

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Otavio Rodrigues de Paula

**Busca e avaliação de potenciais inibidores do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} como
candidatos a antivirais contra a Febre Zika.**

São Carlos, SP
2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Otavio Rodrigues de Paula

**Busca e avaliação de potenciais inibidores do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} como
candidatos a antivirais contra a Febre Zika.**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de bacharelado em
Biotecnologia, da Universidade Federal de São
Carlos, como parte dos requisitos para obtenção
do título de bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Nathalya Cristina de Moraes Roso Mesquita
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes

São Carlos, SP
2025

Dedicatória

Dedico este trabalho e todo o seu significado à minha família, Beatriz e Anna Júlia e à Nathalya, minha orientadora.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Elza e Gustavo, pelos sacrifícios feitos em nome de minha educação.

Aos meus irmãos, por enfrentarem ao meu lado os desafios da vida e torná-la mais leve em meio às dificuldades.

Aos meus avós, por me oferecerem um lar e por me orientarem em momentos críticos e tão cheios de incerteza.

À minha companheira de vida, Beatriz, por todos os seus esforços realizados em nome deste trabalho e de minha formação.

À minha filha, Anna Júlia, por ressignificar a minha concepção da felicidade e me permitir extrair o melhor de mim.

Ao curso de Biotecnologia da UFSCar, pela oportunidade de estudar o que amo.

À doutora Nathalya, por me orientar de forma excepcional, equilibrando de forma impecável seriedade e profissionalismo com serenidade, alegria e entusiasmo.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial à Letícia, pela ajuda no dia a dia e pelas conversas descontraídas.

À minha coorientadora, doutora Andrea, pela prontidão em me auxiliar e orientar sempre que necessário.

E aos professores Dr. Rafael Guido e Dra. Arlene Corrêa, por aceitarem compor a banca examinadora deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. O vírus Zika: histórico e distribuição geográfica	7
1.2. A febre ZIKA	8
1.2.1. Transmissão, sintomatologia e possíveis complicações	8
1.2.2. Diagnóstico e tratamento	8
1.3. Biologia estrutural do ZIKV	9
1.4. Complexo ZIKV_NS2B-NS3 ^{Pro}	10
1.5. Estratégias de inibição e inibidores do complexo ZIKV_NS2B-NS3 ^{Pro}	12
1.6. Chalconas, Flavonas, Cumarinas, Pirimidinonas, Pirroquinazolininas e Quinoxalinonas	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Clonagem expressão e purificação do complexo ZIKV_NS2B-NS3 ^{Pro}	18
3.2. Avaliação da concentração enzimática ideal para ensaios de atividade	18
3.3. Caracterização cinética do complexo ZIKV_NS2B-NS3 ^{Pro}	19
3.4. Triagem de compostos	20
3.4.1. Atividade pontual	20
3.4.2. Determinação do IC ₅₀	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Purificação do complexo ZIKV_NS2B-NS3 ^{Pro}	21
4.2. Avaliação da concentração enzimática ótima para ensaios de atividade	21
4.3. Caracterização cinética do complexo ZIKV_NS2B-NS3 ^{Pro}	22
4.4. Triagem de compostos	24
4.4.1. Atividade pontual	24
4.4.2. Determinação do IC ₅₀	25
5. CONCLUSÕES	29
6. PERSPECTIVAS	29
7. REFERÊNCIAS	30

Resumo

O vírus Zika (ZIKV) foi isolado pela primeira vez no ano de 1947, em Uganda, e o primeiro registro de infecção humana pelo vírus foi feito 5 anos mais tarde, na Nigéria. O primeiro grande surto ocorreu na polinésia francesa onde 183 mil pessoas foram acometidas pelo vírus. Entre 2014 e 2015 o vírus passou a circular no Brasil, mais de 1 milhão de casos suspeitos foram relatados e relacionados com condições mais graves como a microcefalia e a síndrome de Guillain-Barré. Ainda não existem vacinas ou tratamentos específicos para a Febre Zika comercialmente disponíveis e considerando a possibilidade de uma nova epidemia, a busca por tratamentos permanece urgente. Uma possibilidade é o desenvolvimento de inibidores de proteínas essenciais para o ciclo de replicação viral, como a protease de ZIKV (ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}). Neste trabalho, dois conjuntos de compostos foram avaliados quanto ao seu potencial inibitório frente à protease de ZIKV. Para isso, a enzima foi expressa, purificada e avaliada quanto à concentração ideal de proteínas a ser usada nos ensaios subsequentes. Posteriormente, um ensaio de cinética enzimática foi realizado, a partir do qual verificou-se que a proteína se comportava conforme o esperado e então testes de inibição puderam ser realizados. Inicialmente, um teste de inibição de atividade pontual foi feito sob concentração de 200 μ M de cada composto e aqueles que exibiram inibição significativa, foram então testados novamente através de diluição seriada de 10 pontos inicialmente à 200 μ M. Os compostos capazes de inibir a protease de ZIKV e mais de 80%, tiveram seu IC₅₀ determinado, a fim de entender se eram promissores como potenciais agentes anti-Zika. O protocolo de purificação do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} se mostrou reprodutível fornecendo concentrações enzimáticas satisfatórias. Os ensaios de cinética enzimática, por sua vez, apresentaram resultados consistentes quando comparados com a literatura. Já os ensaios de atividade pontual revelaram, inicialmente, 7 compostos capazes de inibir em 80% a atividade proteolítica do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} *in vitro*. Os LSPN 921, LSPN 1070, LSPN 1111, LSPN 1112 e LSPN 1121 se mostraram bons inibidores de ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}. Entre eles, LSPN 1111 ganha destaque por seu IC₅₀ de 0,4 μ M. Tendo em vista os resultados apresentados, a otimização estrutural destes compostos aqui identificados podem contribuir para o desenvolvimento de antivirais eficazes contra flavivírus, representando uma abordagem promissora na busca por novas terapias.

Listas de ilustrações

Figura 1: Esquema ilustrativo da poliproteína de ZIKV antes e depois do processamento pós traducional.....	10
Figura 2: Conformações estruturais do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}.....	12
Figura 3: Representação da estrutura química da Chalcona.....	13
Figura 4: Representação da estrutura química da Flavona.....	14
Figura 5: Representação da estrutura química da Cumarina.....	15
Figura 6: Representação da estrutura química da 4(1H) - pirimidinona.....	15
Figura 7: Representação da estrutura química da Quinazolina.....	16
Figura 8: Representação da estrutura química da Quinoxalina.....	16
Figura 9: Curva de calibração que relaciona os níveis de emissão de fluorescência de uma amostra com a concentração de aminometilcumarina.....	19
Figura 10: Validação do processo de purificação do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}.....	21
Figura 11: Gráfico de RFU versus tempo de reação.....	22
Figura 12: Gráfico de velocidades iniciais de formação de AMC versus concentração de substrato.....	23
Figura 13: Gráfico de atividade relativa do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} na presença dos diferentes inibidores do conjunto de compostos 1.	24
Figura 14: Gráfico de atividade relativa do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} na presença dos diferentes inibidores do conjunto de compostos 2.....	25
Figura 15: Gráficos de atividade relativa do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} na presença dos compostos LSPN 903, LSPN 921, LSPN 923, LSPN 1070, LSPN 1111, LSPN 1112 e LSPN 1121 versus o logaritmo de suas respectivas concentrações.....	26

1. INTRODUÇÃO

1.1. O vírus Zika: histórico e distribuição geográfica

O vírus Zika (ZIKV) foi isolado pela primeira vez a partir do soro sanguíneo de um macaco Rhesus sentinela que servia à estudos de vigilância da Febre Amarela na Floresta Zika, localizada em Uganda, no ano de 1947 (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). O primeiro registro de infecção humana por ZIKV foi feito na Nigéria em 1952 (MACNAMARA, 1954), e em 1969 o ZIKV foi isolado a partir de *Aedes aegypti* na Malásia, estabelecendo o primeiro registro do vírus no continente asiático (MARCHETTE; GARCIA; RUDNICK, 1969).

Casos de infecção por ZIKV ocorreram de forma esporádica e deslocalizada, tendo-se confirmados 14 casos em quase 60 anos após o primeiro isolamento do vírus. O primeiro grande surto registrado ocorreu em 2007 na Micronésia, mais precisamente na Ilha Yap. Cerca de 8 mil pessoas foram infectadas, o que correspondia, na época, a quase três quartos da população local (DUFFY et al., 2009). Pequenos surtos ocorreram em diversos países da África e Ásia até 2013, quando uma epidemia mais alarmante ocorreu na Polinésia Francesa com cerca de 183 mil indivíduos infectados, o que correspondia à mais de dois terços da população entre 2013 e 2014 (CAO-LORMEAU et al., 2014).

O ZIKV passou a circular no Brasil em meados de 2015. Acredita-se que o fluxo intenso de pessoas que visitaram o país em virtude da Copa do Mundo de 2014 tenha trazido consigo o vírus. Em junho do mesmo ano foi confirmada a transmissão autóctone da doença em território nacional (ZANLUCA et al., 2015). O Brasil foi o primeiro dos países Americanos a ser acometido pela epidemia de ZIKV, com mais de 1 milhão de casos suspeitos entre maio de 2015 e janeiro de 2016 (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016).

Ainda que a situação pareça ter sido controlada, com queda substancial no número de infecções registradas de 2017 em diante, a presença do ZIKV foi confirmada em quase uma centena de países até 2019, o que mostra que a possibilidade de uma nova pandemia é latente (PIELNAA et al., 2020).

1.2. A Febre Zika

1.2.1. Transmissão, sintomatologia e possíveis complicações

A transmissão do vírus Zika ocorre, em seu ciclo urbano, mais frequentemente de maneira horizontal, através da picada de um inseto vetor, geralmente mosquitos do gênero *Aedes*, em especial o *Aedes aegypti*, conhecido por transmitir também outros vírus de importância sanitária e epidemiológica como o da Dengue e da Febre Amarela (SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019). Já foi relatado ainda que a transmissão pode ocorrer através do contato sexual (XIE et al., 2016), de forma vertical ou congênita, na qual a mãe transmite o vírus para o feto durante a vida intrauterina (MLAKAR et al., 2016), por transfusões e pelo contato com fluidos corporais contaminados (BIERLAIRE et al., 2017; LUZ; SANTOS; VIEIRA, 2015).

Os sintomas mais comuns da Febre Zika são aqueles característicos de arboviroses como dores de cabeça e nas articulações e febre. De maneira geral, não existem maiores complicações para pessoas adultas e a infecção frequentemente ocorre de forma assintomática (LUZ; SANTOS; VIEIRA, 2015; SHEHU et al., 2018). É relatado, no entanto, que quando a infecção ocorre durante a gravidez, existe o risco de evolução deste quadro, que pode resultar em malformações neurológicas no feto, como a microcefalia (MARTINES et al., 2016; MLAKAR et al., 2016). Além disso, malformações oculares no feto (MASMEJAN et al., 2020) e abortos espontâneos (SHEHU et al., 2018) também já foram descritos. Em adultos com o sistema de defesa comprometido e propensão a comprometimento neurológico, a síndrome de Guillain-Barré é uma possível complicação (CAO-LORMEAU et al., 2016).

1.2.2. Diagnóstico e tratamento

Atualmente, basicamente dois tipos de diagnóstico estão disponíveis para a detecção do vírus Zika, o teste sorológico e o molecular. O primeiro enfrenta maiores dificuldades e está sujeito a maior imprecisão, uma vez que interações sorológicas cruzadas com anticorpos produzidos em infecções por outros *flavivirus*, inclusive de infecções passadas, podem ocorrer e resultar em falsos positivos. O diagnóstico molecular, baseado em transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT - PCR) se mostra mais preciso, pois são desenhados iniciadores (*primers*) altamente específicos para o RNA viral. No entanto, os títulos virais permanecem altos nos fluidos corporais por pouco tempo, em média, cerca de 4

a 5 dias após o início da infecção, embora na urina seja detectável por mais tempo, entre 7 e 14 dias, o que torna o exame a partir da urina fortemente recomendado (LANDRY; ST GEORGE, 2017).

O diagnóstico da Febre Zika é dificultado por características intrínsecas do vírus e da doença. Entre elas, a semelhança na manifestação clínica que apresenta com outras arboviroses e o tempo que o vírus permanece detectável no organismo são as principais. As limitações impostas ao diagnóstico preciso e eficiente somadas ao alto índice de infecções assintomáticas, que dificultam a suspeita do paciente em relação à doença, torna impraticável dimensionar de forma adequada a distribuição do vírus, o que contribui para que ele se perpetue silenciosamente (LANDRY; ST GEORGE, 2017). Em busca de solucionar este problema, PEREIRA et al. (2024) projetaram e expressaram três proteínas multiepítopas de ZIKV, a saber, ZIKV-1, ZIKV-2 e ZIKV-3 e utilizaram-as em testes de ELISA para o diagnóstico diferencial do vírus Zika. Especialmente ZIKV-1 e ZIKV-2 demonstraram resultados promissores, apresentando sensibilidade de 81,6% e 95% e especificidade de 97% e 96%, respectivamente, em soro humano com a presença de anticorpos anti-DENV. Estes resultados evidenciam o poder de anticorpos multiepítopos contra igG do vírus Zika, no diagnóstico diferencial de infecções por ZIKV mesmo em casos de coinfeção por diferentes flavivírus.

