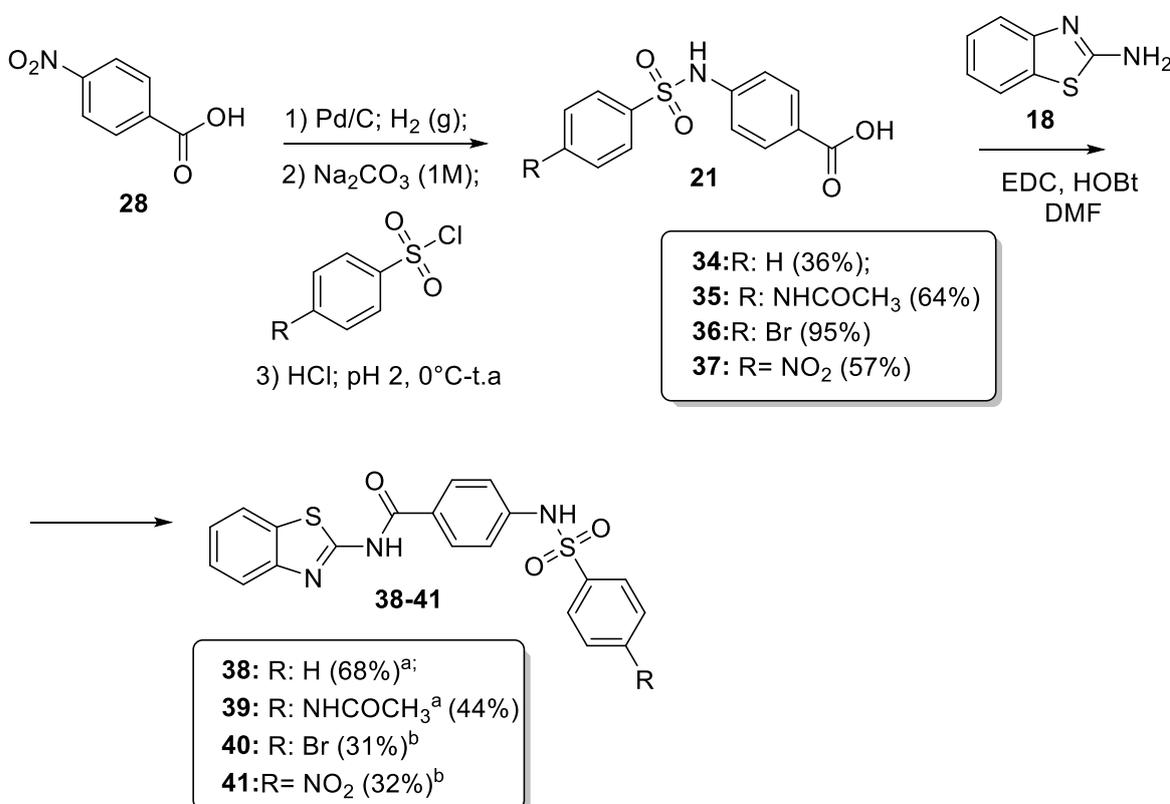
32-orto: Sólido amarelo; **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)**: δ 10,38 (s, 1H), 7,87 (dd, *J* = 7,9, 1,4, 0,7 Hz, 1H), 7,76 (dd, *J* = 8,4, 1,1 Hz, 1H), 7,71 – 7,65 (m, 3H), 7,57 (d, *J* = 7,9 Hz,

1H), 7,50 (td, $J = 8,3, 7,4, 1,5$ Hz, 1H), 7,43 (td, $J = 8,0, 7,2, 1,3$ Hz, 1H), 7,37 (td, $J = 7,8, 7,2, 1,3$ Hz, 1H), 7,12 (td, $J = 7,6, 1,2$ Hz, 1H), 6,74 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 3,62 (s, 3H). **RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3):** δ 166,85, 162,59, 159,28, 145,39, 138,69, 133,45, 130,69, 129,94, 128,92, 127,60, 126,04, 123,92, 123,75, 122,04, 121,15, 120,44, 119,24, 113,62, 54,86. **HRMS (ESI+):** calc. for $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 462,0553$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{Na}]^+ = z$ 462,0544 m/z , erro = 1,95 ppm. Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$.

33-meta: Sólido branco; **RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6):** δ 12,86 (s, 1H), 10,45 (s, 1H), 7,87 – 7,76 (m, 3H), 7,73 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 7,50 – 7,39 (m, 2H), 7,37–7,28 (m, 2H), 7,07 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 3,78 (s, 3H). **RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO-d_6):** δ 162,49, 138,41, 130,88, 129,40, 128,82, 126,17, 123,67, 123,34, 121,72, 119,69, 114,43, 55,57. **HRMS (ESI+):** calc. para $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 462,0553$ m/z , found $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 462,0544$ m/z , erro = 1,95 ppm. Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$.

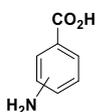
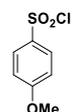
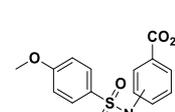
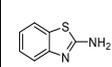
5.4.3 Procedimento para a preparação dos compostos 38-41

Esquema 14- Síntese dos compostos 38 a 41



O ácido 4-nitrobenzóico (1g; 5,98 mmol) (Esquema 14) foi adicionado à mistura de 30mL de MeOH e AcOEt (1:1) e Pd/C (64 mg;10 mmol%). O balão foi coberto com balão de hidrogênio e agitado por 8 horas a temperatura ambiente até a conversão completa do material de partida (monitorado por CCD, DCM/MeOH = 9:1). A mistura reacional foi filtrada através de uma camada de celite e o solvente foi removido sob pressão reduzida, resultando no ácido 4-aminobenzóico com 98% de rendimento. Para a formação de sulfonamida, uma mistura de ácido 4-aminobenzóico, cloreto de sulfonila e o pH foram ajustados em 8, usando solução de Na₂CO₃ (1 M). A reação foi agitada durante 24 ou 48 horas até a conclusão da reação de formação do sal de ácido carboxílico (monitorada por CCD, AcOEt /hexano = 7:3, UV254nm). Após a formação do sal, o pH foi ajustado para 2-3 usando solução de HCl (1M) em banho de gelo a 0°C para haver a hidrólise e formação do ácido carboxílico. Os precipitados formados foram filtrados em funil de vidro sinterizado, lavados várias vezes com água destilada, dissolvidos em metanol, secos com Na₂SO₄ anidro, filtrados em papel e evaporados sob pressão reduzida, resultando nos ácidos carboxílicos correspondentes do Esquema 13 com 36-95 % de rendimento. Para a reação de acoplamento de amida, uma mistura dos compostos ácido carboxílico, 2-amino-benzotiazol, EDC e HOBt em DMF (0,5mL) foi agitada por 24 ou 48 horas à temperatura ambiente. Após a adição de água (5 mL), o precipitado resultante foi filtrado e purificado em coluna cromatográfica com sílica gel 230-400 *mesh*. As quantidades de cada reagente e a mistura de solventes usados estão listadas na Tabela 17.

Tabela 17- Formação de amidas 38-41

Composto [a]	 [mmol]	R	 [mmol]	 [mmol]	 [mmol]	EDC [mmol]	HOBt [mmol]	Ren d. %
38 ^b	0,73	H	0,73	0,155	0,155	0,186	0,015 5	68
39 ^b	1,46	NHAc	1,46	0,15	0,15	0,180	0,195	44
40 ^c	0,73	Br	0,73	0,14	0,14	0,168	0,14	31
41 ^c	0,73	NO ₂	0,73	0,11	0,11	0,13	0,11	32

[a] obtido em 24h; mistura de solventes: 9:1 (AcOEt/Hexano); [b] obtido em 48h; mistura de solventes: 9:1 (DCM/MeOH).

38: Sólido branco. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆):** δ 12,70 (s, 1H), 10,93 (s, 1H), 8,09 – 7,97 (m, 3H), 7,86 (d, *J* = 10,6 Hz, 2H), 7,77 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,71-7,55 (m, 3H), 7,46 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,33 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,26 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H). **RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆):** δ 164,91, 158,65, 148,58, 142,01, 139,27, 133,30, 131,57, 129,84, 129,49, 126,67, 126,15, 123,63, 121,70, 120,45, 118,00. **HRMS (ESI +):** calc. for [M + H]⁺ = 410,0628 *m/z*, encontrado [M + H]⁺ = 410,0622 *m/z*, erro = 1,46 ppm. Fórmula molecular: C₂₀H₁₅N₃O₃S₂.

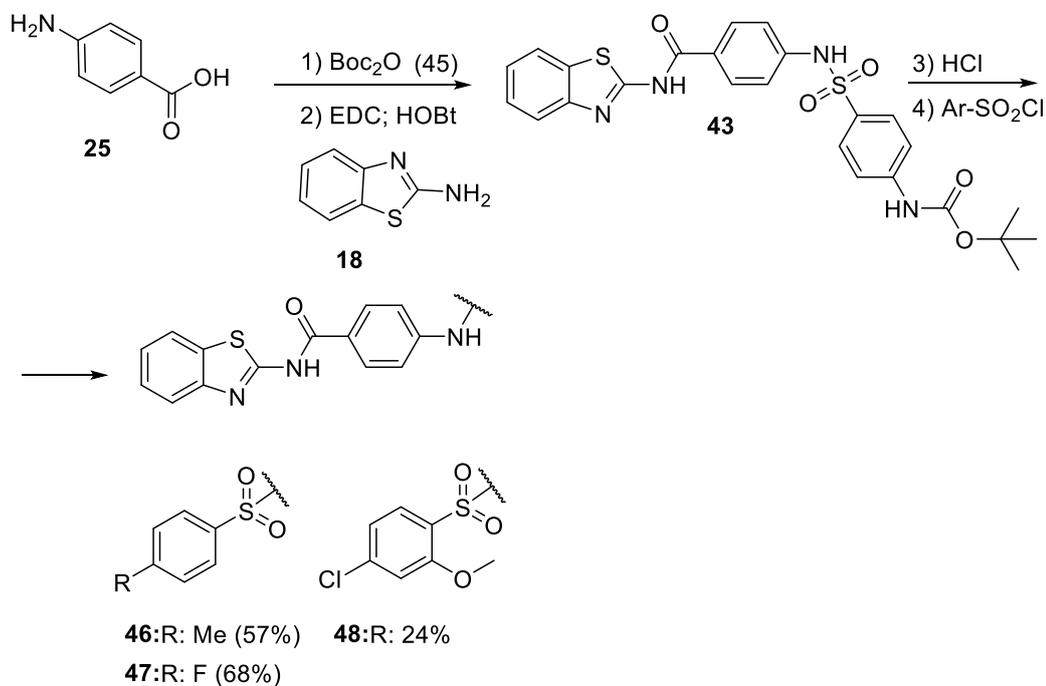
39: Sólido amarelo claro. **RMN ¹H (DMSO-d₆):** δ 12,67 (s, 1H), 10,77 (s, 1H), 10,30 (s, 1H), 8,06 – 7,96 (m, 3H), 7,83 – 7,70 (m, 5H), 7,45 (td, *J* = 8,2, 7,2, 1,3 Hz, 1H), 7,32 (td, *J* = 8,3, 7,2, 1,2 Hz, 1H), 7,24 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 2,05 (s, 3H). **RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆):** δ 168,99, 143,49, 143,39, 142,16, 132,68, 129,74, 127,98, 126,09, 123,56, 121,64, 118,66, 117,86, 24,06.

40: Sólido branco. **RMN ¹H (DMSO-d₆):** δ 7,73 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,69 – 7,60 (m, 3H), 7,54 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,45 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,21 (td, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,02 (td, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,75 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H). **RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆):** δ 174,21, 154,17, 151,11, 147,50, 133,29, 131,49, 129,50, 129,18, 125,06, 123,02, 121,25, 119,97, 119,16. **HRMS (ESI +):** calc. para [M + Na]⁺ = 509,9552 *m/z*, encontrado [M + Na]⁺ = 509,9537 *m/z*, erro = 2,94 ppm. Fórmula molecular: C₂₀H₁₄BrN₃O₃S₂.

41: Sólido marrom claro. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆)** δ 12,73 (s, 1H), 11,20 (s, 1H), 8,39 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 8,07 (dd, *J* = 17,0, 8,9 Hz, 4H), 7,99 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,75 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,45 (td, *J* = 8,3, 7,2, 1,3 Hz, 1H), 7,32 (td, *J* = 8,3, 7,2, 1,2 Hz, 1H), 7,26 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H). **RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆):** δ 149,65, 144,17, 140,85, 129,57, 127,92, 125,78, 124,47, 123,26, 121,32, 118,22. **HRMS (ESI+):** calc. para [M + Na]⁺ = 477,0298 *m/z*, encontrado [M + Na]⁺ = 477,0287 *m/z*, erro = 2,30 ppm. Fórmula molecular: C₂₀H₁₄N₄O₅S₂.

5.4.4 Procedimento geral para a preparação dos compostos 46-48

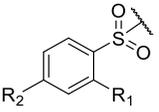
Esquema 15- Síntese dos compostos 46-48



Para proteção o 4-aminobenzóico (804,3mg; 5,86mmol; 1eq.) (Esquema 15) foi adicionado à solução (16 mL dioxano/água (2:1; v/v), seguido de NaOH 235mg; 5,86mmol; 1eq.) e Boc₂O (8,79mmol; 1,918g; 1,5eq.). A reação foi monitorada por CCD e agitada por 72 horas à temperatura ambiente. Após, foram adicionados 30mL de água destilada e a reação foi acidificada com solução de HCl (1M) até pH 3. Após, o sólido foi filtrado em funil sinterizado e lavado várias vezes com água destilada e lavado com diclorometano para retirar o excesso de terc-butil-carbamato. O sólido marrom claro resultante foi dissolvido em MeOH, seco com Na₂SO₄ anidro, filtrado e concentrado no vácuo. O produto da etapa 1 foi obtido com 75% de rendimento. Para a reação de amidação foi adicionado 2-aminobenzotiazol (0,798mmol; 119,84mg; 1eq.), o ácido protegido (0,798mmol; 189,30mg; 1eq.), HOBt (0,798mmol; 107,83mg; 1eq.), EDC (1,04 mmol; 198,87mg; 1,3 eq.) e DMF (1mL). Após agitação durante 24 horas à temperatura ambiente, adicionou-se água (20 mL) para precipitar o sólido.

O sólido foi filtrado e lavado com água destilada (2x 20 mL), dissolvido em DCM/MeOH, seco com Na₂SO₄ anidro, filtrado e evaporado sob pressão reduzida. O sólido foi purificado por cromatografia de sílica gel 35-70 *mesh* no eluente 7:3 (AcOEt /hexano). O produto da etapa 2 foi obtido com 79% de rendimento. O composto protegido (0,632 mmol; 233,4 mg) foi adicionado em DCM (3 mL) e adicionado em 4,8 mL de uma solução de HCl em AcOEt (2M). A reação foi monitorada por CCD (AcOEt /hexano = 1:1) e agitada por 72 horas à temperatura ambiente. Após o término da reação, o balão foi concentrado no vácuo e o produto da etapa 3 foi obtido com 97% de rendimento. Uma mistura de cloridrato, cloreto de sulfonil, piridina dissolvida em acetonitrila (5mL) foi agitada durante 24 horas à temperatura ambiente. O progresso da reação foi monitorado por CCD, AcOEt/hexano = 7:3). A mistura reacional foi lavada com solução saturada de NH₄Cl (3 x 10mL), extraída com AcOEt (3 x 15mL) e a fase orgânica seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida, resultando nas amidas correspondentes da etapa 4. As quantidades de cada reagente e a mistura de solventes utilizados para a cromatografia de sílica 35-70 *mesh* estão listadas na Tabela 18.

Tabela 18- Obtenção dos compostos 46-48

Composto ^[a]	Cloridrato [mmol]	[mg]		[mmol]	[mg]	Piridina [mmol]	Rend. %
46 ^[b]	0,175	60	R ₂ = CH ₃	0,263	50	1,4	57
47 ^[b]	0,146	50	R ₂ = F	0,219	42,65	1,17	66
48 ^[c]	0,157	53,9	R ₁ = OCH ₃ R ₂ = Cl	0,157	38	1,24	24

^[a] Mistura de solventes para coluna: 1:1 (AcOEt/hexano); ^[b] Mistura de solventes: 7:3 (AcOEt/hexano).

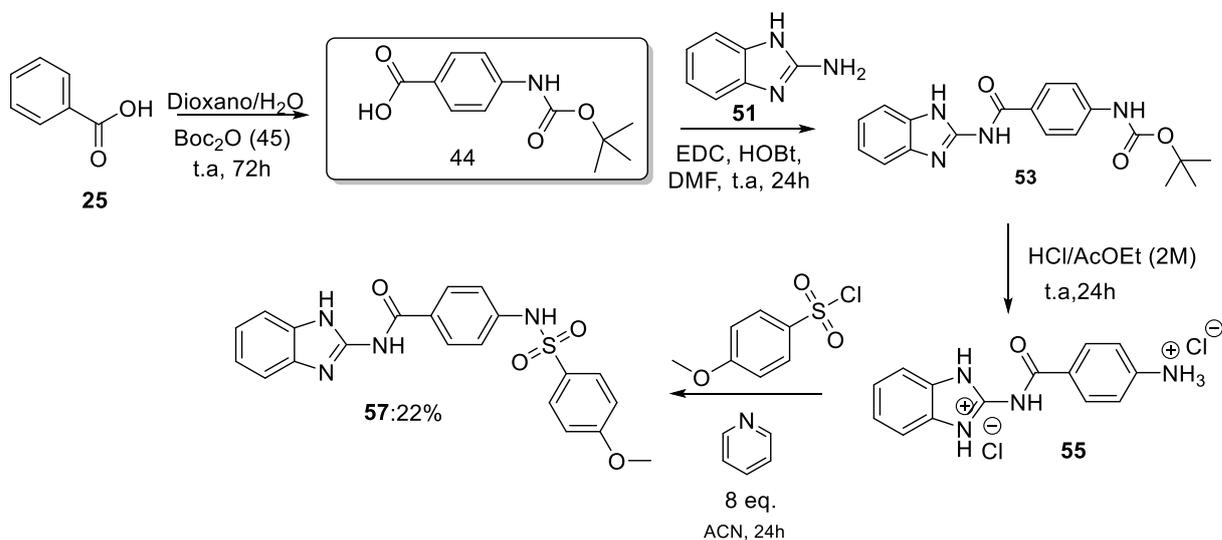
46: Sólido amarelo claro. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆):** δ 12,69 (s, 1H), 10,84 (s, 1H), δ 8,04 – 7,96 (m, 3H), 7,78–7,71 (m, 3H), 7,45 (td, *J* = 7,6, 7,2 Hz, 1H), 7,38 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,32 (td, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,24 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H). **RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆):** δ 164,94, 158,63, 148,55, 143,68, 142,09, 136,43, 129,85, 129,77, 126,70, 126,09, 123,57, 121,64, 120,38, 117,87, 20,91. **HRMS (ESI +):** calc. for [M + Na]⁺ = 446,0603 *m/z*, encontrado [M + Na]⁺ = 446,0578 *m/z*, erro = 5,60 ppm. Fórmula molecular: C₂₁H₁₇N₃O₃S₂.

47: Sólido branco. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆):** δ 12,71 (s, 1H), 10,93 (s, 1H), 8,02 (dd, *J* = 16,4, 8,1 Hz, 3H), 7,92 (dd, *J* = 8,6, 5,1 Hz, 2H), 7,76 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,44 (q, *J* = 8,8, 8,2 Hz, 3H), 7,32 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,25 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H). **RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆):** δ 165,97, 163,46, 142,24, 136,23, 130,10, 129,99, 126,38, 123,86, 121,93, 118,42, 117,07, 116,84. Fórmula molecular: C₂₀H₁₄FN₃O₃S₂.

48: Sólido amarelo claro. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆):** δ 12,66 (s, 1H), 10,77 (s, 1H), 8,03 – 7,94 (m, 3H), 7,80 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H), 7,75 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,65 (dd, *J* = 8,9, 2,7 Hz, 1H), 7,43 (td, *J* = 8,2, 7,2, 1,3 Hz, 1H), 7,30 (td, *J* = 8,3, 7,2, 1,2 Hz, 1H), 7,22 (dd, *J* = 9,0, 2,4 Hz, 3H), 3,85 (s, 3H). **RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆):** δ 165,13, 158,63, 155,32, 148,57, 141,96, 134,99, 131,58, 129,72, 129,35, 127,57, 126,43, 126,12, 123,76, 123,60, 121,67, 120,43, 117,84, 115,38, 56,99. **HRMS (ESI +):** calc. para [M + H]⁺ = 474,0343 *m/z*, encontrado [M + H]⁺ = 474,0332 *m/z*, erro = 2,32 ppm. Fórmula molecular: C₂₁H₁₆ClN₃O₄S₂.

5.4.5 Procedimento para a preparação dos compostos 57 e 58

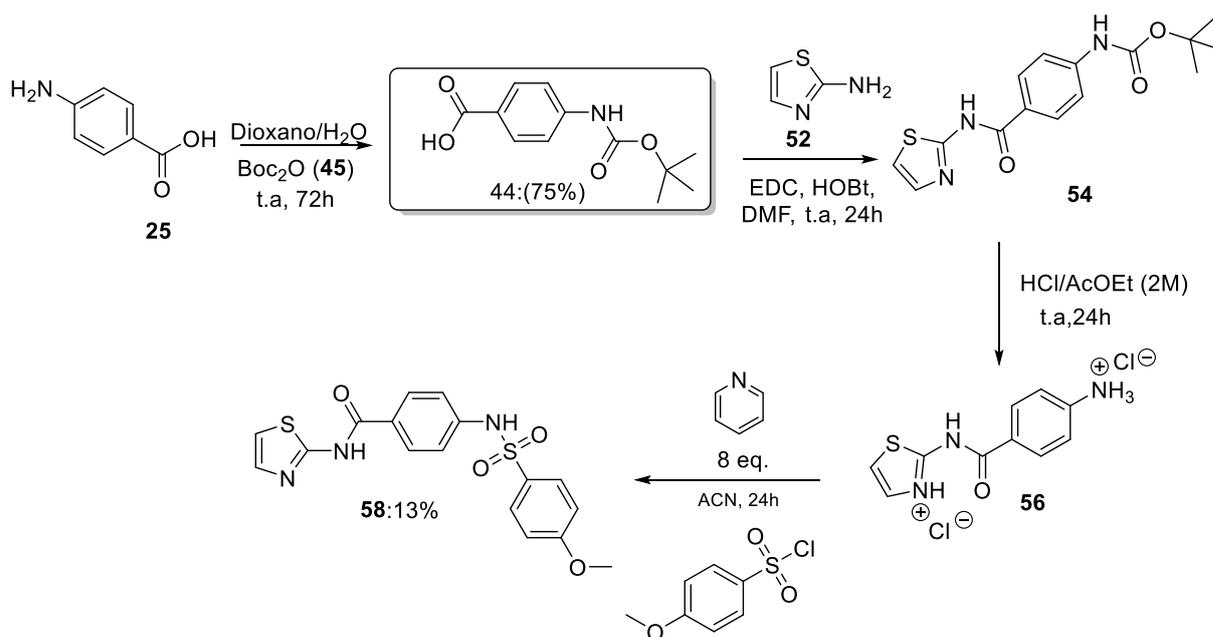
Esquema 16- Síntese do composto 57



Síntese de 57: Uma solução de 44 (0,5783mmol; 137mg) (Esquema 16) em DMF (1 mL) foi adicionada a 2-amino-benzoimidazol (0,5257mmol; 70 mg), EDC (0,631mmol; 120,93mg), HOBT (7,10 mg; 0,0525 mmol). A reação foi monitorada por CCD e agitada durante 24 horas à temperatura ambiente. Depois foi adicionado água (5mL) para precipitar o sólido. O sólido foi filtrado em funil sinterizado e lavado com água destilada (2x20mL), dissolvido em DCM/MeOH, seco com Na₂SO₄ anidro, filtrado e evaporada a pressão reduzida. O sólido foi purificado com sílica gel 35-70 *mesh* no eluente 95:05 (DCM/MeOH). O produto 53 da etapa 1 foi obtido com 63% rendimento. Para clivagem do grupo Boc, uma mistura de tert-butil (4-((1H-benzoimidazol-2-il) carbamoyl) fenil) carbamato (0,334 mmol; 117,6mg), em 20 eq. de uma solução de HCl (2M/ AcOEt) foi agitada durante 24 horas à temperatura ambiente. Após a reação foi evaporada a pressão reduzida. O produto da etapa 2 foi obtido com rendimento de 82%. Para a preparação do composto 57, uma solução de cloridrato 55 (89,3 mg; 0,1461 mmol; 1,0 eq.), em acetonitrila (5 mL), seguido do cloreto de 4-metoxibenzenosulfonil (68,1mg, 0,219mmol, 1,5 eq.) e piridina (8,0 eq.; 94.0 μL) foi agitado por 24 horas a temperatura ambiente. O progresso da reação foi monitorado por CCD, AcOEt/hexano = 7:3). A reação foi lavada com solução sat. aq. de NH₄Cl (3 x15mL), extraída com AcOEt (3 ×20 mL) e a fase orgânica seca com Na₂SO₄ anidro, filtrado e evaporado a pressão reduzida e purificado por sílica gel 35-70 *mesh* no eluente 7:3 (AcOEt /Hex). O produto 57 foi obtido com 22% de rendimento. Sólido amarelo. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 12,10 (s, 2H), 10,61 (s, 1H), 8,00 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,77 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 7,44 (dd, *J* = 5,9, 3,2 Hz, 2H), 7,21 (d, *J* =

8,8 Hz, 2H), 7,11 (dd, $J = 5,9, 3,2$ Hz, 2H), 7,08 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 3,80 (s, 3H). **RMN ^{13}C** (101 MHz, DMSO- d_6): δ 162,57, 141,38, 130,81, 130,02, 129,56, 128,90, 121,39, 117,84, 114,47, 112,52, 55,59. **HRMS (ESI +)**: calc. para $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 445,0941$ m/z , found $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 445,0923$ m/z , error = 4,04 ppm. Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$.

