



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas Alimentos e Nutrição - FACFAN
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Mestrado

Giovanna Filizzola Costa de Azevedo

**SINTESE DE FLAVONOIDES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE
A COVID-19**

**Campo Grande – MS
2025**



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Giovanna Filizzola Costa de Azevedo

**SINTESE DE FLAVONOIDES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE
A COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas – Nível Mestrado – da
Universidade Federal de Mato Grosso do
Sul para obtenção do Título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Adilson Beatriz
Co-orientador: Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos

**Campo Grande – MS
2025**



AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família por sempre me apoiar durante a graduação e em todas as escolhas da minha vida. Por sempre estarem presentes em cada momento e pela relação que temos. Em especial a minha madrinha (Marcia Elisa Silveira de Azevedo) e meu pai (Marcos Assis Almeida de Azevedo).

Aos meus avós (Carmensita Almeida de Azevedo e Assis Silveira de Azevedo) que sempre cuidaram de mim e me trataram como se fosse filha deles, sem eles nada seria possível, mesmo seu avô não estando mais comigo presencialmente.

Aos professores orientadores Dr. Dênis Pires de Lima e Dr. Adilson Beatriz pela oportunidade, pelo exemplo de pesquisadores e professores que sempre levarei como referência na minha vida profissional. Agradeço também pela compreensão e paciência no decorrer do meu aprendizado.

Ao Dr. Edson dos Anjos dos Santos, pela coorientação, pela dedicação e pelos ensinamentos durante a graduação que se prolongaram à pós-graduação. Só tenho a agradecer pelos anos de aprendizado que me proporcionou.

As minhas colegas de pesquisa Rosane e Estela, elas foram essenciais no decorrer do mestrado pelo compartilhamento de conhecimento e ajuda nas dificuldades no caminho. Aos meus amigos do LP4, pelas conversas que faziam meu dia mais leve e aos alunos de iniciação científica, Maria Eduarda, Jonas e Lorena, que me auxiliaram nesse percurso.

Ao grupo de pesquisa e os responsáveis pelos experimentos e análises da atividade biológica realizada nesse trabalho do Laboratório de Modelagem Molecular e Planejamento de Fármacos (ICB/UFMS).

A CAPES, FUNDECT e Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGFARM – UFMS) pelo auxílio financeiro fornecido.



Sumário

1.	Introdução Geral.....	13
2.	Objetivos Gerais.....	18
2.1.	Objetivos Específicos.....	18
CAPÍTULO I: Uma breve revisão bibliografia sobre COVID-19 e os análogos do nafamostato.....		19
1.	Revisão de Literatura.....	20
1.1	Classificação e Morfologia Viral.....	20
1.2.	Processo de Infecção Viral.....	21
1.3.	Imunopatologia da Doença.....	24
1.4.	Alvos Terapêuticos.....	26
1.4.1.	TMRSS2.....	27
1.4.2.	Mpro.....	28
1.4.3.	Catepsinas.....	29
1.5.	O atual tratamento para COVID-19.....	30
1.5.1.	Tratamento Antiviral.....	31
1.5.1.1.	Remdesivir.....	31
1.5.1.2.	Nirmatrelvir-ritonavir (Paxlovid®).....	33
1.5.1.3.	Molnupiravir.....	35
1.5.2.	Terapia Imunomoduladora.....	36
1.5.2.1.	Corticoides (Dexametasona).....	36
1.5.2.2.	Baricitinibe.....	37
1.5.2.3.	Tocilizumabe	38
1.6.	A indústria farmacêutica no combate ao Covid-19.....	39
1.7.	Mesilato de Nafamostato.....	41
1.8.	A fitoquímica na COVID-19.....	42
1.9.	Capsaicinas.....	44
1.10.	Flavonoides.....	46
2.	Referências Bibliográficas.....	48
CAPÍTULO II: Síntese de análogos de capsaicinas derivadas do mesilato de nafamostato.....		55
1.	Introdução.....	58
2.	Objetivos Gerais.....	60
2.1.	Objetivos Específicos.....	60
3.	Resultados e Discussões.....	61
3.1.	Síntese.....	61
4.	Parte Experimental.....	69
4.1.	Materiais e Métodos.....	69
4.2.	Síntese dos Capsaicinóides.....	69
4.2.1.	Procedimento geral para síntese do composto 2.....	69
4.2.2.	Procedimento geral da reação da guanidina.....	69
5.	Conclusão.....	71
6.	Referências Bibliográficas.....	72
CAPÍTULO III: Síntese de flavonoides e sua atividade inibitória sobre a COVID-19		75
1.	Introdução.....	78
2.	Objetivos Gerais.....	80
2.1.	Objetivos Específicos.....	80
3.	Resultados e Discussões.....	81