Atualmente, não existem tratamentos específicos para a Febre Zika ou vacinas disponíveis contra o vírus (PATTNAIK; SAHOO; PATTNAIK, 2020). Assim, as medidas profiláticas são limitadas ao controle da exposição da população aos artrópodes vetores (CORBEL et al., 2016). Considerando o contexto de um mundo globalizado, a possibilidade de uma nova pandemia é sempre iminente, motivo pelo qual a busca por tratamentos eficazes permanece urgente (PATTNAIK; SAHOO; PATTNAIK, 2020).

1.3. Biologia estrutural do ZIKV

O ZIKV é um arbovírus pertencente à família Flaviviridae e ao gênero Flavivírus, que possui relação filogenética bastante íntima com outros arbovírus como o vírus da Dengue, vírus da Febre Amarela, e o vírus do Nilo Ocidental (HADDOW et al., 2012). Trata-se de um vírus envelopado e esférico, cujo genoma é composto de ácido ribonucleico fita simples e sentido positivo (+ssRNA) de cerca de 11 kb organizadas em uma longa, e única, região codificante denominada quadro aberto de leitura (ORF - *Open Reading Frame*) (WIKAN;

SMITH, 2016). A região codificante é flanqueada por duas regiões não traduzidas (UTRs), uma na extremidade 5'-fosfato (5'-UTR) e outra na extremidade 3'-OH (3'-UTR) (KUNO; CHANG, 2007).

A ORF do ZIKV, à semelhança do que ocorre com a ORF de outros flavivírus, é traduzida em uma poliproteína precursora inativa de 3419 resíduos de aminoácidos (aa) que, depois de clivada por ação de proteases, tanto virais quanto do hospedeiro, dá origem à dez proteínas, sendo três delas estruturais: capsídeo (C), precursora de membrana (prM) e envelope (E); e sete não estruturais (NSs): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 1) (KUNO; CHANG, 2007; WIKAN; SMITH, 2016). As proteínas não estruturais estão envolvidas nos processos de replicação viral e evasão da resposta imunológica do hospedeiro, enquanto as proteínas estruturais se organizam para formar a partícula viral (BRIANT et al., 2014; XIE et al., 2016), além de serem responsáveis pelos processos de adesão e invasão celular (LINDENBACH; RICE, 2003).

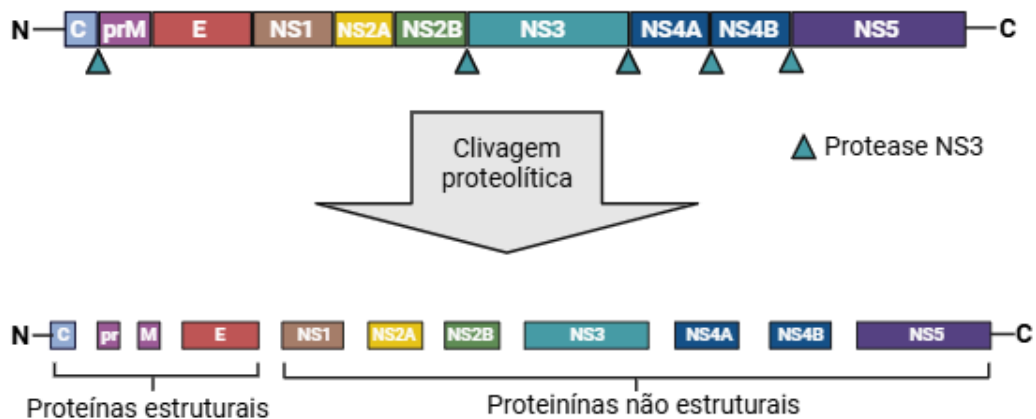


Figura 1: Esquema ilustrativo da poliproteína de ZIKV antes e depois do processamento pós-traducional. O retângulo em ciano representa a NS3, onde se localiza o domínio protease, e as setas em ciano e apontam para seus sítios de clivagem da poliproteína. Os demais sítios de clivagem representados pelas junções entre as diferentes proteínas são alvos de peptidases de sinal e outras proteases do hospedeiro. Fonte: Desenvolvido pelo autor em BioRender.com.

1.4. Complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}

A proteína NS3 de ZIKV é uma proteína multifuncional formada por 617 resíduos de aa e por dois domínios proteicos. O domínio N-terminal de 150 resíduos de aa (ZIKV_NS3^{Protease} - ZIKV_NS3^{Pro}) exibe atividade de protease, enquanto o domínio C-terminal de 143 resíduos de aa (ZIKV_NS3^{Helicase} - ZIKV_NS3^{Hel}) apresenta atividades de

abertura de dupla fita de RNA. Além dessas duas funções principais, NS3 apresenta ainda atividade de NTPase e RNA trifosfatase (SHIRYAEV et al., 2023b). O domínio NS3^{Pro} é proteoliticamente inativo por si só, e fica à dependência da interação covalente com a região hidrofílica da proteína NS2B para dar origem ao complexo heterodimérico ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}, este último, altamente ativo (LEI et al., 2016).

ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} é uma serino-protease que possui uma tríade catalítica típica (His51-Asp75-Ser135) e permanece ancorada internamente à membrana do retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira por uma região hidrofóbica de NS2B formada por 48 resíduos de aa (LEI et al., 2016). O papel crucial de ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} no processamento da poliproteína precursora, torna-a essencial para a propagação viral e evasão da resposta imune inata do hospedeiro e, conseqüentemente, um dos alvos mais frequentes em estudos de busca por inibidores que possam ser utilizados no desenvolvimento de terapias anti-Zika (SHIRYAEV et al., 2023).

ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} apresenta um acentuado dinamismo estrutural, que se manifesta em suas três conformações possíveis - **Figura 2** - (SHIRYAEV et al., 2023). Na conformação fechada, NS2B envolve o domínio NS3^{Pro} exibindo sua forma ativa. Já na conformação aberta, NS2B se liga apenas a uma pequena porção próxima do sítio ativo, o que resulta em inatividade proteolítica (PHOO et al., 2018). A estrutura cristalina desta conformação ainda não foi relatada, mas recentemente pôde ser modelada a partir das proteases do vírus da dengue e do vírus do Nilo Ocidental (SHIRYAEV et al., 2023). Na conformação superaberta, o complexo proteico experimenta uma dissociação maior entre NS2B e NS3^{Pro}, que afeta mais fortemente o dobramento geral da protease (SHIRYAEV et al., 2023).

A partir destes estudos, os autores propuseram um mecanismo de funcionamento no qual a alteração entre as conformações aberta e superaberta é responsável por ligar e expulsar RNA viral do sítio catalítico de NS3^{HeI} (SHIRYAEV et al., 2023). ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} possui dois sítios alostéricos sendo que o primeiro, composto de 5 resíduos de aminoácidos, é permanente (PDB ID 7M1V), enquanto o segundo, composto de 9 aminoácidos (PDB ID 5ZOB), existe apenas transitoriamente e surge a partir das alterações conformacionais do complexo (PHOO et al., 2018).

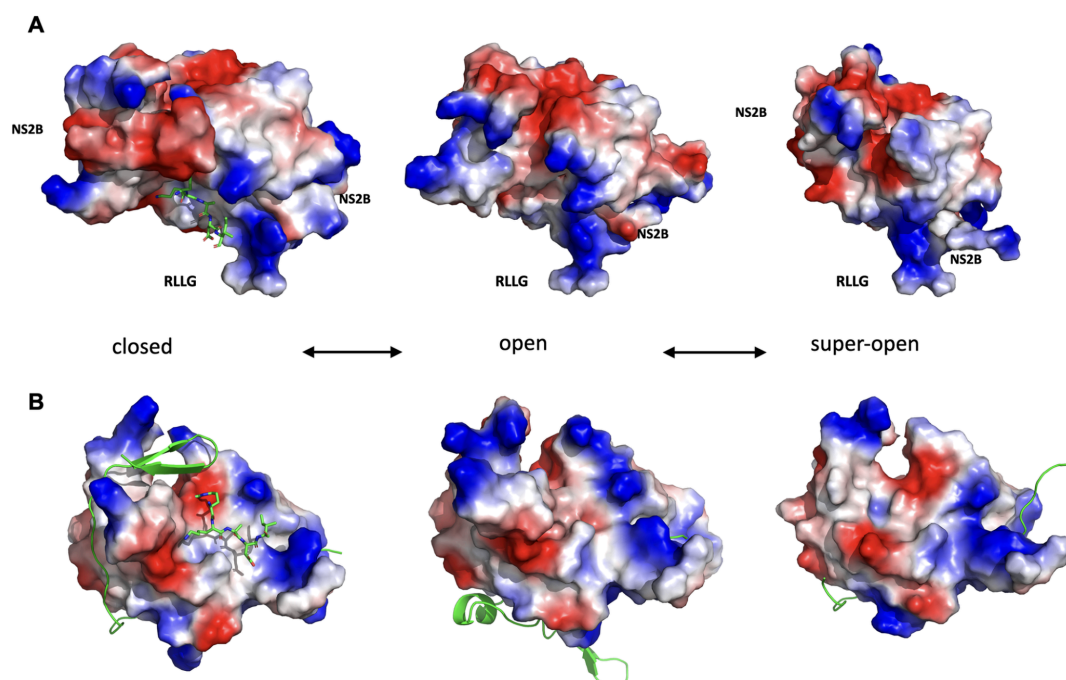


Figura 2: Conformações estruturais do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}. (A) O sítio ativo de NS3^{Pro} aponta para baixo. As cadeias laterais carregadas positivamente são de cor azul e os resíduos carregados negativamente são vermelhos e, em verde, um substrato peptídico modelado com base na estrutura resolvida do complexo WNV_NS2B-NS3^{Pro} + Aprotinina. Fonte: (SHIRYAEV et al., 2023). (B) Rotação de 180° da posição da proteína em (A).

1.5. Estratégias de inibição e inibidores do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}

Algumas características intrínsecas da protease do vírus Zika dificultam o desenho e restringem o leque de compostos já estudados enquanto potenciais inibidores competitivos para esta enzima. Entre estas características, se destacam a flexibilidade estrutural e a existência de cargas negativas - **Figura 2** - no sítio ativo desta proteína (BLISNICK; FOULON; BONNET, 2017; LI; KANG, 2021; NUNES et al., 2022). Para que um composto possa acessar e se ligar ao sítio ativo do complexo proteico é necessário que existam interações hidrofílicas e eletrostáticas, no entanto compostos com essas características são frequentemente associados a baixa permeabilidade de membrana, o que se torna um problema para que esses compostos ganhem o interior celular (BEHNAM et al., 2015), dessa forma, inibidores não-competitivos têm se mostrado mais atraentes para o desenvolvimento de terapias anti-Zika (SHIRYAEV et al., 2023).

A busca por inibidores do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} tem sido conduzida através de abordagens diversas. Triagem de alto rendimento, desenho de moléculas baseado na estrutura e utilizando métodos computacionais e busca de medicamentos baseada em

fragmentos de moléculas identificados em seus sítios específicos são algumas delas (LI; KANG, 2021; NUNES et al., 2022; SANTOS et al., 2023).

Nos últimos 15 anos, uma série de estudos *in vitro* revelaram e caracterizam pelo menos 18 potenciais inibidores da protease do vírus Zika com valores de IC₅₀ variando entre 0,2 a 158 µM, entre os quais a maioria são inibidores não-competitivos (SHIRYAEV et al., 2023). No entanto, ainda não há relato de qualquer composto que tenha avançado para a fase de testes clínicos (SANTOS et al., 2023), o que reafirma a urgência da busca por compostos que sejam eficazes contra o vírus Zika.

1.6. Chalconas, Flavonas, Cumarinas, pirimidinonas, Pirroquinazolininas e Quinoxalinonas

As Chalconas (**Figura 3**) são compostos pertencentes à classe dos flavonoides, caracterizadas pela estrutura que consiste em um sistema de dois anéis aromáticos conectados por uma cadeia de três carbonos insaturados (fórmula geral C₁₅H₁₂O). Esta configuração estrutural dota as chalconas de propriedades eletrofílicas significativas, permitindo-lhes participar de diversas reações químicas e interações moleculares (GURMEET et al., 2018). Entre as chalconas mais estudadas está a 4,2'-dihidroxicalcona, isolada de várias espécies vegetais, incluindo o gênero *Himalayan*, que é conhecida por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (SILVA et al., 2020). O interesse em chalconas vem crescendo nas últimas décadas devido às suas potencialidades farmacológicas, bem como sua aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos (KUMAR et al., 2019).

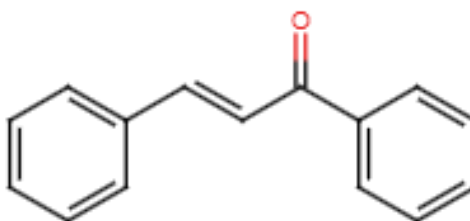


Figura 3: Representação da estrutura química da Chalcona. A Chalcona é caracterizada por dois anéis aromáticos unidos por cadeia de três carbonos insaturados. Fonte: Desenvolvido pelo autor em <https://www.rcsb.org/chemical-sketch>.

