



**Universidade
Federal de
Uberlândia**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA (UFU)
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS (ICBIM)
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

GIOVANNA ANDRÉ ANTONIUCCI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DO
BENZOTIAZOL NA REPLICAÇÃO DO ZIKA VÍRUS *IN VITRO***

**UBERLÂNDIA – MG
ABRIL/2024**

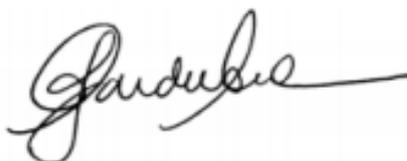
GIOVANNA ANDRÉ ANTONIUCCI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DO
BENZOTIAZOL NA REPLICAÇÃO DO ZIKA VÍRUS *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso II
submetido ao Instituto de Ciências
Biomédicas como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Dra. Ana Carolina Gomes
Jardim.





Prof. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim
Orientadora

**UBERLÂNDIA – MG
ABRIL/2024**

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais por darem todo o apoio necessário para que eu conseguisse cursar a graduação, abdicando de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus;

Ao meu irmão que é meu maior incentivador e a pessoa que mais acredita em mim, mesmo quando eu não acredito;

Aos meus amigos que me acompanharam em toda a jornada da graduação, me incentivando e auxiliando nos momentos de incertezas;

A todos do Laboratório de Pesquisa em Antivirais (LAPAV) que tornaram os meus dias de pesquisa mais leves e felizes, além de servirem de fontes de inspiração profissional;

À minha orientadora Dra. Ana Carolina Gomes Jardim e coorientadora Ma. Natasha Marques Cassani pelos ensinamentos e paciência durante meu processo de aprendizagem, me auxiliando em tudo o que fosse necessário para conseguir realizar esse trabalho;

Ao professor Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior pela colaboração;

Ao CNPq pelo auxílio financeiro;

E a Deus e todos os meus guias de luz que me dão forças diariamente para trilhar o meu caminho.

RESUMO

O *Orthoflavivirus zikaense* (Zika vírus - ZIKV) é um arbovírus responsável pela Febre Zika. Está relacionado com o desenvolvimento de complicações neurológicas como microcefalia em recém-nascidos e Síndrome de Guillain-Barré em adultos. Sua transmissão ocorre principalmente pela picada do mosquito do gênero *Aedes sp.* Atualmente, não existem fármacos específicos para combater a infecção pelo ZIKV, e, portanto, o desenvolvimento de novas terapias antivirais torna-se fundamental. Com base nisso, compostos derivados do benzotiazol representam fontes promissoras de novos antivirais, visto suas propriedades farmacológicas e capacidade previamente reportada de se ligarem a proteínas virais não-estruturais, como demonstrado para o vírus da Dengue (DENV) e vírus da hepatite C (HCV). Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral de 10 compostos derivados do aminobenzotiazol na replicação do ZIKV *in vitro*. A atividade antiviral dos compostos foi testada utilizando células de rim de hamster neonato (BHK-21) que expressam continuamente o *replicon* subgenômico ZIKV-IRES-Neo (BHK-21-ZIKV-IRES-Neo), o qual contém a região genômica correspondente às proteínas não-estruturais do ZIKV, o gene *reporter Renilla luciferase (Rluc)* e o gene da enzima Geneticina-N-Acetiltransferase, que confere resistência ao antibiótico Geneticina. A viabilidade celular dos compostos foi determinada nas concentrações de 50, 10 e 2 μM , por ensaio de MTT (Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio), e a maior concentração não-citotóxica foi utilizada para a avaliação da atividade antiviral. Para o ensaio antiviral, a luminescência das células foi avaliada após 72h por meio do ensaio de *Renilla-luciferase*, no qual a diminuição dos sinais de luminescência é proporcional aos níveis de replicação das proteínas. Os resultados demonstraram que dos 10 compostos derivados do aminobenzotiazol, os compostos CAC153, CAC154 e DNF9 reduziram a replicação do ZIKV, resultando em valores de índice de seletividade de 1,7; 2,4 e 2,8, respectivamente. Com isso, esses resultados indicam que derivados de aminobenzotiazol se apresentam como uma promissora fonte de moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais que atuem no tratamento de doenças associadas à infecção pelo ZIKV.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Sintomas da Febre Zika.....	7
<i>Figura 2:</i> Morfologia craniana na SCZ.....	8
<i>Figura 3:</i> Anomalias presentes na SCZ.	9
<i>Figura 4:</i> Representação estrutural do vírion e do genoma do ZIKV.	11
<i>Figura 5:</i> Ciclo replicativo do ZIKV	12
<i>Figura 6:</i> Mapa epidemiológico referente à distribuição geográfica do ZIKV.....	14
<i>Figura 7:</i> Mapa epidemiológico do ZIKV no Brasil entre as semanas epidemiológicas 1 e 32 de 2023.	15
<i>Figura 8:</i> Coeficiente de incidência dos casos prováveis de ZIKV no Brasil em 2024.....	16
<i>Figura 9:</i> Estrutura molecular do benzotiazol.....	17
<i>Figura 10:</i> Estrutura do aminobenzotiazol.....	18
<i>Figura 11:</i> Construção do replicon subgenômico ZIKV-IRES-Neo.	22
<i>Figura 12:</i> Análise de viabilidade celular dos compostos derivados do aminobenzotiazol. ...	25
<i>Figura 13:</i> Efeito de compostos derivados do aminobenzotiazol na replicação do ZIKV e na viabilidade de células BHK21-RepZIKV_IRES-Neo.....	27
<i>Figura 14:</i> Determinação de EC ₅₀ , CC ₅₀ e IS dos compostos com maior atividade antiviral.	29

TABELAS

<i>Tabela 1:</i> Nomenclatura e estrutura dos compostos derivados do aminobenzotiazol.....	20
<i>Tabela 2:</i> Relação entre os valores de CC ₅₀ e EC ₅₀ de cada composto e seu índice de seletividade.....	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1. Febre Zika	6
1.2. ZIKV: Partícula Viral e Ciclo Replicativo	10
1.3. Epidemiologia do ZIKV	13
1.4. Antivirais e o Benzotiazol	17
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivos específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Compostos	20
4.2. Cultura de células.....	21
4.3. Avaliação da citotoxicidade	22
4.4. Avaliação da atividade antiviral.....	22
4.5. Determinação da concentração efetiva de 50% (EC_{50}), concentração citotóxica em 50% (CC_{50}) e índice de seletividade ($IS=CC_{50}/EC_{50}$).....	23
4.6. Análise estatística	23
5. RESULTADOS	24
5.1 Análise de viabilidade celular dos compostos derivados do benzotiazol	24
5.2 Compostos derivados do aminobenzotiazol inibem a replicação do ZIKV <i>in vitro</i>	26
5.3 Os compostos CAC153, CAC154 e DNF9 exibem uma atividade inibitória dose-dependente	28
6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÃO	31

1. INTRODUÇÃO

1.1. Febre Zika

A febre Zika é uma arbovirose endêmica causada pelo *Orthoflavivirus zikaense* (Zika vírus - ZIKV). Proveniente do termo *arthropod-borne-virus*, as arboviroses são doenças causadas por vírus incidentes no mundo todo que dependem da interação entre um artrópode hematófago (vetor invertebrado), o vírus e hospedeiro vertebrado. A transmissão desse tipo de infecção ocorre durante a picada do vetor artrópode infectado, que ao promover o seu repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, inocula o vírus pela saliva no sistema circulatório do mesmo (Schneider; Calvo; Peterson, 2021).

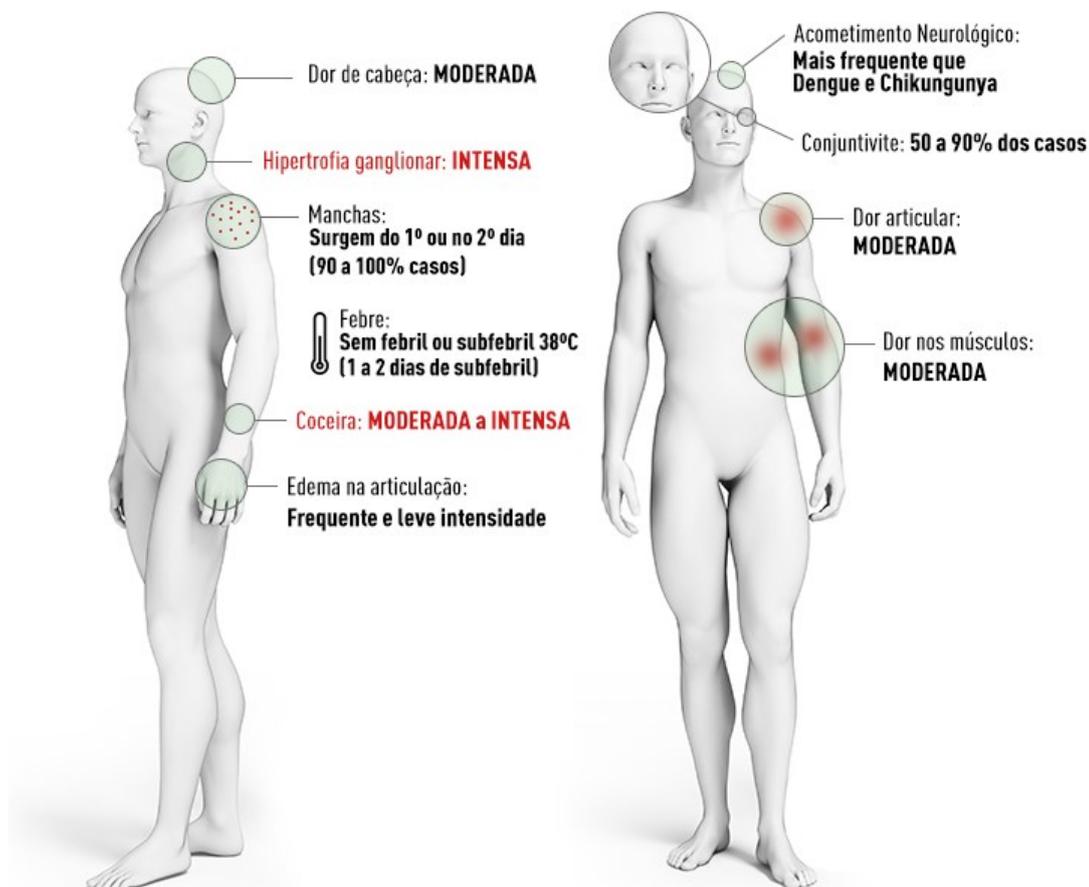
Os principais mosquitos responsáveis pela transmissão do ZIKV são as fêmeas do gênero *Aedes sp*, em que se destaca a espécie *A. aegypti*, por sua disseminação em regiões urbanas (Madewell, 2020). Ademais, mosquitos do gênero *Culex sp.* e *Anopheles sp.* também podem ser infectados pelo ZIKV, sendo considerados possíveis vetores, o que pode aumentar a disseminação do vírus e conseqüentemente causar um aumento no número de casos de infecções (Viveiros-Rosa *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Adicionalmente, as mudanças climáticas e o aumento da distribuição geográfica dos mosquitos transmissores contribuem de forma significativa para o aumento da disseminação do vírus causador da doença (Musso & Gubler, 2016).

Além da transmissão pelos mosquitos, o ZIKV também pode ser transmitido através de relações sexuais sem proteção, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e durante a gestação (Pielnaa *et al.*, 2020).