3.1. Síntese.....	81
3.2. Ensaio Enzimático com a Mpro do SARS-CoV-2.....	85
4. Parte Experimental.....	89
4.1. Materiais e Métodos.....	89
5. Conclusão.....	95
6. Referências Bibliográficas.....	96
7. ANEXOS 1.....	99



Índice de Figuras

Figura 1. Número de casos confirmados e óbitos no Brasil. Adaptado de <i>World Health Organization</i> . Consultado em agosto/2024	14
Figura 2. Estrutura do nafamostatato com o grupo guanidino (vermelho) destacado.	15
Figura 3. Estrutura dos medicamentos que contêm o grupo guanidino (vermelho)... ..	16
Figura 4. Estrutura dos metabolitos secundários. A esquerda é apresentada a capsaicina e seus grupos funcionais importantes em vermelho e azul. A direita é apresenta a estrutura básica para a composição dos flavonoides	16
Figura 5. Estrutura do vírus SARS-Cov-2. Fonte: KIRTIPAL et al.,2020	20
Figura 6. Organização genômica do SARS-CoV-2. Adaptado de KIRTIPAL et al.2020	21
Figura 7. Representação da ligação do receptor RBD com a ACE2.Fonte:GUSEV et al.2022	22
Figura 8. Representação esquemática da replicação e morfogênese do coronavírus.. Fonte: V'kovski et.al,2021	24
Figura 9. Imunopatologia da COVID-19.1. Fonte: CHAMS et al.,2020.....	26
Figura 10. Esquema do peptídeo de 492 aminoácidos da isoforma 2 do TMPRSS2. O domínio TM corresponde à região transmembranar; o LDLRA representa o domínio da classe A do receptor de LDL; e o SRCR é o domínio rico em cisteína, característico dos receptores scavenger. A tríade catalítica, composta por histidina (H), ácido aspártico (D) e serina (S), é fundamental para a atividade proteolítica da enzima. Fonte: THUNDERS& DELAHUNT,2020.....	28
Figura 11. A) Representação da M ^{pro} do SARS-CoV-2 onde os domínios I, II e III estão representados em vermelho, amarelo e azul respectivamente. A díade catalítica representadas pelos resíduos Cys145 e His41 em esfera solida, em branco é possível ver a ligação entre os domínios II e III. B) Representação do sítio ativo da protease que estão envolvidos nas interações com um possível inibidor. Fonte: BANERJEE, PERERA, TILLEKERATNE,2020	29
Figura 12. Recomendações de acordo com a gravidade da COVID-19 em pacientes confirmados. Fonte: <i>Therapeutics and COVID-19: living guideline</i> – WHO,2024.....	31
Figura 13. Estrutura química do fármaco Remdesivir.....	32
Figura 14. Estrutura química do fármaco Paxlovid®.	34
Figura 15. Estrutura química do fármaco Molnupiravir.	35
Figura 16. Estrutura química do corticoide dexametasona.....	36
Figura 17. Estrutura química do fármaco Baricitinibe.	38
Figura 18. Interações realizada entre o Nafamostatato e a TMRSS2 em estudos in sílico. Adaptado de: FUJIMOTO et al.,2022	42
Figura 19. Estrutura química das capsaicinas.	44
Figura 20. Estrutura química de diferentes capsaicinoides e seus análogos.	45
Figura 21. Estrutura do núcleo químico dos flavonoides (C6–C3–C6)	46
Figura 22. Estrutura química do composto 2	62
Figura 23. Estrutura do composto obtido.....	63
Figura 24. Estrutura química do composto com a guanidina.....	66
Figura 25. Estrutura química das chalconas nas formas isômeras Z e E, respectivamente.	82
Figura 26. Representação do mecanismo de reação da condensação de Claisen-Schmidt. Fonte: MANCHANAYAKAGE, 2016	83