As Flavonas (**Figura 4**) são compostos que pertencem à classe dos flavonoides e são caracterizadas por um esqueleto de 15 carbonos, que consiste em um anel aromático e uma

estrutura C6-C3-C6, que inclui um anel cromânico substituído e uma cetona. Essa configuração química confere às flavonas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias notáveis, além de permitir interações com várias biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos (KARODIN et al., 2021). A flavona mais estudada, a luteolina, encontrada em diversas plantas como a *Origanum majorana* e *Citrus limon*, tem sido isolada e utilizada em pesquisas devido às suas potencialidades terapêuticas, incluindo atividade anticancerígena e neuroprotetora (LÓPEZ-ALONSO et al., 2022). O crescente interesse em flavonas se deve, em grande parte, aos seus diversos efeitos biológicos e à possibilidade de aplicação em fitoterapia (GARCÍA et al., 2020).

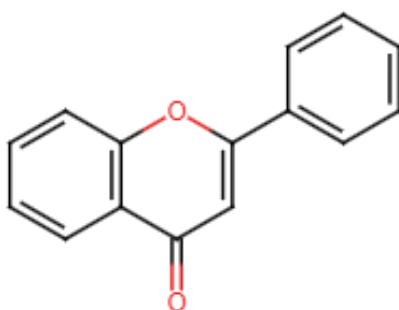


Figura 4: Representação da estrutura química da Flavona. Dois anéis aromáticos se conectam por um anel pirano, com uma cetona na posição 4. Fonte: Desenvolvido pelo autor em <https://www.rcsb.org/chemical-sketch>.

As Cumarinas (**Figura 5**) pertencem à família de benzopirona e sua estrutura é constituída por um anel benzeno e um anel α -pirona. Estes anéis fundidos apresentam riqueza de elétrons e de transporte de cargas, que dão a esse composto a capacidade acentuada de interagir com outras moléculas (MATOS et al., 2015). A primeira Cumarina a ser descrita (2H-1-benzopiran-2-ona) foi encontrada na fava tonka, cientificamente conhecida como *Dipteryx odorata*, pertencente à família das Fabáceas, e isolada há mais de 200 anos (STEFANACHI et al., 2018).

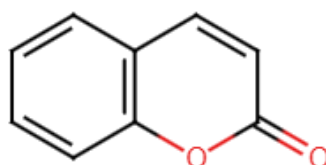


Figura 5: Representação da estrutura química da Cumarina. Mais à esquerda, um anel aromático fundido a um anel α -pirona, à direita, contendo uma lactona. Fonte: Desenvolvido pelo autor em <https://www.rcsb.org/chemical-sketch>.

Os derivados da Cumarína são formados a partir de substituições no núcleo cumarínico e são amplamente distribuídas como metabólitos secundários em plantas, bactérias e fungos, com mais de 1.300 cumarinas descobertas. Entre as plantas, a cumarina já foi encontrada em cerca de 150 espécies estando presente em, pelo menos, 30 famílias como Rutaceae, Oleaceae e Apiaceae (SHARIFI-RAD et al., 2021; VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013). As Cumarinas fornecem bons esqueletos moleculares para a química médica como fruto de sua versatilidade química, que resulta em uma gama de propriedades biológicas (GONÇALVES et al., 2020; SIERRA et al., 2021), algumas delas são: antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antiviral (SIERRA et al., 2021).

As pirimidinonas (**Figura 6**) são compostos heterocíclicos que contêm um anel de pirimidina substituído por uma cetona, caracterizando-se pela presença de um grupo funcional carbonila. Essa estrutura confere às pirimidinonas propriedades químicas únicas, incluindo a capacidade de atuar como agentes quelantes de metais e como intermediários em reações orgânicas (JARDIM et al., 2019). Uma das pirimidinonas mais estudadas é a 2-piridinona, que tem sido isolada de várias fontes naturais, além de ser sintetizada em laboratório, e é reconhecida por suas atividades biológicas, como propriedades antimicrobianas e antitumorais (VERONEZI et al., 2020). O interesse nas pirimidinonas tem crescido devido às suas possíveis aplicações em farmacologia e em materiais funcionais (GONÇALVES et al., 2021).

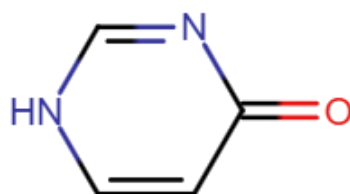


Figura 6: Representação da estrutura química da 4(1H) - pirimidinona . Um anel de seis membros contendo dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 3. Apresenta uma carbonila (C=O) na posição 4. Fonte: Desenvolvido pelo autor em <https://www.rcsb.org/chemical-sketch>.

As pirroloquinazolininas (**Figura 7**) são uma classe de compostos heterocíclicos, apresentando uma configuração que envolve um anel pirrol e um anel quinazolinina. Essa formação estrutural confere às pirroquinazolininas propriedades farmacológicas interessantes, destacando-se por suas atividades antitumorais e antimicrobianas (SOARES et al., 2019). A primeira pirroquinazolinina a ser relatada, a 4,5-dihidropirroquinazolinina, foi isolada a partir de extratos vegetais e tem sido estudada por suas diversas aplicações médicas, incluindo a

inibição de enzimas relevantes em processos patológicos (OLIVEIRA et al., 2020). O crescente interesse em compostos dessa classe se deve não apenas às suas propriedades biológicas, mas também ao potencial de modificação estrutural para otimização de suas atividades terapêuticas (LIMA et al., 2021).

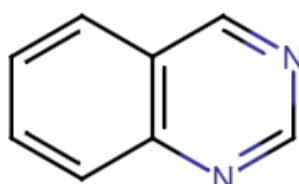


Figura 7: Representação da estrutura química da Quinazolina. Um anel benzênico se funde com um anel pirimidínico. Possui dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 3 do sistema aromático. Fonte: Desenvolvido pelo autor em <https://www.rcsb.org/chemical-sketch>.

As quinoxalinas (**Figura 8**) são compostos pertencentes a uma classe de heterociclos que possuem uma estrutura distintiva composta por um núcleo de quinoxalina, caracterizado por dois anéis aromáticos interligados por nitrogênio e carbono (fórmula geral $C_9H_6N_2O$). Esta configuração estrutural confere às quinoxalinas uma variedade de propriedades químicas e biológicas, tornando-as relevantes em diversas áreas da pesquisa (KIM et al., 2018). Entre as quinoxalinas mais objeto de estudo está a 2-(2-hidroxifenil)-4-thiazole quinoxalina, extraída de várias fontes naturais, que demonstrou atividades antimicrobianas e antitumorais promissoras (ALMEIDA et al., 2021). O interesse por quinoxalinas tem aumentado significativamente nas últimas décadas, não só devido ao seu potencial farmacológico, mas também por sua aplicação em novas terapias e como agentes de contraste em técnicas de imagem (SHARMA et al., 2020).

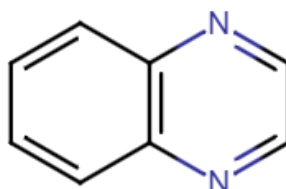


Figura 8: Representação da estrutura química da Quinoxalina. heterocíclico bicíclico formado pela fusão de um anel aromático com um anel pirazínico. Apresenta dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 4 do anel pirazina. Fonte: Desenvolvido pelo autor em <https://www.rcsb.org/chemical-sketch>.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial inibitório dois conjuntos de inibidores constituídos por Chalconas, Flavonas, Cumarinas, Pirimidinonas, Pirroquinazolinas e Quinoxalinonas contra o complexo enzimático ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}.

2.2. Objetivos específicos

- I. Expressar e purificar o complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}.
- II. Avaliar a concentração adequada de proteína para ensaios de atividade, caracterização cinética e inibição enzimática.
- III. Avaliar os parâmetros cinéticos K_m , $V_{m\acute{a}x}$ e K_{cat} do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}.
- IV. Avaliar a existência e os níveis de inibição do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} na presença de 71 compostos, divididos em dois conjuntos para teste subdivididos nas classes: Chalconas, Flavonas, Cumarinas, Pirimidinonas, Pirroquinazolinas e Quinoxalinonas .
- V. Determinar o IC_{50} dos compostos que se mostraram efetivos na inibição do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}.
- VI. Determinar o mecanismo de inibição.
- VII. Avaliar os compostos ativos frente modelos celulares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Clonagem expressão e purificação do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}

O gene gZiPro que codifica a ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}_gZiPro foi previamente amplificado a partir de gene sintético e clonado pela Dra. Nathalya Cristina de Moraes Roso Mesquita (LIMA et al., 2021). O gene gZiPro se diferencia do gene selvagem apenas pela exclusão de sequências codificadoras de regiões hidrofóbicas de NS2B (resíduos de a.a. 1-44 e 97-130) e inserção do linker G4SG4. A proteína ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}_gZiPro foi, então, expressa e purificada, de acordo com protocolo estabelecido por (LIMA et al., 2021). De maneira resumida, o gene ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}_gZiPro foi clonado em pETSUMO-1a/LIC e expresso em células de *Escherichia coli* (*E. coli*) Rosetta (DE3) induzidas com 0,5 mM de IPTG a 18 °C por 16 h. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em tampão contendo Tris, NaCl, Imidazol e Glicerol, e purificadas em quatro etapas: cromatografia em coluna HisTrap, clivagem da cauda de hexahistidina (6His-SUMO) com TEV protease, remoção da cauda de hexahistidina em HisTrap inversa e cromatografia de exclusão por tamanho em coluna Superdex 75 10/300 GL.

3.2. Avaliação da concentração enzimática ideal para ensaios de atividade

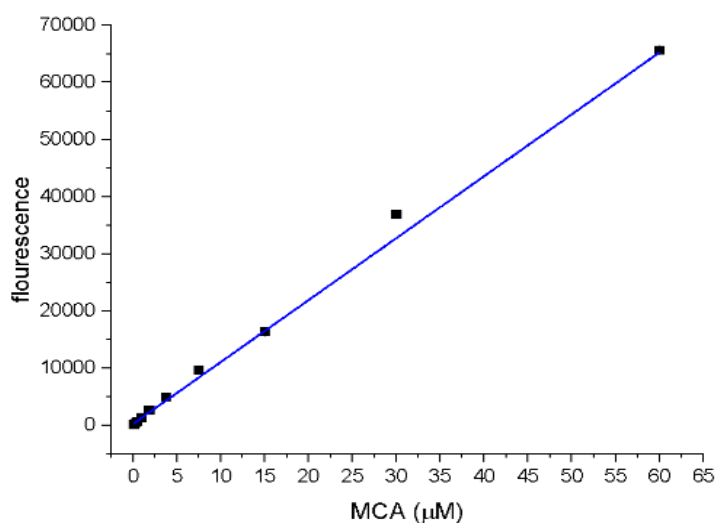
Para determinar a concentração enzimática ideal a ser usada nos ensaios subsequentes, foi realizada uma diluição seriada da proteína em tampão de reação (Tris 20 mM, pH 8,5, Triton-X 100 0,01 % e 10% de Glicerol) de 1000 nM a 0,98 nM em placas de 96 poços. A cada poço foi adicionado 30 µM de substrato Benzoil-Nle-Lys-Arg-Arg-Aminometilcumarina (Bz-nKRR-AMC), Nle trata-se de um análogo sintético da leucina, a L-norleucina, comumente usado em síntese de peptídeos.

Os níveis de fluorescência em unidades arbitrárias (RFU) resultante da liberação de AMC após clivagem do substrato (λ excitação = 380 nm, λ emissão = 460 nm) foram monitorados em leitor de placas SpectraMax Gemini EM Microplate Reader, por um total de 30 minutos, com medidas a cada 1 minuto, em temperatura de 37 °C. O ensaio foi realizado em duplicata técnica e biológica e um controle negativo foi utilizado para monitorar o sinal de fundo. Para melhor visualização e análise dos dados, gráficos foram plotados com o auxílio do software GraphPad Prism 10.

3.3. Caracterização cinética do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}

Os parâmetros cinéticos K_m , $V_{máx}$ e K_{cat} do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} foram determinados por meio de ensaios enzimáticos em diluição seriada do substrato (Bz-nKRR-AMC) de 300 a 0,29 μM em tampão de reação (Tris 20 mM, pH 8,5, 0,01 % de Triton X 100 e 10% de glicerol). Os níveis de fluorescência resultante da liberação de AMC após clivagem do substrato (λ excitação = 380 nm, λ emissão = 460 nm) foram monitorados a cada minuto, por um total de 30 minutos e temperatura de 37 °C em leitor de placas SpectraMax Gemini EM Microplate Reader.

Os valores de RFU foram convertidos em atividade enzimática através de uma curva padrão (**Figura 9**), que relaciona os níveis de fluorescência da amostra com a concentração de substrato. O ensaio foi realizado em duplicata duplicata técnica e biológica e um controle negativo foi utilizado para monitorar o sinal de fundo. Para melhor visualização e análise dos dados, gráficos foram plotados com o auxílio do software GraphPad Prism 10.



	Value	Standard Error	t-Value	Prob> t
Intercept	40	16	249.229	0,06732
Slope	1.321	13	1,02E+07	5,63E-04

Figura 9: Curva de calibração que relaciona os níveis de emissão de fluorescência de uma amostra com a concentração de aminometilcumarina. Gráfico construído a partir da diluição seriada de aminometilcumarina e da fluorescência detectada para cada concentração, a tabela abaixo do gráfico mostra os valores obtidos para a equação resultante do ajuste linear. Fonte: Elaborado pelo autor com auxílio do software GraphPad Prism 10.