Esquema 17- Síntese do composto 58

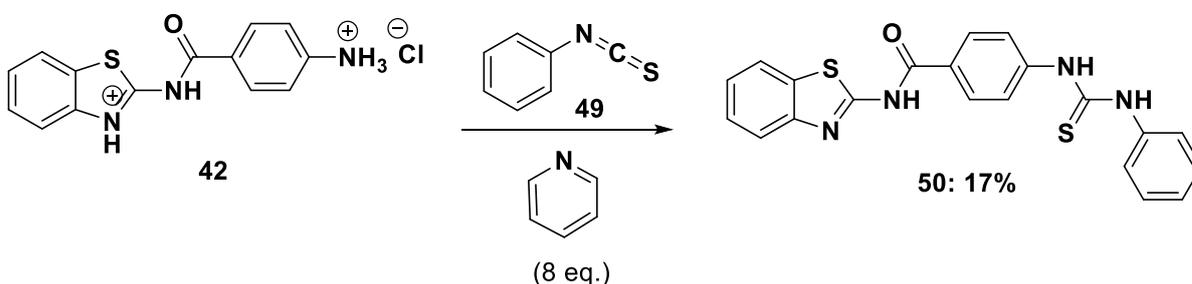


Síntese de 58: Uma solução de **44** (1,088mmol; 258mg) (Esquema 17) em DMF (1 mL) foi adicionado 2-amina-tiazol (0,989mmol; 100mg), EDC (227mg; 1,2eq.), HOBt (0,0989 mmol; 13,36mg; 0,1eq.). A reação foi monitorada por CCD e agitada durante 24 horas a temperatura ambiente. Após foi adicionado água destilada (5 mL) para precipitar o sólido. O sólido foi filtrado em funil sinterizado e lavado com água destilada (2x 20mL), dissolvido em DCM/MeOH, seco com Na_2SO_4 anidro, filtrado e evaporado a pressão reduzida. O sólido foi purificado por sílica gel 35-70 *mesh* no eluente 1:1 (AcOEt /Hex). O produto **54** da etapa 1 foi obtido com 76% de rendimento. Para clivagem do grupo protetor, uma mistura de tert-butil (4-(tiazol-2-ilcarbamoil) fenil) carbamato (0,751 mmol; 240 mg), em 20 eq. de uma solução de HCl (2M/ AcOEt) foi agitada por 24 horas a temperatura ambiente. A reação foi monitorada por CCD no eluente 1:1 (AcOEt /Hex). Após a reação foi evaporada à pressão reduzida. O produto **56** da etapa 2 foi obtido com rendimento de 76%. Para preparação do composto **58**, uma solução de cloridrato **56** (0,2403mmol; 70,22 mg 1,0 eq.), em acetonitrila (5 mL), seguido do cloreto de 4-metoxibenzenosulfonil (0,288 mmol; 59,6 mg; 1,2 eq.) e piridina (1,82 mmol;

0,154mL; 8,0 eq.) foi agitada por 24 horas a temperatura ambiente. A reação foi lavada com solução sat. aq. de NH_4Cl (3x 15mL), extraída com AcOEt (3 ×20 mL) e a fase orgânica seca com Na_2SO_4 anidro, filtrado e evaporado a pressão reduzida e purificado por cromatografia em coluna de sílica gel 35-70 *mesh* no eluente 7:3(AcOEt/Hex), o produto **58** foi obtido com 13% de rendimento. Sólido marrom. **RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6):** δ 12,41 (s, 1H), 10,69 (s, 1H), 7,97 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,78 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 7,52 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H), 7,22 (dd, $J = 8,8, 4,0$ Hz, 3H), 7,08 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 3,79 (s, 3H). **RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6):** δ 164,16, 162,63, 158,54, 141,86, 130,85, 129,51, 128,91, 126,64, 117,82, 114,53, 113,69, 55,62. **HRMS (ESI +):** calc. for $[\text{M} + \text{H}]^+ = 390,0577$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 390,0558$ m/z , erro = 4,87 ppm. Fórmula molecular: $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$.

5.4.6 Procedimento para a preparação dos compostos 50

Esquema 18- Síntese do composto 50

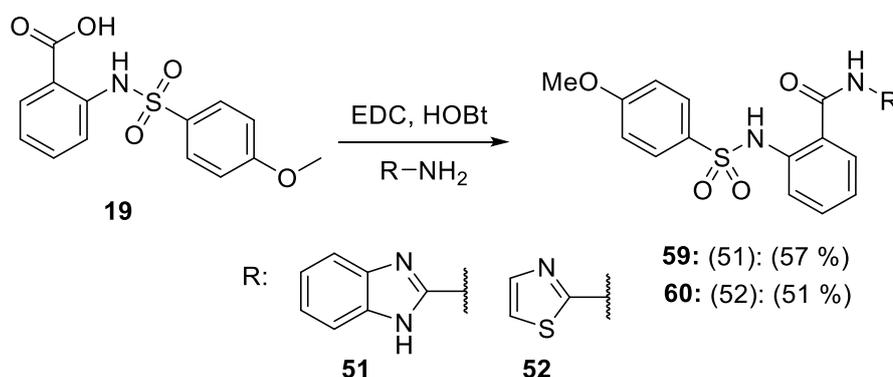


Síntese de 50: Uma solução de cloridrato **42** (Esquema 18) (50 mg; 0,1461 mmol; 1,0 eq.) foi adicionada em acetonitrila (5 mL), seguida de fenil isocianato **49** (29,63 mg, 0,219 mmol, 1,5 eq.) e piridina (0,168 mmol; 94 μL ; 8 eq.) à temperatura ambiente sob agitação durante 24 horas. A reação foi monitorada por CCD em 7:3 (AcOEt/Hexano). Depois, a mistura de reação foi lavada com solução sat. de NH_4Cl (3 x 15mL), extraída com AcOEt (3 x 20 mL) e a fase orgânica seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida e purificada por cromatografia em sílica gel 70-230 *mesh* na proporção 7:3 (AcOEt/Hexano), dando o produto **50** foi obtido com 17%. Sólido marrom. **RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6):** δ 10,10 (s, 1H), 10,06 (s, 1H), 8,07 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,71 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,55 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H), 7,49 (dd, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,35 (t, $J = 7,8, 7,3$ Hz, 2H), 7,27 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H), 7,18–7,13 (m, 1H). **RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6):** δ 179,33, 143,52, 139,15, 129,91, 128,62, 128,46, 124,66, 123,62, 121,75, 113,67, 112,56, 79,23, 78,89, 78,57. **HRMS (ESI +):** calc.

para $[M + Na]^+ = 427,0658 \text{ m/z}$, encontrada $[M + Na]^+ = 427,0647 \text{ m/z}$, erro = 2,57 ppm.
Fórmula molecular: $C_{21}H_{16}N_4OS_2$.

5.4.7 Procedimento para a preparação dos compostos **59** e **60**

Esquema 19-Sínteses de **59** e **60**



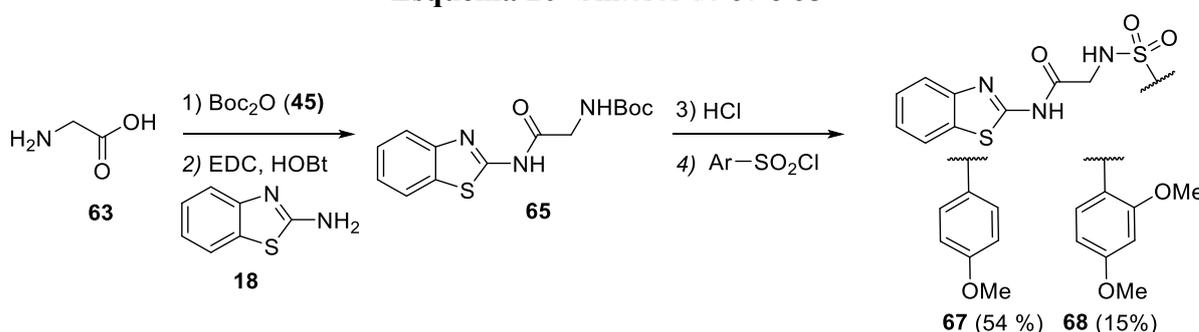
Síntese de 59: Foi preparada uma solução de **19** (Esquema 19) (0,195 mmol; 60 mg; 1,2 eq.) em DMF (0,5 mL) seguida por 2-amino-tiazol **52** (0,163 mmol; 17,24 mg; 1,0 eq.); EDC (0,212 mmol; 40,55 mg; 1,3 eq.), HOBt (0,0163 mmol; 0,1 eq.; 2,2 mg) foram agitados durante 48 horas a 100°C. A reação foi monitorada por CCD no eluente 7:3 (Hexano/ AcOEt). Após a adição de água (10 mL), o precipitado resultante foi filtrado através de um funil sinterizado, solubilizado em MeOH, seco com Na_2SO_4 anidro, filtrado e evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se o produto **59** com 57% de rendimento. amarelo sólido. **RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6):** δ 12,61 (s, 1H), 8,16 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,72 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), δ 7,48 (d, $J = 10,6$ Hz, 1H), 7,37 (t, $J = 55,5, 21,8, 18,1$ Hz, 1H), 7,23 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 7,07-6,92 (m, 3H), 3,73 (s, 3H). **RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6):** δ 162,81, 132,78, 131,52, 129,36, 123,21, 119,23, 114,82, 112,67, 56,10. **HRMS (ESI $^+$):** calc. for $[M + H]^+ = 423,1121 \text{ m/z}$, encontrado $[M + H]^+ = 423,1115 \text{ m/z}$, error = 1,42 ppm. Fórmula molecular: $C_{21}H_{18}N_4O_4S$.

Síntese de 60: Foi preparada uma solução de **19** (Esquema 19) em DMF (0,195 mmol; 60 mg; 1,2 eq.) seguido do 2-amino-benzoimidazol (0,163 mmol; 21,66 mg; 1,0 equiv.), EDC (0,212 mmol; 40,55 mg; 1,3 eq.), HOBt (0,0163 mmol; 2,2 mg; 0,1 eq.) foram agitados durante 48 horas a 100°C. A reação foi monitorada por CCD no eluente 95:05 (Hexano/ AcOEt). Após a adição de água (10 mL), o precipitado resultante foi filtrado em funil sinterizado, solubilizado em MeOH, seco com Na_2SO_4 anidro, filtrado e evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se o produto **60** com 51% de rendimento. Sólido marrom. **RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6):** δ 7,95

(dd, $J = 7,9, 1,8$ Hz, 1H), 7,68 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,48 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H), 7,30 (d, $J = 8,5, 1,2$ Hz, 1H), 7,15 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H), 7,10 (td, $J = 8,6, 6,9, 1,9$ Hz, 1H), 6,91 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 6,63 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 3,74 (s, 3H). **RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6):** δ 165,33, 160,77, 158,84, 138,16, 132,52, 130,38, 119,70, 119,11, 116,80, 113,84, 113,31, 55,63. **HRMS (ESI $^+$):** calc. para $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 412,0396$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 412,0392$ m/z , erro = 0,97 ppm. Fórmula molecular: $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$.

5.4.8 Procedimento para a preparação dos compostos 67 e 68

Esquema 20- Sínteses de 67 e 68



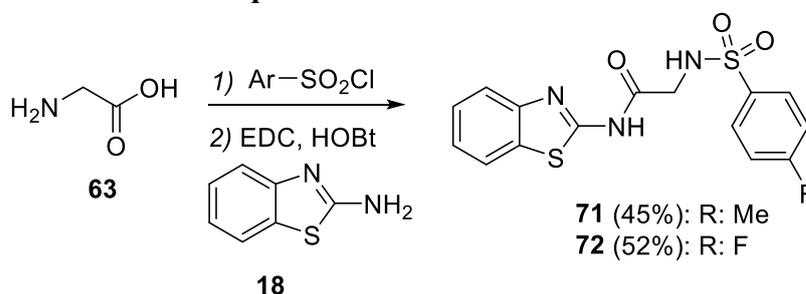
A uma solução de glicina **63** (500mg; 6,6mmol) (Esquema 20) foi adicionado em 24 mL de dioxano/água (1:1) a 0°C, seguido de carbamato de terc-butila (10mmol; 2,18g; 1,5 eq.), NaOH (13,32mmol; 532,8 mg; 2,0 eq.) A reação foi agitada à temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi monitorada por CCD no eluente 7:3 (Hexano/ AcOEt). Após evaporado sob pressão reduzida foi adicionado 20 mL de água destilada, seguido de adição de solução de HCl (1M) até pH 3. Após foi extraído com AcOEt (3x 40mL). As fases orgânicas foram secas com Na₂SO₄, filtradas e concentradas no vácuo. O produto da etapa 1, a (terc-butoxicarbonil) glicina, foi obtido com 100% de rendimento. Uma mistura de 2-amino-benzotiazol (1,33 mmol; 119,84 mg; 1 eq.), Glicina-Boc (1,6 mmol; 279 mg; 1,2 eq.), EDC (1,73 mmol; 303 mg; 1,3 eq.), HOBT (0,133 mmol; 18 mg; 0,1eq.), e DMF (1mL) foi agitado por 24 horas a 100°C. A reação foi monitorada por CCD no eluente 1:1 (Hexano/ AcOEt). Depois foi adicionada água (10 mL) para precipitar o sólido. O sólido foi filtrado e lavado com água destilada (2x 20mL), dissolvido em DCM/MeOH, seco com Na₂SO₄ anidro, filtrado, evaporado sob pressão reduzida e purificado por cromatografia em sílica gel de 230-400 *mesh*, no eluente 1:1 (AcOEt /Hexano), dando o produto **65** com 26% de rendimento. A uma solução de **65** (0,283mmol; 87,1mg) foi adicionado DCM (10 mL), seguido de 15 eq. do HCl em AcOEt (4M) agitado por 24 horas em temperatura ambiente, dando produto na etapa 3 com rendimento obtido de 100%.

Síntese de 67: A uma solução de cloridrato (0,245 mmol; 60 mg; 1,0 equiv.), em acetonitrila (5 mL), cloreto de 4-metoxibenzenossulfonil (0,294 mmol; 61 mg; 1,2 eq.), trietilamina (1,47 mmol; 0,2 mL; 6 eq.). A reação foi monitorada por CCD no eluente 9:1 (DCM/MeOH) e agitada à temperatura ambiente por 24 horas. A reação completa, a mistura de reação foi lavada com solução sat. de NH₄Cl (3 x 15 mL), extraída com AcOEt (3 x 20 mL) e a fase orgânica seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida e purificada por cromatografia em sílica 230-400 *mesh* no eluente 9:1 (DCM/MeOH), dando **67** com 54% de rendimento. Sólido amarelo. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆):** δ 12,28 (s, 1H), 8,04 (t, *J* = 6,1, 5,3 Hz, 1H), 7,97 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,73 (dd, *J* = 6,8 Hz, 3H), 7,43 (td, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,31 (td, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,07 (dd, *J* = 8,9 Hz, 2H), 3,85 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H), 3,75 (s, 3H). **RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆):** δ 162,19, 131,86, 128,73, 127,60, 126,09, 123,58, 121,66, 120,52, 114,18, 55,56, 44,99. **HRMS (ESI⁺):** calc. para [M + Na]⁺ = 400,0396 *m/z*, encontrado [M + Na]⁺ = 400,0386 *m/z*, erro = 2,50 ppm. Fórmula molecular: C₁₆H₁₅N₃O₄S₂.

Síntese de 68: A uma solução de cloridrato (0,1071 mmol; 30 mg; 1,0 eq.) em diclorometano (3 mL), cloreto de 2,5-dimetoxibenzenossulfonil (0,1285 mmol; 30,41 mg; 1,2 eq.), piridina (69 μL; 8eq.). A reação foi monitorada por CCD no eluente 9:1 (DCM/MeOH). A reação foi agitada à temperatura ambiente durante 24 horas. Após a reação completa, a mistura de reação foi lavada com solução sat. de NH₄Cl (3 x 15 mL), extraída com AcOEt (3x20mL) e a fase orgânica seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida e purificada por cromatografia em sílica gel 60 70-230 *mesh* no eluente 100% diclorometano seguido de um gradiente de eluente 95:05 (DCM/MeOH) para eluente 9:1 (DCM/MeOH), obtendo-se o produto **68** com 15% de rendimento. Sólido amarelo pálido. **RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD):** δ 7,83 (d, *J* = 8,2, 1,3 Hz, 1H), 7,73 (d, 1H), 7,43 (td, *J* = 8,3, 7,2, 1,1 Hz, 1H), 7,38 (d, 1H), 7,30 (td, *J* = 8,3, 7,3, 1,1 Hz, 1H), 7,06 (d, *J* = 1,5 Hz, 2H), 3,99 (s, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,73 (s, 3H). **RMN ¹³C (101 MHz, CD₃OD):** δ 169,07, 159,01, 154,21, 151,92, 127,08, 126,62, 124,86, 122,58, 122,13, 121,63, 120,84, 115,74, 114,76, 114,68, 56,89, 56,17, 46,58.

5.4.9 Procedimento para a preparação dos compostos 71 e 72

Esquema 21-Síntese de 71 e 72



A uma solução de glicina **63** (Esquema 21) (100 mg; 1,33mmol; 1,0 equiv) foi adicionada em H₂O (2,0mL) /THF (1,0 mL) a 0°C, seguindo cloreto de sulfonil (1,6 mmol; 304,7mg; 1,2 eq.) TEA (0,6 mL; 3,0 eq). A reação foi agitada durante 24 horas à temperatura ambiente. Após foi adicionado 1 mL de éter etílico, a fase aquosa foi extraída, acidificada com HCl até pH 2. Após foi extraída com AcOEt (2x15 mL). As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com solução salina (5 mL), secas com Na₂SO₄ anidro, filtradas e evaporadas sob pressão reduzida. (*Tosilglicina*): Sólido amarelo claro. 92% de rendimento. **RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD):** δ 7,74 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,37 (d, *J* = 8,6, 0,7 Hz, 2H), 3,67 (s, 2H), 2,42 (s, 3H). **RMN ¹³C (101 MHz, CD₃OD):** δ 172,28, 144,84, 138,62, 130,68, 128,12, 44,79, 21,45. (*4-fluorofenil sulfonil) glicina*): Sólido amarelo. 86% de rendimento. **RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD):** δ 7,94-7,89 (m, 2H), 7,31-7,25 (m, 2H), 3,72 (s, 2H). **RMN ¹³C (101 MHz, CD₃OD):** δ 170,24, 165,76, 163,25, 136,21, 129,17, 129,08, 115,28, 115,05, 42,85.

Síntese de 71: Uma solução de tosilglicina (0,2615 mmol; 60 mg; 1,2 eq.) em DMF (0,5 mL) seguida por 2-amino-benzotiazol (0,2179 mmol; 32,70 mg; 1 eq.); EDC (0,283 mmol; 54,3 mg; 1,3 eq.), HOBT (0,0283 mmol; 0,1 eq.; 3 mg) foram agitados durante 24 horas à temperatura ambiente. A reação foi monitorada por CCD no eluente 9:1 (DCM/MeOH). Após a adição de água (5 mL), o precipitado resultante foi filtrado em funil sinterizado, solubilizado em MeOH, seco com Na₂SO₄ anidro, filtrado, evaporado sob pressão reduzida e purificado por cromatografia em sílica 230-400 *mesh* no eluente 9:1 (DCM/MeOH), dando o produto **34** foi obtido com 45% de rendimento. Sólido amarelo. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 12,29 (s, 1H), 8,13 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H), 7,98 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,74 (dt, *J* = 8,1, 0,9 Hz, 1H), 7,70 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,43 (dt, *J* = 8,2, 7,2, 1,3 Hz, 1H), 7,37 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,31 (td, *J* = 8,2, 7,2, 1,2 Hz, 1H), 3,86 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H), 2,32 (s, 3H). **RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 167,94, 157,60, 148,52, 143,00, 137,54, 131,54, 130,32, 129,69, 127,40, 126, 72, 126,31,

123,81, 121 0,85, 120,71, 45,14, 21,02. **HRMS (ESI⁺)**: calc. for $[M + H]^+ = 362,0628 m/z$, encontrado $[M + H]^+ = 362,0615 m/z$, erro = 3,59 ppm. Fórmula molecular: $C_{16}H_{15}N_3O_3S_2$.

Síntese de 72: Para uma solução de 4-fluorofenil) sulfonil) glicina) (0,2572 mmol; 60 mg; 1,2 eq.) em DMF (0,5 mL) seguido por 2-amino-benzotiazol (0,2143 mmol; 32,2 mg; 1,0 eq.), EDC (0,278 mmol; 41,1 mg; 1,3 eq.), HOBt (0,0214 mmol; 0,1 eq.; 3 mg) foram agitados durante 24 horas à temperatura ambiente. A reação foi monitorada por CCD no eluente 9:1 (DCM/MeOH). Após a adição de água (5 mL), o precipitado resultante foi filtrado em funil sinterizado, solubilizado em MeOH, seco com Na_2SO_4 anidro, filtrado, evaporado sob pressão reduzida e purificado por cromatografia em sílica gel 230-400 *mesh* no eluente 9:1 (DCM/MeOH), dando o produto **72** obtido com 52% de rendimento. Sólido amarelo. **RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD)**: δ 7,98-7,92 (m, 2H), 7,84 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,73 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,43 (td, $J = 8,3, 7,2, 1,3$ Hz, 1H), δ 7,32 (dd, $J = 7,0, 1,0$ Hz, 1H), 7,29-7,23 (m, 2H), 3,96 (s, 2H). **RMN ¹³C (101 MHz, CD₃OD)**: δ 179,37, 169,46, 168,08, 165,56, 149,86, 137,93, 133,46, 131,41, 131,32, 127,54, 125,37, 122,54, 122,02, 117,54, 117,31, 46,70. **HRMS (ESI⁺)**: calc. for $[M + H]^+ = 366,0377 m/z$, found $[M + H]^+ = 366,0363 m/z$, erro = 3,82 ppm. Fórmula molecular: $C_{15}H_{12}FN_3O_3S_2$.

5.5 ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS BENZOTIAZÓIS NA REPLICACÃO DO ZIKV

5.5.1 Cultura de células

Células Vero E6 foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma-Aldrich) suplementado com 100 U/mL de penicilina (*Gibco Life Technologies*), 100 mg/mL de estreptomicina (*Gibco Life Technologies*), 1% (v/v) não- aminoácidos essenciais (*Gibco Life Technologies*) e soro fetal bovino a 10% (v/v) (FBS; Hyclone) a 37°C em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂. Replicon subgenômico (SGR) contendo linhas celulares (BHK21-RepZIKV_IRES-Neo) foram mantidos nas mesmas condições das células Vero E6, exceto pela adição de G418 (*Sigma-Aldrich*) a 500 μ g/mL

5.5.2 Ensaio do vírus

O isolado de ZIKV de tipo selvagem de uma amostra clínica de um paciente no Brasil (ZIKVPE243) 53 foi amplificado e titulado conforme já descrito na literatura (DONALD *et al.*, 2016).

5.5.3 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi medida pelo ensaio MTT [brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio] (*Sigma-Aldrich*). Células Vero E6 e BHK21-RepZIKV_IRES-Neo foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações de cada composto por 72 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após 72 horas, o meio contendo o composto foi removido e a solução de MTT a 1 mg/mL foi adicionada a cada poço, incubada por 30 minutos e substituída por 100 µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazan. A absorvância foi medida a 490 nM num leitor de microplacas Glomax (Promega). A viabilidade celular foi calculada de acordo com a equação $(T/C) \times 100\%$, onde T e C representaram a densidade óptica dos grupos bem tratados e controle, respectivamente. DMSO foi utilizado como controle não tratado. Para calcular a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀), as células Vero E6 foram plaqueadas em placas de 96 poços a 5×10^3 células por poço para ensaios de ZIKV e foram incubadas durante a noite a 37 °C com 5% de CO₂. Meio contendo diluições em série de cada composto variando de 3 a 400 µM foi adicionado às células e incubado por 72 h. Depois disto, o ensaio MTT foi realizado conforme descrito acima. A concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) foi calculada utilizando GraphPad Prism 8.0 empregando uma regressão não linear.