Índice de Espectros

Espectro 1. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) da N-vanililformamida ..	63
Espectro 2. Espectro de RMN de DEPT 135 (75 MHz em CDCl_3) da N-vanililformamida	64
Espectro 3. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) da N-vanililformamida	65
Espectro 4. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em DMSO-d_6) do composto teste	67
Espectro 5. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em DMSO-d_6) do composto teste	68
Espectro 6. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_1a.....	99
Espectro 7. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_1a.....	99
Espectro 8. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_1b...	100
Espectro 9. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_1b....	100
Espectro 10. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_1c	101
Espectro 11. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_1c.	101
Espectro 12. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_2a	102
Espectro 13. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_2a.	102
Espectro 14. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_2b	103
Espectro 15. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_2b.	103
Espectro 16. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_2c	104
Espectro 17. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_2c.	104
Espectro 18. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_3a.	105
Espectro 19. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_3a..	105
Espectro 20. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_3b.	106
Espectro 21. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_3b..	106
Espectro 22. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_3c.	107
Espectro 23. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_3c..	107
Espectro 24. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_4a.	108
Espectro 25. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_4a..	108
Espectro 26. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_4b.	109
Espectro 27. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_4b.	109
Espectro 28. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_4c.	110
Espectro 29. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_4c..	110
Espectro 30. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em DMSO-d_6) do composto EM_F12a	111
Espectro 31. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em DMSO-d_6) do composto EM_F12a	111
Espectro 32. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em DMSO-d_6) do composto EM_F12b	112
Espectro 33. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em DMSO-d_6) do composto EM_F12b	112
Espectro 34. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz em DMSO-d_6) do composto EM_F12c	113
Espectro 35. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz em DMSO-d_6) do composto EM_F12c	113



Espectro 36. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz em DMSO-d_6) do composto EM_F13a	114
Espectro 37. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz em DMSO-d_6) do composto EM_F13a	114

Índice de Esquemas

Esquema 1. Rota sintética geral para a preparação dos análogos da capsaicina.....	61
Esquema 2. Rota sintética para preparação do composto 2	62
Esquema 3. Rota sintética esperada do composto 3	63
Esquema 4. Rota sintética da reação de Leuckart	65
Esquema 5. Rota sintética da reação teste para formação da guanidina.....	66
Esquema 6. Rota sintética das chalconas	81
Esquema 7. Síntese de flavonoides através da metodologia de Algar-Flynn-Oyamada. Fonte: Adaptado de Oyamada (1935)	84

Índice de Tabelas

Tabela 1. Rendimentos da reação da chalconas.	81
Tabela 2. Rendimentos das reações dos flavonoides.....	84
Tabela 3. Porcentagem de inibição da M^{pro} em experimentos com pré-incubação dos compostos com a enzima.....	85



Lista de abreviatura

μM	Micro molar
AcOEt	Acetato de etila
ANOVA	Análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
aq	aquoso
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CH_2Cl_2	Diclorometano
cys	cisteína
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
dl	Dupleto largo
dt	Dupleto de tripleto
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
DTT	ditiotreitol
EBSERH	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EtOH	Etanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Hab.	Habitantes
Hex	Hexano
HCl	Ácido clorídrico
His	Histidina
Hz	Hertz



H_2O_2	Peroxido de hidrogênio
IC_{50}	Quantidade de composto necessária para inibir 50% da atividade enzimática
J	Constante de acoplamento
kb	kilobase
m	Multiplete
MHz	Megahertz
mM	Milimolar
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio
NaOH	Hidróxido de sódio
ppm	Parte por milhão
q	quarteto
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Simpleto
Ser	Serina
sl	Simpleto Largo
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
td	Triplete de dubleto
TMS	Tetrametilsilano
δ	Deslocamento químico em ppm