3.4. Triagem de compostos

3.4.1. Inibição da Atividade pontual do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}

Os compostos testados neste trabalho foram selecionados a partir de dois conjuntos de compostos de alunos da Prof.^a Dra. Arlene Gonçalves Corrêa, do Laboratório de Síntese de Produtos Naturais (LSPN). Esses dois conjuntos eram constituídos de compostos derivados de Chalconas, Flavonas, Cumarinas, Pirimidinonas e Pirroloquinazolininas (**Anexo A**).

Para a avaliação do potencial inibitório dos compostos, 5 µL de enzima foi adicionado a 84 uL de tampão de reação (Tris 20 mM, pH 8,5, Triton X 100 0,01 % e 10% de glicerol) para concentração final de 8 nM. 1 µl de cada composto diluídos previamente a 20 mM em 100% de DMSO foi adicionado à mistura para concentração final de 200 µM (exceto os compostos LSPN886 e LSPN1078, que estavam a 10 mM e ficaram a 100 µM), seguido de um período de 30 minutos de incubação a 8 °C. Após esse período, 10 µl de substrato (Bz-nKRR-AMC) (λ excitação = 380 nm, λ emissão = 460 nm) a 300 µM foi adicionado para o início da reação.

Os níveis de fluorescência, a quantidade de ensaios e a análise de resultados foram realizados como descrito anteriormente na seção 3.2.

3.4.2. Determinação do IC₅₀ dos compostos frente o complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}

Para determinar o IC₅₀ dos compostos que exibiram atividade inibitória significativa no ensaio anterior, foram realizados ensaios de concentração-resposta para cada um, a partir de diluições seriadas deles.

Para isso, a enzima foi diluída em tampão de reação (Tris 20 mM, pH 8,5, Triton X 100 0,01 % e 10% de Glicerol) para a concentração final de 8 nM, seguido da adição de 1 µl de uma diluição seriada de 10 pontos de composto iniciando a 20 mM em 100% de DMSO. A mistura foi incubada por 30 minutos a 8 °C, tempo necessário para que a interação enzima-composto acontecesse. Após esse período, 10 µl de substrato (Bz-nKRR-AMC) (λ excitação = 380 nm, λ emissão = 460 nm) a 300 µM foi adicionado para iniciar a reação.

Os níveis de fluorescência, a quantidade de ensaios e a análise de resultados foram realizados como descrito anteriormente na seção 3.2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Purificação do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}

De acordo com o protocolo de purificação descrito na metodologia, realizamos inicialmente uma etapa de afinidade, seguida por diálise e clivagem com a TEV protease, e, por fim, uma segunda etapa de afinidade para remover a cauda de hexahistidina. Após essas fases, realizamos uma análise de pureza da proteína utilizando um gel de SDS-PAGE 12,5% (**Figura 10A**). Com a amostra validada, finalizamos a purificação do complexo proteico por cromatografia de exclusão molecular por tamanho. O pico principal obtido no cromatograma e assinalado em azul (**Figura 10B**) foi coletado e analisado novamente por SDS-PAGE 12,5% (**Figura 10C**) mostrando que obtivemos a proteína em quantidade e grau de pureza para realização dos ensaios a seguir.

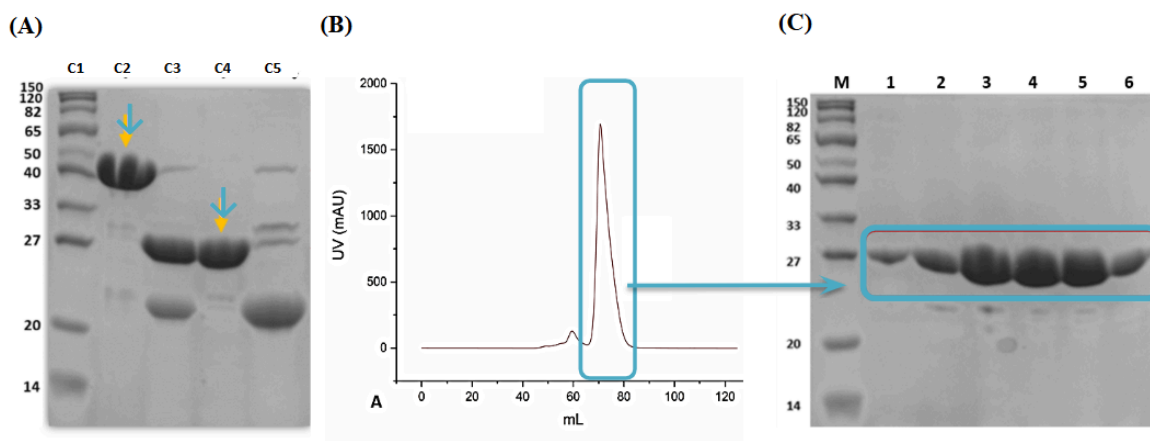


Figura 10: Validação do processo de purificação do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}. (A) Gel de SDS-PAGE 12,5 %. Em C1, marcador de massa molecular; em C2, amostra coletada após primeira purificação por afinidade; em C3, amostra coletada após diálise e clivagem com TEV; em C4, amostra coletada após purificação por afinidade reversa e em C5, amostra coletada após eluição com 100% de tampão com alta concentração de imidazol da purificação por afinidade reversa. (B) Cromatograma da amostra representada em C4(A) analisada durante o processo de gel filtração por tamanho molecular. O pico de absorvância (eixo y) que se desenvolve entre 65 e 80 ml (eixo X) flagra o momento em que a proteína alvo passa a ser eluída. (C) Gel SDS - PAGE 12,5 %. Em M, marcador de massa molecular. De 1 a 6, corrida das frações coletadas do pico majoritário durante a etapa de gel filtração por tamanho. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2. Determinação da concentração enzimática ótima para ensaios de atividade

Após a realização do ensaio de atividade enzimática conforme descrito na seção 3.2., foram plotados os dados de RFU versus tempo (**Figura 11**). Neste ensaio, buscou-se

encontrar uma faixa de concentrações para a qual um bom sinal de fluorescência fosse obtido e que, simultaneamente, não atingisse a fase de platô muito rapidamente. As concentrações para as quais suas respectivas curvas atingiram o limite de detecção foram descartadas pois não oferecem informações valiosas para este estudo.

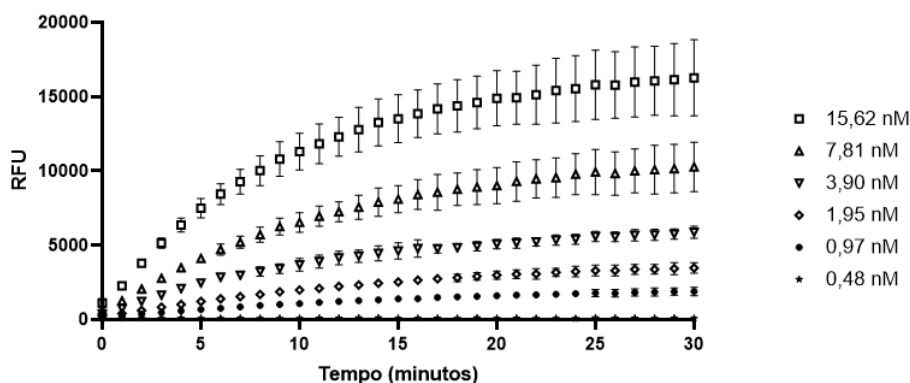


Figura 11: Curva de atividade enzimática para o complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}. Gráfico construído a partir de RFU versus tempo de reação para a diluição seriada do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}. Fonte: Elaborado pelo autor com auxílio do software GraphPad Prism 10.

A partir dessa triagem, foi escolhida a concentração de 8 nM, que oferece um bom sinal de fluorescência sem estourar o limite de detecção, além de uma boa parte da faixa linear de reação - estado estacionário da reação - para calcularmos a velocidade inicial de cada reação, o que é fundamental para a determinação dos parâmetros cinéticos mais tarde. Quaisquer faixas em torno dessa concentração podem ser utilizadas sem prejudicar ou causar a perda de informação neste ensaio e nos subsequentes. As barras de erros foram traçadas com base na divergência entre os resultados obtidos para as duplicatas.

4.3. Caracterização cinética do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}

A fim de determinar os parâmetros sintéticos K_m , $V_{máx}$ e K_{cat} do complexo enzimático ZIKV_NS2B_NS3^{Pro}, um gráfico auxiliar, não apresentado aqui, foi elaborado a partir dos pontos experimentais obtidos até o minuto 10 (faixa linear de reação em todas as concentrações de substrato).

Neste gráfico, podemos interpretar o coeficiente angular da região linear da curva de fluorescência (RFU) versus tempo de reação (minutos), como sendo a velocidade inicial de reação do complexo enzimático tendo (Bz-nKRR-AMC) como substrato. Após determinar as velocidades iniciais para cada concentração de substrato de 300 a 0,29 μM , e utilizando uma

curva padrão de fluorescência de AMC, um gráfico das velocidades iniciais (V_0 AMC $\mu\text{M}\cdot\text{S}^{-1}$) versus concentração de substrato (μM) foi plotado (**Figura 12**). A partir do gráfico e com o auxílio do software GraphPad Prism 10, K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados.

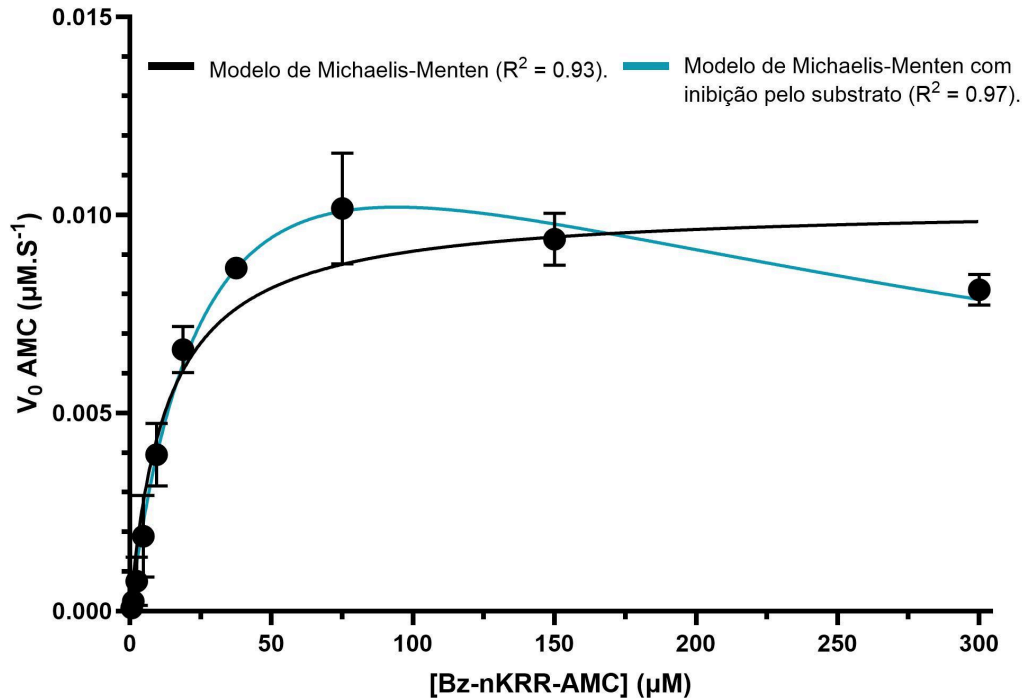


Figura 12: Curvas de cinética enzimática segundo o modelo de Michaelis-Menten para o complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}. O gráfico foi construído a partir das velocidades iniciais de formação de AMC versus concentração de substrato para a diluição seriada de Bz-nKRR-AMC. O modelo utilizado para a construção da curva em preto não considera a inibição pelo substrato, o modelo utilizado na construção da curva em ciano o faz. Fonte: Elaborado pelo autor com auxílio do software GraphPad Prism 10.

Ao seguir o modelo cinético de Michaelis-Menten, comportamento usual da maioria das enzimas, a curva obtida não apresentou monotonia até atingir a fase de platô, apresentando declínio em torno dos 150 μM , além de um ajuste ruim da curva aos dados experimentais a partir dessa região.

Constatou-se, dessa forma, que se tratava de um complexo enzimático que apresenta inibição pelo substrato quando este último está presente em altas concentrações, em consonância com o que é descrito na literatura. Foi, portanto, construída uma segunda curva a partir de um modelo cinético que considera essa inibição, que resultou em melhor ajuste dos dados e sugere que este segundo modelo descreve melhor o comportamento e o relacionamento do complexo enzimático e do substrato aqui estudados.

Para o primeiro modelo usado, os parâmetros determinados foram $K_m = 13 \pm 5,4 \mu\text{M}$; $V_{\text{máx}} = 0,010 \pm 0,0010 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ e $K_{\text{cat}} = 1,3 \cdot\text{s}^{-1}$. Já para o modelo de inibição pelo substrato foram, $K_m = 31 \pm 15 \mu\text{M}$; $V_{\text{máx}} = 0,016 \pm 0,0050 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ e $K_{\text{cat}} = 2,1 \cdot\text{s}^{-1}$.

4.4. Triagem de compostos

4.4.1 Atividade pontual

Para analisar o potencial inibitório dos conjuntos de compostos e a significância desta inibição, foram realizados os ensaios de atividade pontual relatados na seção 3.3.1. Os dados obtidos foram plotados em gráficos para cada conjunto, comparando-se a atividade do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} na presença de cada inibidor com o controle negativo de inibição - ausência do inibidor e 1 % DMSO - e o controle positivo de inibição - ausência de proteína. Foram considerados significativamente efetivos aqueles que se igualaram ou superaram os 80 % de inibição da atividade proteolítica do complexo enzimático sobre o substrato (Bz-nKRR-AMC).