5.5.4 Ensaios Antivirais

Para avaliar a atividade antiviral dos compostos contra o ZIKV, as células Vero E6 foram semeadas a uma densidade de 5×10^3 células por poço em placas de 96 poços 24 horas antes da infecção. ZIKVPE₂₄₃ a um MOI de 0,01 foi utilizado para infectar células na presença de cada composto seguindo a mesma faixa de concentrações. 72h depois, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%, lavadas com PBS e o ensaio de imunofluorescência foi realizado conforme já descrito na literatura (CASSANI *et al.*, 2022). FFU sob tratamento com cada composto ou controle não tratado foram contados. Para ensaios antivirais BHK21-RepZIKV_IRES-Neo, as células foram semeadas a uma densidade de 1×10^4 células por poço em placas de 96 poços 24 horas antes dos ensaios. As células foram tratadas com as maiores concentrações não citotóxicas de cada composto durante 72 horas a 37°C com 5% de CO₂. 72 horas após o tratamento, as amostras foram colhidas utilizando tampão de lise Renilla-luciferase (Promega®) e os níveis de replicação do vírus foram quantificados medindo a atividade de Renilla-luciferase utilizando o Renilla luciferase Assay System (Promega®). A concentração

efetiva de 50% de inibição (EC_{50}) foi calculada utilizando o software GraphPad Prism 8.0. Os valores de CC_{50} e CE_{50} foram utilizados para calcular o índice de seletividade ($IS = CC_{50}/EC_{50}$).

5.5.5 Análise estatística

Experimentos individuais foram realizados em quadruplicado e todos os ensaios foram realizados no mínimo três vezes para confirmar a reprodutibilidade dos resultados. O software GraphPad Prism 8.0 foi utilizado para avaliar diferenças estatísticas de médias de leituras usando o teste t não pareado de Student ou testes de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,01$ foram considerados estatisticamente significativos. A EC_{50} e a CC_{50} foram calculadas por meio de regressão não linear considerando $\log(\text{inibidor})$ vs. resposta, com inclinação variável (quatro parâmetros). Os dados foram expressos como média \pm DP e submetidos a teste de normalidade e lognormalidade.

5.6 ENSAIOS ENZIMÁTICOS COM NS2B-NS3

5.6.1 Expressão e purificação de NS2B-NS3

O ZIKV NS2B-NS3pro foi expresso e purificado a partir da construção descrita e fornecida por *Lei et al.*, 2016. A construção continha o NS2B-NS3pro do isolado brasileiro BeH823339, com um ligante Gly4-Ser-Gly4 entre as duas cadeias proteicas e quatro pontos mutações: R96A (em NS2B) e R29G/C80S/C143S (em NS3), em um plasmídeo pET-15b. Células BL21-DE3 contendo a construção ZIKV NS2B-NS3pro foram cultivadas durante a noite (12 h) a 37 °C e 200 rpm de agitação constante em 12,5 mL de meio estéril 2xYT contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, que foi então adicionado a 1 L de no mesmo meio, nas mesmas condições. A densidade óptica foi monitorada até atingir uma DO_{600} de $0,7 \pm 0,1$, e 1 mM de isopropil- β -D-galactosídeo (IPTG) foi adicionado para induzir a superexpressão. A cultura foi mantida durante a noite a 20 °C e 200 rpm de agitação constante, seguida de centrifugação por 30 min a 5000 rpm a 4 °C, e as células foram ressuspensas usando 20 mL de tampão A (Tris-HCl 25 mM, NaCl 10 mM, 5% de glicerol, pH 8,5). Finalmente, as células foram lisadas por sonicação sob pulsos on/off de 20/40 s em gelo e centrifugadas a 4°C e 10.000 g por 1 h. Para purificar a proteína, o sobrenadante da cultura foi injetado em uma coluna de níquel HisTrap Sepharose HP (GE Healthcare) de 5 mL e eluído com uma taxa de fluxo de 1 mL/min de tampão, empregando um gradiente linear cobrindo 5 volumes de coluna de 0 a 100% de tampão B (Tris-HCl 25 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, glicerol a 5%, pH 8,5). Em seguida, a

solução proteica foi carregada em uma coluna de filtração em gel HiLoad 16/600 Superdex 75pg (GE Healthcare) e eluída usando tampão. A uma taxa de fluxo de 0,1 mL/min por 1,2 volumes de coluna. As amostras de proteína resultantes foram armazenadas a -80°C.

5.6.2 Ensaio enzimáticos com ZIKV NS2B-NS3pro

A atividade do ZIKV NS2B-NS3pro foi medida monitorando o sinal de fluorescência resultante da clivagem do substrato fluorogênico Bz-Nle-Lys-Lys-Arg-AMC. A intensidade de fluorescência (Excitação λ : 340 nm; emissão λ : 440 nm) foi monitorizada durante pelo menos 6 min (num leitor de placas Biotek Synergy 2). Todos os ensaios foram realizados num tampão contendo Tris-HCl 10 mM pH 8,5, CHAPS 1 mM e 20% de glicerol. A concentração final de proteína foi de 0,2 nM (salvo indicação em contrário) e a concentração de substrato foi de 44 μ M. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em dois ensaios independentes. Os valores informados referem-se à média e ao desvio padrão. Para triagem inicial, cada composto foi avaliado a 100 μ M, sem e com pré-incubação com enzima por 10 minutos a 37 °C. Todos os outros ensaios foram realizados com pré-incubação com a enzima. Para determinar os valores de IC₅₀, foram avaliadas pelo menos sete concentrações de composto (0-100 μ M ou 0-400 μ M). Os valores de IC₅₀ foram calculados no Graph Pad Prism 6.0, ajustando-se à equação IC₅₀ de quatro parâmetros $Y = \text{Bottom} + ((\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{(([\log IC]_{50} - X) * s))))$, onde X é a concentração do inibidor, s é a inclinação da curva concentração-resposta (inclinação de Hill), e o topo e a base são, respectivamente, os platôs superior e inferior. Para avaliar a sensibilidade ao detergente, os compostos foram avaliados a 100 μ M, com o tampão de ensaio modificado pela remoção de CHAPS e adição de Triton X-100 a 0,001%. Para avaliar a sensibilidade à BSA, os compostos foram pré-incubados com BSA (inicialmente a 4 mg/mL, resultando em uma concentração final de 1 mg/mL nos ensaios) por 10 minutos, em concentração próxima ao seu IC₅₀, no mesmo tampão empregado para triagem composta. Em seguida, a enzima foi adicionada e a mistura foi incubada por mais 10 minutos. Finalmente, o substrato foi adicionado e o ensaio foi monitorado. Para avaliar o impacto da concentração da enzima, foi realizado um ensaio variando a concentração de NS2B-NS3pro (0,2 nM e 2 nM) mantendo também as demais características do tampão. Os compostos foram avaliados em concentrações próximas do seu IC₅₀.

5.6.3 Ensaios enzimáticos com cruzaina

A cruzaina recombinante foi gentilmente fornecida por Allison Doak e Prof. Brian Shoichet (Universidade da Califórnia em São Francisco, EUA). A atividade da cruzaina foi medida monitorando o sinal de fluorescência obtido pela clivagem do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC. A intensidade de fluorescência (Excitação λ : 340 nm; emissão λ : 440 nm) foi monitorada durante pelo menos 5 minutos, num leitor de placas BioTek Synergy 2. Todos os ensaios foram realizados em acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 e β -mercaptoetanol 10 mM. A concentração final de proteína foi de 2 nM e a concentração de substrato foi de 2,5 μ M. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em dois experimentos independentes, com pré-incubação com a enzima por 10 minutos a 25 °C. Os ensaios foram realizados em concentrações de compostos próximas aos valores de IC₅₀ de cada composto contra ZIKV NS2B-NS3pro.

6 REFERENCIAS

ADAMS, R.A. *et al.*; Rifamycin antibiotics and the mechanisms of their failure. **The Journal Of Antibiotics**, v.74, p.786–798, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41429-021-00462-x> . Acesso em: 19 jul. 2022.

ALERT-ONLINE. Medicamento para o glaucoma pode tratar tuberculose? Disponível em: <https://www.alert-online.com/br/news/health-portal/medicamento-para-o-glaucoma-pode-tratar-tuberculose>. Acesso em: 19 jul. 2022.

ALZFORUM, 2022. Riluzole. Disponível em: <https://www.alzforum.org/therapeutics/riluzole>. Acesso em: 19 jul. 2022.

AUBRY, M. *et al.*; Zika Virus Seroprevalence, French Polynesia, 2014-2015. **Emerging infectious diseases**. v.23, n. 4, p. 669-672, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2304.161549>. Acesso em: 18 jul. 2022.

AULD, D.S., Inglese J., Dahlin, J.L. Assay Interference by Aggregation. Assay Guidance Manual [Internet]. **Company and the National Center for Advancing Translational Sciences**, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442297/> Acesso em: 23 set. 2023.

AYRES, C.F.C. J. Identification of Zika virus vectors and implications for control. **The Lancet Infectious Diseases**, v.16, n.3, p. 278-279, 2016. Disponível em: [https://doi.org/doi:10.1016/s1473-3099\(16\)00073-6](https://doi.org/doi:10.1016/s1473-3099(16)00073-6). Acesso em: 19 jul. 2022.

BABA, H.; YAOITA, Y.; KIKUCHI, M.; Sesquiterpenoids and Lactone Derivatives from *Ligularia dentata*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 90, n.5, p. 1028-1037, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/hlca.200790086>. Acesso em: 19 jul. 2022.

BECHARA, J H; STEVANI, C.V. Brazilian Bioluminescent Beetles: Reflections on Catching Glimpses of Light in the Atlantic Forest and Cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S. l.], ano 2018, v. 90, n. 1, p. 663-679, 2023. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170504> Acesso em: 12 set. 2023.

BRANCO, F. S. C. *et al.*; Ressonância Magnética Nuclear de Substâncias Organofluoradas: Um Desafio no Ensino de Espectroscopia. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1237-1246, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150139>. Acesso em: 19 jul. 2022.

CASSANI, N.M.; SANTOS, I.A.; GROSCHE, V.R.; FERREIRA, G.M.; GUEVARA-VEJA, M.; ROSA, R.B.; PENA, L.J.; NICOLAU-JUNIOR, N.; CINTRA, A.C.O.; MINEO, T.P.; SABINO-SILVA, R.; SAMPAIO, S.V.; JARDIM, A.C.G. Roles of Bothrops jararacussu toxins I and II: Antiviral findings against Zika virus. **Internacional Journal Biological Macromolecules**, V., 2023, 227:630-640. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.102>. Acesso em: 23 set. 2023

CRICCHIO R.; ANTONINI P.; SARTORI G. Thiazorifamycins. III. Biosynthesis of rifamycins P, Q and verde, novel metabolites from a mutant of *Nocardia mediterranea*. **The Journal of Antibiotics**, v. 33, n. 8, p.842-6.

Disponível em: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.33.842> Acesso em: 23 set. 2023.

DA SILVA et al. Structure-Based Optimization of Quinazolines as Cruzain and *Tbr* CATL Inhibitors. **Journal Medicinal Chemistry**, v.64, n.17, p.13054-13071, 2021, Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01151>. Acesso em: 23 set. 2023.

DAS, T.C.; QUADRI, S. A.; FAROOQUI, M. Recent advances in synthesis of sulfonamides: A review. **Chemistry & Biology Interface**, [S. l.], ano 2018, v. 8, n. 4, p. 194-204, 2023. Acesso em: dez. 12 dez. 2023

DICK, G. W; KITCHEN, S.F; HADDOW, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.46, n.5, p.509-520, 1952. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4). Acesso em: 18 jul. 2022.

DIOSA-TORO, M.; PRASANTH, K.R.; BRADRICK, S.S. et al. Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle. **Journal Virology**, v.17, n. 60, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01329-7>. Acesso em: 23 set. 2023.

DONALD, C.L.; BRENNAN, B.; CUMBERWORTH, S.L. et al. Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, V. 10, n.10, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/image.pntd.v10.i09> Acesso em: 23 set. 2023.

DONALD, C.L. *et al.*; Sequência completa do genoma e atividade antagonista do interferon sfRNA do vírus Zika de Recife. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005048, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005048> Acesso em: 19 jul. 2022.

DUELEN, R. *et al.*; Medicinal Biotechnology for Disease Modeling, Clinical Therapy, and Drug Discovery and Development. **Introduction to Biotech Entrepreneurship: From Idea to Business**, p.89–128, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-22141-6_5. Acesso em: 19 jul. 2022.

DUFFY, M.R *et al.*; Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal Of Medicine**. v.360, n. 24, p. 2536-2543, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>. Acesso em: 18 jul. 2022.

EGAN W.J.; MERZ, K.M.; BALDWIN J.J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. **Journal Medicinal Chemistry**, v.43, 2000, p. 43:3867–3877. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1021/jm000292e>, Acesso em: 23 set. 2023.

FENG, B.Y.; SIMEONOV, A.; JADHAV, A. et al. A High-Throughput Screen for Aggregation. Based Inhibition in a Large Compound Library. **Journal Medicinal Chemistry**, v.50, n.10, 2007, p.2385-2390. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm061317y>

FERNANDES, R. S.; FREIRE, M.C. L. C.; BUENO, R. V.; GODOY, A. S.; GIL, L.H. V. G.; OLIVA, G. Reporter replicons for antiviral drug discovery against positive single-stranded RNA viruses. **Viruses**, v.12, n.6, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v12060598> Acesso em: 23 set. 2023.

FERREIRA, L.G. *et al.*; Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v.20, n.7, p.13384-13421, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules200713384> . Acesso em: 19 jul. 2022.

GARCIA-BÁEZ, E.V. *et al.*; Benzothiazoles from Condensation of o-Aminothiophenoles with Carboxylic Acids and Their Derivatives: A Review. **Molecules**, v. 26, n.21, p. 6518. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26216518>. Acesso em: 19 jul. 2022.

GHOSE A.K.; VISWANADHAN V.N.; WENDOLOSKI, J.J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. **Journal Combinatorial Chemistry**, v. 1, 1999; p.55–68. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cc9800071> Acesso em: 23 set. 2023.

GUIDO, R. V.C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**. v.24, n.70, p.81-98, 2010. disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300006>. Acesso em: 23 set. 2023.

HOSOKAWA, N. *et al.*; New Triene-ansamycins, Thiazinotrienomycins F and G and a Diene-ansamycin, Benzoxazomycin, **The Journal of Antibiotics**, 2000, v.53, n. 9, P. 886-894, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.53.886>. Acesso em: 19 jul. 2022.

HU, Y.; MACMILLAN, J. B.; Erythrazoles A–B, Cytotoxic Benzothiazoles from a Marine-Derived Erythrobacter sp. **Organic Letters**, v.13, n.24, p. 6580-6583, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ol202944g>. Acesso em: 19 jul. 2022.

JADHAV *et al.* Quantitative analyses of aggregation, autofluorescence and reactivity artifacts in a screen for inhibitors of a thiol protease. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 37-51, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm901070c>. Acesso em: 23 set. 2023.

JIN, J. *et al.*; Chiral Brønsted Acid Catalyzed Enantioselective Dehydrative Nazarov-Type Electrocyclization of Aryl and 2-Thienyl Vinyl Alcohols. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 17, p. 5834–5841, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jacs.8b02339>. Acesso em: 19 jul. 2022.

KLAITONG, P.; SMITH, D. R. Roles of Non-Structural Protein 4A in Flavivirus Infection. **Viruses**, v.13, n.10, p. 2077, 2021. disponível em: <https://doi.org/10.3390/v13102077>. Acesso em: 23 set. 2023.

LEE, H. *et al.*; Identification of novel small molecule inhibitors against NS2B/NS3 serine protease from Zika virus, **Antiviral Research**, v.139, n.49, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.12.016> . Acesso em: 19 jul. 2022.

LI, Y. *et al.*; Structural Dynamics of Zika Virus NS2B-NS3 Protease Binding to Dipeptide Inhibitors. **Structure**, v. 25, n. 8, p. 1242-1250, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.06.006>. Acesso em: 19 jul. 2022.

LIMA, L. M. **Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira**. Química Nova, v. 30, n.6, pag. 1456–1468, 2007. disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000600015> Acesso em: 23 set. 2023.

LIPINSKI C.A.; LOMBARDOF.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.23, p.3-25. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1). Acesso em: 23 set. 2023.

MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D. M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. **EMBRAPA**, 2018. Comunicado Técnico, 427. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/191253/1/CT-427-1572-final2.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2022.

McGOVERN, S.L; CASELLI, E.; GRIGORIEFF, N.; SHOICHET, B.K. A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening. **Journal Medicinal Chemistry**, v.45, n.8, 2002, p. 1712-1722. Disponível em: <https://doi:10.1021/jm010533y> Acesso em: 23 set. 2023.

MILLIES, B. *et al.*; Proline-based allosteric inhibitors of Zika and Dengue virus NS2B/NS3 proteases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 11359–11382. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01697>. Acesso em: 19 jul. 2022.

MORTIMER, C. G. *et al.*; Antitumor Benzothiazoles. 26.12-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-fluorobenzothiazole (GW 610, NSC 721648), a Simple Fluorinated 2-Arylbenzothiazole, Shows Potent and Selective Inhibitory Activity against Lung, Colon, and Breast Cancer Cell Lines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n.1, p.179–185, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm050942k>. Acesso em: 19 jul. 2022.

MUEGGE I.; HEALD S.L.; BRITTELLI, D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. **Journal Medicinal Chemistry**, v.44, 2001; p. 1841–1846. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm015507e>. Acesso em: 23 set. 2023.

MUKHOPADHYAY, S; KUHN, R.J; ROSSMANN, M.G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Review Microbiology**, v. 3, n.1, p. 13-22, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>. Acesso em: 19 jul. 2022.

MYLARI, B.L *et al.*; Novel, potent aldose reductase inhibitors: 3,4-dihydro-4-oxo-3-[[5-(trifluoromethyl)-2-benzothiazolyl] methyl]-1-phthalazineacetic acid (zopolrestat) and congeners. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.34, n.1, p.108-122. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm00105a018>. Acesso em: 19 jul. 2022.

OLIVEIRA, A. G. *et al.*; Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 314-319, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000200018>. Acesso em: 22 jun. 2022.

PARDY, R.D; RICHER, M.J; Zika Virus Pathogenesis: From Early Case Reports to Epidemics. **Viruses**, v.11, n.10 p.886, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v11100886>. Acesso em: 19 jul. 2022.

PAULAI, F. R.; SERRANO, S. H.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p.1013-1020, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400032>. Acesso em: 19 jul. 2022.

RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SING, S.K.; FLAVIVIRUS NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. **Virology Journal**, v. 13, n. 131, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7> Acesso em: 23 set. 2023.

RODNEY *et al.* 4-Chlorophenylthioacetone-derived thiosemicarbazones as potent antitrypanosomal drug candidates: Investigations on the mode of action. **Bioorganic Chemistry**, v.113, 2021; p.105018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105018> Acesso em: 23 set. 2023.

SAMPAIO, G. S. *et al.*; Expansão da circulação do vírus Zika da África à América, 1947- 2018: revisão da literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.28, n.2, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742019000200022>. Acesso em: 19 jul. 2022.

SHIRYAEV, S.A.; CIEPLAK, P.; CHELTSOV, A.; LIDDINGTON, R.C.; TERSKIKH, A.V. Dual Function of Zika vírus NS2B-NS3 protease. **bioRxiv**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2021.11.28.470275>. Acesso em: 23 set. 2023.

SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, n.4, p.335-338, 1964. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(64\)90200-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(64)90200-7). Acesso em: 18 jul. 2022.

TAKAKURA, H. Molecular Design of d-Luciferin-Based Bioluminescence and 1,2-Dioxetane-Based Chemiluminescence Substrates for Altered Output Wavelength and Detecting Various Molecules. **Molecules**, v. 26, n. 6, p.1618, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26061618>. Acesso em: 19 jul. 2022.

TAN, T.Y. *et al.*; Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. **Nature Communications**, v.11, n.895, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14647-9> . Acesso em: 19 jul. 2022.

THOMAS, K.D. *et al.*; New quinolin-4-yl-1,2,3-triazoles carrying amides, sulphonamides and amidopiperazines as potential antitubercular agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, n. 6, p. 2503–2512, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.03.039>. Acesso em: 19 jul. 2022.

VEBER D.F.; JOHNSON S.R.; CHENG H.-Y.; SMITH B.R.; WARD, K.W.; KOPPLE, K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 45, 2002, p. 45:2615–2623. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm020017n> Acesso em: 23 set. 2023.

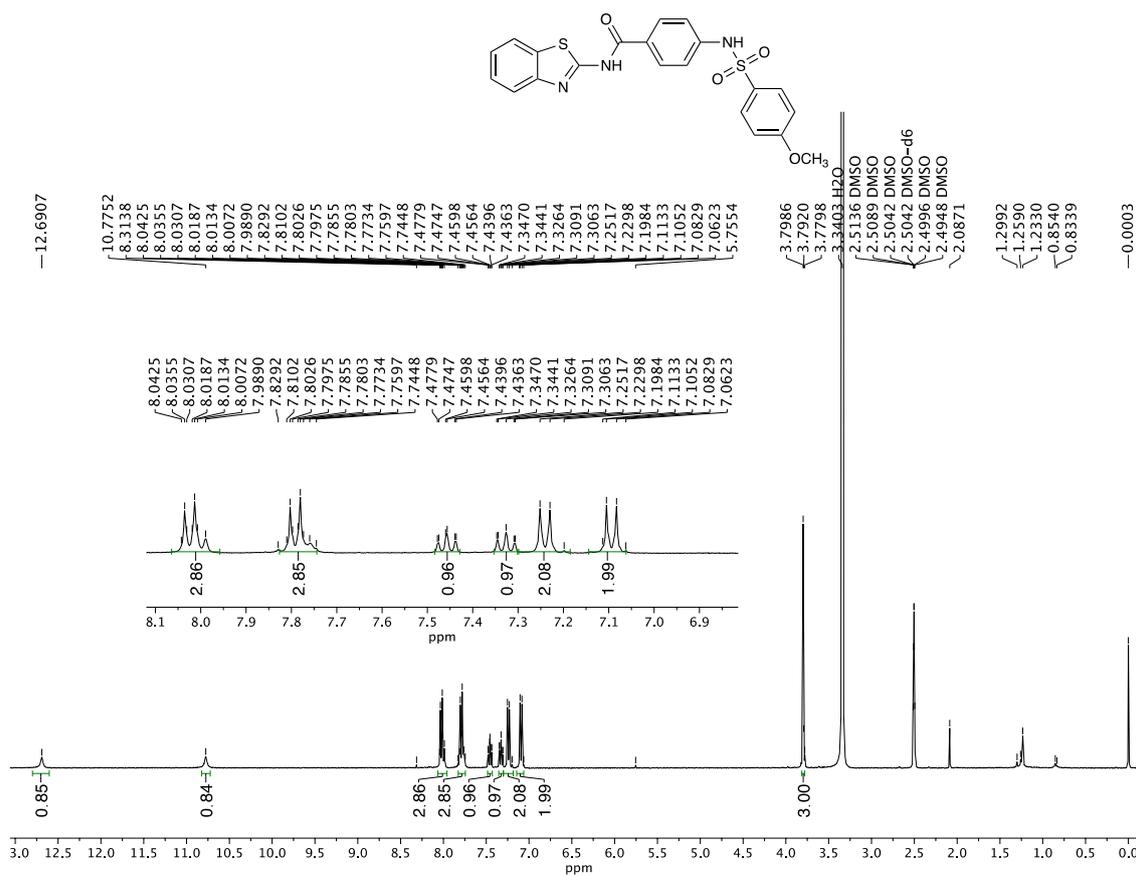
VOSS, S.; NITSCHKE, C. Inhibitors of the Zika virus protease NS2B-NS3. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.30, n.5, 2020. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.126965>. Acesso em: 19 jul. 2022.

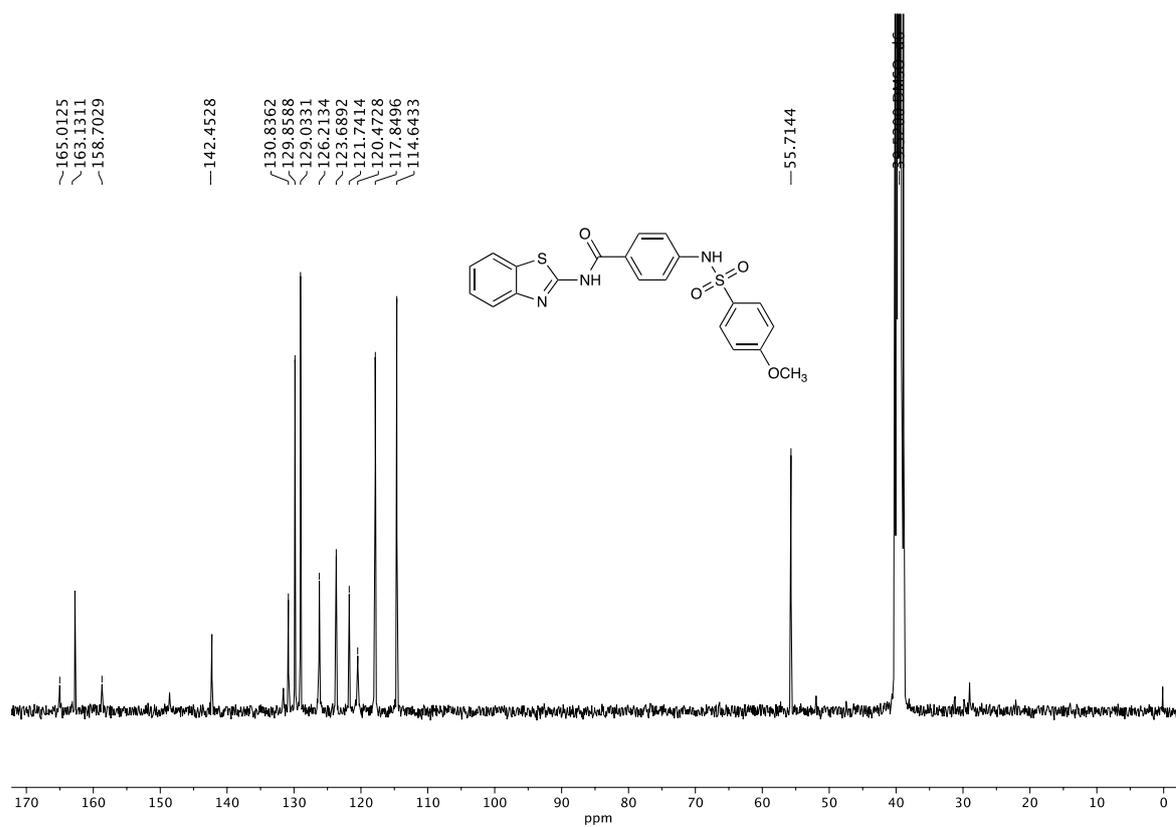
WANG, B.; THURMOND, S.; HAI, R., Song, J. Structure and function of Zika virus NS5 protein: perspectives for drug design. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.75, p.1723–1736, 2018. disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2751-x>. Acesso em: 23 set. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022. Ten threats to global health. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>. Acesso em: 20 jan. 2022.