Resumo

No final de 2019, uma epidemia viral originária de Wuhan, China, desencadeou a pandemia de COVID-19, levando à emergência de novos desafios na área da saúde pública. Embora a FDA e a ANVISA tenham autorizado alguns medicamentos para o tratamento da doença, as terapias disponíveis apresentam limitações—como interações medicamentosas, necessidade de administração intravenosa e eficácia restrita—destacando a necessidade de desenvolver antivirais mais eficazes e acessíveis. Nesse contexto, parcerias entre a indústria farmacêutica e instituições acadêmicas têm empregado estratégias como o desenho de fármacos assistido por computador (CADD), que possibilita a criação de compostos bioativos com base na estrutura dos alvos moleculares. Um exemplo citado é o mesilato de nafamostato, inibidor de serina protease, que demonstrou inibir a fusão celular mediada pelo TMPRSS2 e a replicação viral in vitro contra o SARS-CoV-2. Além disso, o estudo aborda duas classes de metabolitos secundários com potencial antiviral: os flavonoides e as capsaicinas. Os flavonoides, presentes em diversas plantas, possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antivirais, enquanto as capsaicinas também demonstraram atividade inibitória sobre a protease principal do SARS-CoV-2. Diante da importância sanitária e econômica da pandemia, o presente trabalho teve como objetivo a síntese de compostos com potencial antiviral por meio de metodologias sintéticas simples, sustentáveis e escalonáveis, empregando estratégias de CADD. A organização do estudo distribuiu a revisão bibliográfica e os dados experimentais em três capítulos: o primeiro, abordando a patologia e a emergência global; o segundo, detalhando a síntese de análogos de capsaicinas derivados do mesilato de nafamostato; e o terceiro, apresentando os resultados obtidos com análogos de flavonoides e perspectivas futuras para o tratamento da COVID-19.

Palavras-chave: COVID-19, mesilato de nafasmotato, capsaicina, flavonoides, SARS-CoV-2.



Abstract

In late 2019, a viral outbreak originating in Wuhan, China, led to the COVID-19 pandemic, presenting unprecedented challenges to global public health. While agencies such as the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and Brazil's National Health Surveillance Agency (ANVISA) have authorized certain treatments for COVID-19, these therapies often come with limitations, including drug interactions, the necessity for intravenous administration, and limited efficacy. Consequently, there is a pressing need for the development of more effective and accessible antiviral agents. In response to this need, collaborations between the pharmaceutical industry and academic institutions have increasingly employed Computer-Aided Drug Design (CADD). This approach facilitates the creation of bioactive compounds by analyzing the structures of molecular targets. A notable example is nafamostat mesylate, a serine protease inhibitor traditionally used for other indications, which has demonstrated the ability to inhibit SARS-CoV-2 replication by targeting the TMPRSS2 enzyme. Additionally, secondary metabolites such as flavonoids and capsaicinoids have shown potential antiviral properties. Flavonoids, widely found in various plants, exhibit antioxidant, anti-inflammatory, and antiviral activities. Capsaicinoids, have also demonstrated inhibitory effects against SARS-CoV-2. Given the significant health and economic impacts of the COVID-19 pandemic, this study aimed to synthesize compounds with potential antiviral activity using CADD methodologies. The proposed synthetic routes were designed to be straightforward, sustainable, and scalable. The study is organized into three chapters: the first discusses the pathology of SARS-CoV-2 and the global health emergency it precipitated; the second details the synthesis of capsaicin analogs derived from nafamostat mesylate; and the third presents findings related to flavonoid analogs and prospects for COVID-19

Keywords: COVID-19, nafasmotate mesylate, capsaicin, flavonoids, SARS-CoV-2.



1. Introdução Geral

No final de 2019, uma epidemia viral eclodiu na cidade de Whuan, na China, provocada por uma nova doença respiratória. Em 11 de fevereiro de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) nomeou a nova doença como “*coronavirus disease 2019*” – COVID-19 causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 – SARS-CoV-2 e exatamente 1 mês depois, no dia 11 de março de 2020 foi declarada uma pandemia de COVID-19. (OCHANI et al., 2021) O SARS-CoV-2 é um vírus pertencente à família *Coronaviridae*, e possui homologia genômica com vírus SARS-CoV. (ASSELAH et al.2021; KAUSHIK et al.2020)

Os coronavírus formam uma numerosa família que podem causar doenças em animais e seres humanos. Eles são vírus formados de RNA de fita simples positiva (+ssRNA), envelopados e esféricos (DE ALMEIDA, 2020; YAMAMOTO et al., 2020). Geralmente causam infecções respiratórias que podem variar de quadros leves a graves, como a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) e a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) e atualmente a Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (DE ALMEIDA, 2020)

No início de novembro 2002, na China surgiram relatos da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), onde foram relatados mais de 8 mil casos da doença e 774 óbitos nas regiões da Ásia oriental e ocidental, mas também foram reportados casos de óbitos em regiões da África do Sul, América Central e Europa. A Síndrome Respiratória do Oriente Médio causada pelo *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV) foi reportada em abril de 2012 na Arábia Saudita inicialmente, e posteriormente em países do Oriente Médio, Europa e África. De acordo com a OMS, foram confirmados cerca de 2.494 casos e 858 óbitos. (CHENG et al.2007).