Foram construídos gráficos de barras para representar os níveis de atividade relativa (%) do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} na presença de cada composto do conjunto 1 (**Figura 13**) e do conjunto 2 (**Figura 14**). Os compostos que exibiram atividade inibitória superior a 80% foram selecionados para determinação do IC₅₀.

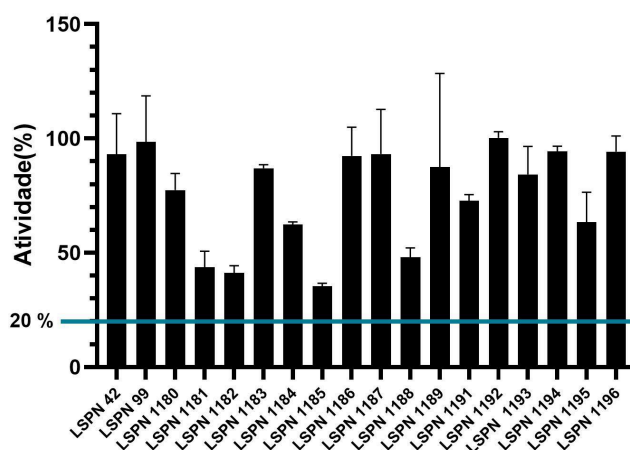


Figura 13: Gráfico de atividade relativa do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} na presença de 200 μM dos diferentes inibidores do conjunto 1. Os níveis de atividade foram normalizados a partir da média obtida para as réplicas do controle negativo de inibição (sem inibidor). A linha em ciano representa o corte de 20% de atividade. Fonte: Elaborado pelo autor com auxílio do software GraphPad Prism 10.

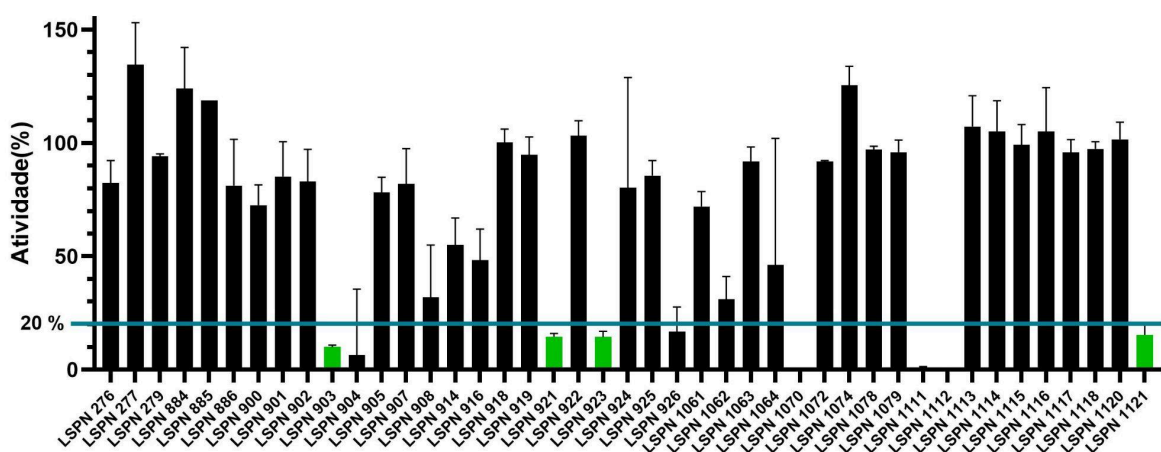


Figura 14: Gráfico de atividade relativa do complexo ZIKV_NS2B-/NS3^{Pro} na presença de 200 μ M dos diferentes inibidores do conjunto 2 (exceto pelos compostos LSPN886 e LSPN1078, a 100 μ M). Os níveis de atividade foram normalizados a partir da média obtida para as réplicas do controle negativo de inibição (sem inibidor). A linha em ciano representa o corte de 20% de atividade e as barras em verde dão ênfase aos compostos que apresentaram mais de 80% de inibição. Fonte: Elaborado pelo autor com auxílio do software GraphPad Prism 10.

Nenhum composto do conjunto 1 apresentou níveis satisfatórios de inibição na faixa de concentrações adotada. Entre os compostos do conjunto 2, foram inicialmente selecionados 7 compostos (LSPN903, LSPN921, LSPN923, LSPN1070, LSPN1111, LSPN1112 e LSPN1121), cujos níveis de atividade somados ao erro resultante da divergência entre as duplicatas não excederam os 20 %.

Durante o monitoramento da atividade proteolítica de ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}, notou-se que as curvas de RFU geradas para as reações que continham os compostos LSPN278, LSPN906, LSPN911, LSPN920, LSPN926, LSPN1066, LSPN1067, LSPN1068, LSPN1079 e LSPN1122, omitidos na **Figura 14**, apresentavam altos níveis de fluorescência imediatamente após o início da reação. Este fato sugere que tais compostos apresentam fluorescência intrínseca e, dada a natureza da metodologia aqui utilizada para o monitoramento da atividade enzimática, nada pode-se dizer a respeito do potencial inibitório destes compostos, uma vez que a fluorescência emitida por um composto qualquer e aquela proveniente do produto fluorescente da reação proteolítica (AMC), são indistinguíveis.

4.4.2. Determinação do IC₅₀

O IC₅₀ dos compostos selecionados foi determinado como descrito na seção 3.2.2. e seus valores podem ser vistos junto às curvas de concentração-resposta construídas através dos dados experimentais de atividade relativa versus o logaritmo da concentração de cada

inibidor (**Figura 15**). A partir da análise do IC_{50} , cada um destes compostos se mostrou promissor, visto que são capazes de inibir 50% da atividade do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} em baixíssimas concentrações.

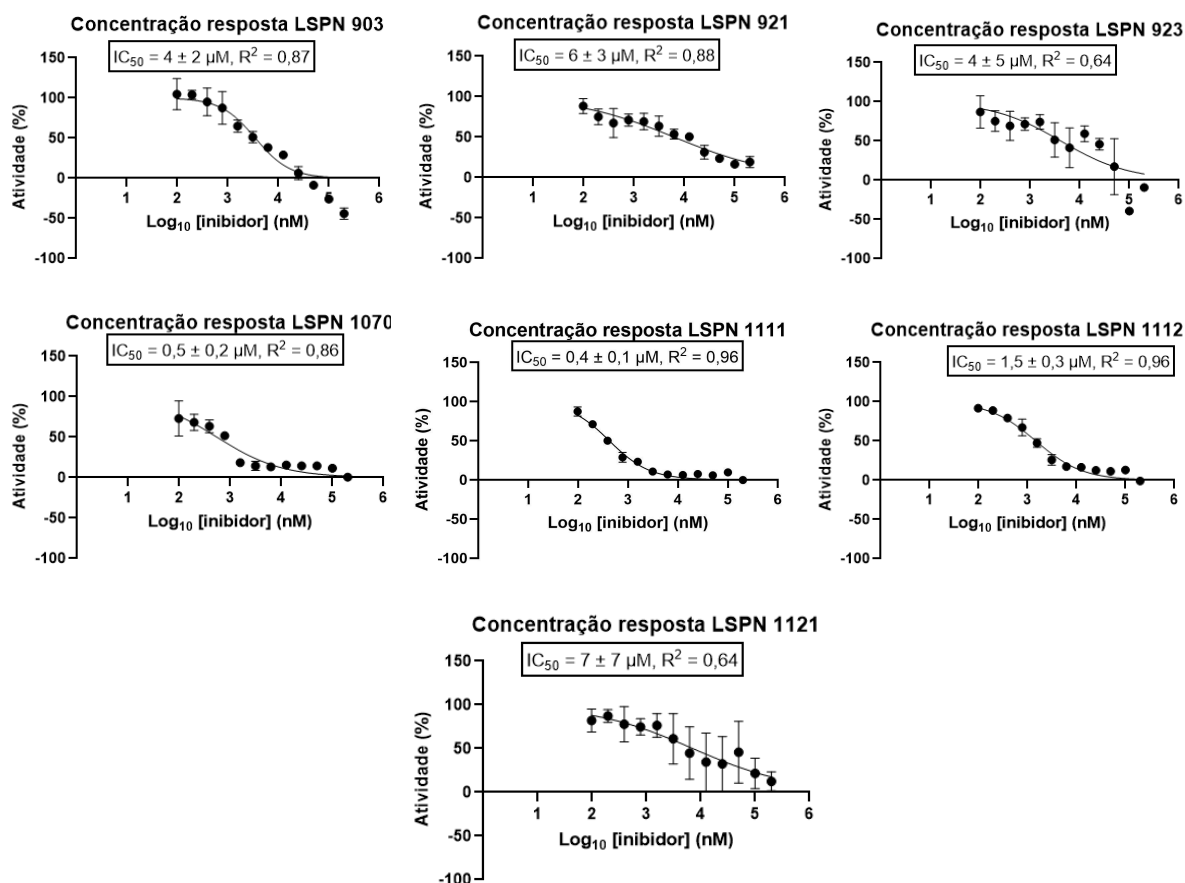


Figura 15: Curvas de concentração resposta do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro} na presença dos compostos LSPN903, LSPN921, LSPN923, LSPN1070, LSPN1111, LSPN1112 e LSPN1121. Os gráficos foram construídos a partir da atividade relativa do complexo versus o logaritmo da concentração de cada composto. Os níveis de atividade foram normalizados a partir da média obtida para as réplicas do controle positivo (sem inibidor). Os valores de IC_{50} foram calculados e são evidenciados em cada gráfico. As barras de erro foram geradas a partir da divergência entre as duplicatas. Fonte: Elaborado pelo autor com auxílio do software GraphPad Prism 10.

No entanto, as curvas obtidas para os compostos LSPN903 e LSPN923 mostram pontos abaixo do 0 no eixo y, o que significaria níveis negativos de atividade enzimática, o que é inconcebível. Uma possível explicação para este ocorrido é de que, para tais compostos, a reação produzia sinais de fluorescência ligeiramente altos imediatamente após o início do monitoramento de modo que a inclinação da curva nesta região perdeu sua linearidade característica, inviabilizando uma análise consistente do IC_{50} . Portanto, parece ser prudente

desconsiderar as informações coletadas a respeito dos compostos LSPN903 e LSPN923 até que novos testes sejam realizados e, preferencialmente, otimizados.

Embora não se possa tirar, ainda, quaisquer conclusões a respeito dos compostos LSPN903 e LSPN923, os compostos LSPN921, LSPN1070, LSPN1111 e LSPN1112 que fazem parte de uma série de compostos da classe cumarinas (**Anexo A**) e o composto LSPN1121 (**Anexo A**), que faz parte da classe de pirimidinonas se mostraram inibidores efetivos do complexo ZIKV-NS2B-NS3^{Pro} *in vitro*, com IC₅₀ variando entre 0,4 e 7 µM. Entretanto, o composto LSPN1121 deve passar por novos testes, uma vez que os erros associados são muito grandes, por vezes sendo maior que a própria média, o que traz muita incerteza para qualquer afirmação sobre este composto.

Cumarinas e Pirimidinonas são classes químicas que têm sido amplamente estudadas como potenciais inibidores de proteases virais devido à sua capacidade de interagir com os sítios ativos dessas enzimas, interferindo na replicação viral.

As Cumarinas, compostos derivados do benzopirona, demonstram atividade antiviral ao modular processos enzimáticos essenciais, incluindo a inibição de proteases como a protease semelhante à 3-quimotripsina (3CL^{pro}) e a *Main-protease* (M-pro - protease principal do SARS-CoV-2), presentes em diversos vírus, incluindo coronavírus e enterovírus (KUMAR et al., 2021). Essa classe de compostos também têm mostrado um potencial significativo como agentes antivirais contra flavivírus, como o vírus da dengue (DENV), o vírus Zika (ZIKV) e o vírus da febre amarela (YFV), atuando por diversos mecanismos, incluindo a inibição de proteases virais, como a NS2B-NS3, e a interferência na replicação do RNA viral (BAILLY et al., 2020). Não o bastante, as cumarinas sintéticas e naturais podem modular vias inflamatórias e oxidativas, reduzindo o estresse celular induzido pela infecção viral, o que as torna promissoras para o desenvolvimento de novas terapias antivirais (FERREIRA et al., 2021).

As pirimidinonas, que contêm o anel pirimidínico modificado, também exibem potencial inibitório significativo, sendo exploradas como candidatas para o desenvolvimento de antivirais direcionados a vírus como o HIV e o SARS-CoV-2, devido à sua capacidade de ligação competitiva com proteases virais (Zhou et al., 2022). Assim, esses compostos têm emergido como potenciais inibidores de proteases virais em flavivírus como DENV, ZIKV, YFV, entre outros. Demonstram alta afinidade por serino-proteases essenciais a replicação viral de Flavivirus (Li et al., 2021). De acordo com dados literários, derivados de pirimidinona podem atuar como inibidores competitivos, bloqueando a clivagem proteolítica

necessária para a maturação viral e, conseqüentemente, reduzindo a carga viral nas células hospedeiras (Wang et al., 2022).