Os sintomas da febre Zika surgem entre 3 e 14 dias após a infecção e são similares aos sintomas de outras arboviroses. Geralmente, os indivíduos acometidos pela infecção com ZIKV apresentam febre, conjuntivite, erupções cutâneas, dores musculares e articulares, mal-estar e dor de cabeça, que perduram por 2 a 7 dias (Organização Mundial de Saúde, 2022) (

Figura 1). Entretanto, cerca de 80% dos pacientes infectados são assintomáticos (Secretaria de Saúde do Distrito Federal, 2022). Além disso, sintomas mais graves também podem estar presentes, como problemas gastrointestinais que podem ocasionar úlceras aftosas, problemas geniturinários somados a calafrios, rigidez, dor de garganta, hipotensão e linfadenopatias (Chan *et al.*, 2016).

Figura 1: Sintomas da Febre Zika



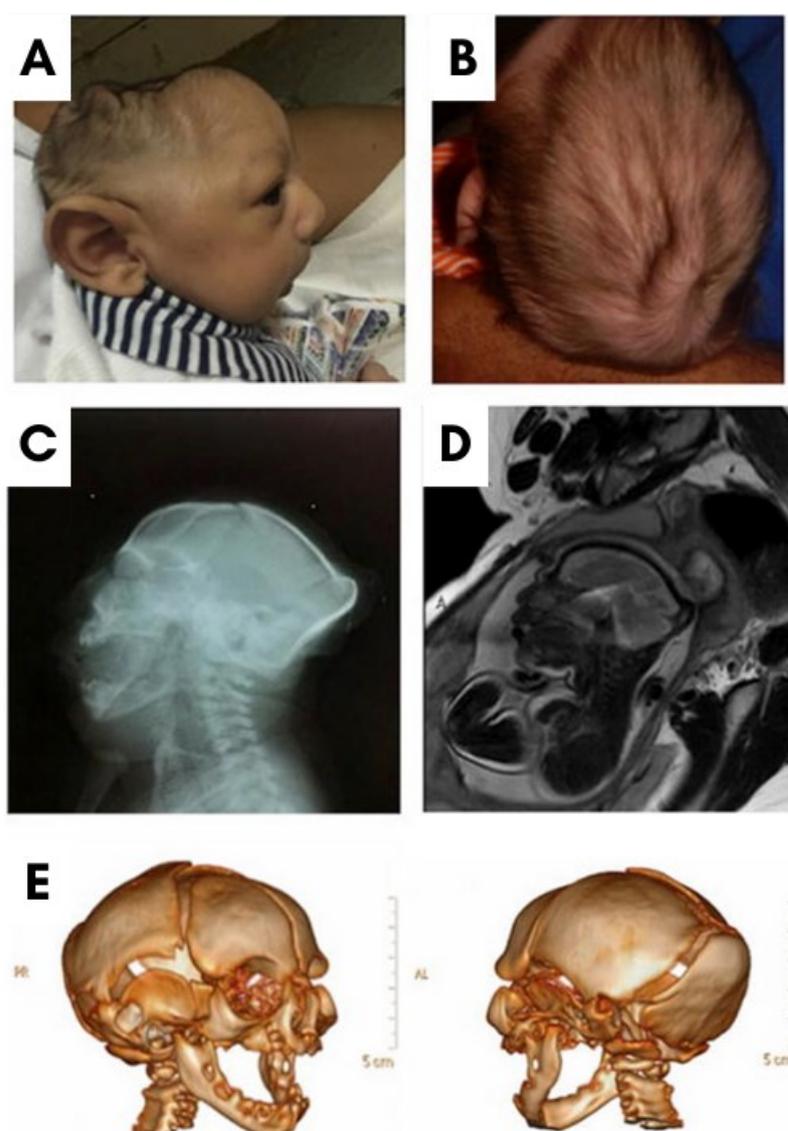
Fonte: Conselho Regional de Enfermagem de Santa Catarina (COREN SC, <https://www.corensc.gov.br/sintomas-zika>)

Em 2016, pesquisas apontaram a relação da infecção pelo ZIKV com o desenvolvimento de complicações neurológicas, como encefalite, meningite e Síndrome de Guillain-Barré (GBS) em adultos, sendo essa, a principal e mais grave complicação (Martínez De Salazar *et al.*, 2016). A Síndrome de Guillain-Barré é uma polirradiculoneuropatia, caracterizada por fraqueza progressiva juntamente com redução ou ausência de reflexos, que pode causar em casos mais graves, fraqueza bulbar, insuficiência respiratória e disfunção autonômica (Kwan & Biliciler, 2021). Mesmo com o tratamento por imunoterapias, cerca de 5% dos pacientes vêm a óbito e 20% perdem a mobilidade dos membros inferiores (Shahrizaila *et al.*, 2021).

Além disso, casos de anormalidades em recém-nascidos também foram associados à infecção pelo ZIKV. Atualmente, designa-se Síndrome Congênita Associada à Infecção por ZIKV (SCZ) todas as anomalias congênitas apresentadas por crianças cujas mães foram infectadas pelo vírus durante a gestação, em que a gravidade dos sinais e sintomas está diretamente relacionada ao período em que a mãe foi infectada pelo vírus (Martins *et al.*, 2020).

A SCZ engloba, dentre outras manifestações: espasticidade, disfunção do tronco encefálico, convulsões, irritabilidade, problemas de deglutição, contraturas de membros, anormalidades auditivas e oculares e desproporcionalidade craniofacial, em que se destaca a microcefalia (**Figura 2**). Embora a infecção pelo ZIKV durante a gravidez não seja causa obrigatória de SCZ em todas as crianças nascidas, o risco de terem consequências clínicas é maior no neurodesenvolvimento a longo prazo (Martins *et al.*, 2020; Ministério da Saúde, 2017) (**Figura 3**).

Figura 2: Morfologia craniana na SCZ.



A) Diminuição do crânio de criança com SCZ. B) Dobras no couro cabeludo em bebê de 3 meses com suposta infecção congênita pelo ZIKV. C) Radiografia de recém-nascido mostrando anormalidade dos ossos do crânio. D) RM fetal mostrando mesmo fenótipo com 29 semanas de gestação. E) Reconstrução 3D do crânio de criança de 3 meses mostrando deslocamento dos ossos frontal e temporal enquanto o osso occipital parece estável.

Fonte: Adaptado de Moore et al., 2017.

Figura 3: Anomalias presentes na SCZ.



(A) Contratura em flexão do joelho; (B) hiperextensão do joelho (luxação do joelho); (C) pé torto; (D) deformidades em 2º, 3º e 4º dedos; (E) contraturas articulares em pernas e braços, sem envolvimento de tronco. Fonte: Adaptado de Van Der Linden et al., 2016.

Com relação a epidemiologia da SCZ, de acordo com dados provenientes do Ministério da Saúde, entre os anos de 2015 e 2022 foram notificados 21.196 casos suspeitos da síndrome, em que desses, 3.732 (17,6%) foram confirmados para alguma infecção congênita, e desse total, 1.857 (49,8%) foram classificados como SCZ. Além disso, nesse período 258 pacientes com casos confirmados de SCZ vieram a óbito (Brasil, 2023).

Na patogênese viral, a ocorrência de complicações no sistema encefálico se dá devido ao tropismo do vírus por células neurais, o que gera retardos no desenvolvimento do córtex cerebral do feto (Mlakar *et al.*, 2016; Komarasamy *et al.*, 2022). A infecção se inicia pela interação da proteína de envelope do vírus com receptores celulares, o que leva à degradação de junções aderentes, redução da proliferação celular e consequentemente apoptose, mecanismos similares à microcefalia genética (Christian; Song; Ming, 2019; Guerrero Saldivia *et al.*, 2023). Crianças nascidas com microcefalia, por exemplo, apresentam uma circunferência

do crânio reduzida devido à má formação neuronal, condição esta que leva à incapacidade motora, sensorial e cognitiva por toda a vida (Mlakar *et al.*, 2016).

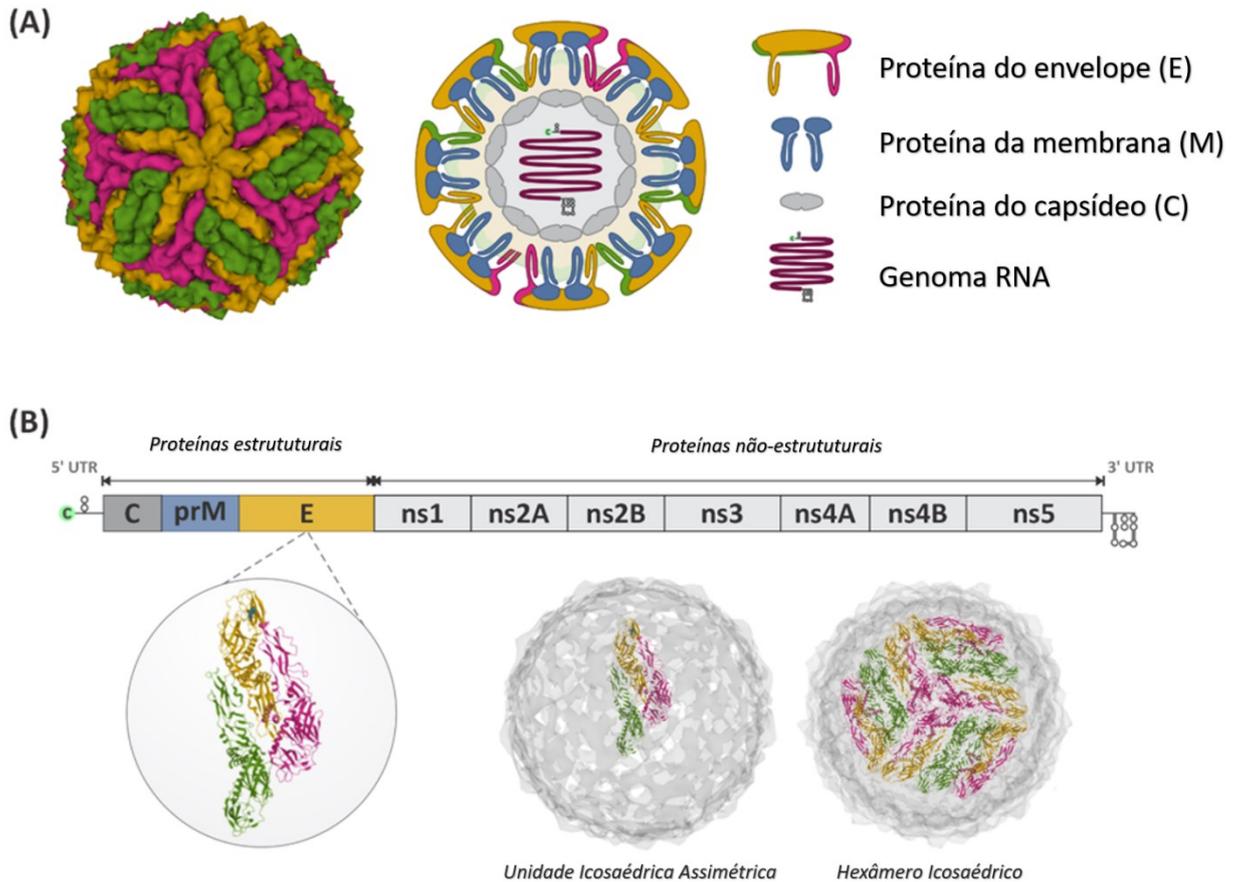
Somado a isso, durante seu processo de infecção em alguns tipos de célula, o vírus é capaz também de bloquear a via de sinalização de IFN-1, gerar apoptose de células não infectadas, e reprimir vias de resposta imune inata, o que auxilia no estabelecimento da infecção (Bhardwaj *et al.*, 2021).