Segundo a OMS, foram relatados cerca de 775.731.698 casos confirmados de COVID-19 no mundo até dia 21 de julho de 2024, incluindo 7.054.891 óbitos. No Brasil, foram registrados cerca de 37.511.921 casos notificados à OMS até o dia 21 de julho de 2024 e 702.116 óbitos. Foi possível visualizar que de acordo com o Ministério da Saúde o Brasil apresenta uma incidência/100mil hab. de 18.487,12 e uma taxa de mortalidade/100mil hab. de 339,18 até agosto/2024. Também foi possível visualizar



que de acordo com a OMS (**Figura 1**), o Brasil apresentou um maior número de óbitos em 2021 e o maior número de casos 2022.

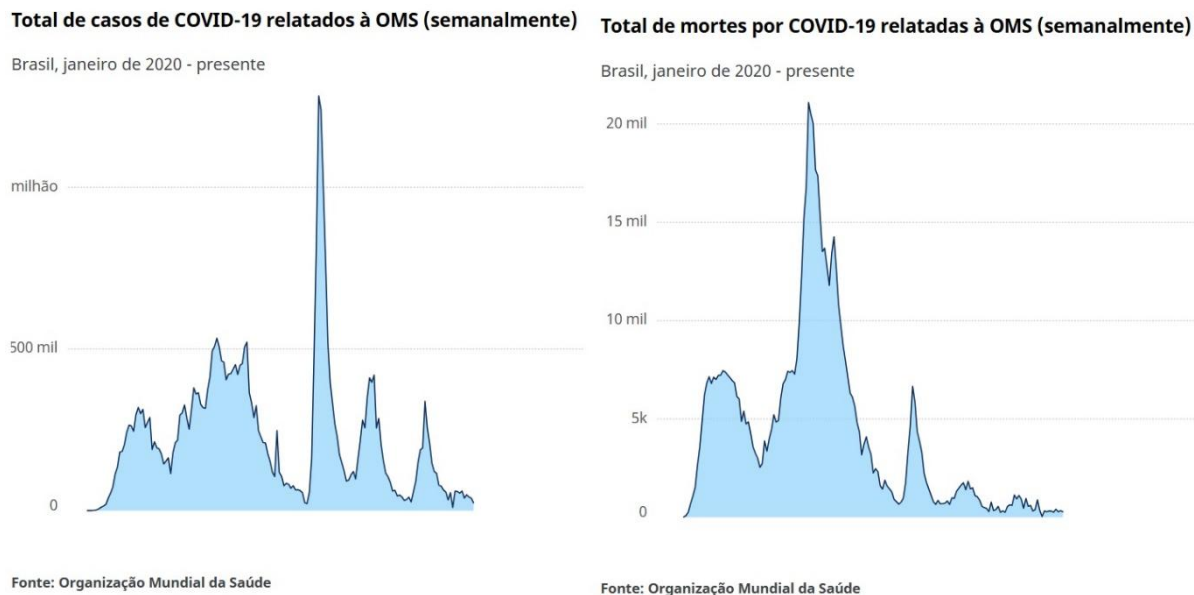


Figura 1. Número de casos confirmados e óbitos no Brasil. Adaptado de *World Health Organization*. Consultado em agosto/2024

Em relação ao tratamento da COVID-19, existem alguns medicamentos autorizados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos para tratar casos leves a moderados da doença. São os antivirais Nirmatrelvir com Ritonavir (Paxlovid®), Remdesivir (Veklury®), Molnupiravir (Lagevrio®) e o anticorpo monoclonal Bebtelovimabe (CDC 2022; NHS 2022). No Brasil, eles foram autorizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o tratamento emergencial. As medicações requerem alguns requisitos para uso, como por exemplo, se o paciente necessita de oxigênio suplementar ou não (ANVISA, 2024).