Dessa forma, a otimização estrutural dessas classes de compostos aqui identificadas podem contribuir para o desenvolvimento de antivirais eficazes contra flavivírus, representando uma abordagem promissora na busca por novas terapias.

5. CONCLUSÕES

O protocolo de purificação do complexo ZIKV_NS2B-NS3^{Pro}, discutido nas seções 3.1. e 4.1., se mostrou reprodutível fornecendo quantidade e pureza de proteína satisfatórias. Os ensaios de cinética enzimática, por sua vez, apresentaram resultados consistentes quando comparados com a literatura.

Os ensaios de atividade pontual revelaram, inicialmente, 7 compostos pertencentes ao conjunto de compostos 2 capazes de inibir em 80% a atividade proteolítica do complexo ZIKV – NS2B/NS3^{Pro} *in vitro*.

Embora os compostos LSPN 903 e LSPN 923 necessitem de reavaliação de suas curvas de concentração-resposta, LSPN 921, LSPN 1070, LSPN 1111, LSPN 1112 e LSPN 1121 se mostraram bons inibidores de ZIKV – NS2B/NS3^{Pro}, entre os quais se destaca LSPN 1111 por seu IC₅₀ de 0,4 µM. Os ensaios para a determinação do mecanismo de inibição destes compostos frente a protease do vírus Zika ainda não foram realizados e são parte fundamental da continuidade deste trabalho.

6. PERSPECTIVAS

Os compostos LSPN 921, LSPN 1070, LSPN 1111, LSPN 1112 e LSPN 1121, merecem continuar em testes devido ao potencial inibitório promissor determinado neste trabalho. Estes testes envolvem, inicialmente, o estudo da estabilidade térmica da proteína em suas presenças e tipo de inibição que promovem sobre a protease de ZIKV através de ensaio de mecanismo de inibição enzimática. Os compostos LSPN 904, LSPN 926 e LSPN 1062, demonstraram níveis de inibição que se aproxima de 80%, portanto é interessante que seu IC₅₀ seja também determinado.

Posteriormente, se forem estáveis em faixas adequadas de temperatura, devem ser submetidos a ensaios baseados em células através de replicons sub genômicos, para que sua interação com outros componentes celulares e virais sejam estudados. Tendo as estruturas destes compostos em mãos, planejamos realizar determinação estrutural para estudo da interação desses compostos ao complexo enzimático, computacional ou cristalograficamente. Não o bastante, com a classe de compostos derivados de cumarinas podemos realizar um estudo de *Quantitative Structure-Activity Relationship* (QSAR) para proposição de desenvolvimento de melhoria dos compostos identificados nesta série.

7. REFERÊNCIAS

ALESHIN, A. E. et al. Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the Flaviviridae fold . **Protein Science**, v. 16, n. 5, p. 795–806, maio 2007.

ALMEIDA, R. F., et a."Natural quinoxalinones: A review of their biological activity. **Molecules**, v. 26 n. 5, p. 1315 2021.

BACHMETOV, L. et al. Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 19, n. 2, fev. 2012.

BAILLY, C. at al. Coumarins and flavonoids as antiviral agents: A systematic review of their mechanism of action against flaviviruses. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 192, p. 112140, 2020.

BEHNAM, M. A. M. et al. Discovery of Nanomolar Dengue and West Nile Virus Protease Inhibitors Containing a 4-Benzyloxyphenylglycine Residue. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 9354–9370, 10 dez. 2015.

BIERLAIRE, D. et al. Zika virus and blood transfusion: the experience of French Polynesia. **Transfusion**, v. 57, n. 3, p. 729–733, 1 mar. 2017.

BLISNICK, A. A.; FOULON, T.; BONNET, S. I. Serine protease inhibitors in ticks: An overview of their role in tick biology and tick-borne pathogen transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** Frontiers Media S.A., , 22 maio 2017.

BRIANT, L. et al. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. **Virology** Academic Press Inc., , 2014.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 9 abr. 2016.

CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 6, p. 1085, 2014.

COELHO-DOS-REIS, J. G. A. et al. Evaluation of the effects of Quercetin and Kaempferol on the surface of MT-2 cells visualized by atomic force microscopy. **Journal of virological methods**, v. 174, n. 1–2, p. 47–52, 2011.

CORBEL, V. et al. Tracking Insecticide Resistance in Mosquito Vectors of Arboviruses: The Worldwide Insecticide resistance Network (WIN). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2016.

DEWI, B. E. et al. Effectivity of quercetin as antiviral to dengue virus-2 strain New Guinea C in Huh 7-it 1 cell line. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Anais...IOP Publishing, 2020.

DICK, G. W. A.; 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.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.

FERREIRA, R. J., BAPTISTA, R.; CORDEIRO, M. N. Natural and synthetic coumarins as potential antiviral agents against flavivirus infections. **Journal of Medicinal Virology**, v. 93 n. 7, p. 4118-4130, 2021.

GARCÍA, A. et al. Flavonoids as potential therapeutic agents: A focus on their mechanisms." *Phytotherapy Research*, v. 34, n. 3, p. 555-573, 2020.

GONÇALVES, D. J. et al. Applications of pyridinones in drug discovery and the development of functional materials. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 12, p. 2345-2365, 2021.

GONÇALVES, G. A. et al. Natural and synthetic coumarins as antileishmanial agents: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 203, p. 112514, 2020.

HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 2, p. e1477, 2012.

HAGDE, P. et al. Therapeutic potential of quercetin in diabetic foot ulcer: Mechanistic insight, challenges, nanotechnology driven strategies and future prospects. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 74, p. 103575, 2022.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Vírus zika se espalha para novas áreas—Região das Américas, maio de 2015—janeiro de 2016. 2016.

JARDIM, A. M., et al. Pyridinones: A review of their synthesis and biological activities. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 543 2020.

KARODIN, M. et al. Flavones: Structure, synthesis, and biological activities. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 909, 2021.

KIM, D. H. et al. Quinoxalinone derivatives as bioactive compounds: A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107 n. 1, p. 45-58, 2018.

KUMAR, R. et al. Coumarins as potent antiviral agents: A review on recent developments. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 213, p. 113137, 2021.

KUNO, G.; CHANG, G.-J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of virology**, v. 152, p. 687–696, 2007.

LANDRY, M. L.; ST GEORGE, K. Laboratory diagnosis of zika virus infection. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 141, n. 1, p. 60–67, 1 jan. 2017.

LEI, J. et al. Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. **J. Exp. Bot**, v. 26, p. 54, 2016.

LI, Q.; KANG, C. Structure and dynamics of zika virus protease and its insights into inhibitor design. **Biomedicines MDPI AG**, , 1 ago. 2021.

LIM, H. JUNG et al. Inhibitory effect of flavonoids against NS2B-NS3 protease of ZIKA virus and their structure activity relationship. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 3, p. 415–421, 1 mar. 2017.

LIMA, A. R., et al. Pyrroquinazolines as promising scaffolds in medicinal chemistry: A review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 20, p. 1899-1915, 2021.

LIMA, C. S. et al. Flavonoids from *Pterogyne nitens* as Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 109, 1 abr. 2021.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in virus research**, v. 59, p. 23–62, 2003.

LÓPEZ-ALONSO, A. et al. Health benefits of luteolin: A systematic review. **Nutrients**, v. 14, n. 7, p. 1450, 2022.

LUZ, K. G.; SANTOS, G. I. V. DOS; VIEIRA, R. DE M. Febre pelo vírus Zika. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, p. 785–788, 2015.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, [S. l.]**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.

MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 3, 1969.

MARTINES, R. B. et al. Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses Brazil, 2015. **Morb Mortal Wkly Rep**, v. 65, n. 6, p. 2015–2016, 2016.

MASMEJAN, S. et al. Zika virus. **Pathogens MDPI AG**, , 1 nov. 2020.

MATOS, M. J. et al. Coumarins—an important class of phytochemicals. **Phytochemicals-isolation, characterisation and role in human health**, v. 25, p. 533–538, 2015.

MEHETRE, G. T.; DASTAGER, S. G.; DHARNE, M. S. Biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by pure and mixed cultures of biosurfactant producing thermophilic and thermo-tolerant bacteria. **Science of the Total Environment**, v. 679, p. 52–60, 20 ago. 2019.

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

NUNES, D. A. DE F. et al. NS2B-NS3 protease inhibitors as promising compounds in the development of antivirals against Zika virus: A systematic review. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 2, p. 442–453, 2022.

OLIVEIRA, R. S., et al. Biological evaluation of pyrroquinazoline derivatives: A potential for drug development. **Bioorganic Chemistry**, v. 95, p. 103526, 2020.

PATTNAIK, A.; SAHOO, B. R.; PATTNAIK, A. K. **Current status of zika virus vaccines: Successes and challenges**. **Vaccines**MDPI AG, , 1 jun. 2020.

PEREIRA, S. H. et al. Design, development, and validation of multiepitope proteins for serological diagnosis of Zika virus infections and discrimination from dengue virus seropositivity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 4, 1 abr. 2024.

PHOO, W. W. et al. Structures of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with peptidomimetic inhibitors. **Antiviral Research**, v. 160, p. 17–24, 1 dez. 2018.

PIELNAA, P. et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**Academic Press Inc., , 1 abr. 2020.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**Nature Research, , 1 jun. 2020.

ROY, A. et al. Solution conformations of Zika NS2B-NS3pro and its inhibition by natural products from edible plants. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, 1 jul. 2017.

SANTOS, L. H. et al. Evaluating Known Zika Virus NS2B-NS3 Protease Inhibitor Scaffolds via In Silico Screening and Biochemical Assays. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 9, 1 set. 2023.

SHARIFI-RAD, J. et al. Natural coumarins: exploring the pharmacological complexity and underlying molecular mechanisms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, n. 1, p. 6492346, 2021.

SHARMA, V., et al. "Emerging roles of quinoxalinones in therapeutic applications." **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, n. 3, p. 545-558, 2020.

SHEHU, N. Y. et al. Pathogenesis, diagnostic challenges and treatment of zika virus disease in resource-limited settings. **The Nigerian postgraduate medical journal**NLM (Medline), , 1 abr. 2018.

SHIRYAEV, S. A. et al. Dual function of Zika virus NS2B-NS3 protease. **PLoS Pathogens**, v. 19, n. 11, 1 nov. 2023.

SIERRA, E. J. T. et al. Coumarins as Potential Antiprotozoal Agents: Biological Activities and Mechanism of Action. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 1–20, 2021.

SOARES, A. F., et al. Pyrroquinazolines: Synthesis, properties, and biological activities. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 13, p. 2275-2292, 2019.

SOUZA-NETO, J. A.; POWELL, J. R.; BONIZZONI, M. **Aedes aegypti vector competence studies: A review. Infection, Genetics and Evolution**Elsevier B.V., , 1 jan. 2019.

STEFANACHI, A. et al. Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 250, 2018.

SUGANTHY, N. et al. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 892–908, 2016.

TRITSCH, D. et al. Flavonoids: True or promiscuous inhibitors of enzyme? the case of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase. **Bioorganic Chemistry**, v. 59, p. 140–144, 2015.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed research international**, v. 2013, n. 1, p. 963248, 2013.

VERONEZI, C. M. et al. Biological activities of pyridinones and their derivatives: A comprehensive review. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 2, p. 325-347, 2020.

WIKAN, N.; SMITH, D. R. **Zika virus: History of a newly emerging arbovirus. The Lancet Infectious Diseases**Lancet Publishing Group, , 1 jul. 2016.

XIE, X. et al. Zika Virus Replicons for Drug Discovery. **EBioMedicine**, v. 12, p. 156–160, 1 out. 2016.