Devido ao fato de muitos pacientes serem assintomáticos e a semelhança com outras arboviroses, o diagnóstico da febre Zika é muitas vezes difícil e negligenciado. Os métodos atualmente disponíveis para identificar a doença se baseiam em análises moleculares de Reação da Transcriptase combinada com a Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) e testes imunoenzimáticos como o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) (Bhandari *et al.*, 2023). Entretanto, falsos positivos podem ser encontrados devido à reatividade cruzada com anticorpos contra outros *Orthoflavivirus*, como o DENV (Bhandari *et al.*, 2023; Balmaseda *et al.*, 2018). Tendo em vista os métodos disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS), utiliza-se de RT-PCR, isolamento viral e determinação da presença de anticorpos anti-ZIKV (Ministério da Saúde, [s.d.]).

1.2. ZIKV: Partícula Viral e Ciclo Replicativo

Pertencente ao gênero *Orthoflavivirus* e família *Flaviviridae*, o ZIKV (Postler *et al.*, 2023) é um vírus envelopado, de capsídeo icosaédrico e genoma de RNA de fita simples e polaridade positiva. Seu material genético tem aproximadamente 11.000 pares de bases (kb) e codifica 3 proteínas estruturais: proteína precursora de membrana (M), capsídeo (C) e envelope (E), responsáveis por formar a partícula viral, e 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), estando essas diretamente relacionadas à replicação do vírus (Sirohi; Kuhn, 2017; Bernardo-Menezes *et al.*, 2022) (**Figura 4**).

Figura 4: Representação estrutural do vírion e do genoma do ZIKV.

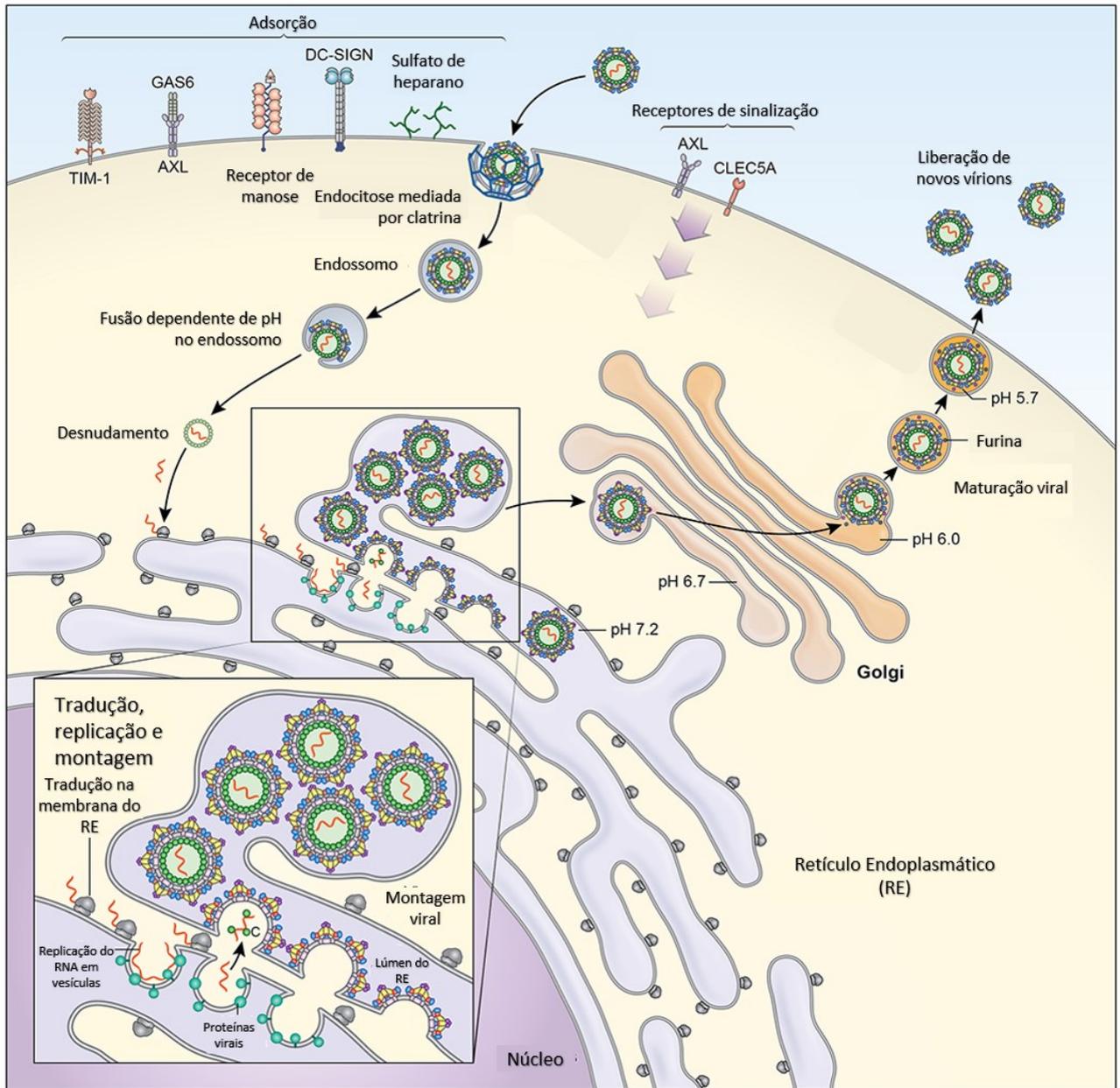


Esquema representativo da partícula viral do ZIKV (PDB: 5JHM) (A). Ilustração do genoma do ZIKV (B).
 Fonte: Adaptado de Dai *et al.*, 2016 e Cassani *et al.*, 2024.

O ciclo replicativo do ZIKV se inicia pela adsorção do vírus à célula hospedeira, através da interação da proteína E viral com receptores na membrana plasmática celular, incluindo os receptores tirosina quinase (TAM-AXL e TIM-1), receptores de manose, receptores de lectina (DC-SIGN) e sulfatos de heparano. A entrada do vírus na célula se dá por endocitose mediada por clatrina, seguida pela fusão do envelope viral ao endossomo, mediada pela mudança de pH nos endossomos, e liberação do genoma no citoplasma da célula (Sharma *et al.*, 2020). Dessa forma, dá-se início à tradução do genoma viral, gerando uma poliproteína precursora, que após sofrer clivagens, gera as três proteínas estruturais necessárias para a formação de vírions infecciosos, e as sete proteínas não estruturais essenciais para a replicação do RNA genômico viral. Com isso, ocorre a catalisação da síntese de uma fita de RNA de polaridade negativa pela NS5 (RNA polimerase RNA dependente - RdRp), que servirá de molde

para sintetizar novas fitas com polaridade positiva. Por fim, ocorre a montagem dos componentes virais no Retículo Endoplasmático (RE) e as novas partículas virais são liberadas por exocitose via Complexo de Golgi (Diosa-toro *et al.*, 2020) (**Figura 5**).

Figura 5: Ciclo replicativo do ZIKV

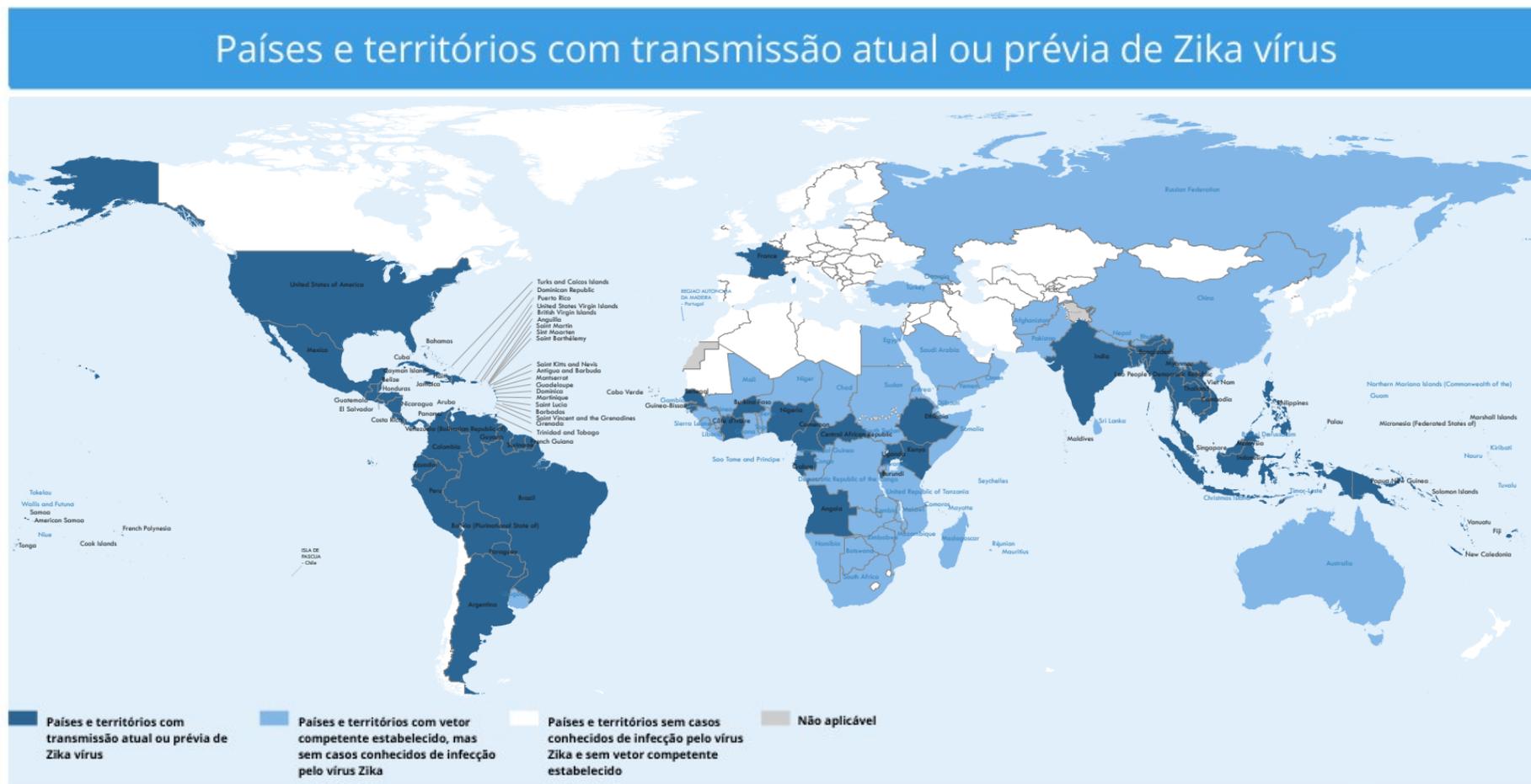


Fonte: Adaptado de Pierson & Diamond, 2020

1.3. Epidemiologia do ZIKV

O primeiro isolamento do ZIKV ocorreu em 1947 na Floresta Zika em Uganda, África. Desde então, infecções pelo ZIKV foram relatadas em diversos países, mas sua incidência é maior em países da América e regiões do Pacífico Sul (Hills; Fischer; Petersen, 2017; Côrtes *et al.*, 2023). De acordo com o último dado epidemiológico da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2022) referente a distribuição de ZIKV no mundo, 89 países/territórios já confirmaram a presença do vírus (**Figura 6**).

Figura 6: Mapa epidemiológico referente à distribuição geográfica do ZIKV.



As designações empregadas e a apresentação do material nesta publicação não implicam a expressão de qualquer opinião por parte da OMS relativamente ao estatuto jurídico de qualquer país, território, cidade ou área ou de suas autoridades, ou relativo à delimitação de suas fronteiras ou limites. As linhas pontilhadas e tracejadas nos mapas representam linhas de fronteira aproximadas para as quais pode ainda não haver acordo total.