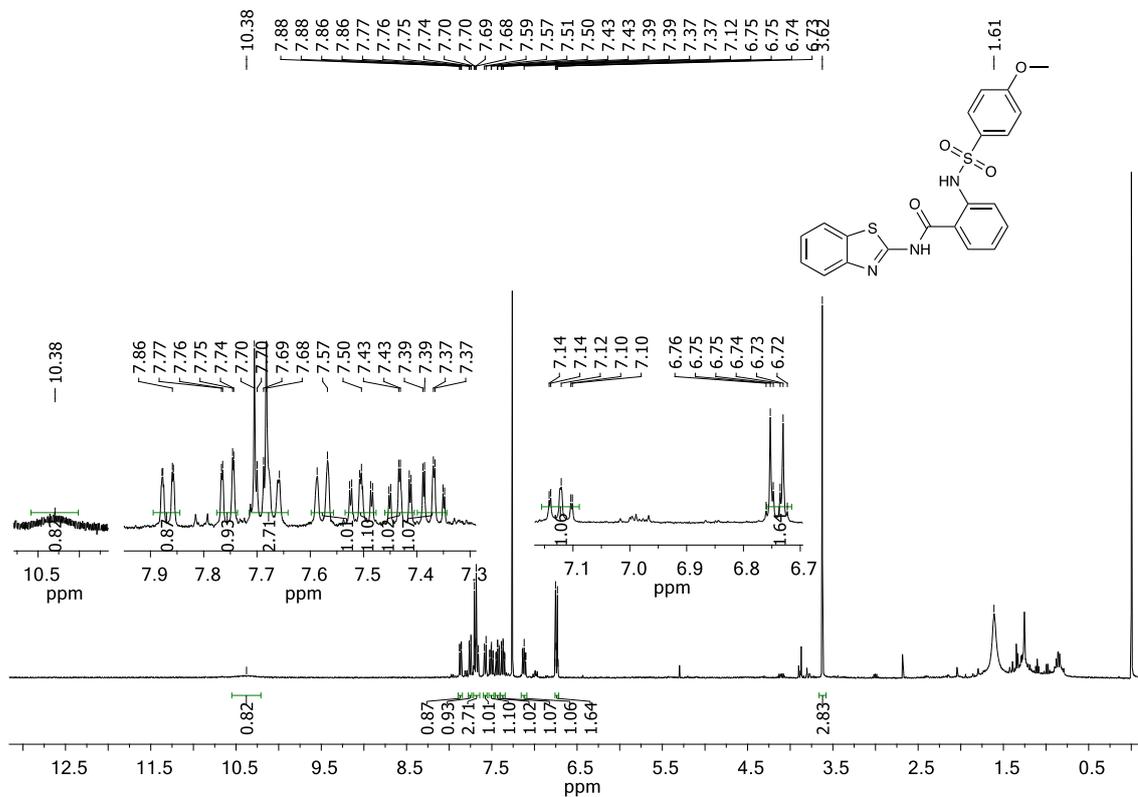
XIE, X.; ZOU, J.; PUTTIKHUNT, C., YUAN, Z.; SHI, PY. Two distinct sets of NS2A molecules are responsible for dengue virus RNA synthesis and virion assembly. **Journal Virology**, v. 89, n. 2, p.1298-313. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.02882-14>. Acesso em: 23 set. 2023.

7 ANEXOS

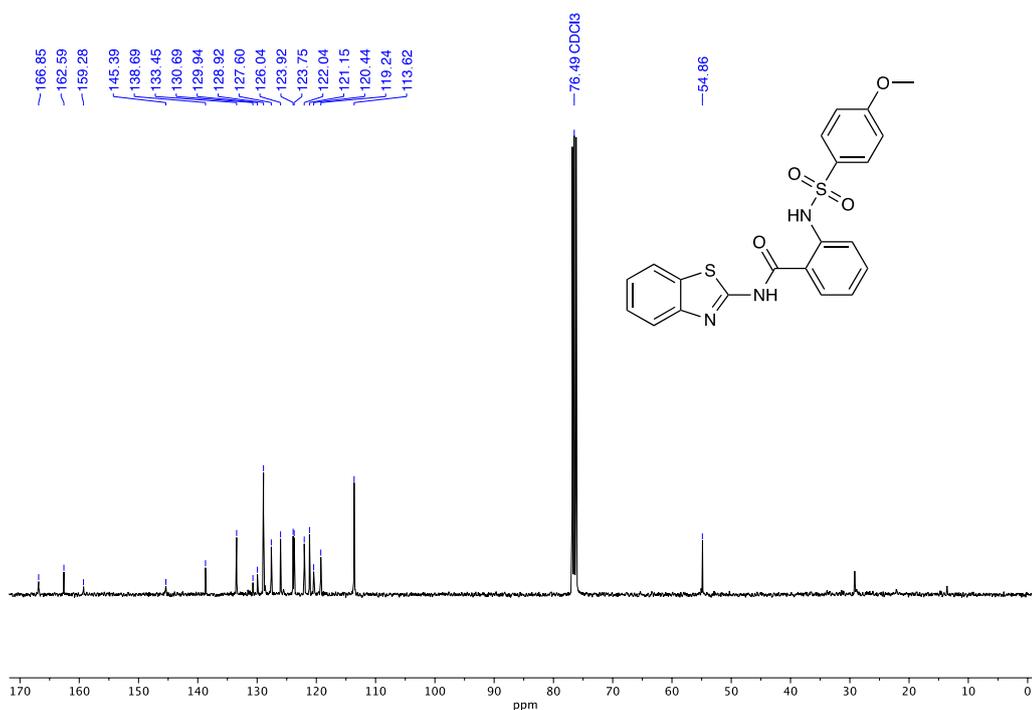
Anexo 1- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de 2

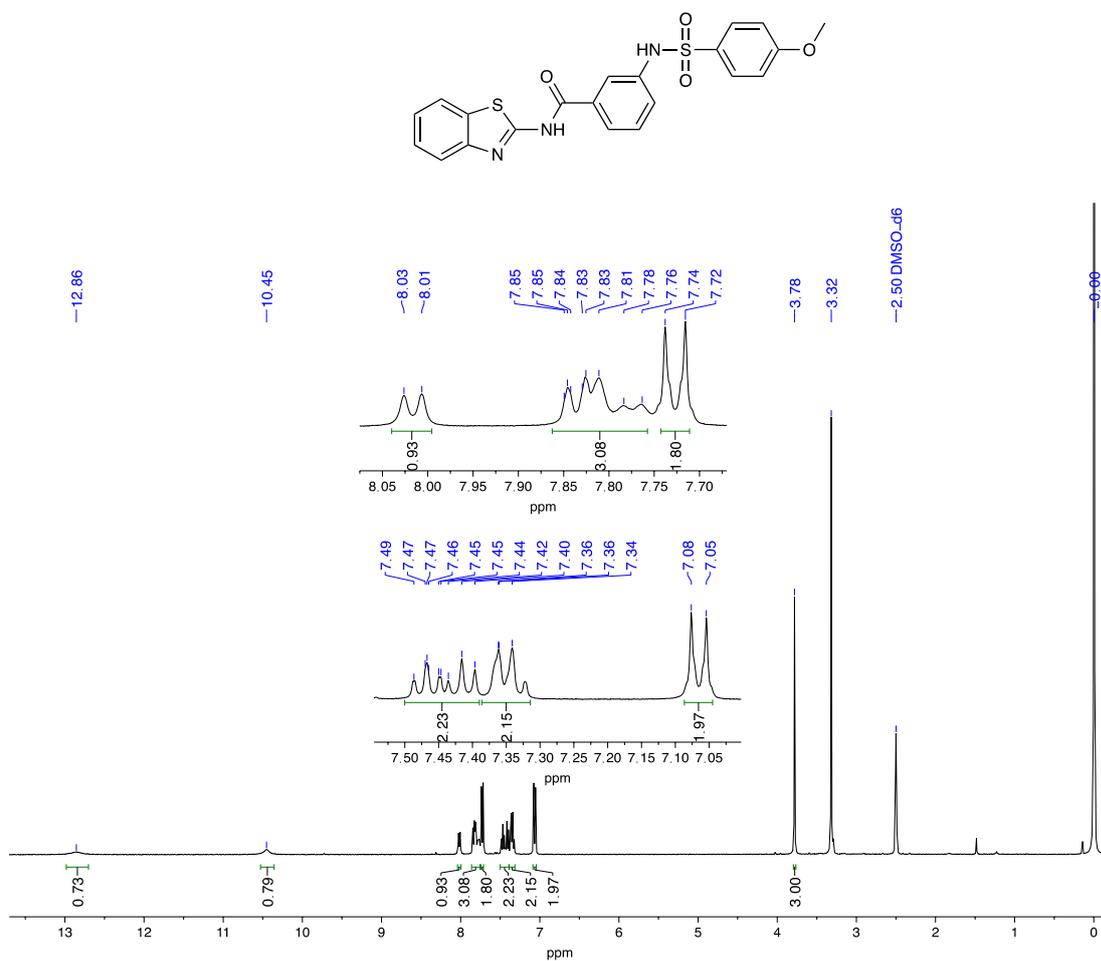
Anexo 2- Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) de 2

Anexo 3- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **32**

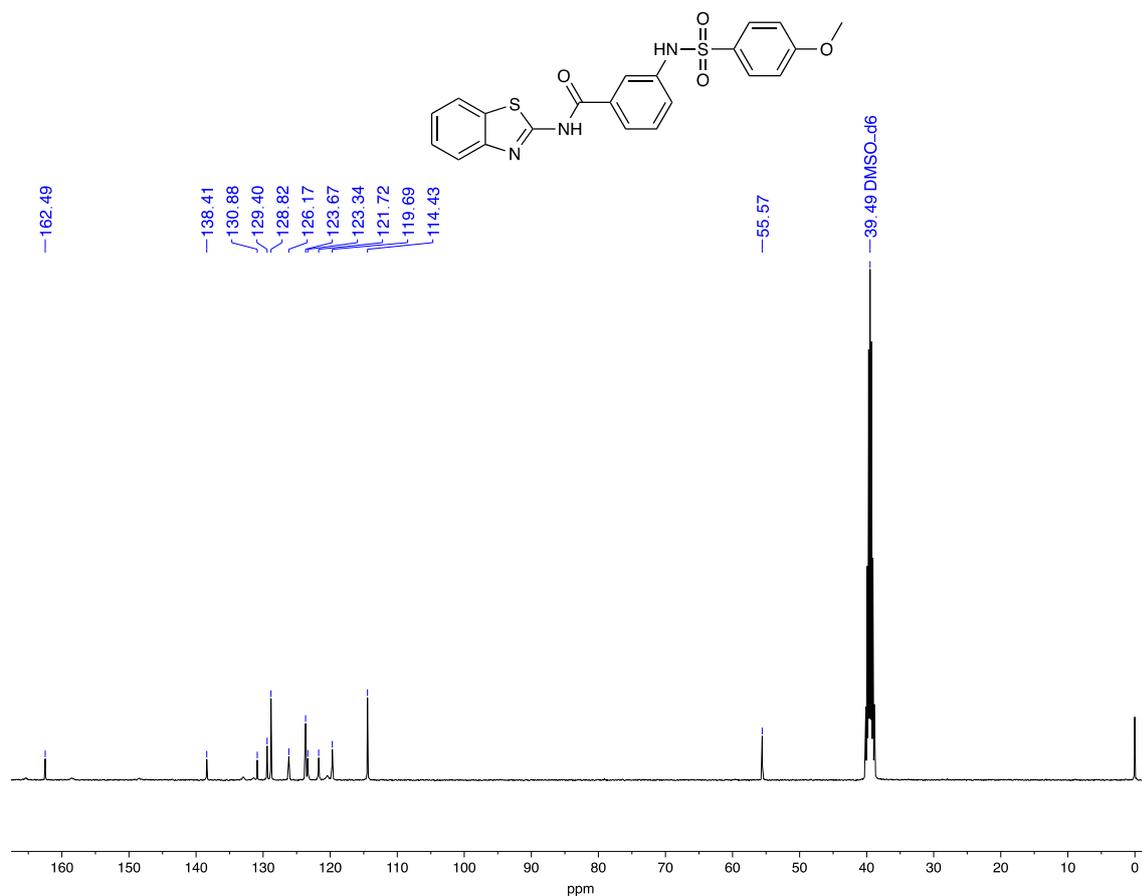


Anexo 4- Espectro de RMN ^{13}C de **32** (101 MHz, CDCl_3)

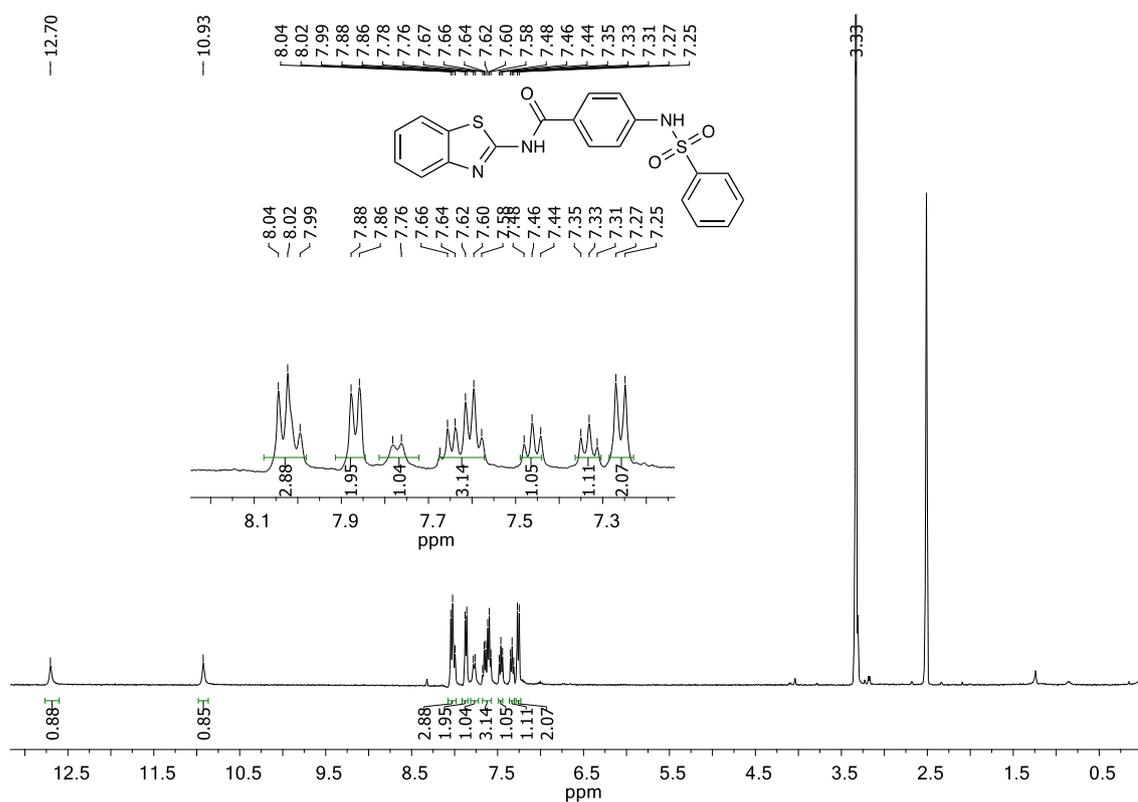


Anexo 5- Espectro de RMN ^1H de **33** (400 MHz, DMSO- d_6)

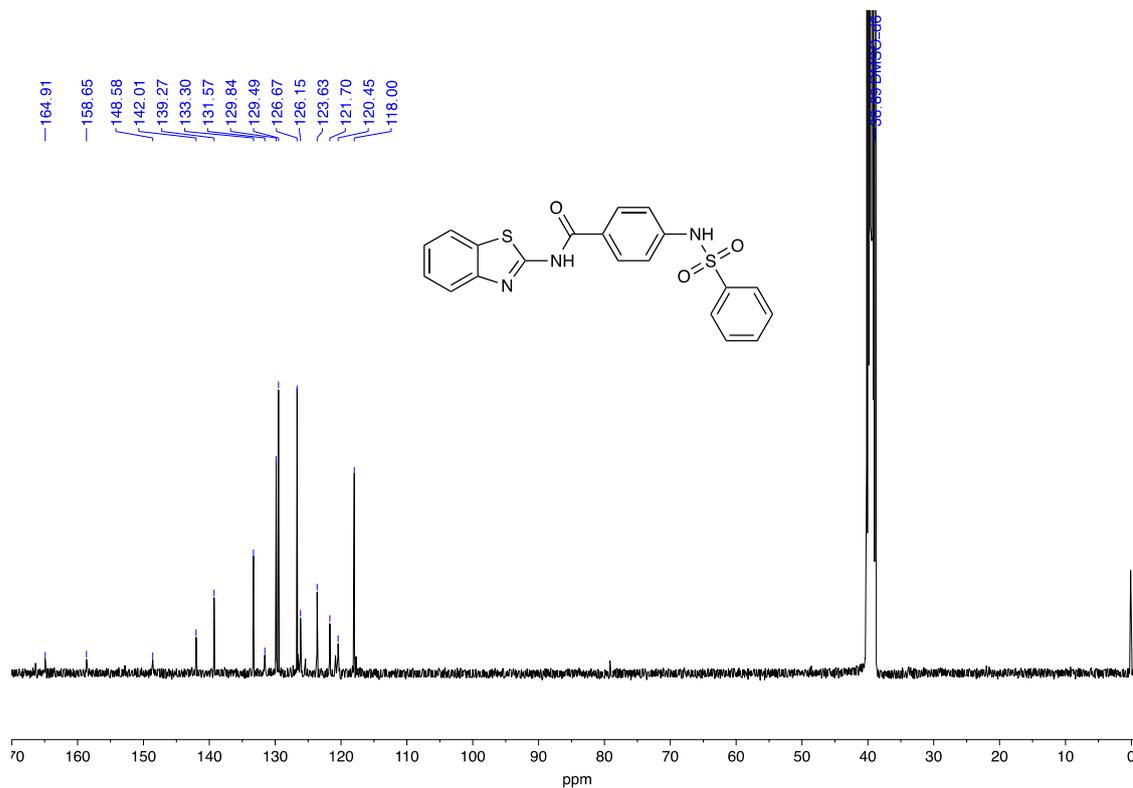
Anexo 6- Espectro de RMN ^{13}C de **33** (400 MHz, DMSO- d_6)



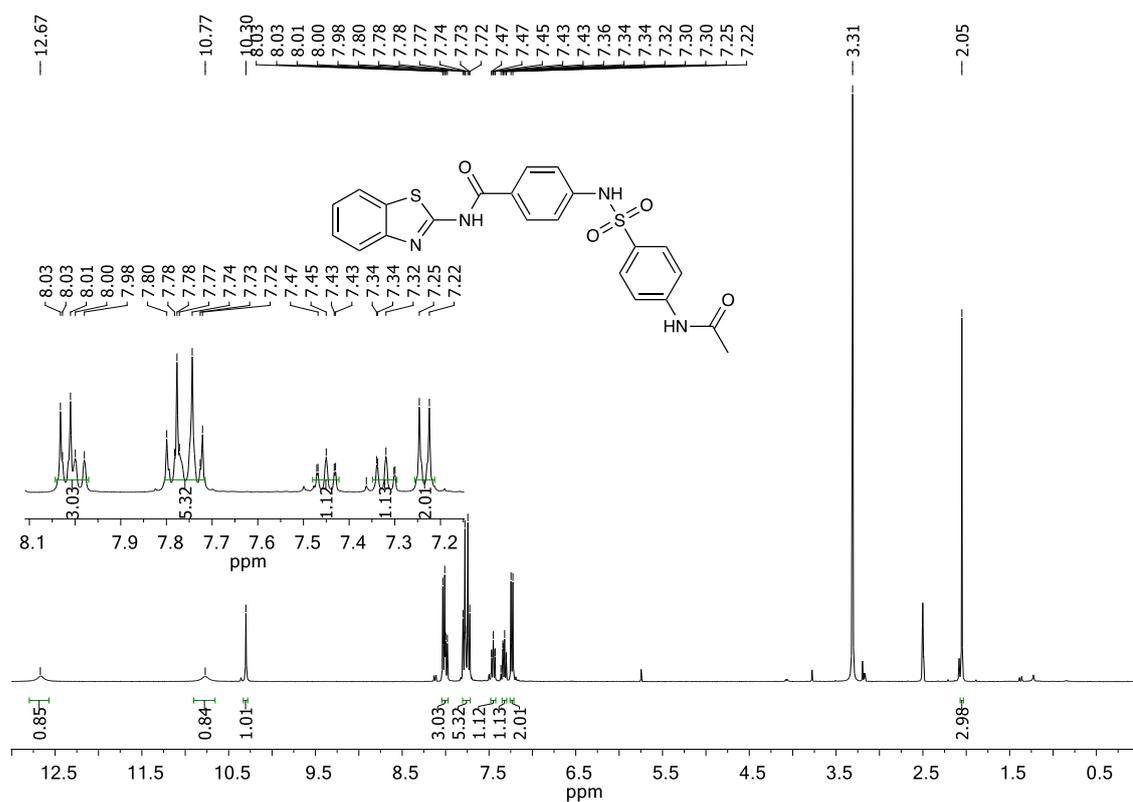
Anexo 7- Espectro de RMN ^1H de **38** (400 MHz, DMSO- d_6)



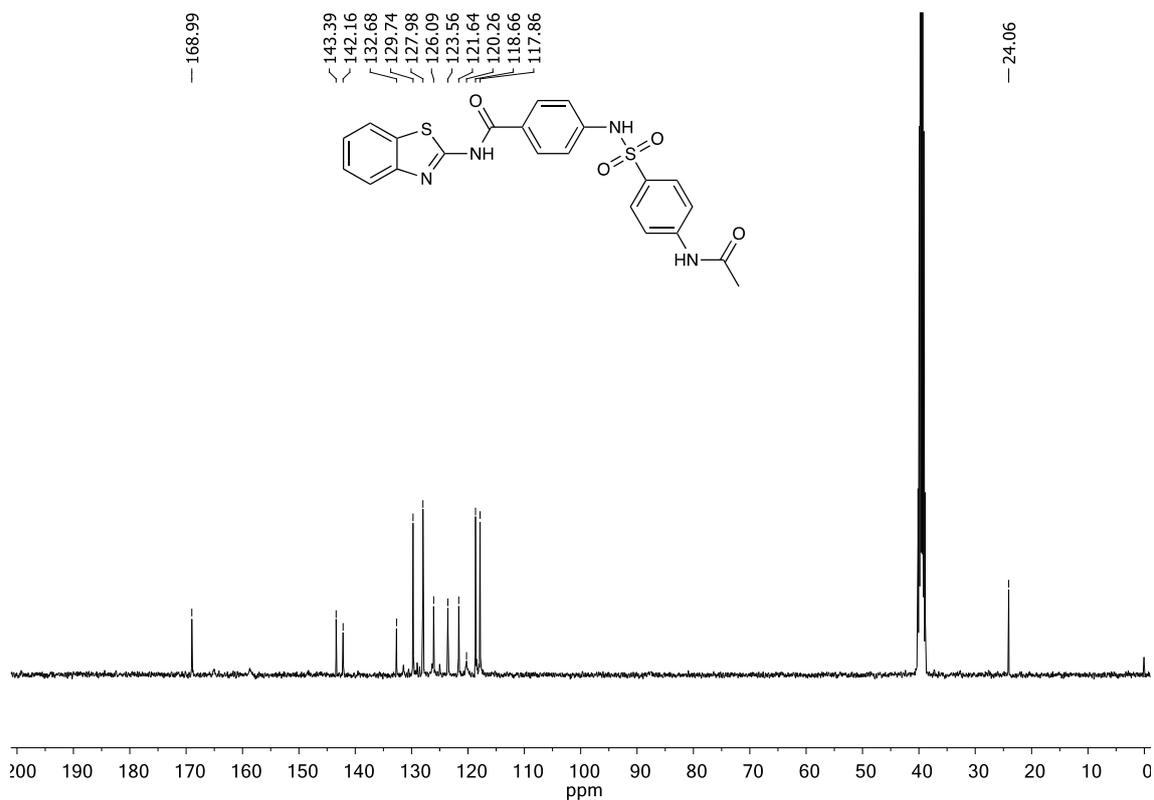
Anexo 8- Espectro de RMN ^{13}C de **38** (101 MHz, DMSO- d_6)