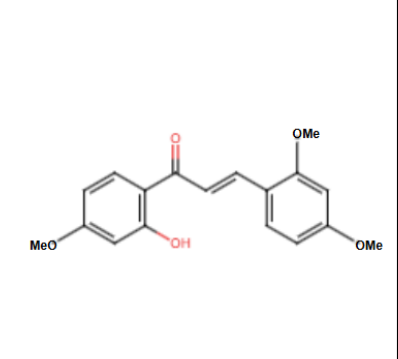
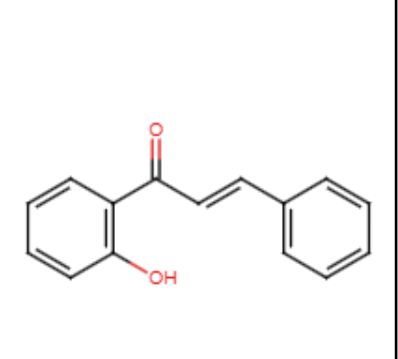
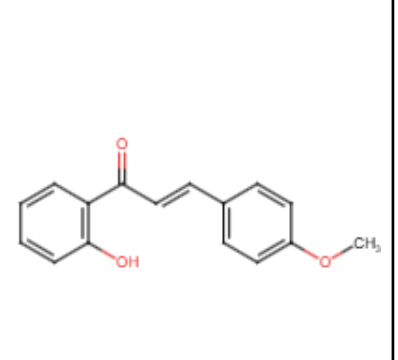
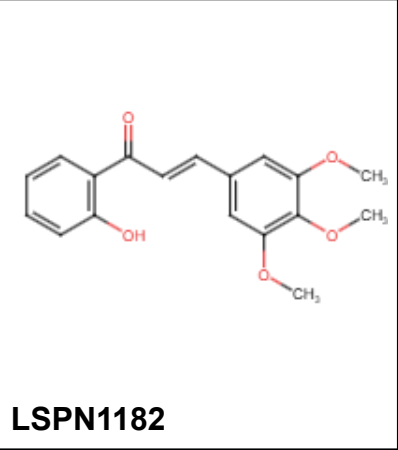
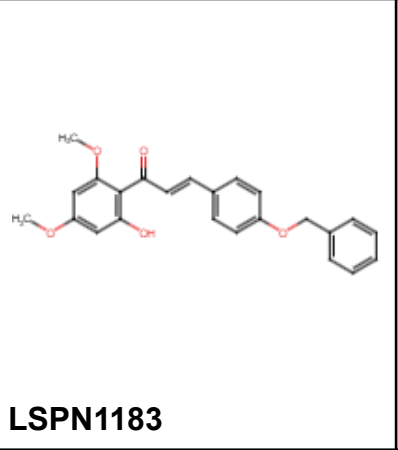
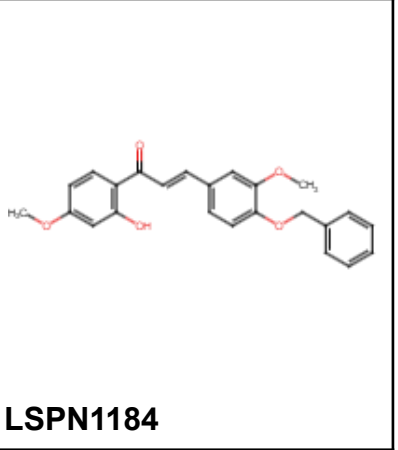
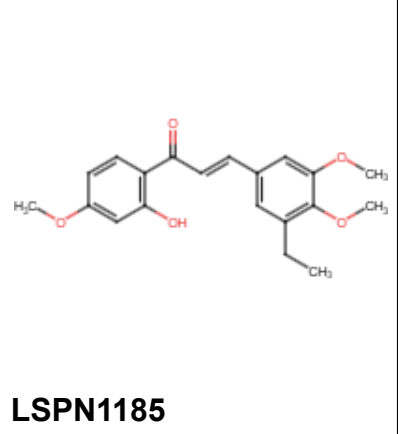
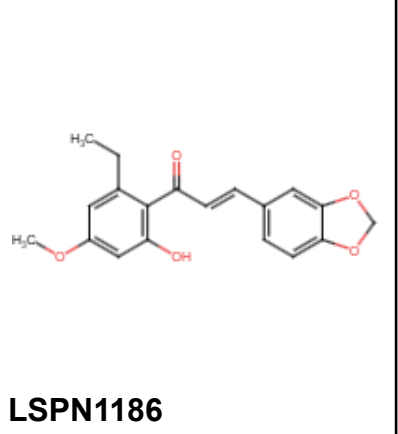
ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 569–572, 2015.

ZOU, M. et al. Structure-activity relationship of flavonoid bifunctional inhibitors against Zika virus infection. **Biochemical Pharmacology**, v. 177, p. 113962, 2020.

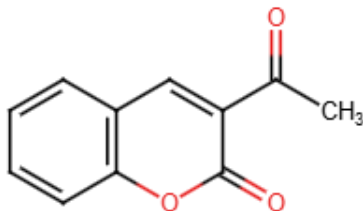
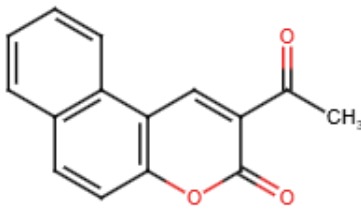
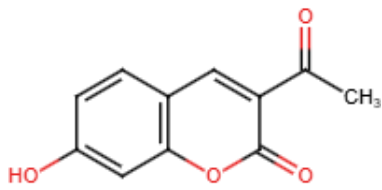
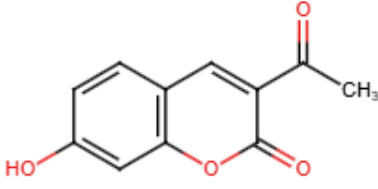
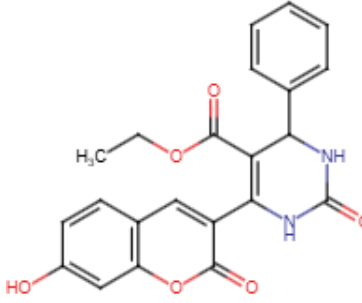
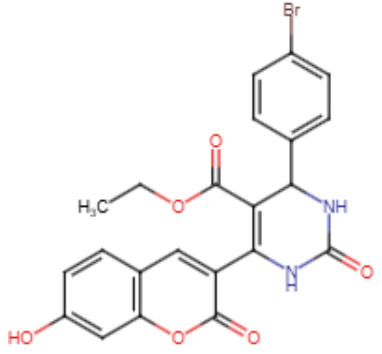
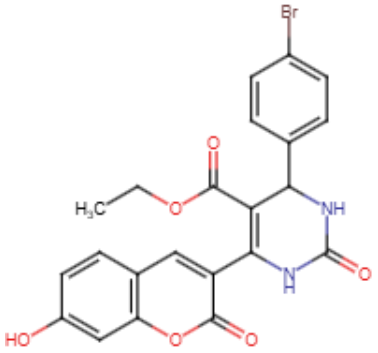
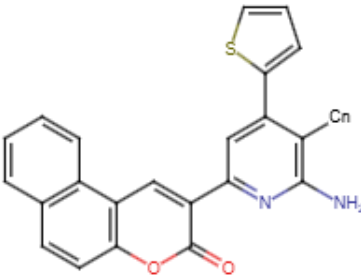
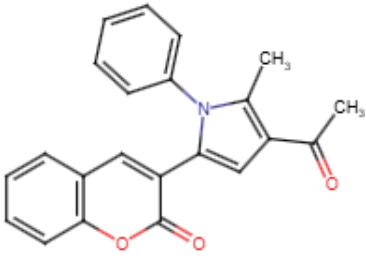
ANEXO A:

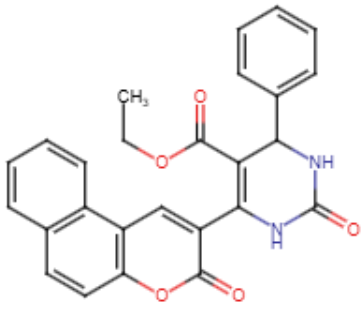
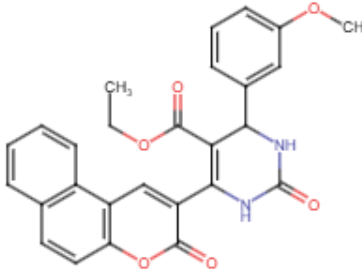
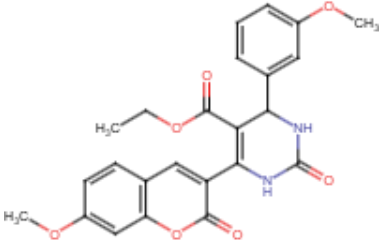
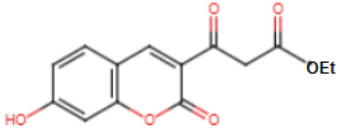
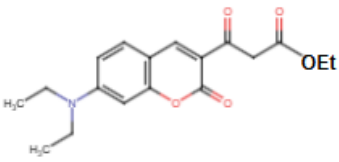
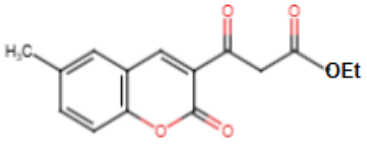
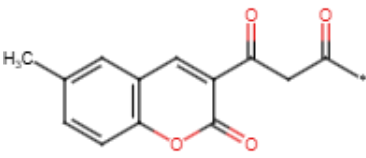
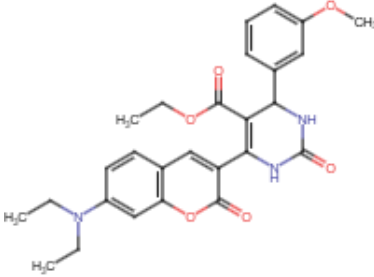
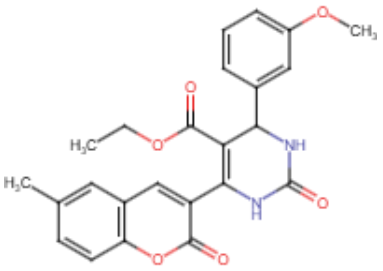
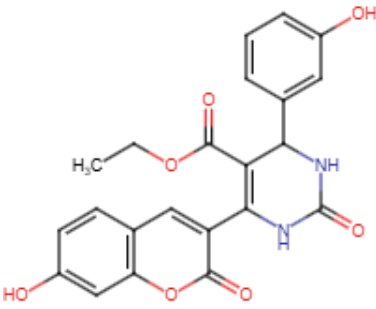
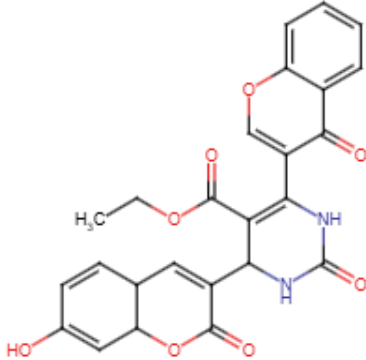
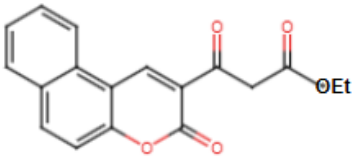
Estruturas dos compostos disponibilizadas pela Prof.^a Dra. Arlene Gonçalves Corrêa, do Laboratório de Síntese de Produtos Naturais (LSPN).

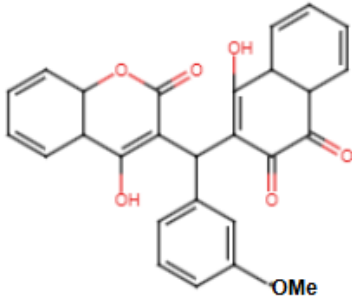
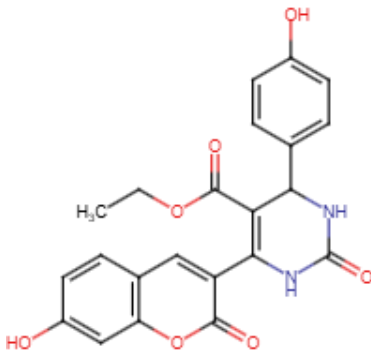
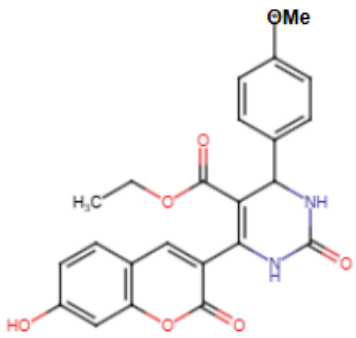
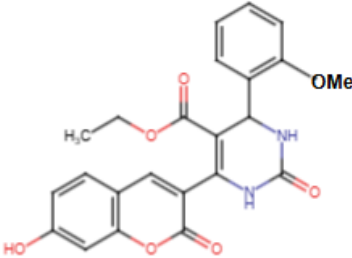
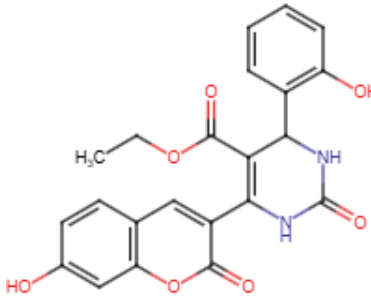
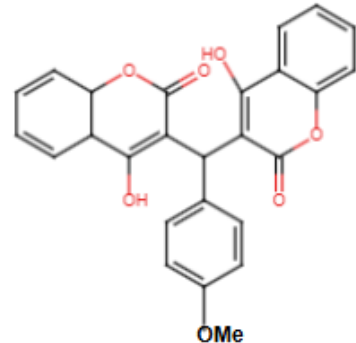
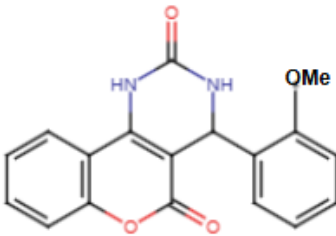
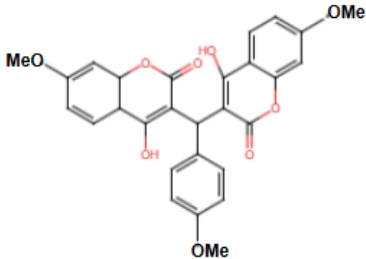
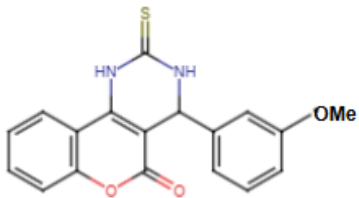
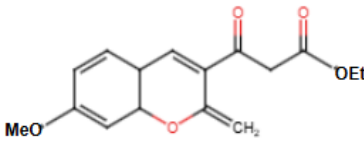
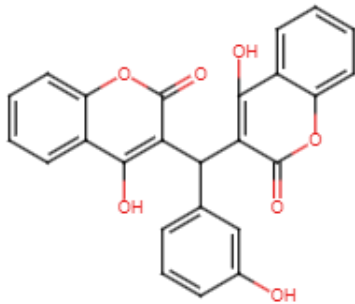
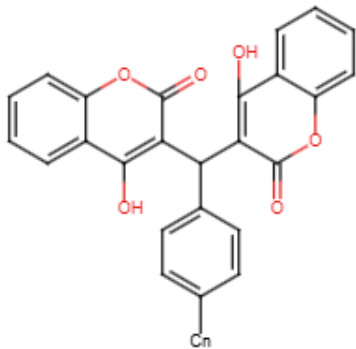
Chalconas