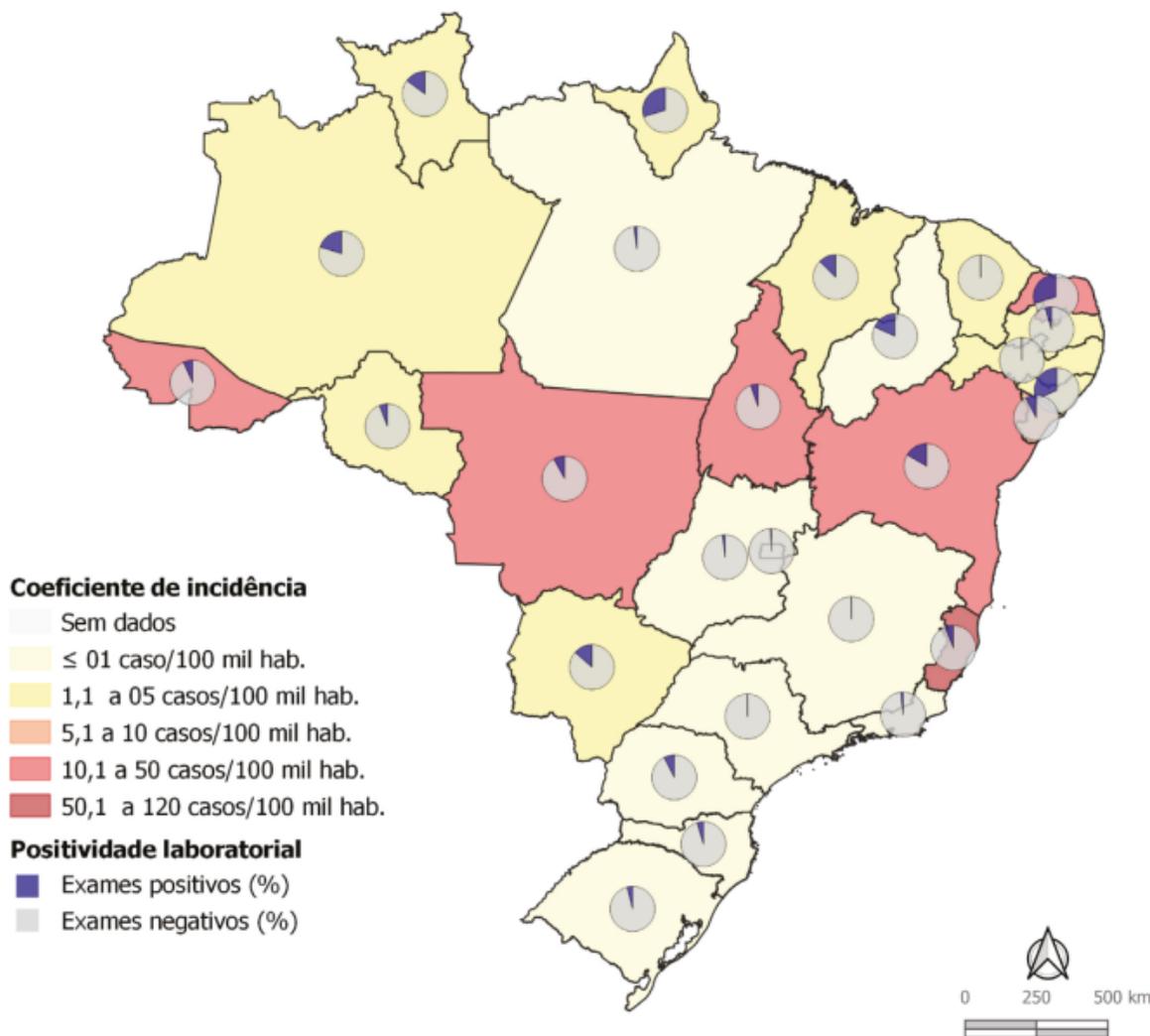
Atualização do Mapa: Fevereiro de 2022
 Fonte: Organização Mundial de Saúde



Fonte: Adaptado de OMS, 2022.

No Brasil, os casos de infecção por ZIKV foram reportados pela primeira vez no ano de 2015, em que a Organização Mundial de Saúde decretou estado de Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (PHEIC) no ano de 2016 (OMS, 2016). Mesmo com a diminuição no número de casos nos anos seguintes, o ZIKV continua sendo um problema de saúde pública que preocupa órgãos governamentais. De acordo com o último boletim epidemiológico no Brasil, em 2023, foram notificados 8.425 casos prováveis de ZIKV até a semana epidemiológica (SE) 32 (taxa de incidência de 4,1 casos/100 mil habitantes), representando um aumento de 20,8% em relação ao mesmo período no ano anterior (**Figura 7**). A maior taxa de incidência foi nas regiões Norte e Nordeste. Em relação a infecção por ZIKV em gestantes, houve 396 casos prováveis, em que desses, 123 foram confirmados (Ministério da Saúde, 2023).

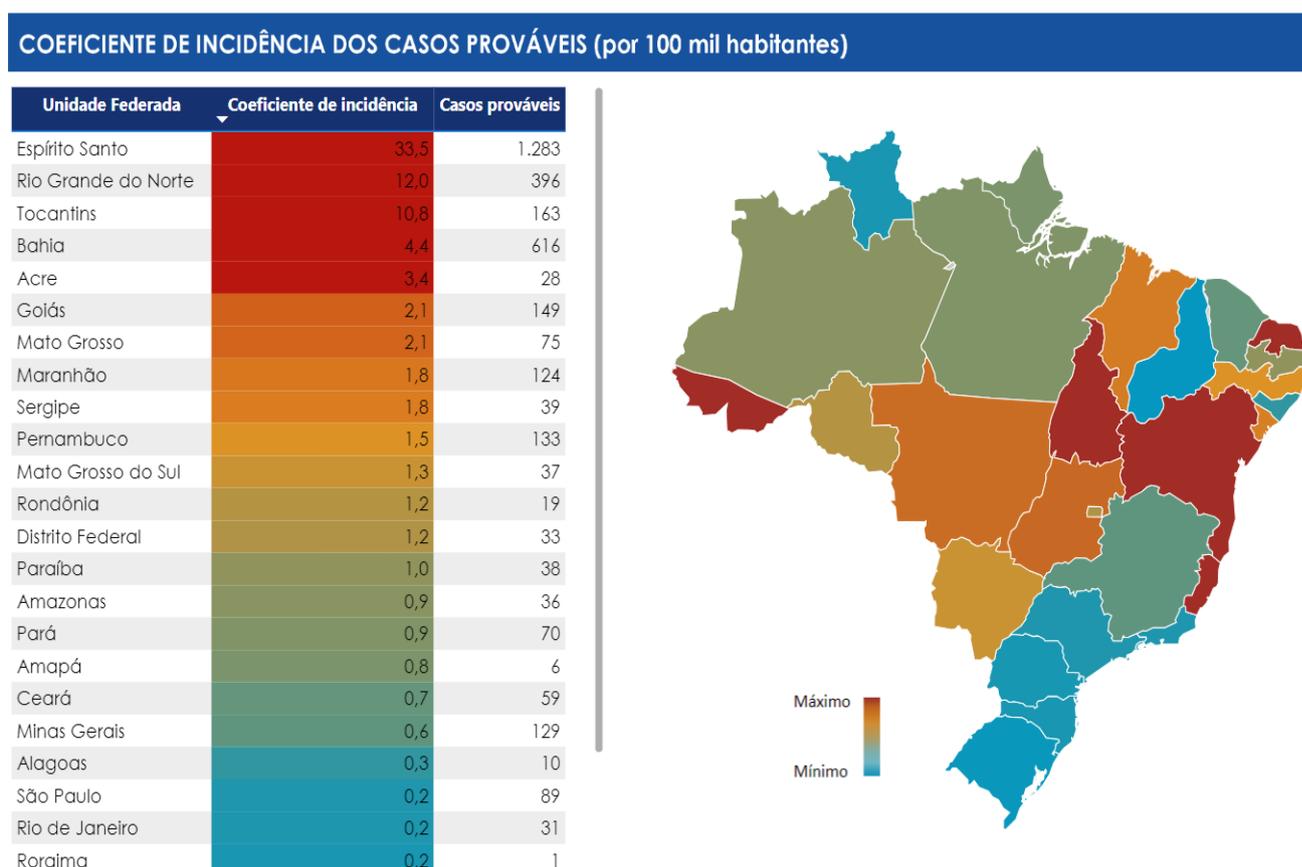
Figura 7: Mapa epidemiológico do ZIKV no Brasil entre as semanas epidemiológicas 1 e 32 de 2023.



Fonte: Ministério da Saúde, 2023.

Em 2024, o coeficiente de incidência de casos prováveis por 100 mil habitantes até o momento variou entre os estados brasileiros entre 0,2 a 33,5 (Ministério da Saúde, 2024) **(Figura 8)**. Ademais, pesquisas recentes apontam que novos surtos de infecções por ZIKV podem ocorrer. Os dados obtidos mostram que mutações ocorridas no material genético do vírus, que culminam na substituição de isoleucina por valina (I39V) ou por treonina (I39T) na proteína NS2B, por exemplo, podem aumentar sua virulência e tropismo por células neurais, além de aumentar a capacidade do vírus de ser transmitido verticalmente, bem como o aumento na mortalidade fetal (Regla-Nava *et al.*, 2022). Assim, a busca por terapias antivirais contra o ZIKV é fundamental para auxiliar no combate à febre Zika e consequentemente a melhoria da saúde pública.

Figura 8: Coeficiente de incidência dos casos prováveis de ZIKV no Brasil em 2024.



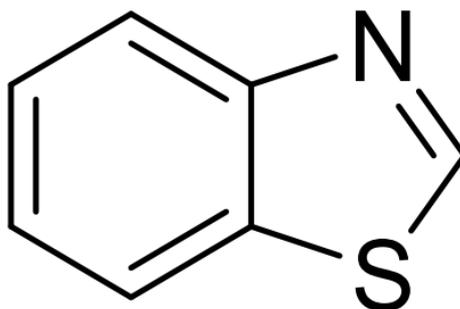
Fonte: Ministério da Saúde.

1.4. Antivirais e o Benzotiazol

Antivirais são fármacos utilizados no tratamento de infecções causadas por vírus, sendo capazes de inibirem uma ou mais etapas do seu ciclo replicativo, sem apresentar toxicidade às células hospedeiras. Devido à importância do combate aos agentes causadores de doenças de importância para a saúde pública, como a febre Zika, pesquisas de compostos químicos com atividade antiviral são fundamentais para contribuir com o tratamento de viroses ainda sem terapia antiviral licenciada (Kausar *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o benzotiazol é um composto químico heterocíclico cujo núcleo é formado a partir da fusão dos anéis benzeno e tiazol (Irfan *et al.*, 2020) (**Figura 9**). O anel tiazol tem em sua estrutura átomos de nitrogênio e enxofre, sendo esses átomos responsáveis pelas atividades farmacológicas do benzotiazol. Adicionalmente, alterações na estrutura desses anéis, podem potencializar suas atividades biológicas intracelulares (Gjorgjieva *et al.*, 2019; Yadav *et al.*, 2023). Seus derivados têm demonstrado interessante atividade antiviral, tais como contra DENV, HCV, *Herpes simplex vírus* (HSV) 1 e 2, *Human immunodeficiency virus* (HIV), vírus Influenza e *West Nile virus* (WNV). A atividade desses derivados se baseia na capacidade de se ligarem às proteínas virais, influenciando diretamente nos ciclos replicativos virais (Asiri *et al.*, 2020; Lai; Sridhar Prasad; Padmanabhan, 2013; Li *et al.*, 2012; Manfroni *et al.*, 2012).