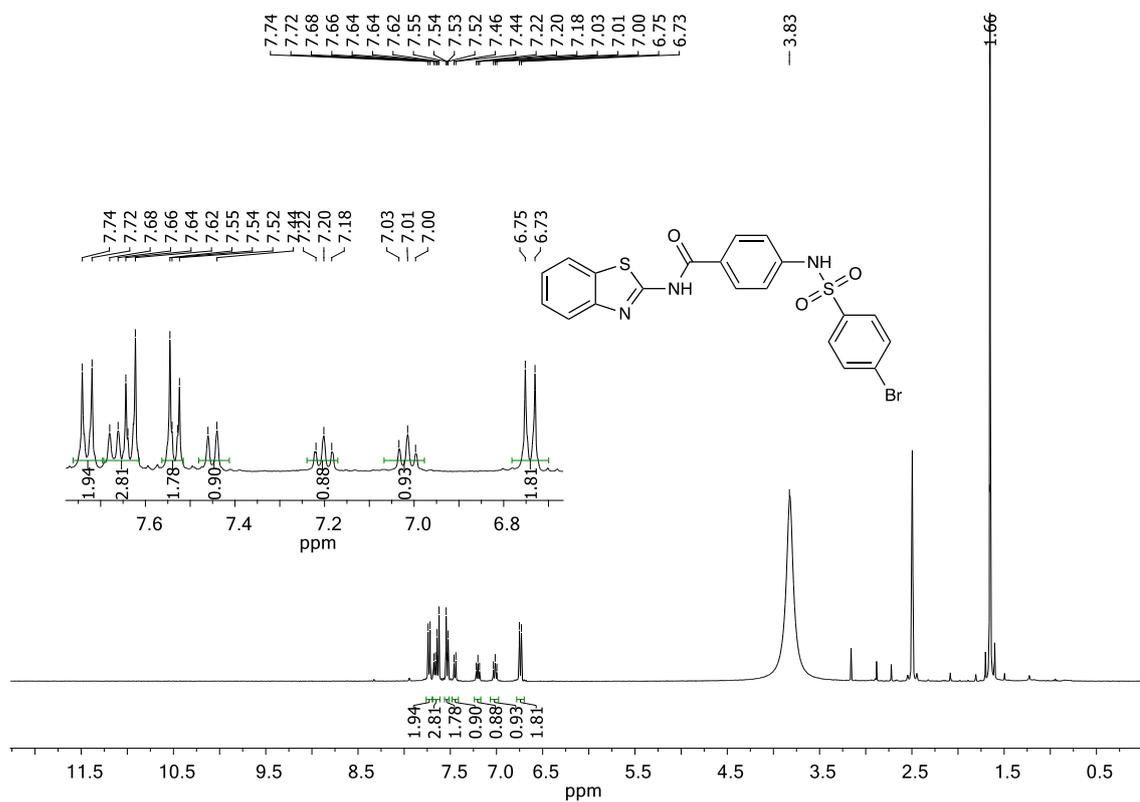
Anexo 9- Espectro de RMN ^1H de **39** (400 MHz, DMSO- d_6)



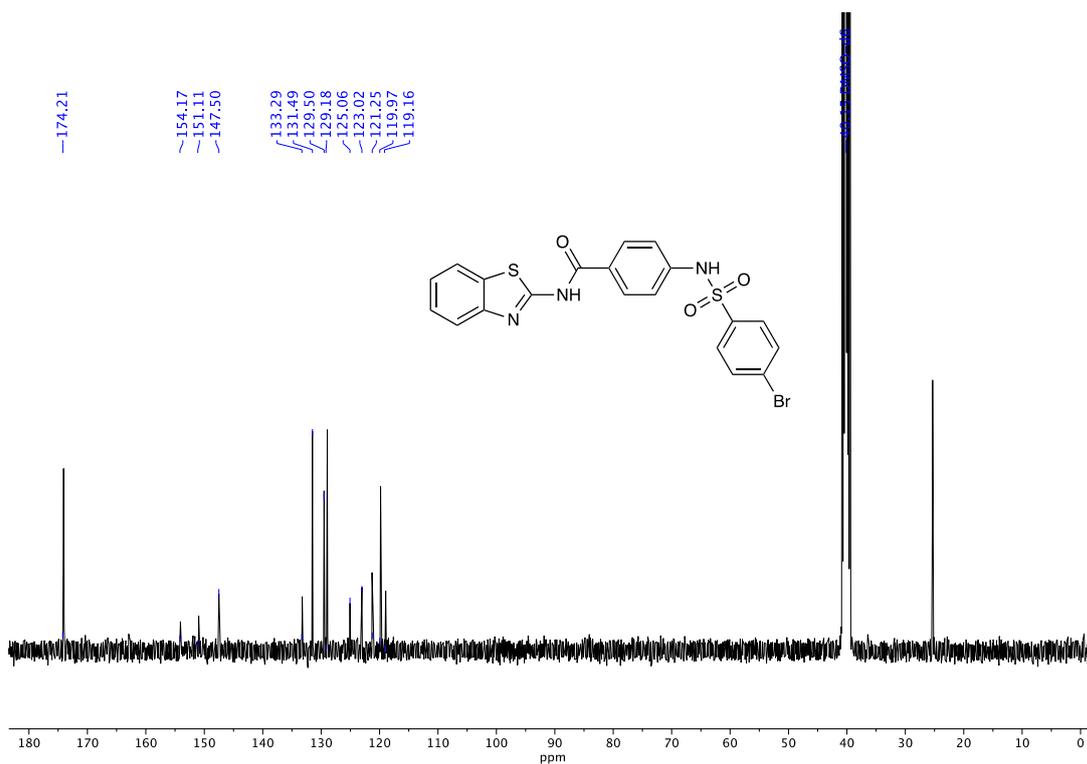
Anexo 10- Espectro de RMN de ^{13}C de **39** (101 MHz, DMSO- d_6)



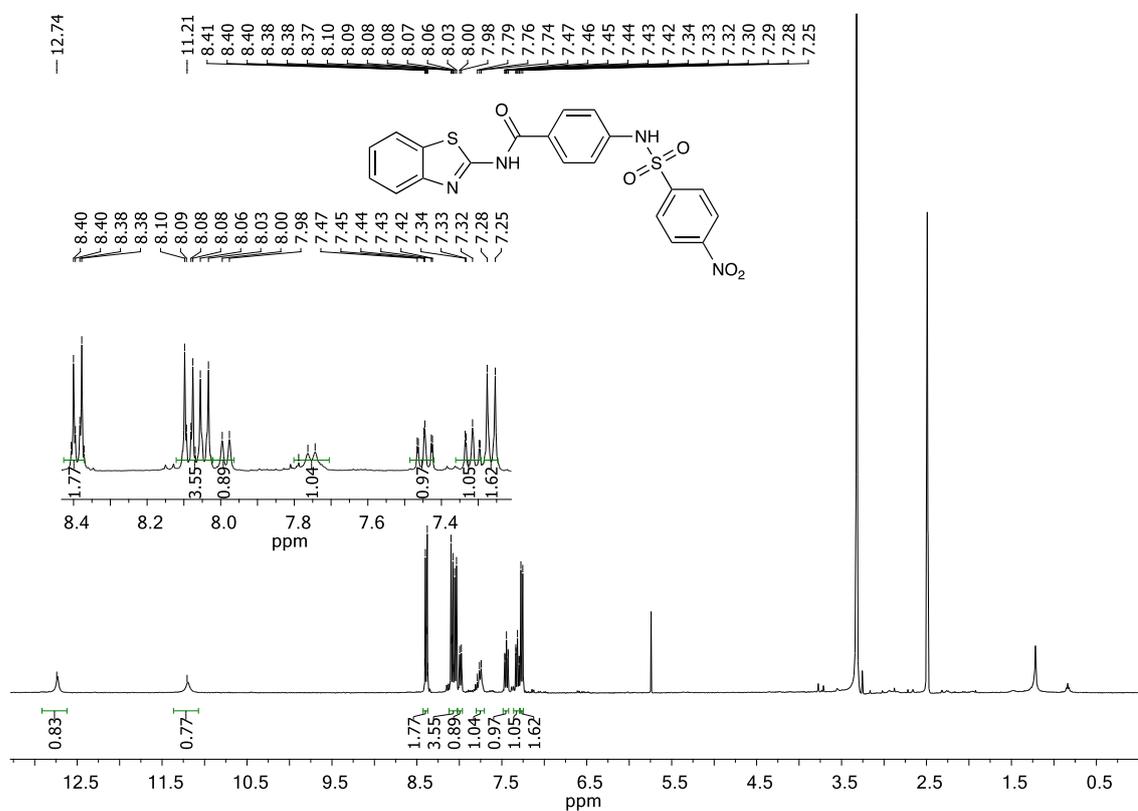
Anexo 11- Espectro de RMN de **40** (400 MHz, DMSO- d_6)



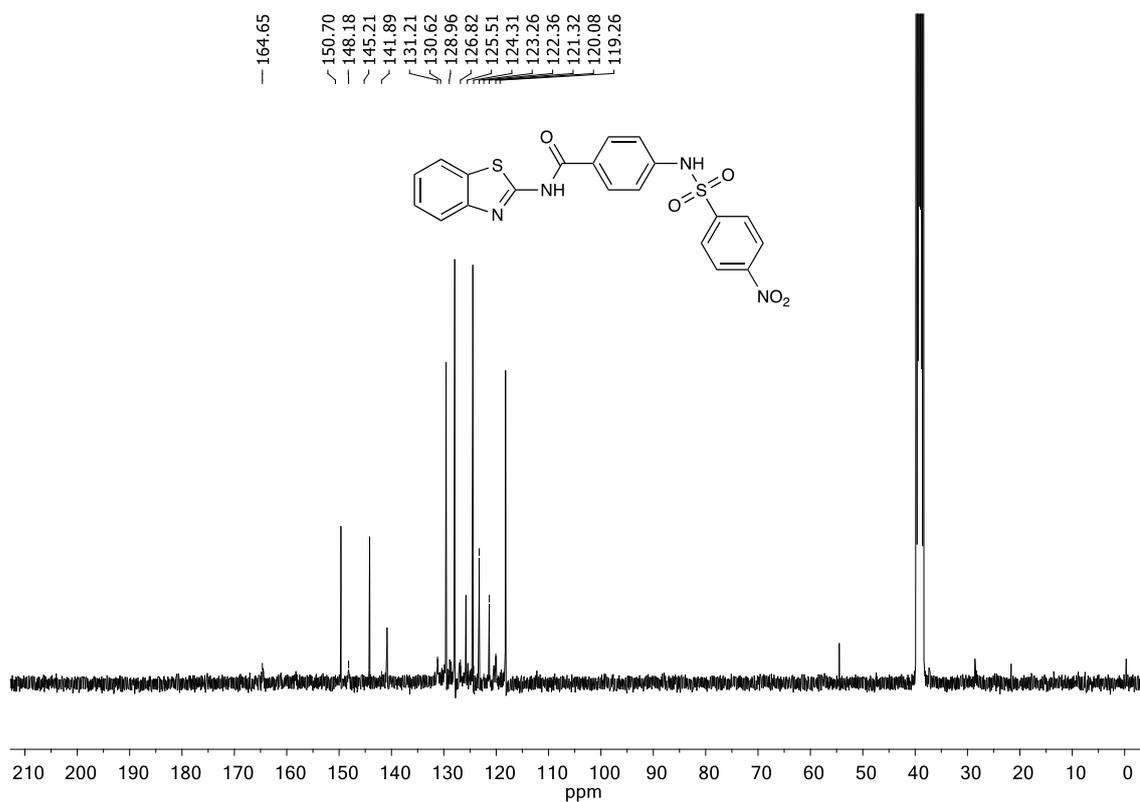
Anexo 12- Espectro de RMN ^{13}C de **40** (101 MHz, DMSO- d_6)



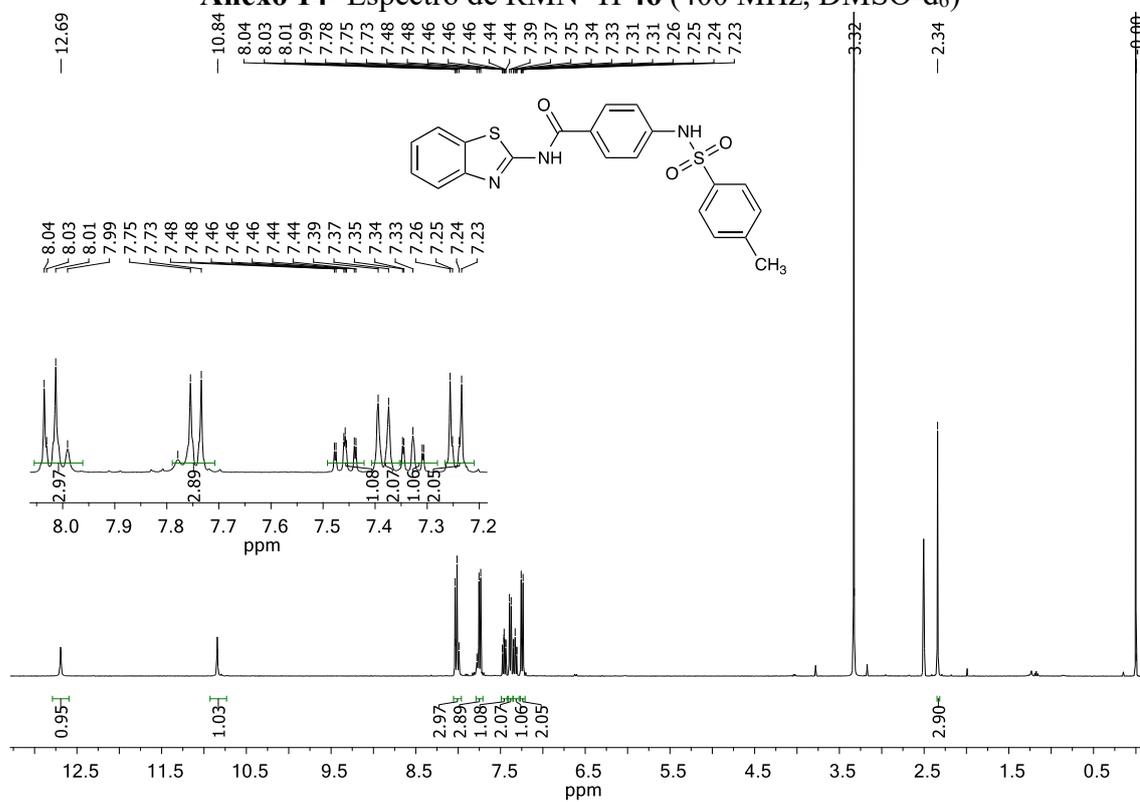
Anexo 13- Espectro de RMN ^1H de **41** (400 MHz, DMSO- d_6)



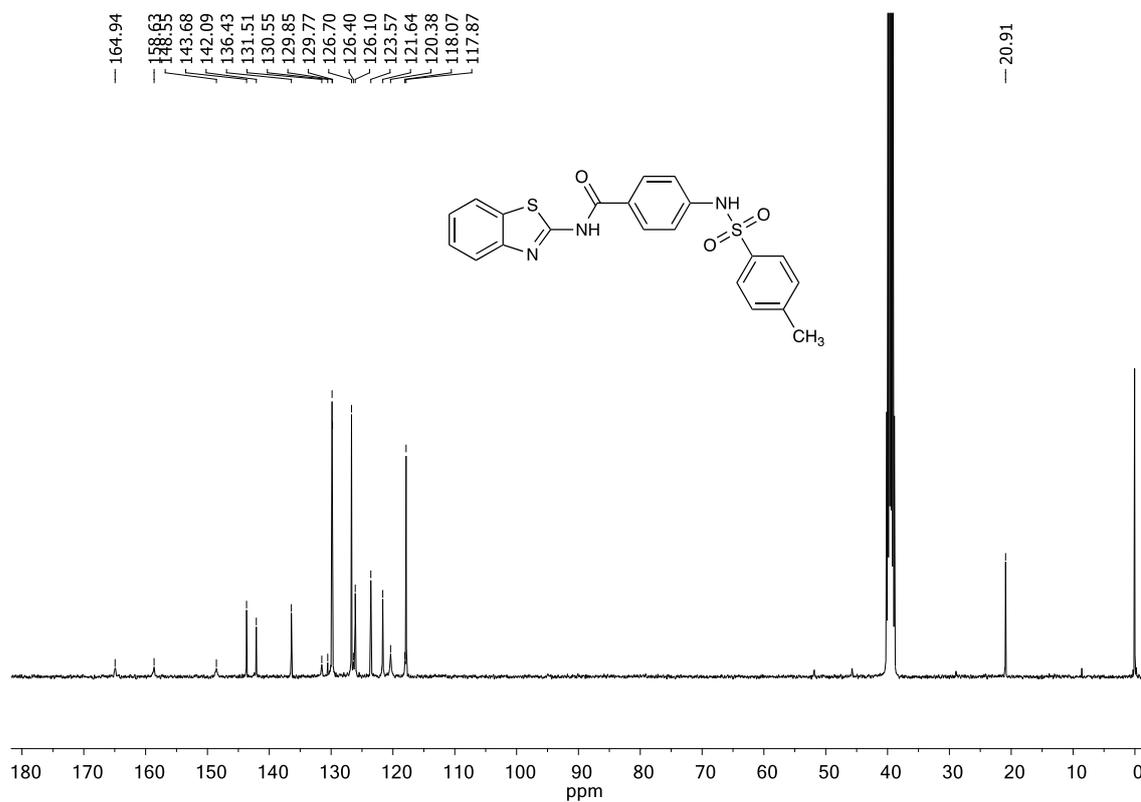
Anexo 13- Espectro de RMN ^{13}C 41 (101 MHz, DMSO- d_6)



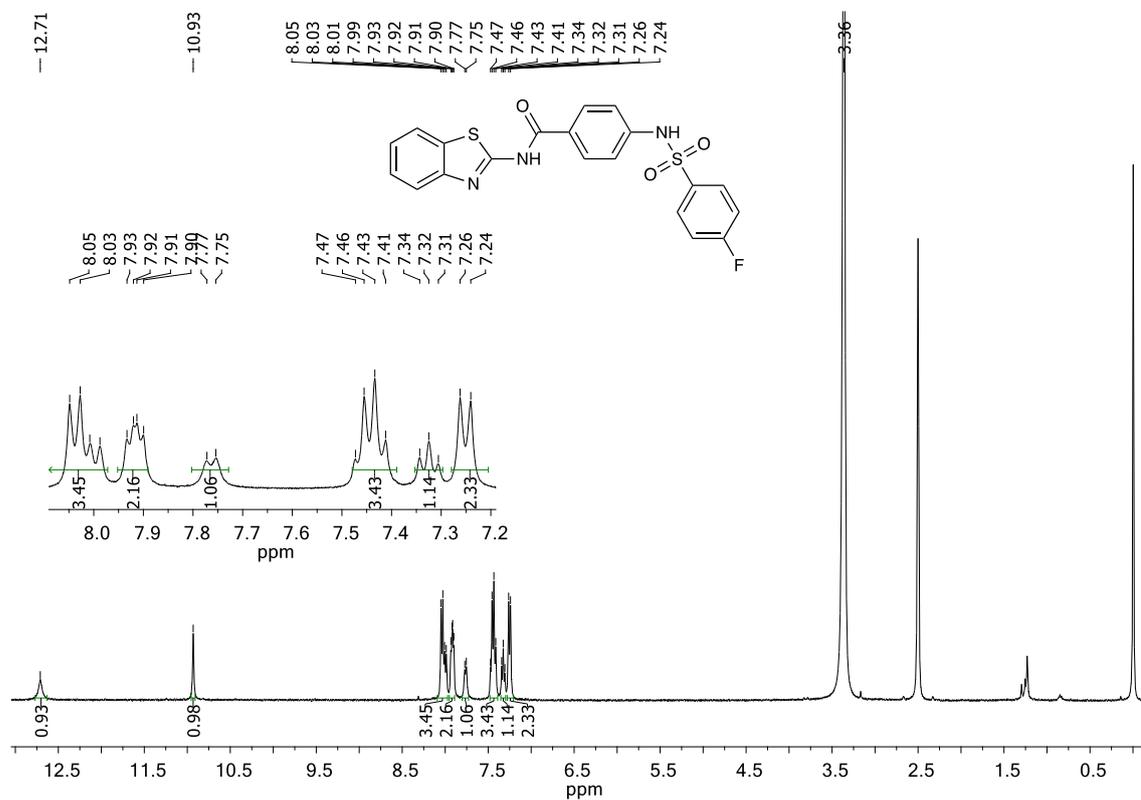
Anexo 14- Espectro de RMN ^1H 46 (400 MHz, DMSO- d_6)



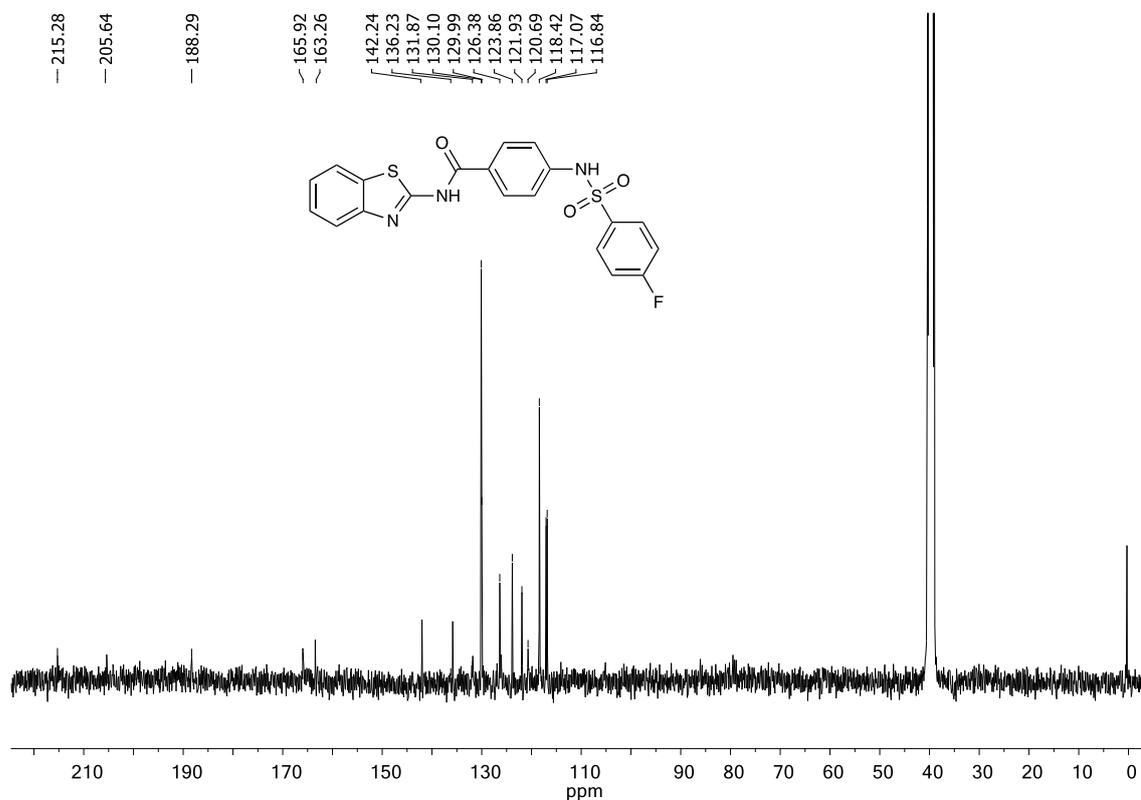
Anexo 15- Espectro de RMN ^{13}C 46 (101 MHz, DMSO- d_6)