 <p>LSPN42</p>	 <p>LSPN1180</p>	 <p>LSPN1181</p>
 <p>LSPN1182</p>	 <p>LSPN1183</p>	 <p>LSPN1184</p>
 <p>LSPN1185</p>	 <p>LSPN1186</p>	

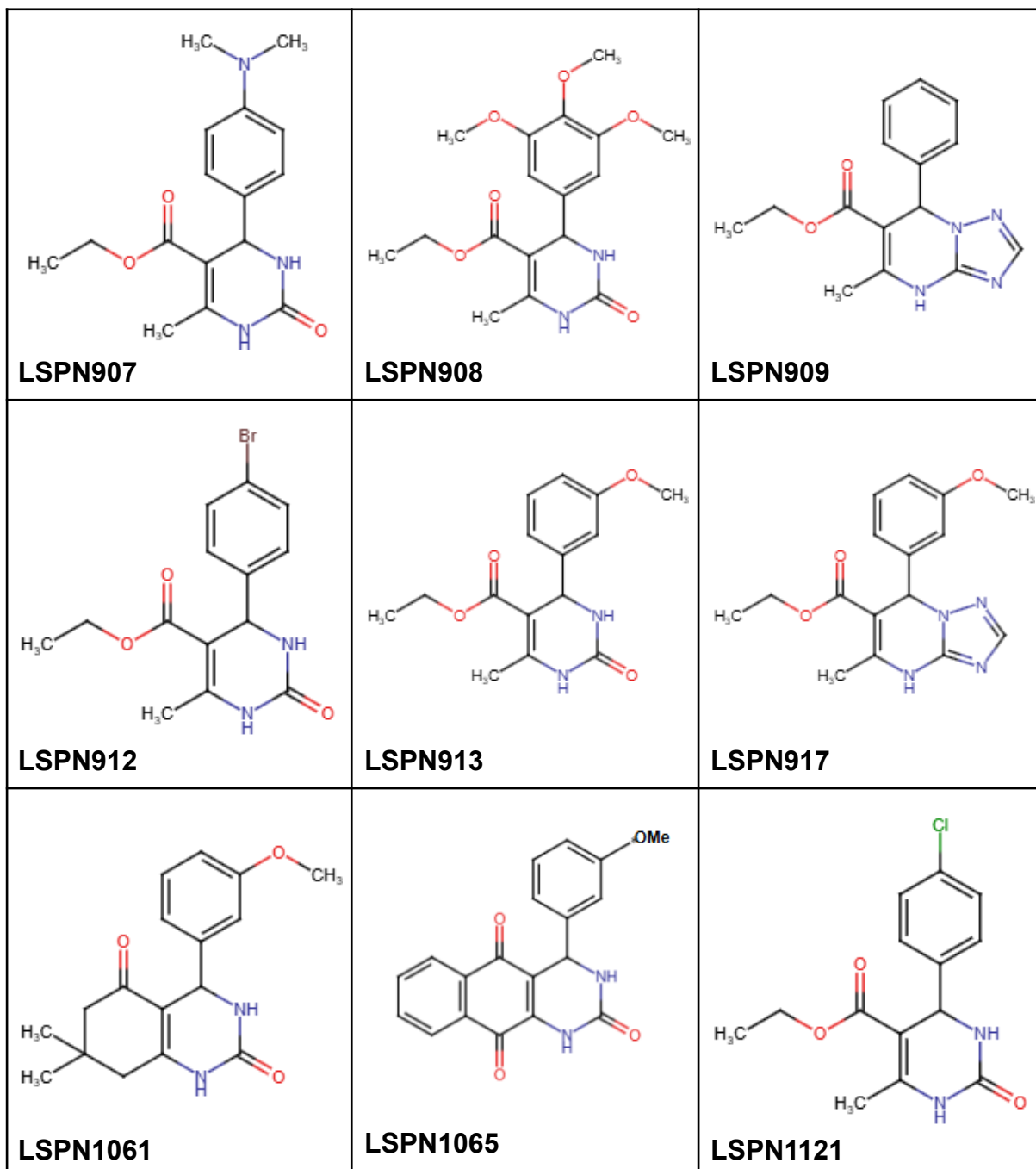
Cumarinas

 <p>Chemical structure of LSPN276: 7-acetylcoumarin. It consists of a coumarin core with an acetyl group (-COCH₃) attached at the 7-position.</p>	 <p>Chemical structure of LSPN277: 7-acetyl-2,3-dihydrocoumarin. It consists of a 2,3-dihydrocoumarin core with an acetyl group (-COCH₃) attached at the 7-position.</p>	 <p>Chemical structure of LSPN278: 7-hydroxy-7-acetylcoumarin. It consists of a coumarin core with a hydroxyl group (-OH) at the 7-position and an acetyl group (-COCH₃) at the 4-position.</p>
LSPN276	LSPN277	LSPN278
 <p>Chemical structure of LSPN279: 7-hydroxy-7-acetylcoumarin. It consists of a coumarin core with a hydroxyl group (-OH) at the 7-position and an acetyl group (-COCH₃) at the 4-position.</p>	 <p>Chemical structure of LSPN903: 7-hydroxy-7-(2-ethoxy-1-phenyl-1H-imidazol-5-yl)coumarin. It consists of a coumarin core with a hydroxyl group (-OH) at the 7-position and a 2-ethoxy-1-phenyl-1H-imidazol-5-yl group attached at the 4-position.</p>	 <p>Chemical structure of LSPN904: 7-hydroxy-7-(2-ethoxy-4-bromophenyl-1H-imidazol-5-yl)coumarin. It consists of a coumarin core with a hydroxyl group (-OH) at the 7-position and a 2-ethoxy-4-bromophenyl-1H-imidazol-5-yl group attached at the 4-position.</p>
LSPN279	LSPN903	LSPN904
 <p>Chemical structure of LSPN906: 7-hydroxy-7-(2-ethoxy-4-bromophenyl-1H-imidazol-5-yl)coumarin. It consists of a coumarin core with a hydroxyl group (-OH) at the 7-position and a 2-ethoxy-4-bromophenyl-1H-imidazol-5-yl group attached at the 4-position.</p>	 <p>Chemical structure of LSPN910: 7-(2-amino-5-(thiophen-2-yl)pyridin-3-yl)-7-acetylcoumarin. It consists of a coumarin core with an acetyl group (-COCH₃) at the 7-position and a 2-amino-5-(thiophen-2-yl)pyridin-3-yl group attached at the 4-position.</p>	 <p>Chemical structure of LSPN911: 7-(2-methyl-1-phenyl-1H-imidazol-5-yl)-7-acetylcoumarin. It consists of a coumarin core with an acetyl group (-COCH₃) at the 7-position and a 2-methyl-1-phenyl-1H-imidazol-5-yl group attached at the 4-position.</p>
LSPN906	LSPN910	LSPN911

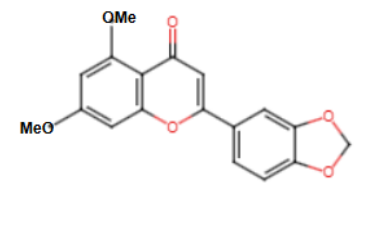
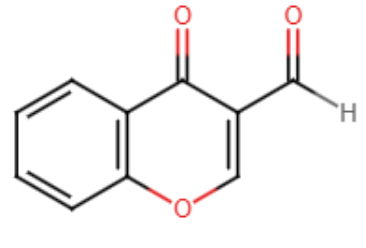
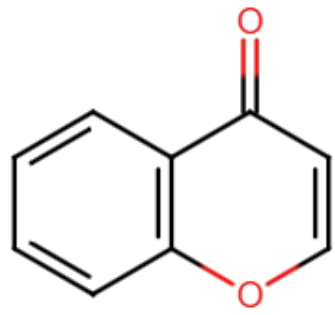
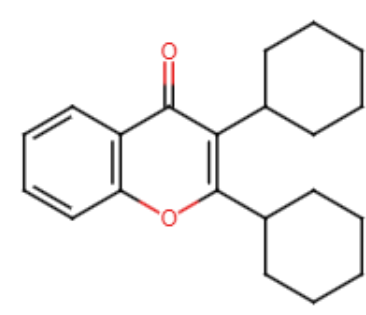
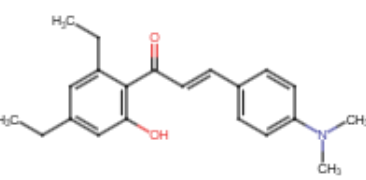
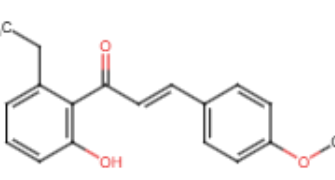
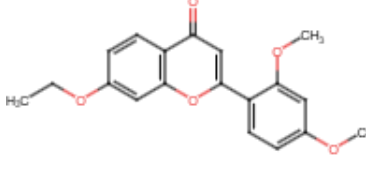
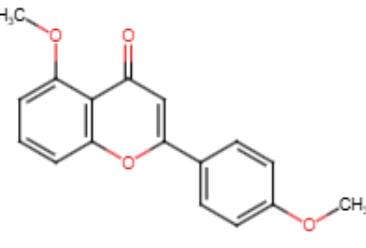
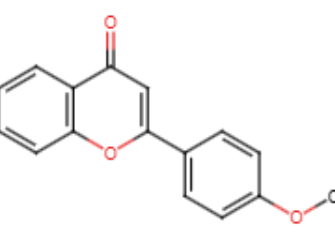
 <p>LSPN914</p>	 <p>LSPN915</p>	 <p>LSPN916</p>
 <p>LSPN920</p>	 <p>LSPN921</p>	 <p>LSPN922</p>
 <p>LSPN923</p>	 <p>LSPN924</p>	 <p>LSPN925</p>
 <p>LSPN926</p>	 <p>LSPN1062</p>	 <p>LSPN1063</p>

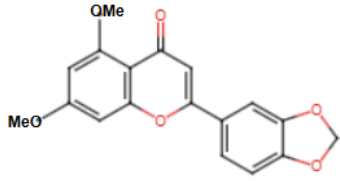
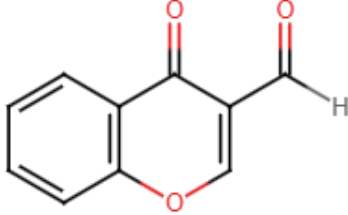
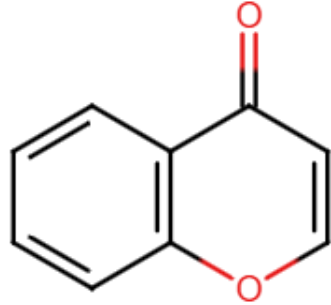
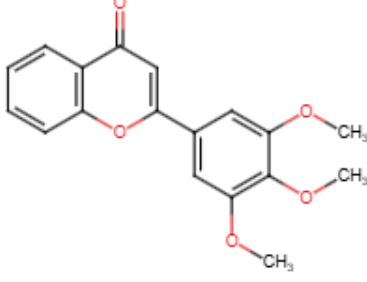
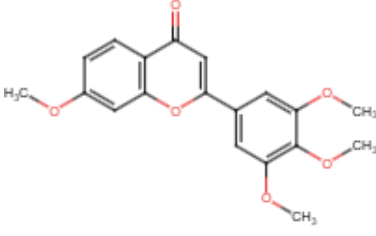
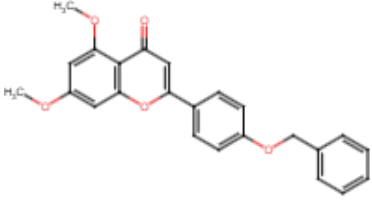
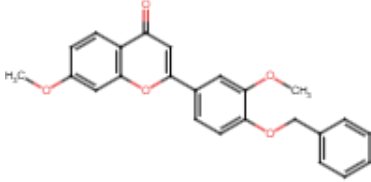
 <p>LSPN1064</p>	 <p>LSPN1066</p>	 <p>LSPN1067</p>
 <p>LSPN1068</p>	 <p>LSPN1069</p>	 <p>LSPN1070</p>
 <p>LSPN1071</p>	 <p>LSPN1072</p>	 <p>LSPN1073</p>
 <p>LSPN1074</p>	 <p>LSPN1111</p>	 <p>LSPN1112</p>

Diidropirimidinona



Flavonas

 <p>LSPN99</p>	 <p>LSPN1079</p>	 <p>LSPN1113</p>
 <p>LSPN1114</p>	 <p>LSPN1187</p>	 <p>LSPN1188</p>
 <p>LSPN1189</p>	 <p>LSPN1191</p>	 <p>LSPN1192</p>

 <p>LSPN99</p>	 <p>LSPN1079</p>	 <p>LSPN1113</p>
 <p>LSPN1193</p>	 <p>LSPN1194</p>	 <p>LSPN1195</p>
 <p>LSPN1196</p>		

Pirrol