Figura 9: Estrutura molecular do benzotiazol



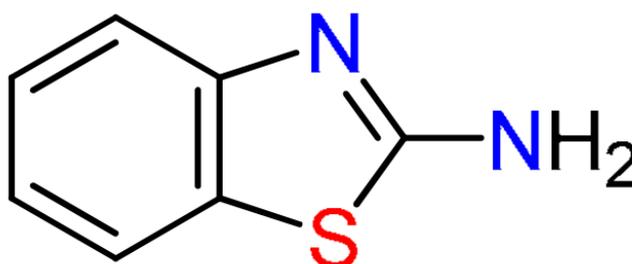
Fonte: Adaptado de Dias *et al.*, 2023.

A relação estrutura-atividade dos seus derivados revela uma excelente compreensão da porção benzotiazol no campo da terapia de doenças infecciosas. Os heterocíclicos derivados desse tipo de composto químico são compostos versáteis que estão presentes em quase todos os produtos naturais e compostos orgânicos sintéticos, geralmente associados a uma determinada atividade (Kharb; Shahar Yar; C. Sharma, 2011). Possuem uma ampla gama de

atividades biológicas e são encontrados em muitas moléculas e medicamentos biologicamente ativos, tais como vitamina tiamina, sulfatiazol (medicamento antimicrobiano), ritonavir (medicamento antirretroviral), abafungina (medicamento antifúngico) e tiazofurina (medicamento antineoplásico) (Rouf; Tanyeli, 2015). A porção tiazol é abundantemente encontrada em produtos naturais, enquanto a porção benzotiazol é rara e fácil de manipular, sendo assim uma fonte de interesse para o desenvolvimento de novos compostos sintetizados com base em sua estrutura (Sharma *et al.*, 2013).

O aminobenzotiazol é um derivado do anel de benzotiazol, ligado à um grupo amino (-NH₂) (**Figura 10**). Pode ser encontrado em alguns produtos naturais, como metabólitos secundários de microrganismos e plantas. Possuem atividades importantes, como por exemplo atividades antivirais, especialmente anti-ZIKV (Lai; Sridhar Prasad; Padmanabhan, 2013; Dias *et al.*, 2023). A porção amino pode ser ligada a outras estruturas e heterocíclicos, de forma a melhorar suas características (Huang; Cierpicki & Grembecka, 2023). Nesse contexto, sua utilização se apresenta como uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos compostos com potenciais atividades antivirais.

Figura 10: Estrutura do aminobenzotiazol



Fonte: Adaptado de Zhilitskaya; Yarosh, 2021

Por isso, o intuito desse trabalho foi avaliar a atividade antiviral de compostos derivados do aminobenzotiazol na replicação do ZIKV *in vitro*.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, não existem medicamentos específicos para tratar a infecção pelo ZIKV, sendo o tratamento disponível utilizado apenas para amenizar os sintomas da doença. De acordo com o Ministério da Saúde, o ZIKV tem sido um problema de saúde pública mundial, uma vez

que as complicações neurológicas decorrentes comprometem toda a vida dos acometidos pela infecção. A microcefalia, por exemplo, uma condição caracterizada pela redução do perímetro cefálico, causa mal desenvolvimento e morte de células progenitoras neurais, células neuroepiteliais e células glias radiais. Desse modo, o indivíduo desenvolve deficiência intelectual, problemas psicomotores, além de problemas de visão e audição. Adicionalmente, a síndrome de Guillain-Barré gera consequências futuras que demonstram a necessidade do desenvolvimento de uma terapêutica eficaz, visto que, as terapias utilizadas atualmente são apenas para redução dos sintomas. Tendo isso em vista, o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos é fundamental para contribuir com o controle da doença e suas complicações. Conseqüentemente, tais descobertas poderiam gerar uma melhoria nos impactos socioeconômicos consequentes, bem como contribuir com o Sistema Único de Saúde (SUS) e com a melhora da qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

Pesquisas recentes demonstraram o potencial terapêutico de derivados de benzotiazol contra vírus de importância para a saúde pública. Entretanto, seus mecanismos de inibição do ciclo replicativo viral, bem como a ação de diferentes derivados na replicação viral, ainda precisam ser elucidados, sendo os resultados obtidos neste trabalho de grande relevância para um maior entendimento sobre a ação antiviral de compostos heterocíclicos. Neste trabalho, investigamos uma série de compostos derivados de aminobenzotiazol contra a replicação do vírus Zika. Frente ao exposto, os compostos sintéticos derivados do aminobenzotiazol representam bons candidatos para investigação científica e para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da febre Zika (Dias *et al.*, 2023).

3. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antiviral de compostos sintéticos derivados do aminobenzotiazol na replicação do ZIKV *in vitro*, a partir de um sistema de *replicon* subgenômico expressando as proteínas não-estruturais do vírus.

3.1. Objetivos específicos

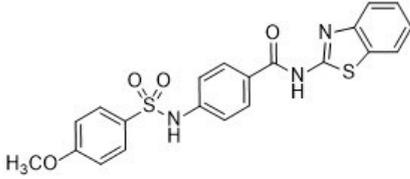
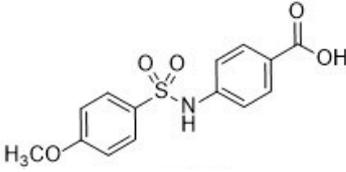
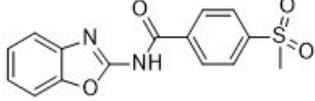
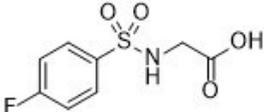
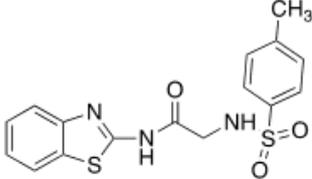
- Avaliar o perfil citotóxico dos compostos derivados do aminobenzotiazol em células BHK-21-ZIKV-IRES-Neo;
- Avaliar a atividade antiviral dos compostos na replicação do ZIKV, utilizando a maior concentração não-citotóxica;
- Determinar a concentração efetiva de 50% (EC₅₀), concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) e índice de seletividade (IS=CC₅₀/EC₅₀) dos compostos ativos.

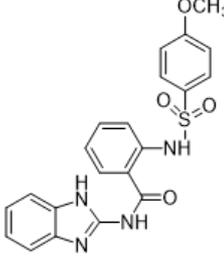
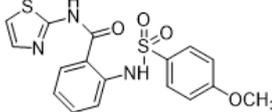
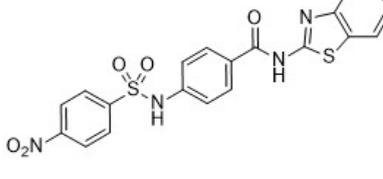
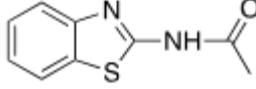
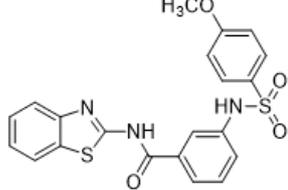
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Compostos

Os compostos foram sintetizados e cedidos pelo Laboratório de Síntese de Candidatos a Fármacos (LaSFar) do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) (Dias et al., 2023). Os compostos apresentam estrutura semelhante à molécula original e sua síntese foi realizada a partir da modificação da estrutura original por meio da otimização *hit-to-lead*. Os compostos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) com pureza $\geq 99,9$ (HPLC), mantidos em solução estoque a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e diluídos em meio de cultura celular imediatamente antes dos ensaios (**Tabela 1**).

Tabela 1: Nomenclatura e estrutura dos compostos derivados do aminobenzotiazol.

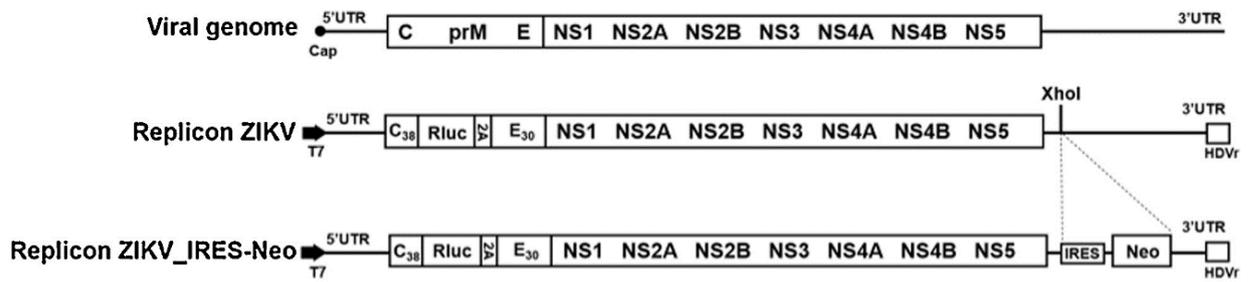
COMPOSTO	ESTRUTURA
CAC034	
CAC050	
CAC066	
CAC111	
CAC115	

CAC153	
CAC154	
DNF8	
DNF9	
DNF16	

4.2. Cultura de células

Foram utilizadas células BHK-21 provenientes de rim de hamster neonato, expressando o replicon subgenômico ZIKV-IRES-Neo (BHK-21-ZIKV-IRES-Neo cells), as quais expressam o gene *reporter Renilla-luciferase* (Rluc) e a enzima Geneticina-N-Acetiltransferase, que confere resistência ao antibiótico Geneticina, utilizado como antibiótico de seleção (500 µg/mL) (Fernandes *et al.*, 2021) (**Figura 11**). As células foram cultivadas em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma-Aldrich) e suplementado com 1% (v/v) de penicilina e estreptomicina (Gibco), 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais (Gibco) e 5% (v/v) de soro fetal bovino inativado (Gibco) incubadas a 37°C e 5% de CO₂.

Figura 11: Construção do replicon subgenômico ZIKV-IRES-Neo.



Fonte: Adaptado de Fernandes et al., 2021.

4.3. Avaliação da citotoxicidade

Para análise da citotoxicidade dos compostos, foi utilizado o ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide) segundo Monsmann e colaboradores (1983), com modificações (Cassani *et.al.*, 2023; Dias *et al.*, 2023).

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelo tratamento das células BHK-21-ZIKV-IRES-Neo com os compostos nas concentrações iniciais de 50, 10 e 2 μ M. As células foram plaqueadas em uma concentração de 1×10^4 célula/poço, e após 24h, os compostos foram diluídos em DMEM e adicionados às células por 72 h à 37°C e 5% de CO₂. Ao final, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se MTT, dissolvido em DMEM incompleto, a 1 mg/mL e incubado por 30 minutos à 37°C. Após incubação, retirou-se o sobrenadante e a adicionou-se DMSO para a formação dos cristais de formazan (100 μ L/poço).

Os ensaios foram realizados em quadruplicatas, em três ensaios independentes, e DMSO foi utilizado como controle não-tratado. A determinação da viabilidade celular foi obtida através da leitura de absorbância em comprimento de onda de 560nm. A porcentagem da viabilidade celular mediante cada tratamento foi determinada pela média dos poços tratados x 100/média dos poços controle. A maior concentração viável de cada composto foi utilizada para avaliar a atividade viral.

4.4. Avaliação da atividade antiviral

Para avaliar a atividade antiviral dos compostos sintéticos no ciclo replicativo do ZIKV, as células BHK-21-ZIKV-IRES-Neo foram cultivadas em microplacas de 96 poços a uma concentração de 1×10^4 células/poço. Após 24h, os compostos nas maiores concentrações não-citotóxicas foram adicionados às células em quadruplicatas e incubados por 72 h à 37°C e 5% de CO₂. DMSO foi utilizado como controle não-tratado nos ensaios.