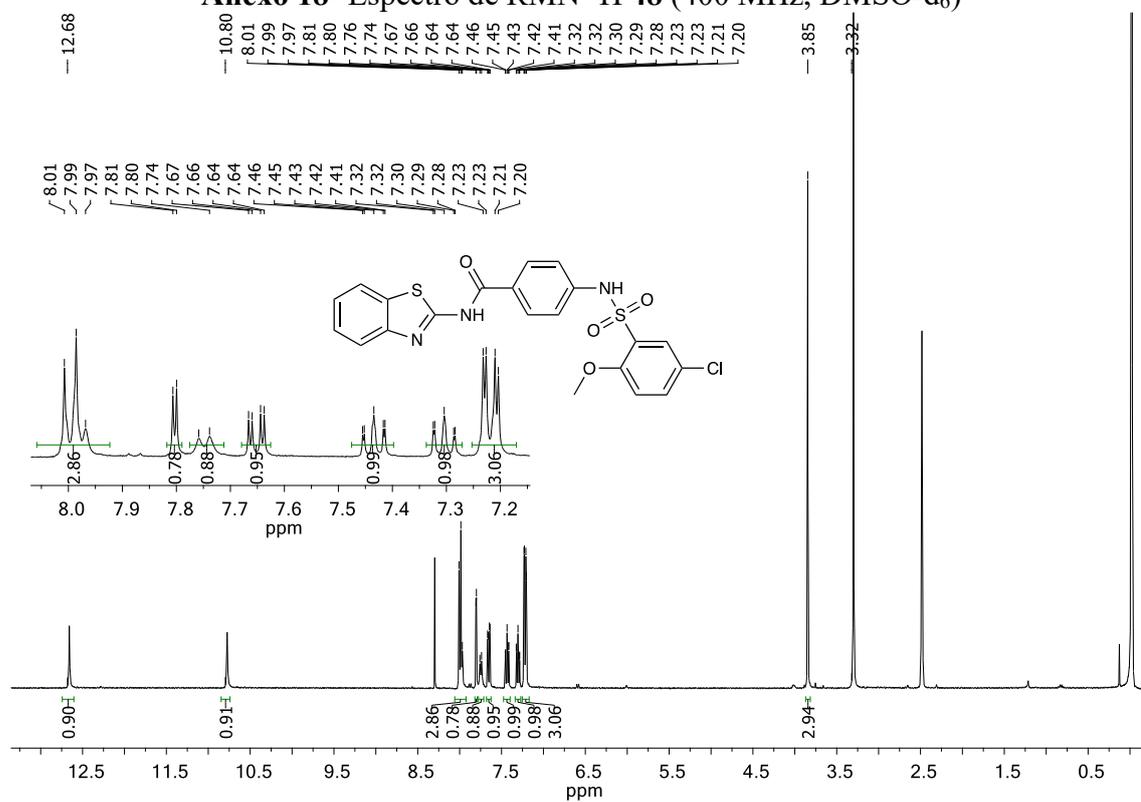
Anexo 16- Espectro de RMN 47(400 MHz, DMSO- d_6)



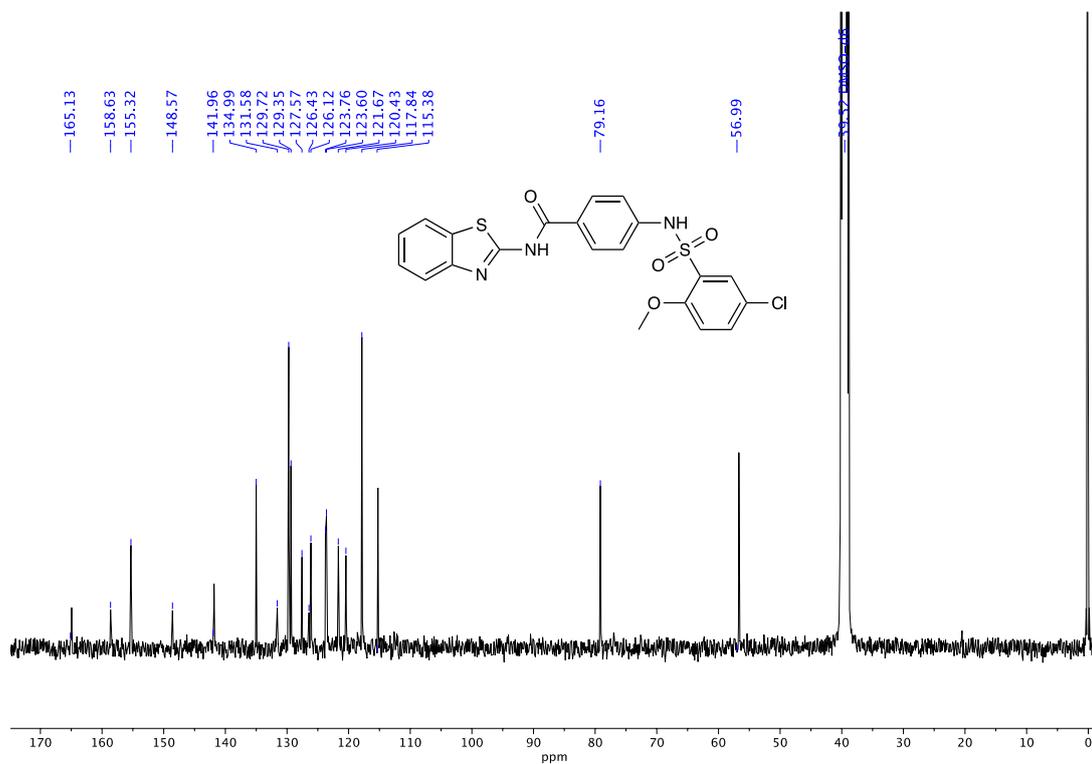
Anexo 17- Espectro de RMN ^{13}C 47 (101 MHz, DMSO- d_6)



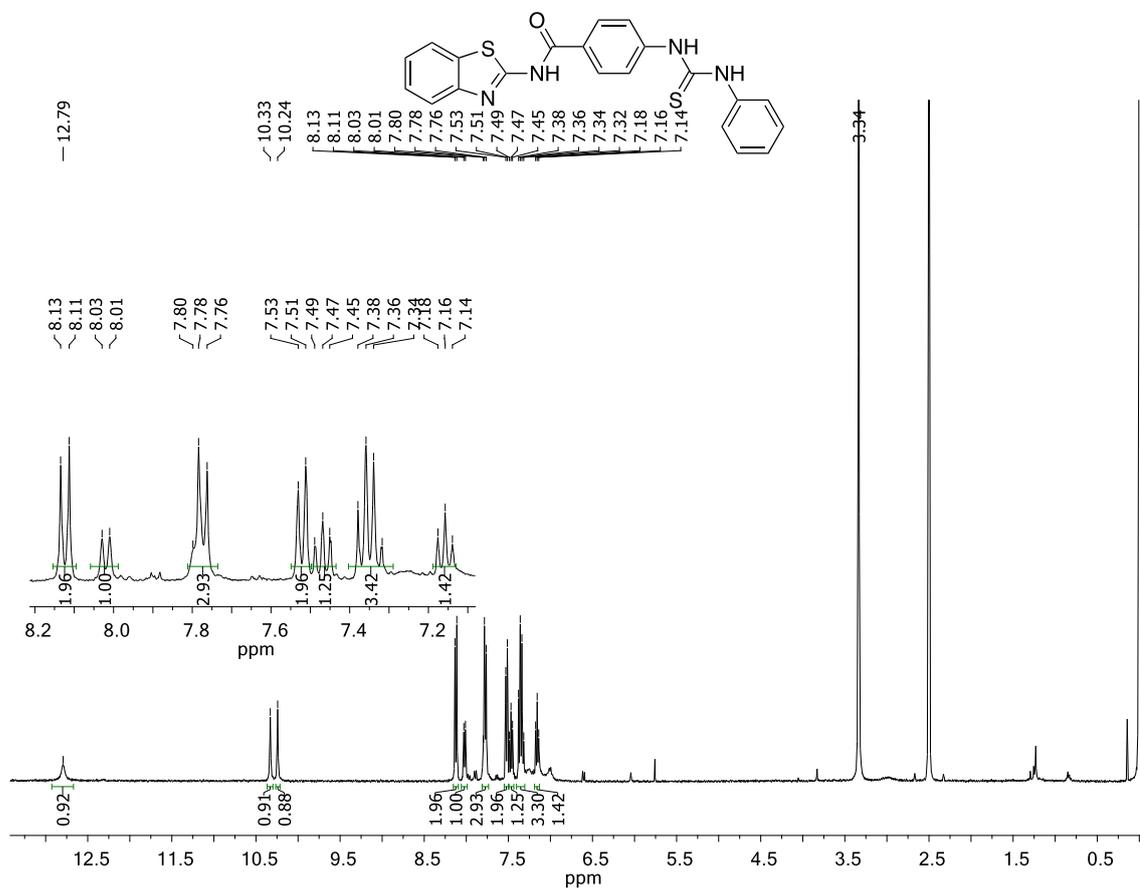
Anexo 18- Espectro de RMN ^1H 48 (400 MHz, DMSO- d_6)



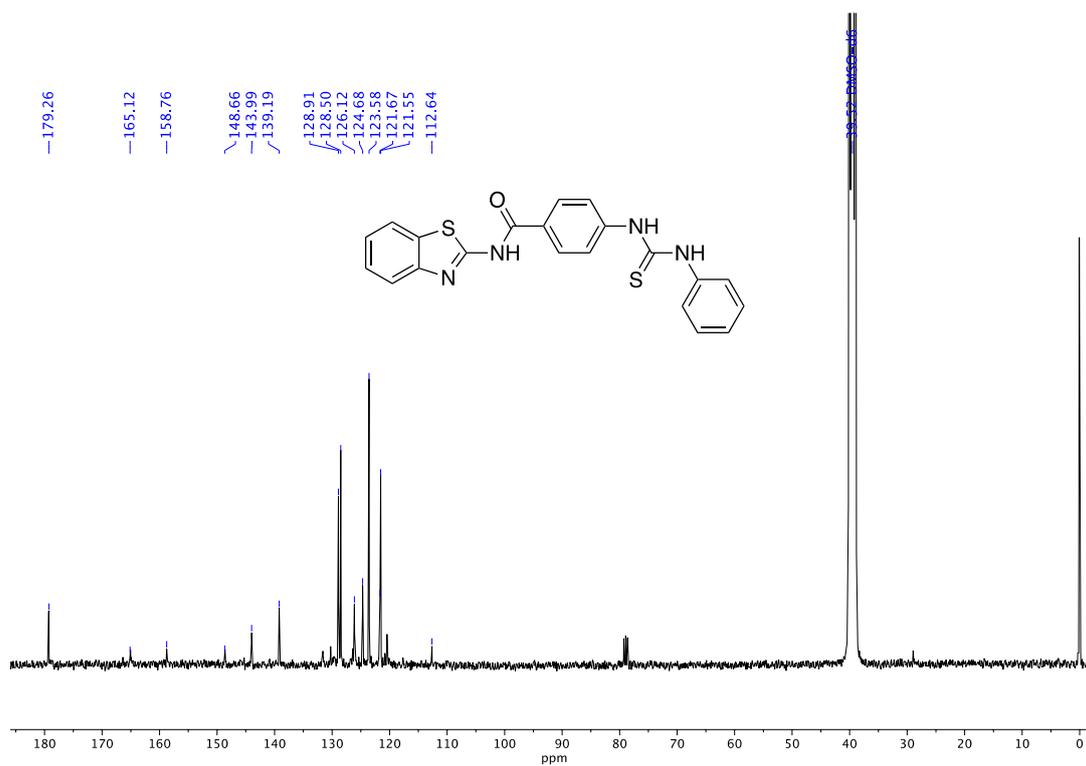
Anexo 19- Espectro de RMN ^{13}C 48 (101 MHz, DMSO- d_6)



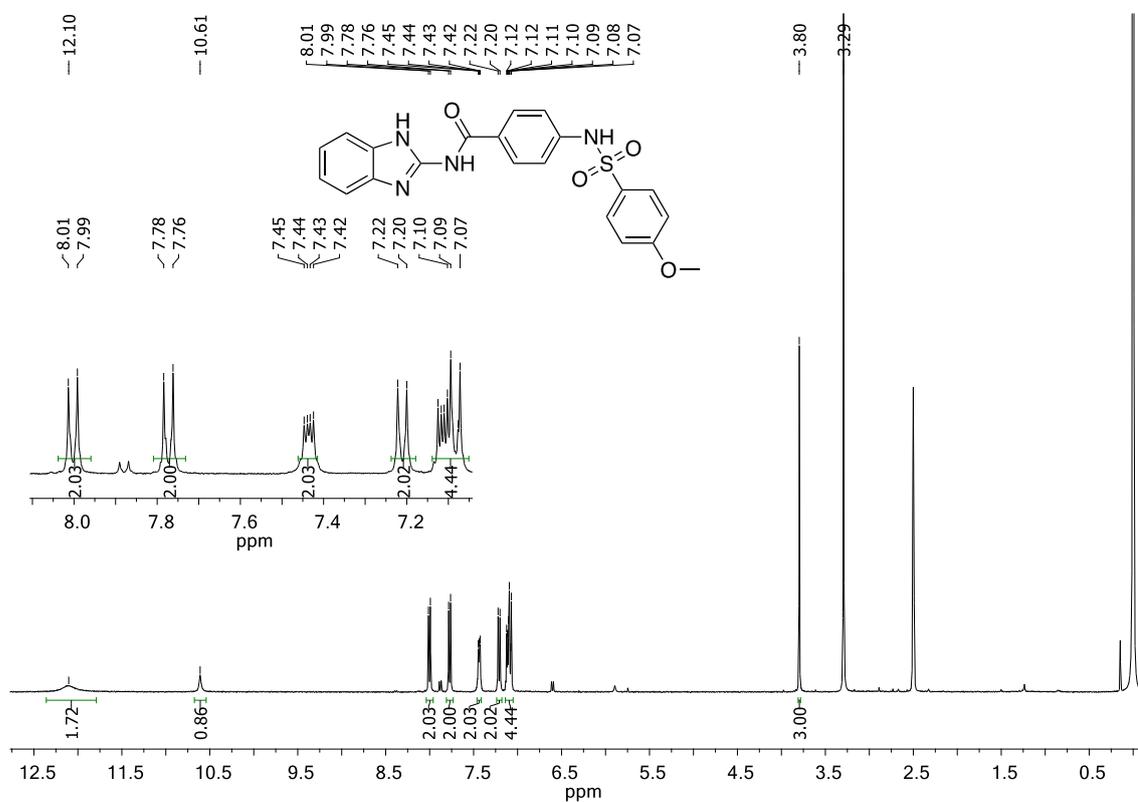
Anexo 20- Espectro de RMN ^1H 50 (400 MHz, DMSO- d_6)

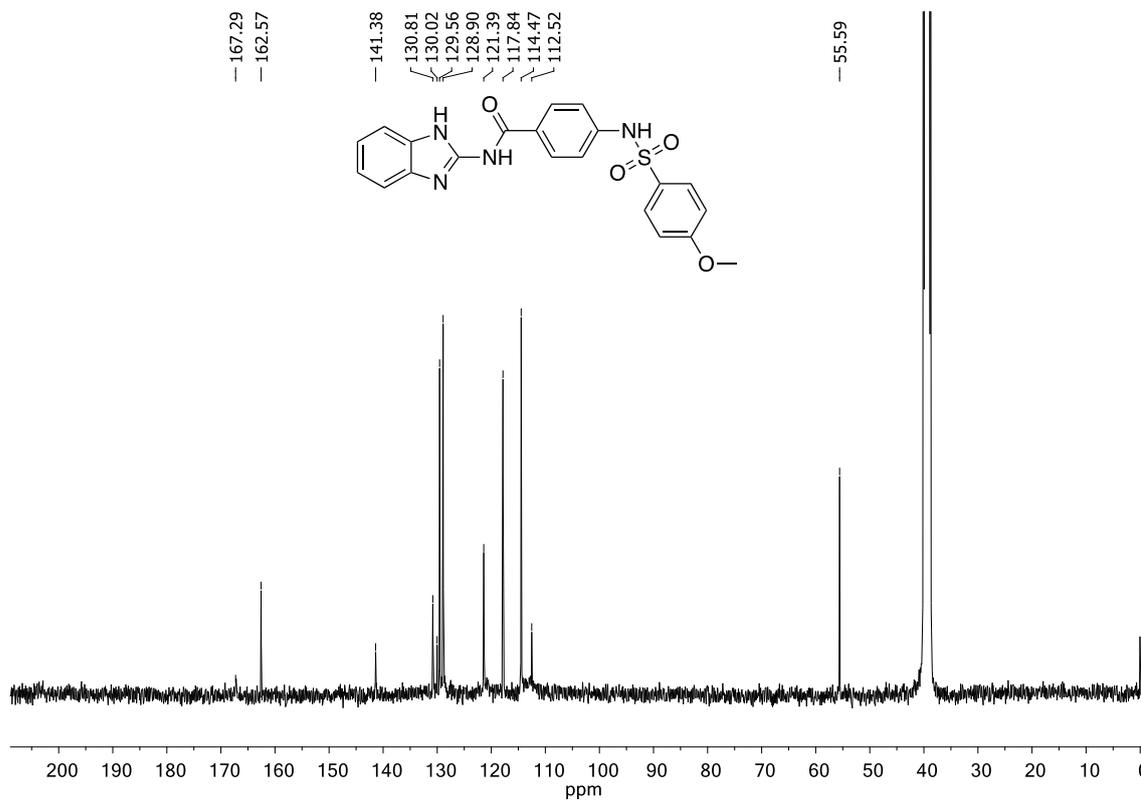
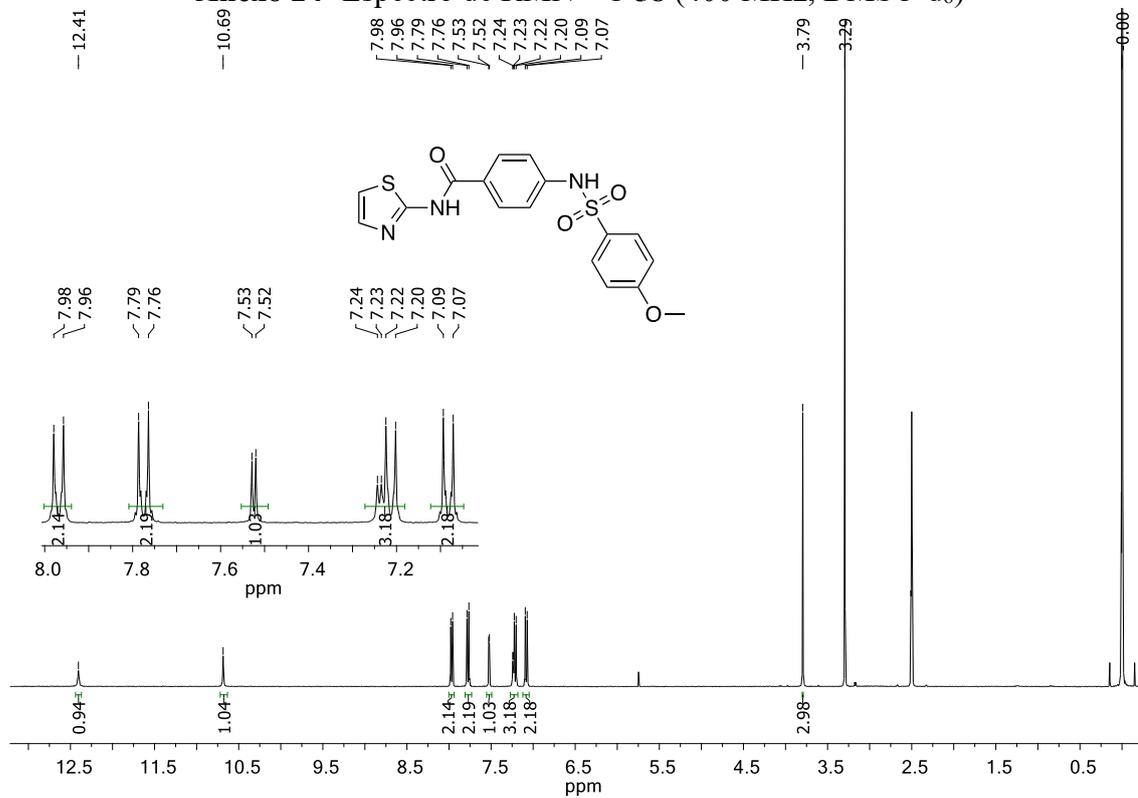


Anexo 21- Espectro de RMN ^{13}C 50 (101 MHz, DMSO- d_6)

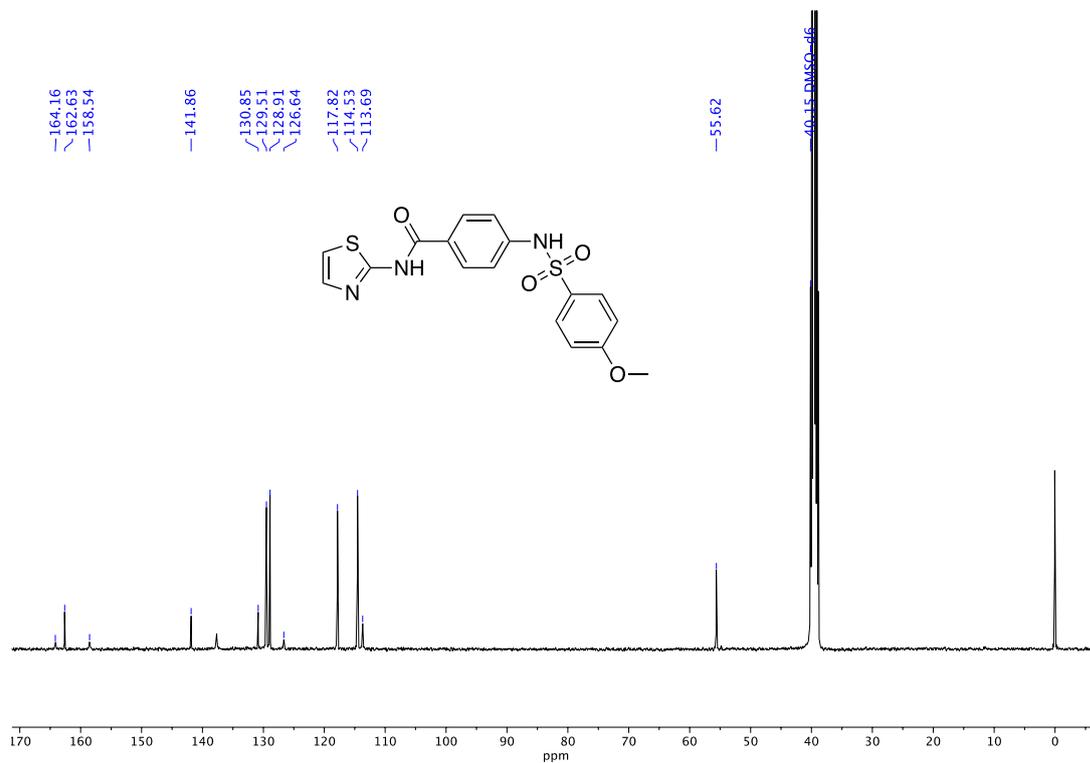


Anexo 22- Espectro de RMN ^{13}C 57 (400 MHz, DMSO- d_6)

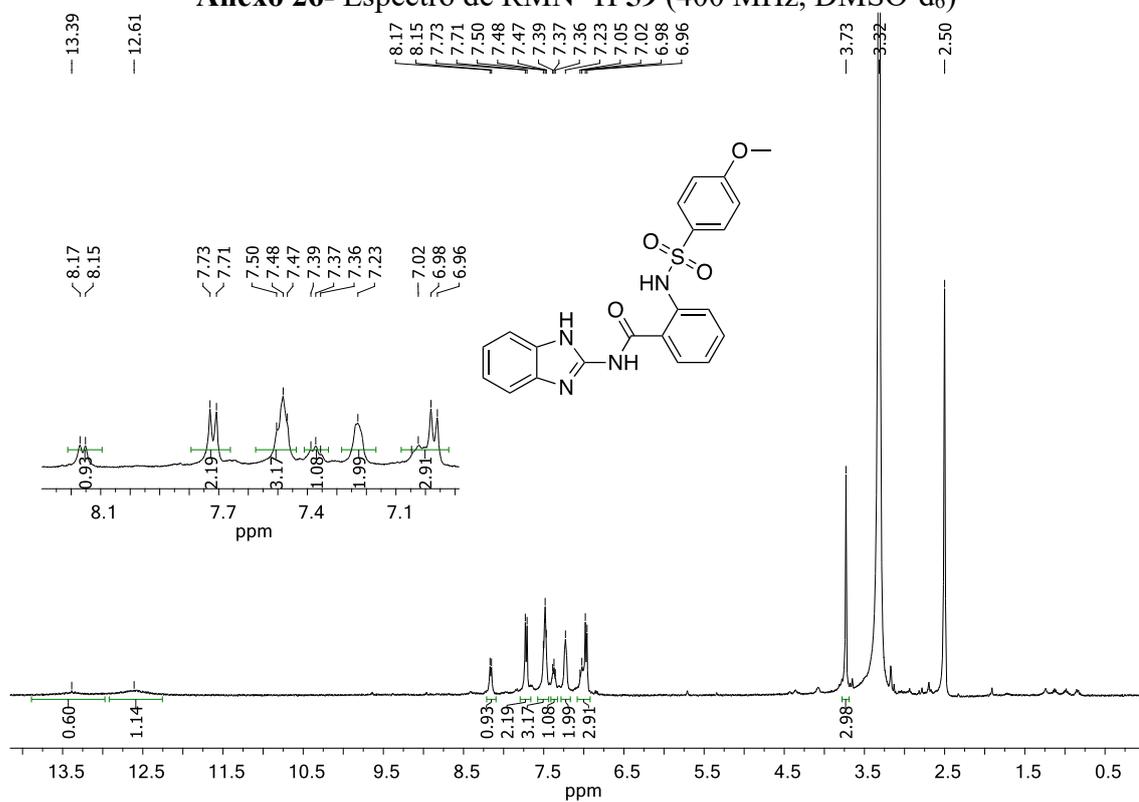


Anexo 23- Espectro de RMN ^{13}C 50 (101 MHz, DMSO- d_6) 57

Anexo 24- Espectro de RMN ^{13}C 58 (400 MHz, DMSO- d_6)