A atividade antiviral foi medida por ensaio de *Renilla*-luciferase (Rluc) (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Para isso, ao final do período de tratamento, o meio contendo os compostos foi retirado, em seguida lavou-se as células com tampão fosfato-salino (*Phosphate-Buffered Saline* - PBS) [1x] e após, adicionou-se de 30µL de tampão de lise passiva. A placa foi incubada por 30 min em estufa a 37°C e, passado o tempo, coletou-se 10µL do sobrenadante, adicionou-se em placa de 96 poços branca para adição do substrato de *Renilla*-luciferase, para realizar a leitura de luminescência seguindo as orientações do fabricante. Mensurou-se a luminescência em leitor de placa GloMax (Promega). Os sinais de luminescência são proporcionais à replicação do *replicon* do ZIKV dentro das células. A porcentagem da atividade antiviral mediante cada tratamento foi determinada pela média dos poços tratados x 100/média dos poços controle.

4.5. Determinação da concentração efetiva de 50% (EC₅₀), concentração citotóxica em 50% (CC₅₀) e índice de seletividade (IS=CC₅₀/EC₅₀)

Para determinação do EC₅₀ e CC₅₀ de cada composto, as células BHK-21-ZIKV-IRES-Neo foram plaqueadas em uma concentração de 1x10⁴ células/poço em placas de 96 poços. Após 24h, os compostos foram diluídos em DMEM 5% em concentrações variando de 200 a 1,56 µM para o composto CAC153; de 100 a 0,78 µM para o CAC154 e de 400 a 3,12 µM para o DNF9. 72h após, o sobrenadante contendo os compostos foi removido e as células foram adicionadas de MTT a 1 mg/mL ou tampão de lise passiva para a continuidade dos ensaios de viabilidade celular e antiviral, respectivamente, como descrito acima. Os dados de MTT e luminescência foram analisados em conjunto utilizando regressão não-linear no software GraphPad Prism 8.0, que fornece os valores de CC₅₀, EC₅₀. O IS foi calculado com base na razão CC₅₀/EC₅₀.

4.6. Análise estatística

Todos os dados foram expressos por meio de média e desvio padrão e realizados em quadruplicatas, em um mínimo de três ensaios independentes, para garantir a reprodutibilidade dos dados. A análise estatística das diferenças foi determinada por meio de teste estatístico de análise de variância (*Two-way ANOVA*) e regressão não-linear aplicando *log(inhibitor) vs. Response – Variable slope (four parameters)*, onde valores de p<0.05 foram considerados significantes.

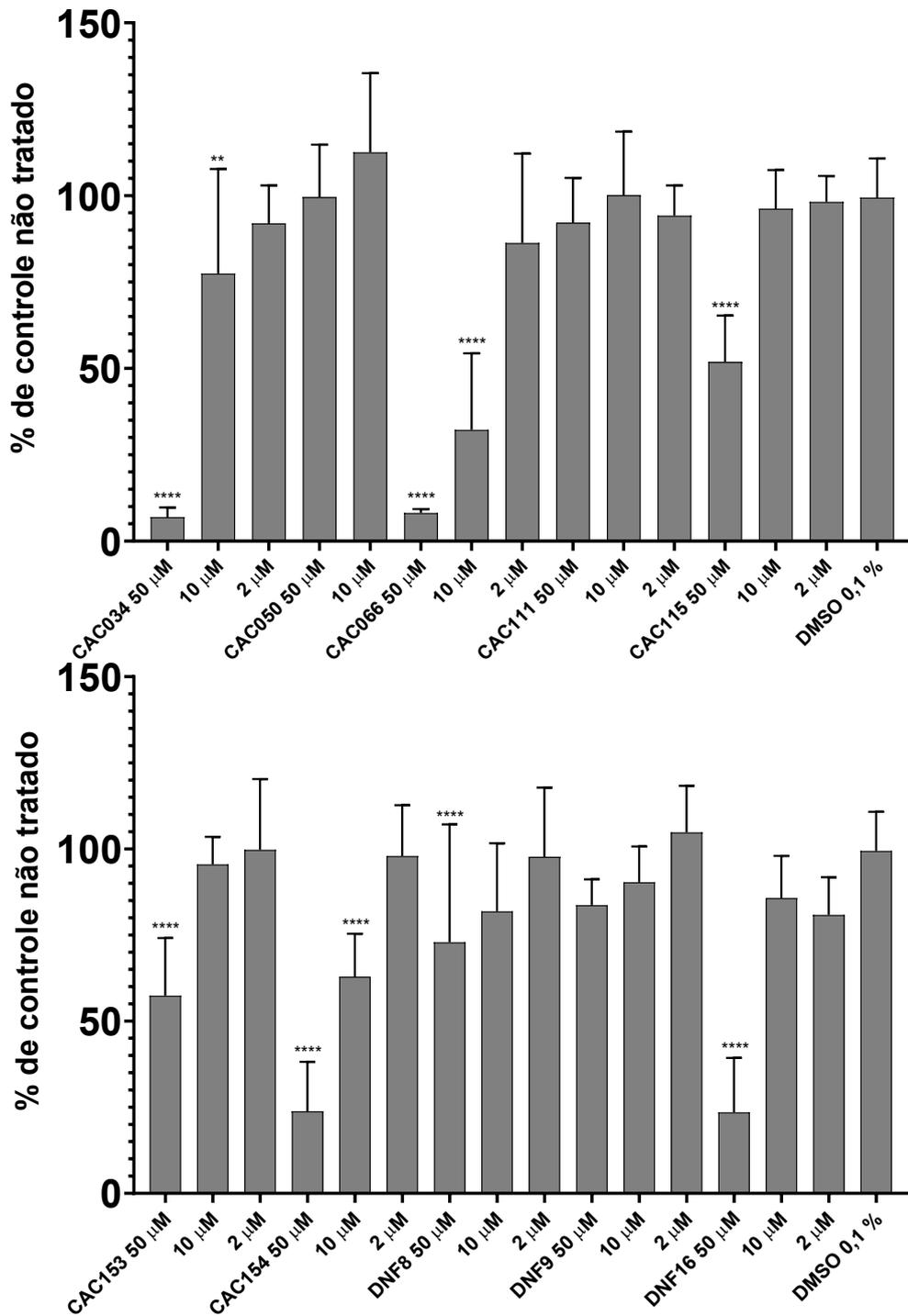
5. RESULTADOS

5.1 Análise de viabilidade celular dos compostos derivados do benzotiazol

Para avaliar o efeito dos compostos na viabilidade celular, células BHK-21-ZIKV-IRES-Neo foram plaqueadas em placa de 96 poços e após 24h, foram tratadas com os compostos nas concentrações de 50, 10 e 2 μM por. As concentrações consideradas viáveis para cada composto apresentaram a média da porcentagem de viabilidade celular igual ou superior à 80%. Os compostos CAC050, CAC111 e DNF9 a 50 μM apresentaram viabilidade celular de 100%, 92% e 84%, respectivamente. Alternativamente, o tratamento com os compostos CAC115, CAC153, DNF8 e DNF16 a 10 μM apresentou 96%, 96%, 82% e 86% de viabilidade celular, respectivamente. Por fim, o tratamento com os compostos CAC034, CAC066 e CAC154 a 2 μM apresentaram 92%, 86% e 98% de viabilidade celular, respectivamente (

Figura 12).

Figura 12: Análise de viabilidade celular dos compostos derivados do aminobenzotiazol.



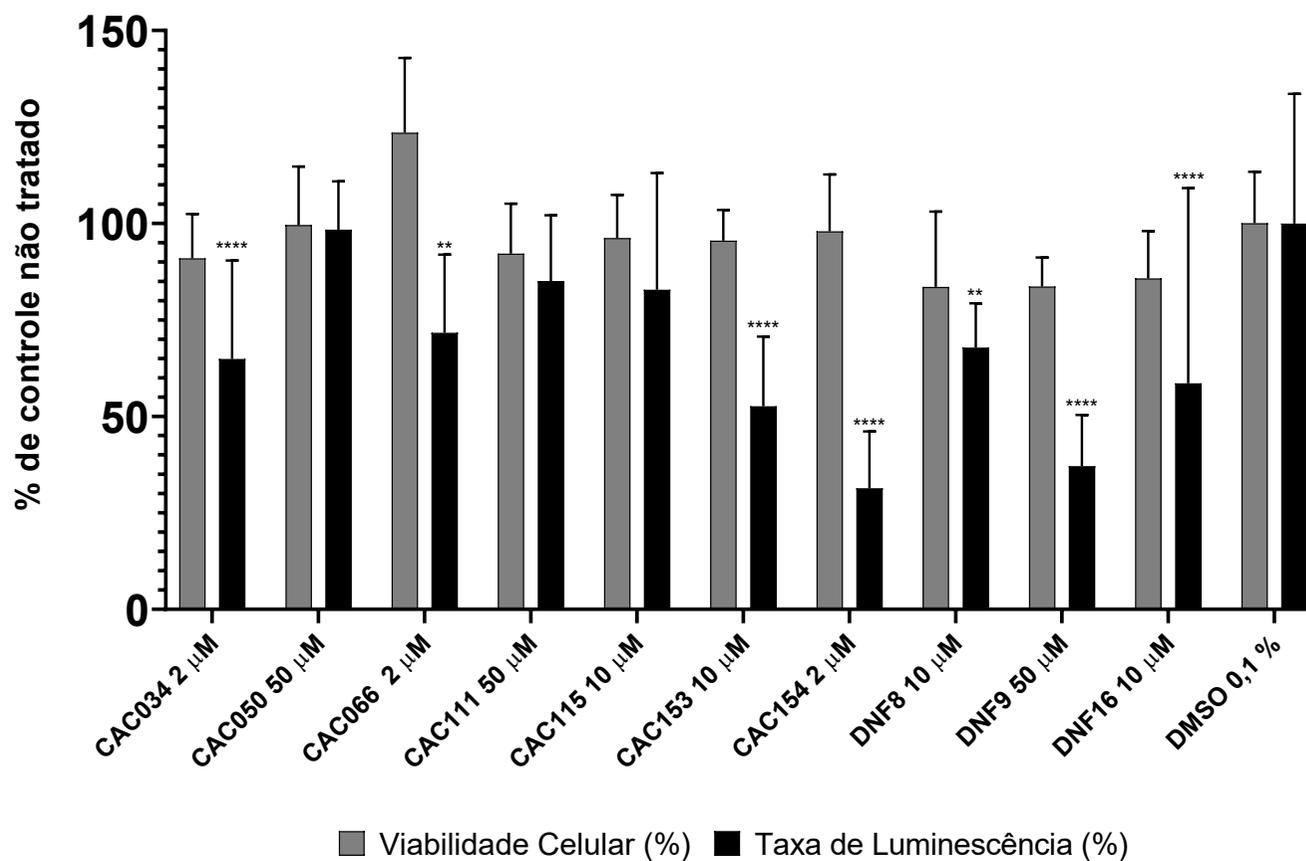
Células BHK-21-ZIKV-IRES-Neo foram plaqueadas em placa de 96 poços e após 24h, foram tratadas com os compostos nas concentrações de 50, 10 e 2 µM por 72h à 37°C e 5% de CO₂. Após o tratamento, o meio com composto foi removido e substituído por meio com MTT a 1 mg/mL e incubado por 30 min. Após a incubação, o meio foi removido e os cristais solubilizados com DMSO. As taxas de viabilidade celular foram medidas por absorvância (560 nm). DMSO foi utilizado como controle não-tratado. Valores médios de três experimentos independentes, cada um em quadruplicatas, incluindo o desvio padrão. Valores de $p < 0,01$ foram considerados significativos: (*) $p < 0,01$; (**) $p < 0,001$; (***) $p < 0,0001$.

5.2 Compostos derivados do aminobenzotiazol inibem a replicação do ZIKV *in vitro*

A atividade antiviral dos compostos foi analisada utilizando-se a maior concentração não-citotóxica, selecionada a partir dos ensaios de viabilidade celular. Baseado nos dados de viabilidade celular, 10 derivados de aminobenzotiazol foram avaliados quanto a atividade na replicação do ZIKV. Para os ensaios de atividade antiviral, células BHK-21-ZIKV-IRES-Neo foram cultivadas em microplacas de 96 poços. Após 24h, os compostos foram adicionados às células e incubados por 72h. DMSO foi utilizado como controle não-tratado. Os dados de luminescência foram obtidos pelo ensaio de *Renilla*-luciferase, e os ensaios de viabilidade celular foram repetidos em paralelo.

Os resultados demonstraram que o tratamento das células com os compostos CAC034, CAC066 e CAC154 a 2 μM reduziram a replicação do ZIKV em 35% ($p < 0,0001$), 28% ($p < 0,01$) e 69% ($p < 0,0001$), respectivamente, enquanto o tratamento com os compostos CAC153, DNF8 e DNF16 a 10 μM demonstrou redução de 47% ($p < 0,0001$), 32% ($p < 0,01$) e 42% ($p < 0,0001$), respectivamente. Por fim, DNF9 a 50 μM reduziu 62,9% as taxas de replicação do ZIKV ($p < 0,0001$) (**Figura 13**).

Figura 13: Efeito de compostos derivados do aminobenzotiazol na replicação do ZIKV e na viabilidade de células BHK21-RepZIKV_IRES-Neo.



As células BHK21-RepZIKV_IRES-Neo foram tratadas com cada composto na maior concentração não-citotóxica. Após 72h, as células foram lisadas e ensaio de *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 sobrenadante foi removido e os cristais solubilizados com DMSO. A leitura de absorbância foi realizada no leitor de placas Glomax (560 nM). O ensaio de *Renilla-luciferase* foi realizado seguindo as instruções do fabricante. DMSO foi usado como controle não tratado. Os valores médios de dois experimentos independentes, cada um medido em triplicata, incluindo o desvio padrão, são mostrados. Valores de $p < 0,01$ foram considerados significativos: (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

5.3 Os compostos CAC153, CAC154 e DNF9 exibem uma atividade inibitória dose-dependente

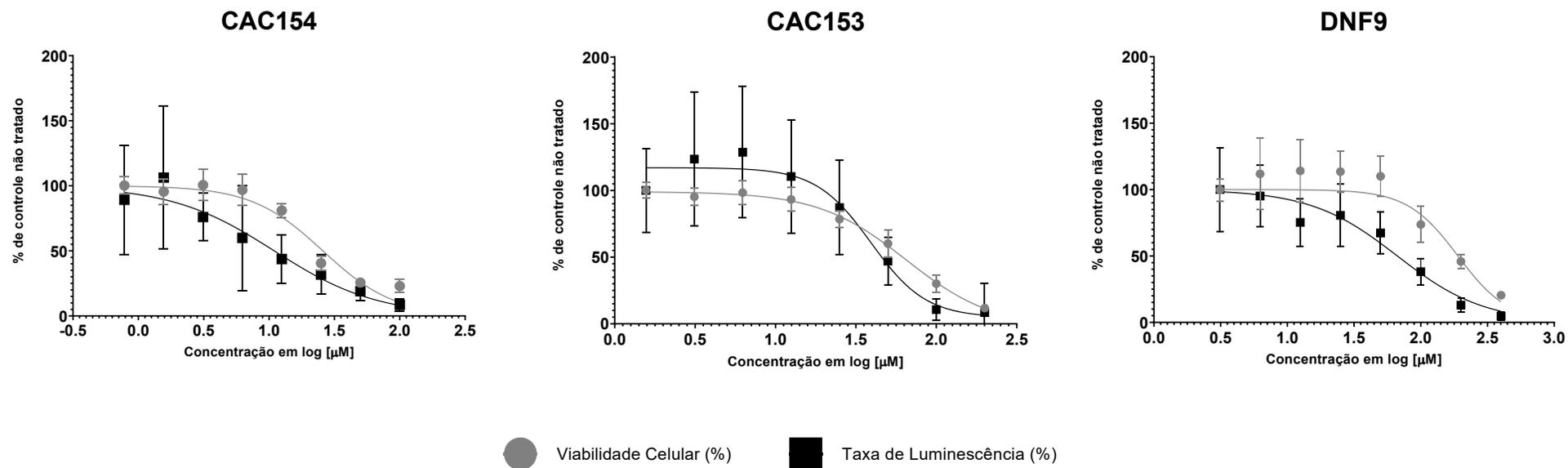
Com base nos dados obtidos, foram realizados ensaios de EC_{50} e CC_{50} com os três compostos que apresentaram as maiores taxas de inibição no ensaio antiviral (**Figura 14**), bem como a determinação do IS de cada composto, através da razão CC_{50}/EC_{50} . Para isso, as células foram plaqueadas e incubadas em concentrações variando de 200 a 1,56 μM para o composto CAC153; de 100 a 0,78 μM para o CAC154 e de 400 a 3,12 μM para o DNF9. Após 72h de incubação, as células foram adicionadas de MTT ou tampão de lise passiva. As leituras de luminescência e absorbância foram realizadas seguindo os mesmos parâmetros da determinação de viabilidade celular e atividade antiviral.

Os valores obtidos de EC_{50} , CC_{50} e IS estão apresentados na **Tabela 2**. CAC153 apresentou CC_{50} de 64,5 μM , EC_{50} de 39,2 μM e um SI de 1,7, enquanto o composto CAC154 apresentou valores de CC_{50} de 25,8 μM , EC_{50} de 10,9 μM e SI de 2,35. Para o composto DNF9, foram apresentados valores de 190,1 μM , 66,8 μM e 2,84, respectivamente para o CC_{50} , EC_{50} e SI (**Figura 14, Tabela 2**).

Tabela 2: Relação entre os valores de CC_{50} e EC_{50} de cada composto e seu índice de seletividade.

COMPOSTO	CC_{50} (μM)	EC_{50} (μM)	IS
CAC153	64,9	39,2	1,7
CAC154	25,8	10,9	2,4
DNF9	190,1	66,8	2,8

Figura 14: Determinação de EC₅₀, CC₅₀ e IS dos compostos com maior atividade antiviral.



Células BHK21-RepZIKV_IRES-Neo foram tratadas com cada composto nas concentrações variando de 200 a 1,56 μM para o composto CAC153; de 100 a 0,78 μM para o CAC154 e de 400 a 3,12 μM para o DNF9. Após 72 horas de incubação, células foram tratadas com MTT a 1 mg/mL para determinar o CC₅₀ ou com tampão de lise passiva para determinar o EC₅₀, e incubadas por 30 minutos a 37°C. As leituras de luminescência e absorbância foram realizadas em leitor de placa Glomax (Promega).

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstramos o efeito antiviral de compostos derivados do aminobenzotiazol como potenciais inibidores da replicação do RNA de ZIKV, utilizando de um sistema de *replicon* subgenômico expressando as proteínas não-estruturais do vírus. 10 compostos foram testados quanto ao seu potencial antiviral, e desses, os compostos CAC153, CAC154 e DNF9, por possuírem as maiores taxas de atividade antiviral, foram selecionados para análises de EC_{50} e CC_{50} , bem como na determinação do IS, resultando em valores de 1,7; 2,4 e 2,8, respectivamente.

Compostos derivados do benzotiazol como moléculas bioativas têm atraído o interesse da Química Medicinal, principalmente em relação à sua ação antiviral, que vem sendo estudada recentemente (Bhagdev & Sarkar, 2021). Maus e colaboradores, em 2021, evidenciaram a atividade de seus derivados por inibirem as proteases NS2B/NS3 de ZIKV e DENV-2, demonstrando o potencial dessa classe na inibição de proteínas não-estruturais dessa família viral (Maus *et al.*, 2021). Adicionalmente, nosso grupo de pesquisas demonstrou a ação de derivados de aminobenzotiazol contra ZIKV, onde os compostos CAC153 e CAC154 foram avaliados com substituintes na posição orto relativa no fragmento sulfonamida, mostrando até 100% de inibição da infecção pelo ZIKV em concentrações não-citotóxicas (Dias *et al.*, 2023). Para o composto DNF9, dados de inibição de compostos com estruturas similares, como DNF8, que incluem a porção nitro em sua estrutura, também apresentaram taxas de inibição significantes, com os maiores índices de seletividade contra ZIKV (Dias *et al.*, 2023). Dessa forma, os resultados aqui encontrados corroboram com dados previamente publicados pelo nosso grupo de pesquisas, e apontam a ação desses compostos na replicação do vírus. Além disso, estudos demonstram a atividade de benzotiazóis contra diversos vírus, tais como: DENV; influenza; *Citomegalovirus Humano*, HIV, *Enterovirus betacoxsackie*, vírus da hepatite A, hepatite C, adenovírus tipo 7, WNV e HSV-1 (Bhagdev & Sarkar, 2021; Azzam *et al.*, 2022). Tais dados apontam a efetividade desses derivados como potenciais antivirais de amplo espectro, devido à inibição da replicação de vários vírus da mesma ou de famílias virais diferentes.

Assim também, o uso de um sistema de *replicon* subgenômico como ferramenta de triagem de compostos, tem se mostrado relevante nos últimos anos, devido a vantagem de sua utilização em laboratórios de nível de biossegurança 1, por não gerar partículas infecciosas e pela facilidade no uso de genes *repórters*, como a *Renilla* luciferase (Fernandes *et al.*, 2021). Estudos publicados previamente demonstrando o uso de *replicons* subgenômicos expressando

as proteínas não-estruturais ZIKV apontam sua eficácia como metodologia de triagem de compostos, demonstrando sua versatilidade na busca por terapias antivirais (Xie *et al.*, 2016). Sua fácil utilização indica moléculas capazes de atuarem no processo de replicação viral que envolve as proteínas não-estruturais, essenciais para formação do complexo replicativo do vírus.

Proteínas não-estruturais são os alvos mais promissores para drogas antivirais tendo em vista sua menor taxa de mutações genéticas, comparado às taxas de proteínas estruturais, como as glicoproteínas de envelope, o que faz com que a ação das drogas direcionadas a esses alvos possam apresentar resultados mais promissores (Van Den Elsen *et al.*, 2023). Denomina-se “*Direct-Acting Antiviral Agents*” (DAAs), os fármacos capazes de inibir especificamente proteínas virais, trazendo como benefício altas taxas de inibição e perfis de segurança, por gerarem menos efeitos colaterais (Kim *et al.*, 2021). Portanto, a redução das taxas de replicação do ZIKV pelos compostos CAC153, CAC154 e DNF9 pode sugerir seu efeito na replicação viral na ausência da produção e disseminação de vírions e pode sugerir que a inibição da infecção é potencialmente devido à interferência no funcionamento das proteínas não-estruturais do ZIKV. A atividade antiviral aqui relatada indica que esta série de aminobenzotiazol pode ser promissora para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos antivirais para o tratamento de doenças associadas ao ZIKV.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi avaliada a atividade antiviral de compostos sintéticos derivados do aminobenzotiazol na replicação do ZIKV *in vitro*, a partir de um sistema de *replicon* subgenômico expressando as proteínas não-estruturais do vírus.