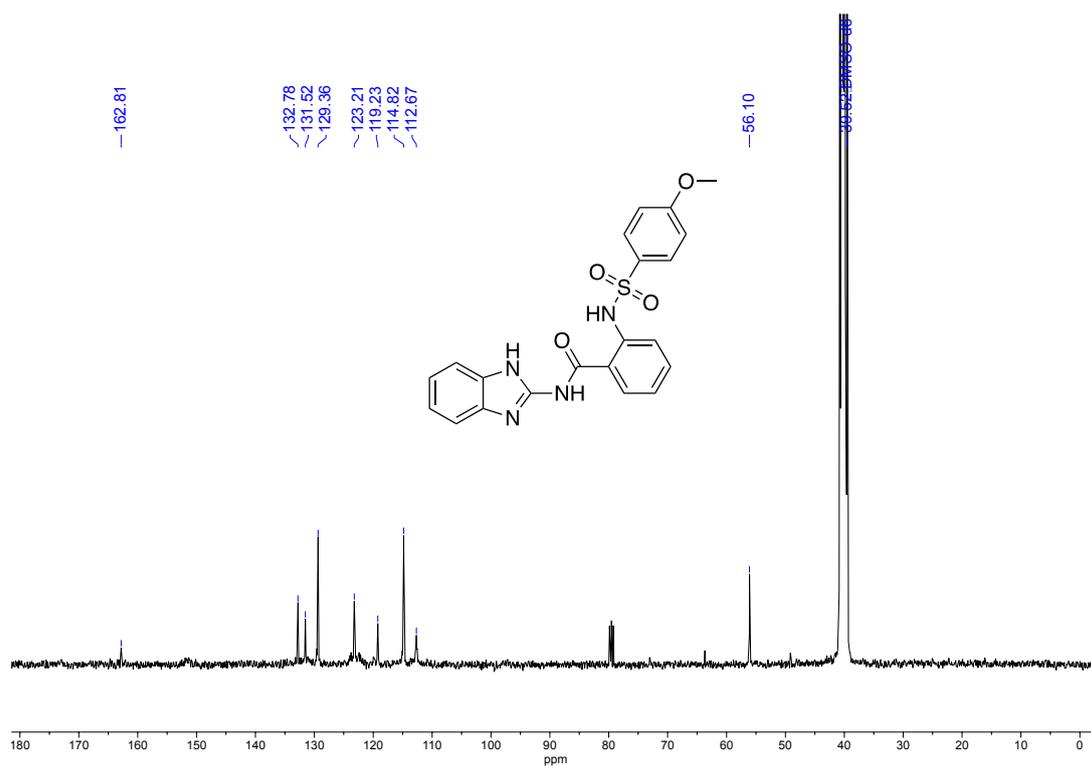
Anexo 25- Espectro de RMN ^{13}C 58 (101MHz, DMSO- d_6)



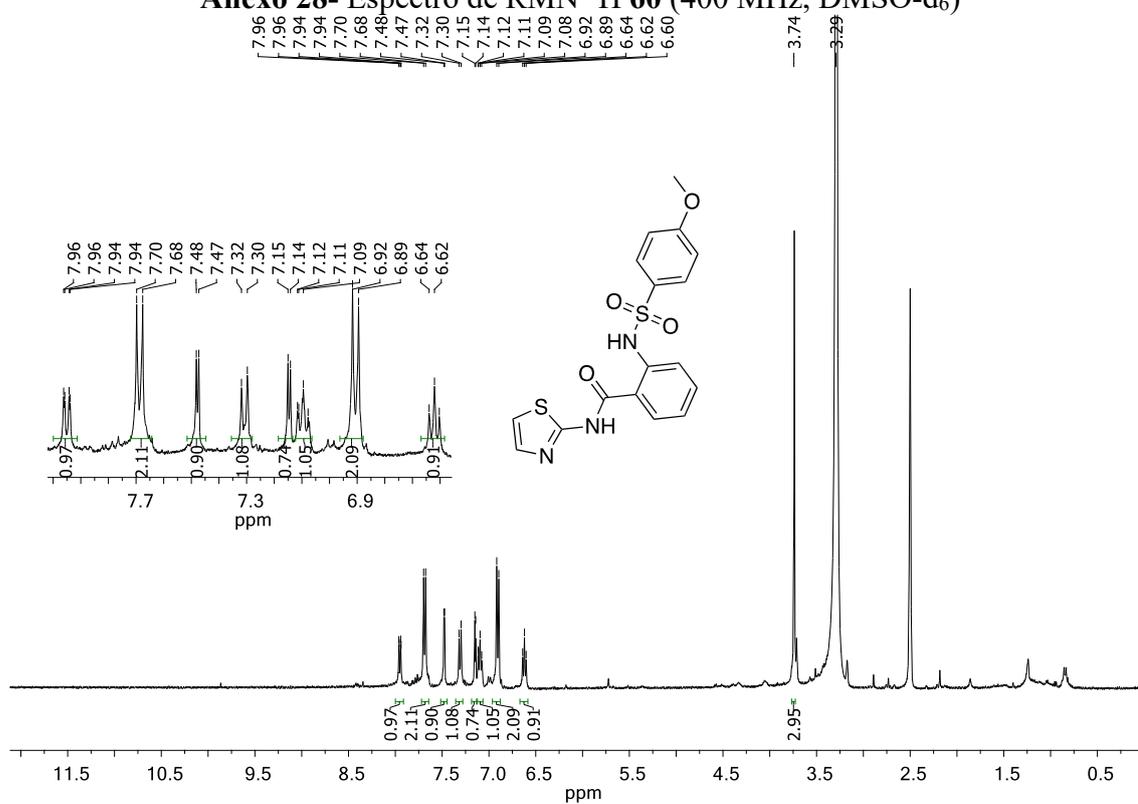
Anexo 26- Espectro de RMN ^1H 59 (400 MHz, DMSO- d_6)



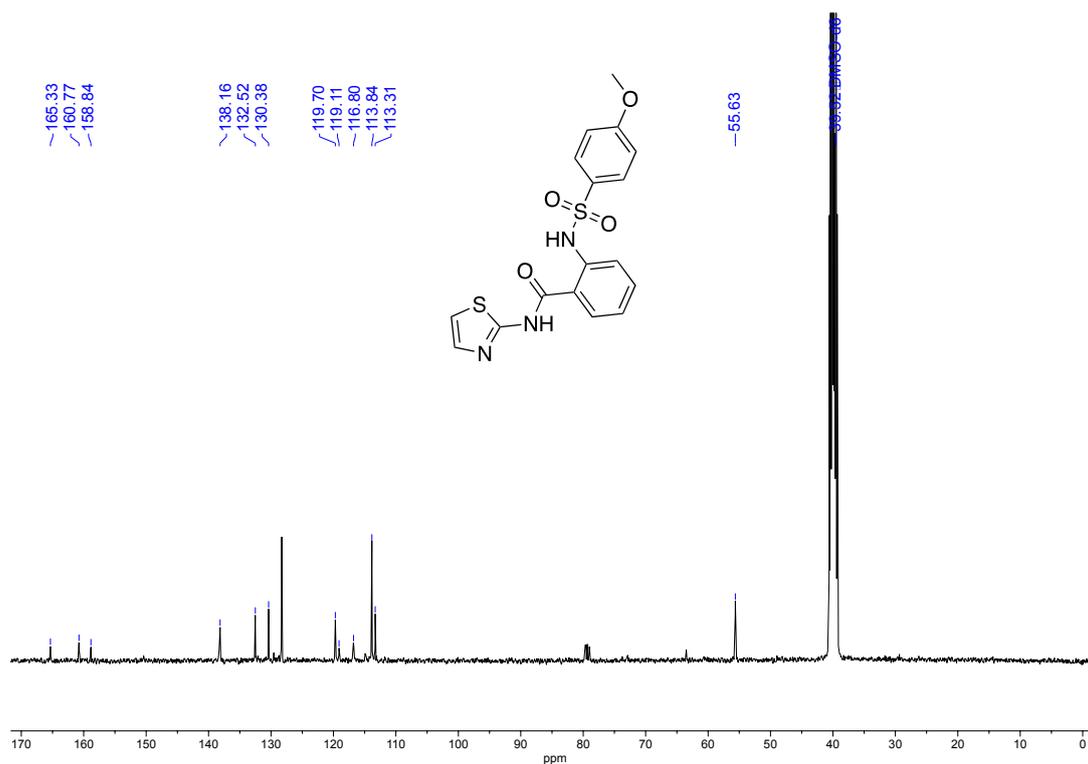
Anexo 27- Espectro de RMN ^{13}C 59 (101 MHz, DMSO- d_6)



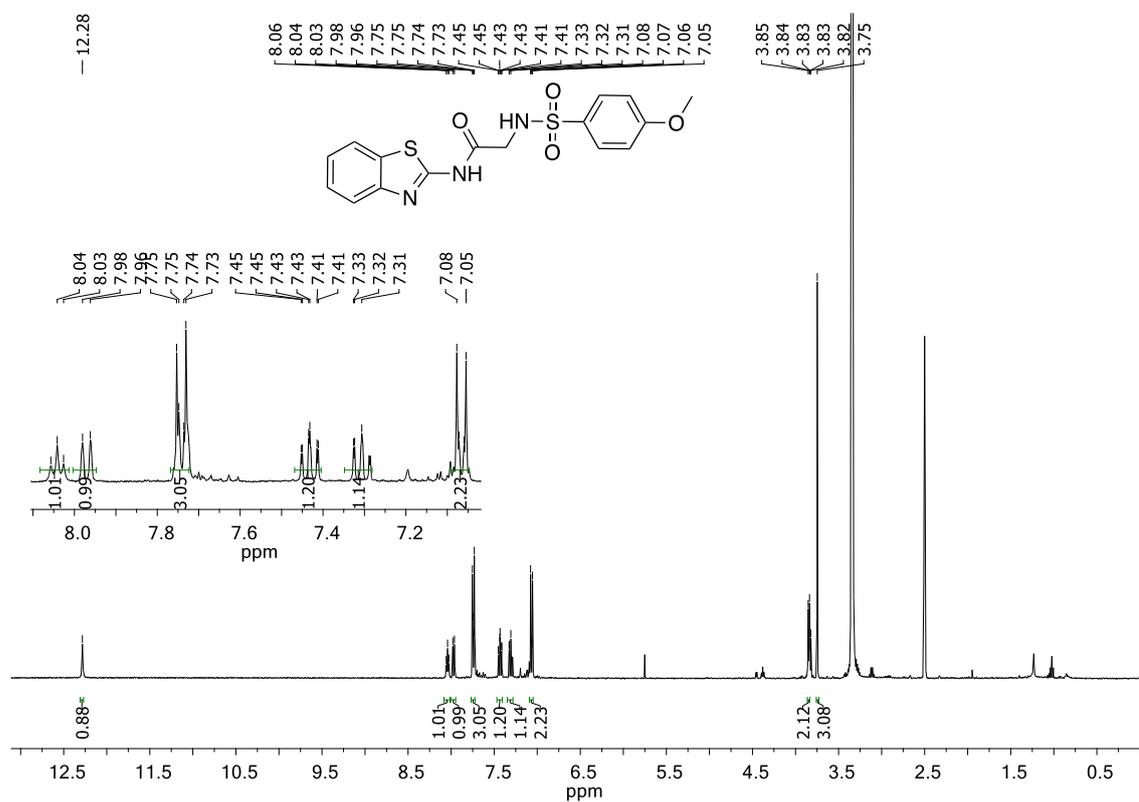
Anexo 28- Espectro de RMN ^1H 60 (400 MHz, DMSO- d_6)



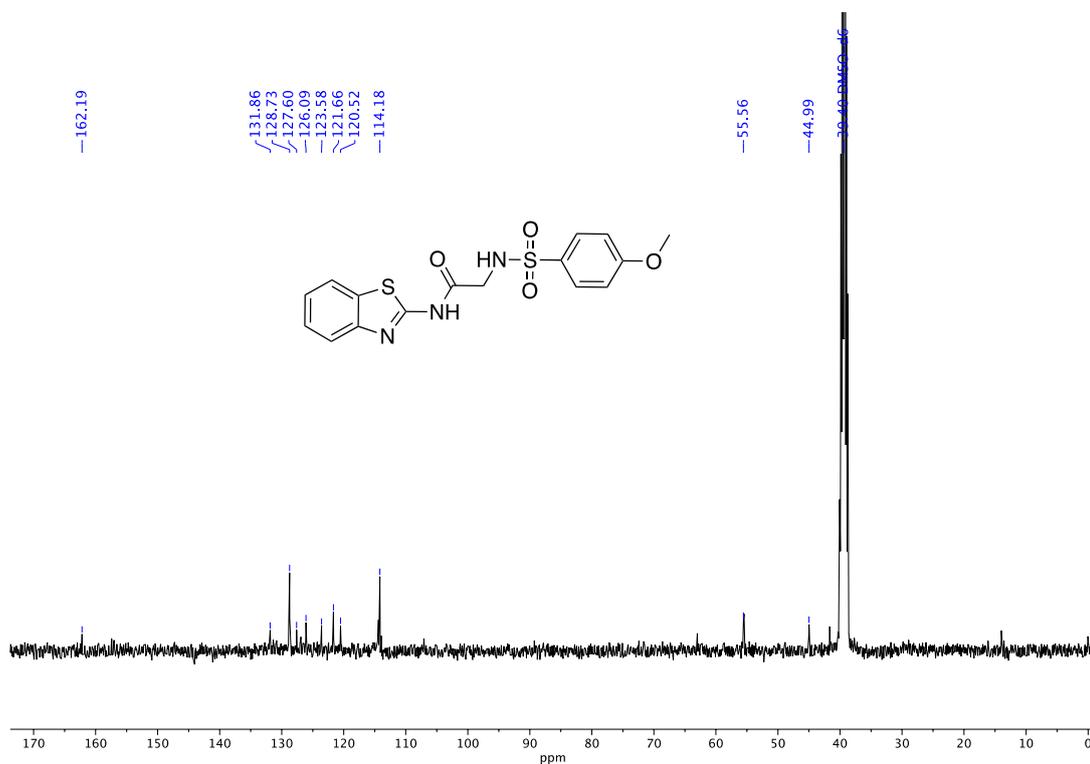
Anexo 29- Espectro de RMN ^{13}C 60 (400 MHz, DMSO- d_6)



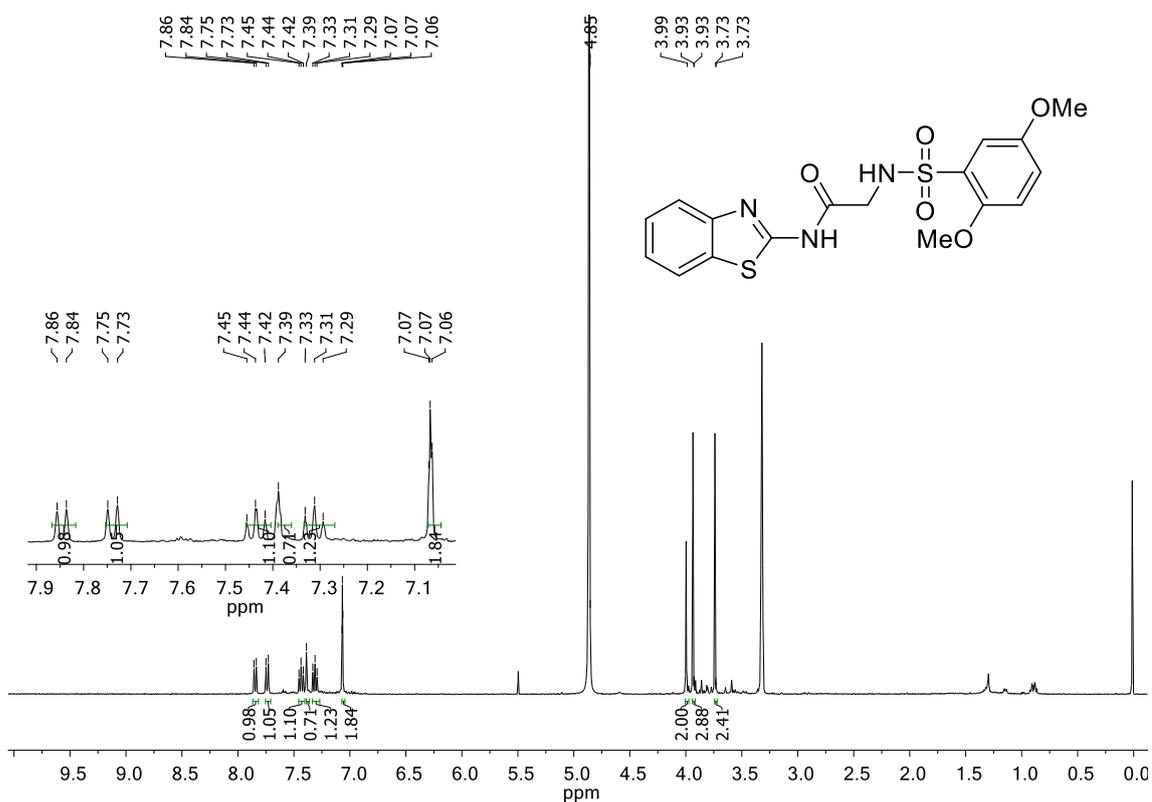
Anexo 30- Espectro de RMN ^1H 67 (400 MHz, DMSO- d_6)



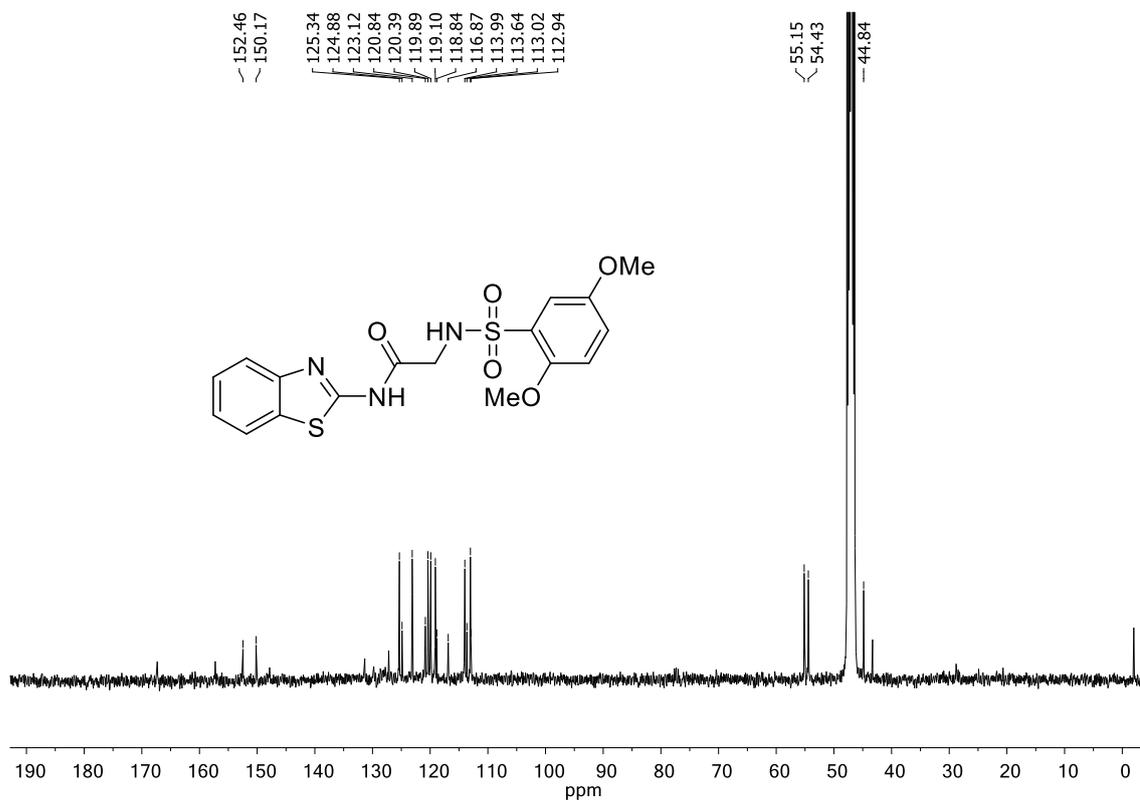
Anexo 30- Espectro de RMN ^{13}C 67(101 MHz, DMSO- d_6)



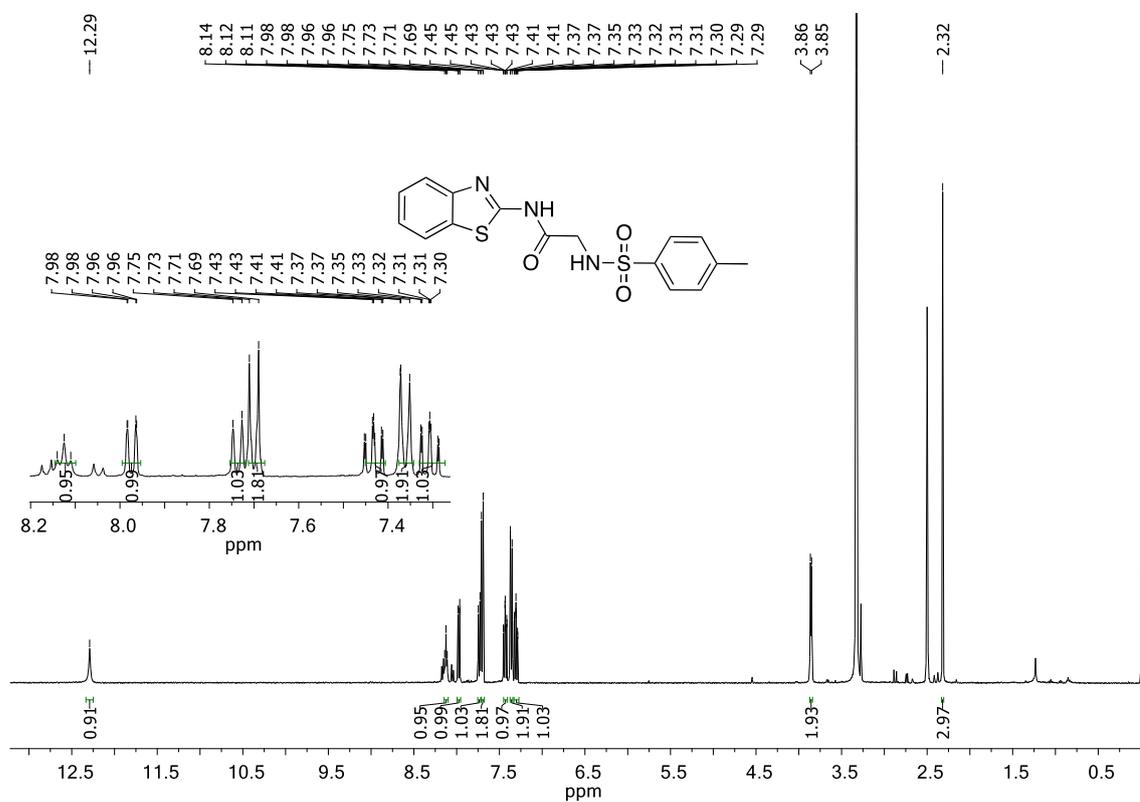
Anexo 30- Espectro de RMN ^1H 68 (400 MHz, CD_3OD)



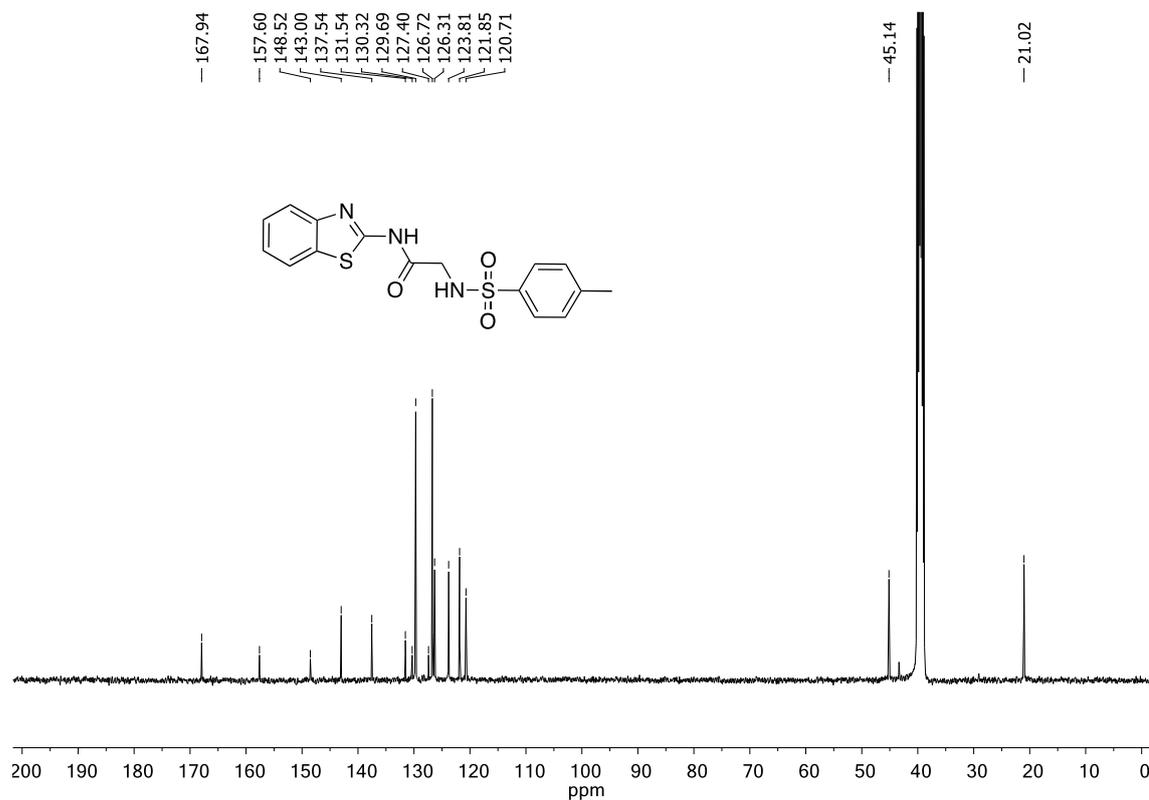
Anexo 31- Espectro de RMN ^{13}C 68 (101 MHz, CD_3OD)



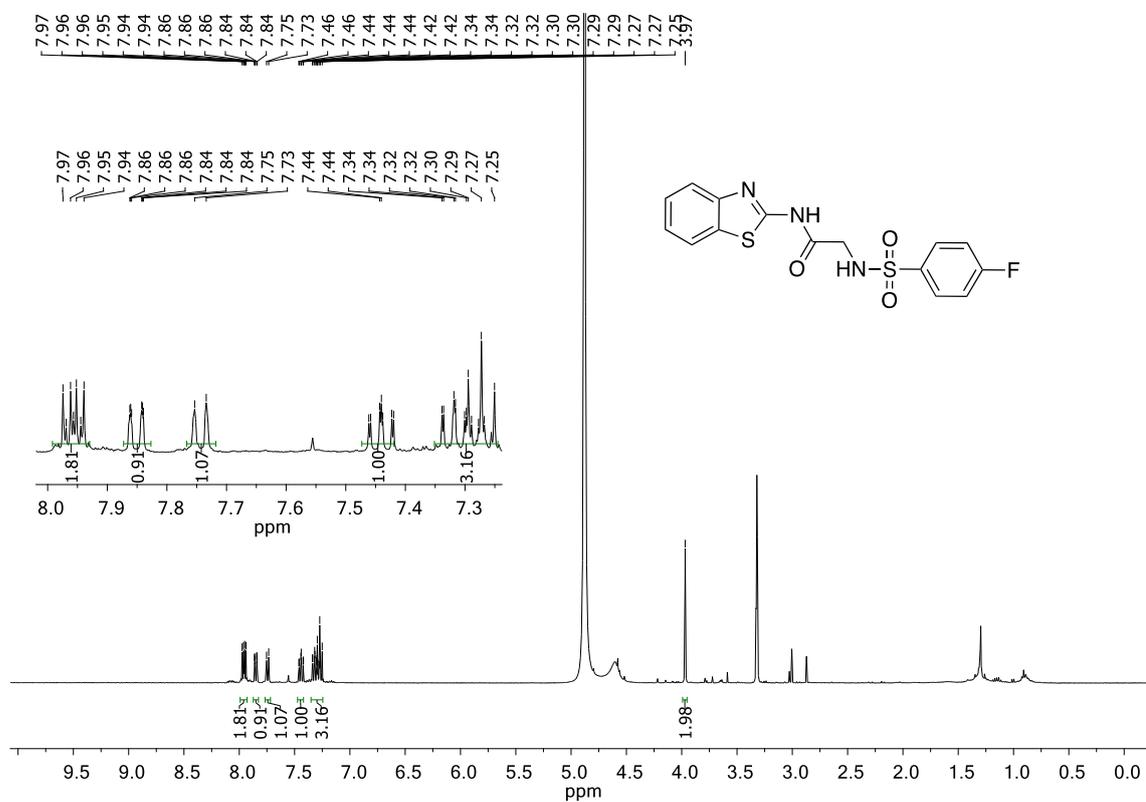
Anexo 32- Espectro de RMN ^1H 71 (400 MHz, DMSO-d_6)



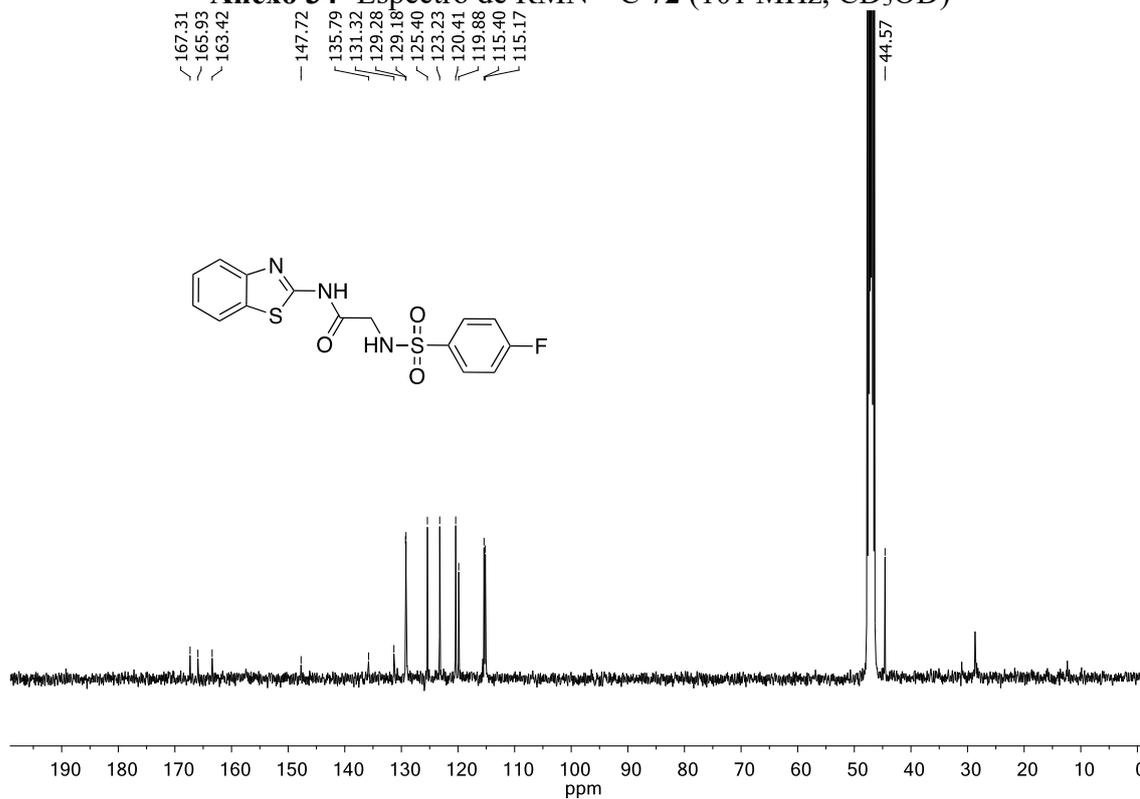
Anexo 33- Espectro de RMN ^{13}C 71 (101 MHz, DMSO- d_6)



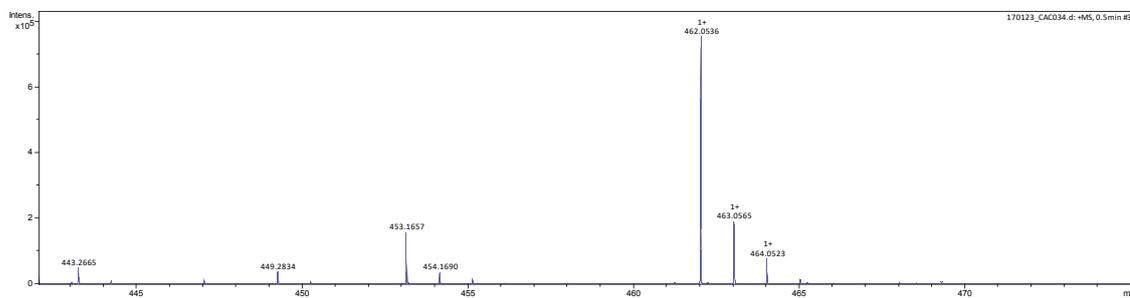
Anexo 34- Espectro de RMN ^1H 72 (400 MHz, DMSO- d_6)



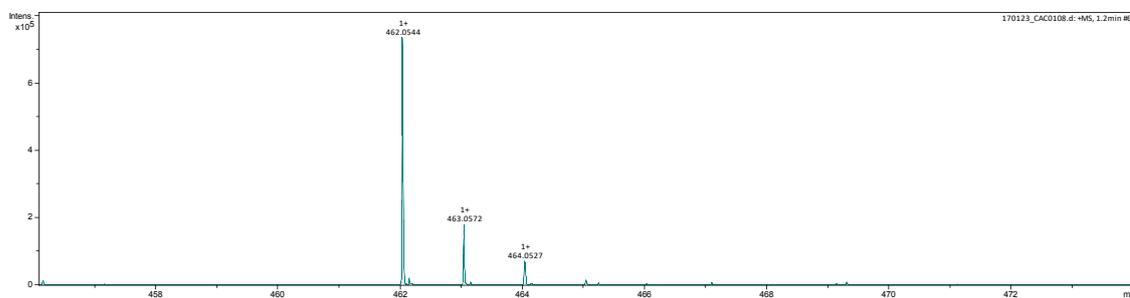
Anexo 34- Espectro de RMN ^{13}C 72 (101 MHz, CD_3OD)

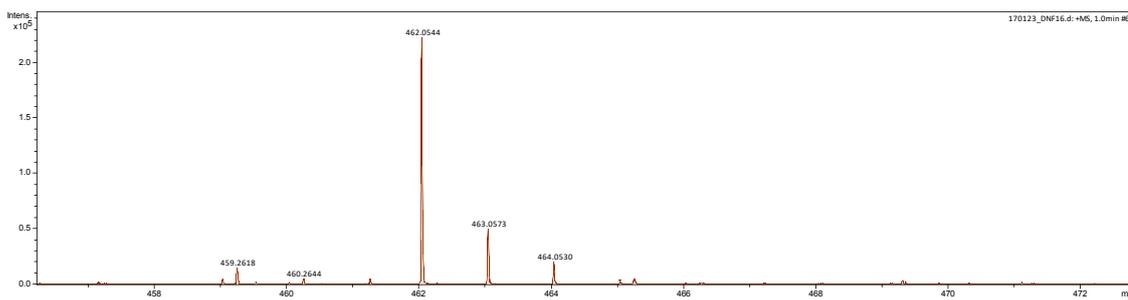
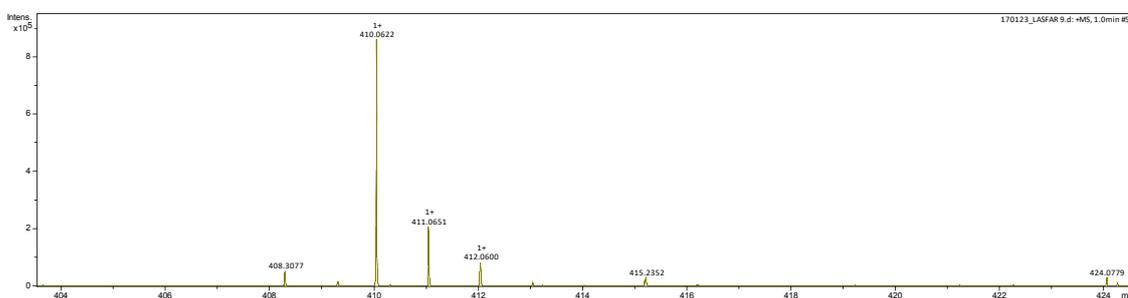
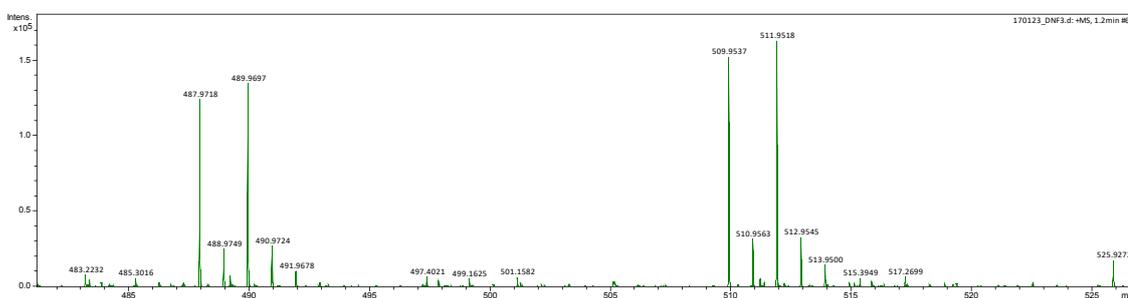
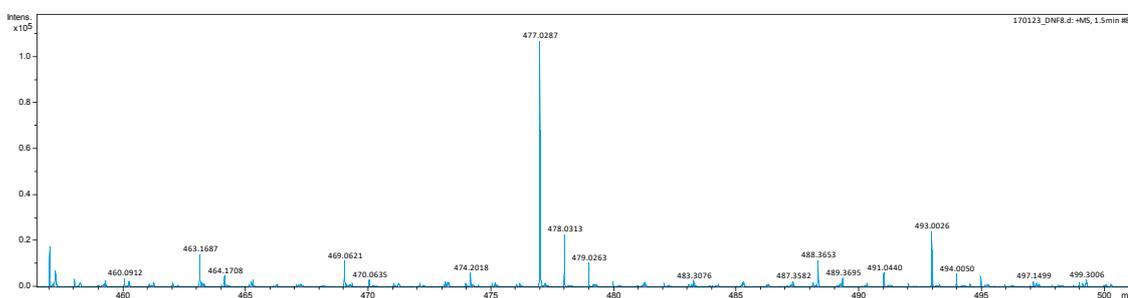


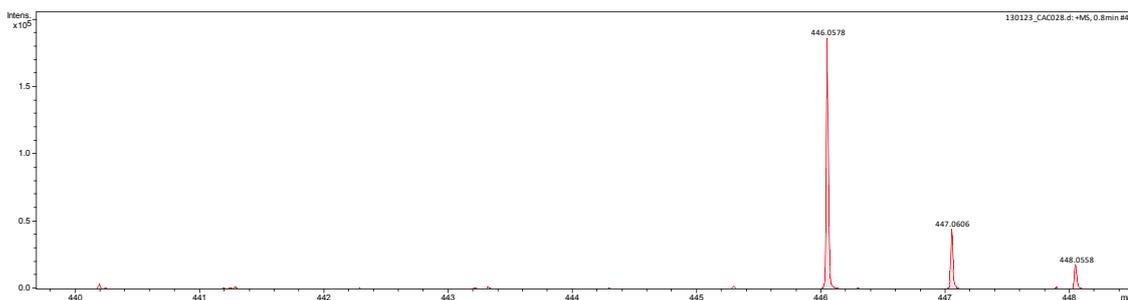
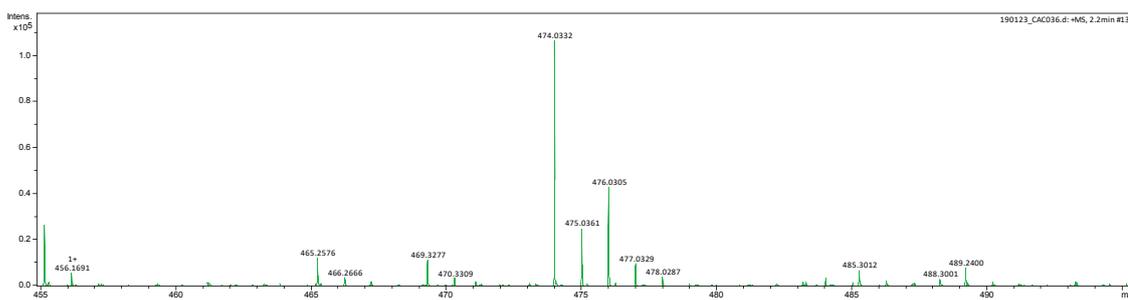
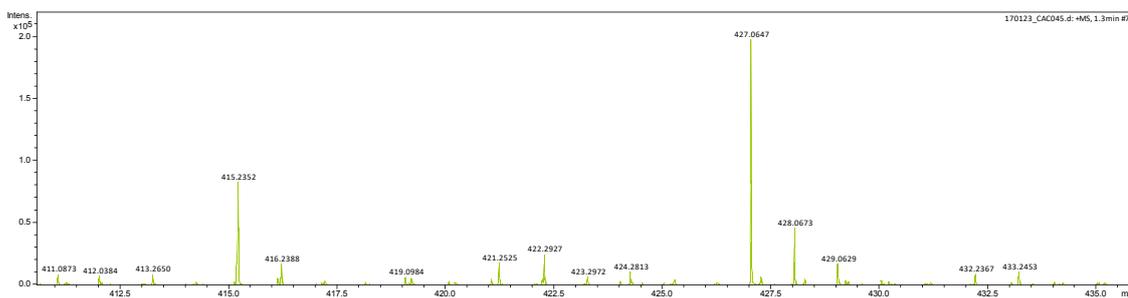
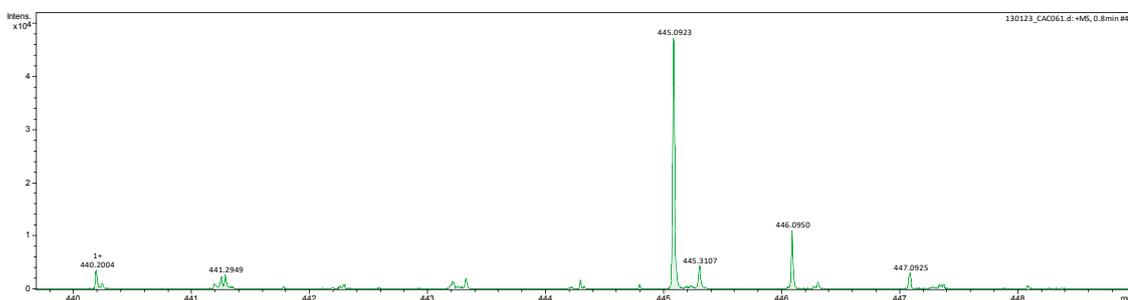
Anexo 35- Espectro de HRMS (ESI+) de 2

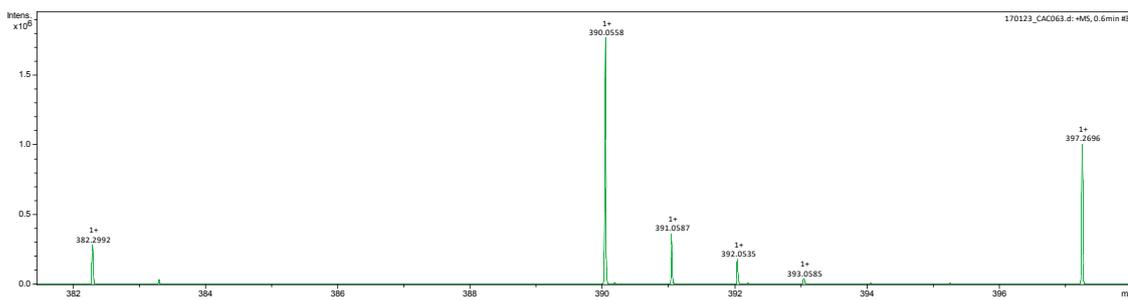
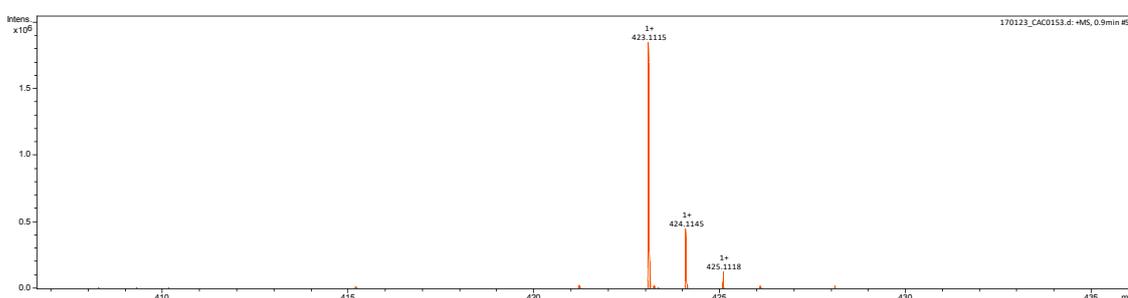
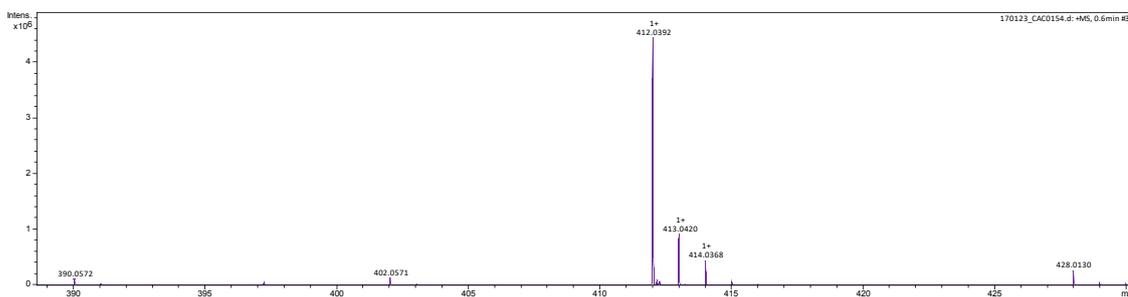
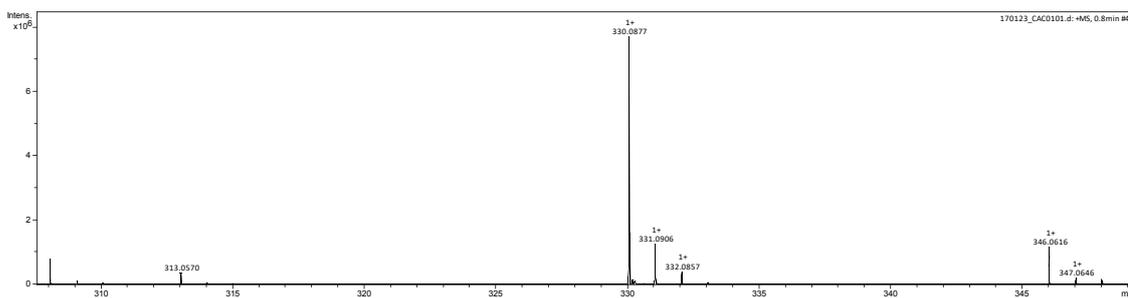


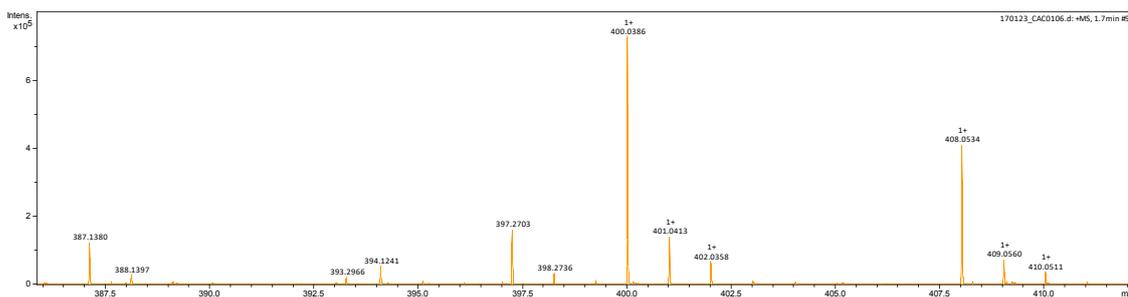
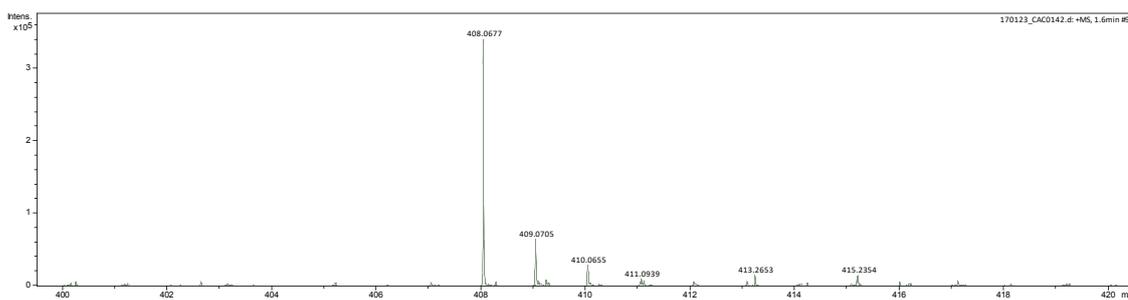
Anexo 36- Espectro de HRMS (ESI+) de 32



Anexo 37- Espectro de HRMS (ESI +) de 33**Anexo 38- Espectro de HRMS (ESI +) de 38****Anexo 39- Espectro de HRMS (ESI +) de 40****Anexo 40- Espectro de HRMS (ESI +) de 41**

Anexo 41- Espectro de HRMS (ESI +) de 46**Anexo 42- Espectro de HRMS (ESI +) de 48****Anexo 43- Espectro de HRMS (ESI +) de 50****Anexo 44- Espectro de HRMS (ESI +) de 57**

Anexo 45- Espectro de HRMS (ESI +) de 58**Anexo 46- Espectro de HRMS (ESI +) de 59****Anexo 47- Espectro de HRMS (ESI +) de 60****Anexo 48- Espectro de HRMS (ESI +) de 65**

Anexo 49- Espectro de HRMS (ESI +) de 67**Anexo 50- Espectro de HRMS (ESI +) de 68****Anexo 51- Espectro de HRMS (ESI +) de 71**