Os dados aqui apresentados demonstram que os compostos derivados do benzotiazol apresentam atividade anti-ZIKV, pois inibem o processo de replicação do vírus *in vitro*. Nesse sentido, é possível indicar esses compostos como moléculas que podem inspirar o desenvolvimento de potenciais novos fármacos contra a febre Zika, destacando a importância da síntese de moléculas com base no aperfeiçoamento de suas propriedades farmacológicas e farmacocinéticas, resultando em possíveis tratamentos que gerem uma melhora na qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela infecção. Contudo, mais análises são necessárias de forma a avaliar a ação destes compostos em ensaios pré-clínicos.

REFERÊNCIAS

- ASIRI, Y. I. et al. Benzothiazoles as potential antiviral agents. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1459–1480, 6 out. 2020.
- AZZAM, R. A.; GAD, N. M.; ELGEMEIE, G. H. Novel Thiophene Thioglycosides Substituted with the Benzothiazole Moiety: Synthesis, Characterization, Antiviral and Anticancer Evaluations, and NS3/4A and USP7 Enzyme Inhibitions. **ACS Omega**, 29 set. 2022.
- BALMASEDA, A. et al. Comparison of Four Serological Methods and Two Reverse Transcription-PCR Assays for Diagnosis and Surveillance of Zika Virus Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 3, mar. 2018.
- BERNARDO-MENEZES et al. An overview of Zika virus genotypes and their infectivity. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 55, 1 jan. 2022.
- BHAGDEV, K.; SARKAR, S. Benzothiazole Moiety and Its Derivatives as Antiviral Agents. **Med. Sci. Forum** 2021, 7, 9.
- BHANDARI, V.; TAKSANDE, A. B.; BHAGYESH SAPKALE. Disease Transmission and Diagnosis of Zika Virus. **Cureus**, 22 nov. 2023.
- BHARDWAJ, U. et al. Gist of Zika Virus pathogenesis. **Virology**, v. 560, p. 86–95, ago. 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: Brasil, 2015 a 2022. Volume 54, N.º 5, 3 Abr. 2023
- BRASIL. **Orientações integradas de vigilância e atenção à saúde no âmbito da Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional**: procedimentos para o monitoramento das alterações no crescimento e desenvolvimento a partir da gestação até a primeira infância, relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas dentro da capacidade operacional do SUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 158 p. ISBN 978-85-334-2489-0.
- CASSANI, N. M. et al. Roles of Bothrops jararacussu toxins I and II: Antiviral findings against Zika virus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 227, p. 630–640, fev. 2023.
- CASSANI, N. M. Atividade antiviral de toxinas de serpente bothrops jararacussu no ciclo replicativo do zika vírus. **Repositorio.ufu.br**, 2024.
- CHAN, J. F. W. et al. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. **Journal of Infection**, v. 72, n. 5, p. 507–524, maio 2016.
- CHRISTIAN, K. M.; SONG, H.; MING, G. Pathophysiology and Mechanisms of Zika Virus Infection in the Nervous System. **Annual Review of Neuroscience**, v. 42, n. 1, p. 249–269, 8 jul. 2019.
- CÔRTEZ, N. et al. Integrated control strategies for dengue, Zika, and Chikungunya virus infections. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 18 dez. 2023.

DIAS, C. et al. Discovery and structural optimization of a new series of N-acyl-2-aminobenzothiazole as inhibitors of Zika virus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 117488–117488, 1 nov. 2023.

DIOSA-TORO, M. et al. Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2020.

FERNANDES, R. S. et al. Discovery of an imidazonaphthyridine and a riminophenazine as potent anti-Zika virus agents through a replicon-based high-throughput screening. **Virus Research**, v. 299, p. 198388, jul. 2021.

GJORGJIEVA, M. et al. Benzothiazole-based Compounds in Antibacterial Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 38, p. 5218–5236, 7 jan. 2019.

GUERRERO SALDIVIA, S. E. et al. Zika Virus: A Systematic Review of Teratogenesis, Congenital Anomalies, and Child Mortality. **Cureus**, 7 fev. 2023.

HILLS, S. L.; FISCHER, M.; PETERSEN, L. R. Epidemiology of Zika Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl_10, p. S868–S874, 16 dez. 2017.

HUANG, G.; CIERPICKI, T.; GREMBECKA, J. 2-Aminobenzothiazoles in anticancer drug design and discovery. **Bioorganic Chemistry**, v. 135, p. 106477, 1 jun. 2023.

IRFAN, A. et al. Benzothiazole derivatives as anticancer agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 265–279, 1 jan. 2020.

KAUSAR, S. et al. A review: Mechanism of action of antiviral drugs. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 35, p. 205873842110026, 16 jan. 2021.

KHARB, R.; SHAHAR YAR, M.; C. SHARMA, P. New Insights into Chemistry and Anti Infective Potential of Triazole Scaffold. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 21, p. 3265–3297, 1 jul. 2011.

KIM, J. et al. Identification of a Direct-Acting Antiviral Agent Targeting RNA Helicase via a Graphene Oxide Nanobiosensor. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 13, n. 22, p. 25715–25726, 26 maio 2021.

KOMARASAMY, T. V. et al. Zika Virus Neuropathogenesis: The Different Brain Cells, Host Factors and Mechanisms Involved. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 16 mar. 2022.

KWAN, J.; BILICILER, S. Guillain-Barré Syndrome and Other Acute Polyneuropathies. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 37, n. 2, p. 313–326, maio 2021.

LAI, H.; SRIDHAR PRASAD, G.; PADMANABHAN, R. Characterization of 8-hydroxyquinoline derivatives containing aminobenzothiazole as inhibitors of dengue virus type 2 protease in vitro. **Antiviral Research**, v. 97, n. 1, p. 74–80, jan. 2013.

LI, K. et al. Optimization of Potent Hepatitis C Virus NS3 Helicase Inhibitors Isolated from the Yellow Dyes Thioflavine S and Primuline. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 3319–3330, 12 abr. 2012.

MADEWELL, Z. J. Arboviruses and Their Vectors. **Southern Medical Journal**, v. 113, n. 10, p. 520–523, out. 2020.

MANFRONI, G. et al. Pyridobenzothiazole derivatives as new chemotype targeting the HCV NS5B polymerase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 866–876, jan. 2012.

MARTÍNEZ DE SALAZAR, P. et al. Zika fever. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 34, n. 4, p. 247–252, abr. 2016.

MARTINS, M. M.; MEDRONHO, R. D. A.; CUNHA, A. J. L. A. D. Zika virus in Brazil and worldwide: a narrative review. **Paediatrics and International Child Health**, v. 41, n. 1, p. 28–35, 24 jun. 2020.

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

MEI, L. et al. Protocol for hit-to-lead optimization of compounds by auto in silico ligand directing evolution (AILDE) approach. **STAR Protocols**, v. 2, n. 1, p. 100312, mar. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Zika Vírus**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/z/zika-virus>>. Acesso em: 9 maio. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Boletim Epidemiológico. Monitoramento das arboviroses urbanas: semanas epidemiológicas 1 a 35 de 2023**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no>

13#:~:text=N%C3%A3o%20foram%20confirmados%20%C3%B3bitos%20por%20Zika%20no%20Brasil%20em%202023.>. Acesso em: 5 mar. 2024.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 10 mar. 2016.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, jul. 2016.

OKSENYCH, V.; KAINOV, D. E. Broad-Spectrum Antivirals and Antiviral Drug Combinations. **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 301, 1 fev. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Vector-borne Diseases**. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Director-General summarizes the outcome of the Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/detail/01-02-2016-who-director-general-summarizes-the-outcome-of-the-emergency-committee-regarding-clusters-of-microcephaly-and-guillain-barr%C3%A9-syndrome>>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Zika Vírus**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>>. 2022. Acesso em: 23 maio.

2023.

OSUNA-RAMOS et al. Cholesterol-Lowering Drugs as Potential Antivirals: A Repurposing Approach against Flavivirus Infections. **Viruses**, v. 15, n. 7, p. 1465–1465, 28 jun. 2023.

PIELNAA, P. et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, v. 543, p. 34–42, 1 abr. 2020.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 4 set. 2019.

POSTLER, T. S. et al. Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. **Archives of Virology**, v. 168, n. 9, 10 ago. 2023.

REGLA-NAVA, J. A. et al. A Zika virus mutation enhances transmission potential and confers escape from protective dengue virus immunity. **Cell Reports**, v. 39, n. 2, 12 abr. 2022.

REZENDE, C. O. et al. Synthesis and Antibacterial Activity of Alkylated Diamines and Amphiphilic Amides of Quinic Acid Derivatives. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, n. 3, p. 344–350, set. 2015.

ROUF, A.; TANYELI, C. Bioactive thiazole and benzothiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 911–927, jun. 2015.

RYU, W.-S. **Virus Life Cycle**. Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses, p. 31–45, 6 maio 2016.

SCHNEIDER, C. A.; Calvo, E.; Peterson, K. E. Arboviruses: How Saliva Impacts the Journey from Vector to Host. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9173, 25 ago. 2021.

SHAHORIZAILA, N.; LEHMANN, H. C.; KUWABARA, S. Guillain-Barré syndrome. **The Lancet**, v. 397, n. 10280, p. 1214–1228, mar. 2021.

SHARMA, P. C. et al. Medicinal significance of benzothiazole scaffold: an insight view. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 240–266, 1 abr. 2013.

SHARMA, V. et al. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 87–98, fev. 2020.

Secretaria de Saúde do Distrito Federal. Zika vírus. 2022. Disponível em: <<https://www.saude.df.gov.br/zika-virus>>.

SIROHI, D.; KUHN, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl_10, p. S935–S944, 16 dez. 2017.

VAN DEN ELSEN, K. et al. Flavivirus nonstructural proteins and replication complexes as antiviral drug targets. **Current Opinion in Virology**, v. 59, p. 101305, 1 abr. 2023.

VIVEIROS-ROSA, S. G.; REGIS, E. G.; SANTOS, W. C. Vector competence of *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Zika virus transmission: an integrative review. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 44, p. 1, 3 fev. 2020.

WANG, J. et al. Emergence of Zika Virus in *Culex tritaeniorhynchus* and *Anopheles sinensis* Mosquitoes in China. **Virologica Sinica**, v. 36, n. 1, p. 33–42, 2 jul. 2020.

XIE, X. et al. Zika Virus Replicons for Drug Discovery. **EBioMedicine**, v. 12, p. 156–160, out. 2016.

XU, S.; WANG, L.; PAN, X. An evaluation of combined strategies for improving the performance of molecular docking. **Journal of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 19, n. 02, p. 2150003, 27 abr. 2021.

YADAV, R. A. et al. Recent advances in the synthesis of new benzothiazole based anti-tubercular compounds. **RSC Advances**, v. 13, n. 32, p. 21890–21925, 1 jan. 2023.

OUTRAS REFERÊNCIAS

Figura 1: Conselho Regional de Enfermagem de Santa Catarina. **Sintomas-zika**. Disponível em: <<https://www.corensc.gov.br/sintomas-zika/>>. Acesso em: 22 abr. 2024.

Figura 2: MOORE, C. A. et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 3, p. 288, 1 mar. 2017.

Figura 3: VAN DER LINDEN, V. et al. Congenital Zika syndrome with arthrogryposis: retrospective case series study. **BMJ**, [S.l.], v. 354, p. i3899, 2016.

Figura 4: DAI, L. et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 5, p. 696–704, maio 2016.

Figura 5: PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature microbiology**, v. 5, n. 6, p. 796–812, 1 jun. 2020.

Figura 6: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Zika epidemiology update - February 2022**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update---february-2022>>.

Figura 8: MINISTÉRIO DA SAÚDE. Painel de Monitoramento das Arboviroses. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses>>.

Figura 10: ZHILITSKAYA, L. V.; YAROSH, N. O. Synthesis of biologically active derivatives of 2-aminobenzothiazole. **Chemistry of heterocyclic compounds**, v. 57, n. 4, p. 369–373, 1 abr. 2021.