Atualmente, a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA já aprovou alguns medicamentos para o tratamento da COVID-19. No entanto, os antivirais disponíveis apresentam certas limitações, como interações medicamentosas no caso da combinação de nirmatrelvir com ritonavir, a necessidade de administração intravenosa do remdesivir e a eficácia limitada do molnupiravir. Diante disso, persiste a necessidade de desenvolver novos antivirais que superem essas restrições e ofereçam opções terapêuticas mais eficazes e acessíveis (GULICK et al., 2024).

Uma estratégia da indústria farmacêutica em parceria com instituições de ensino é o direcionamento da síntese de compostos bioativos por meio de métodos de



desenho de fármacos assistidos por computador (CADD, *computer aided drug design*). A abordagem tem como o objetivo realizar o desenho de compostos baseando-se na estrutura de alvo molecular (SBDD – *structure based drug design*) ou baseia o estudo em um ligante ou mais que será utilizado como referência (LBDD – *ligand based drug design*). (MACALINO et al. 2015).

As principais vantagens disso para a indústria farmacêutica estão relacionadas à redução de custos e agilização do processo de desenvolvimento de medicamentos, minimizando falhas no estágio final. (MACALINO et al. 2015). Como exemplo, destaca-se o mesilato de nafamostato (**Figura 2**), um inibidor sintético de serina protease, já utilizado para o tratamento de outras doenças, (YAMAMOTO et al.2016) ele mostrou inibição da fusão celular dependente da protease transmembrana de serina 2 (TMPRSS2) com IC_{50} 30 μ M.(YAMAMOTO et al.2020), demonstrando um resultado inibição da replicação viral *in vitro* contra o SARS-CoV-2.

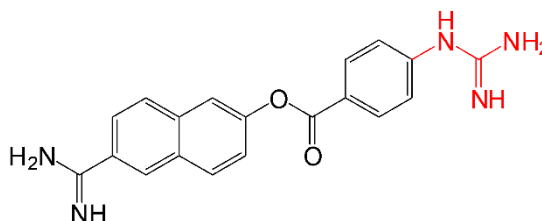


Figura 2. Estrutura do nafamostato com o grupo guanidino (vermelho) destacado.

Uma das características estruturais do mesilato de nafamostato é a presença do grupo guanidino, que tem recebido grande atenção devido às suas diversas aplicações como “building blocks” para diversos medicamentos como metformina, cimetidina, zanamivir, apresentados na **Figura 3** (ZHANG, et al.2015). Esse grupo também está presente na L-arginina, aminoácido essencial que está envolvido em diversos processos fisiológicos e possui um grupo guanidino em sua estrutura. (PETERLIN-MASIC; KIKELI, 2001)

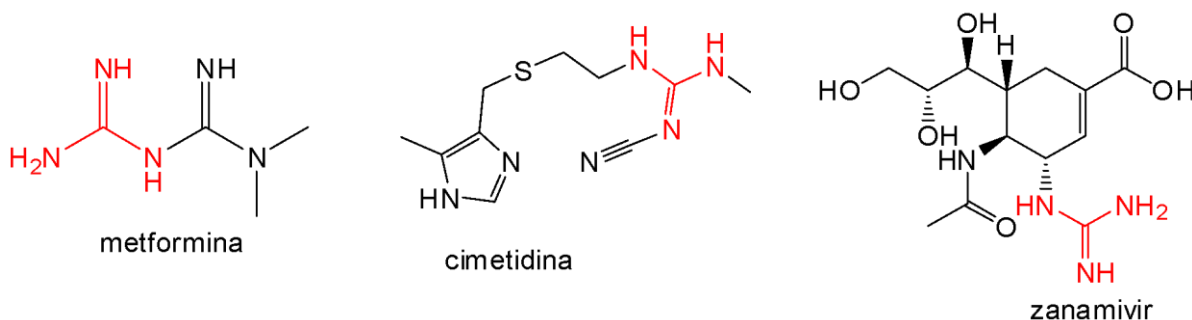


Figura 3. Estrutura dos medicamentos que contêm o grupo guanidino (vermelho)

Outra classe de compostos são os metabolitos secundários, como os flavonoides e as capsaicinas (**Figura 4**). Esse grupo constitui um exemplo de compostos com características multialvo (KESSLER; KALSKE, 2018). Essas características as quais vêm despertando um interesse da indústria farmacêutica que apresentam um perfil mais seguro em comparação aos compostos de alvo único. (RAMSEY et al., 2018)

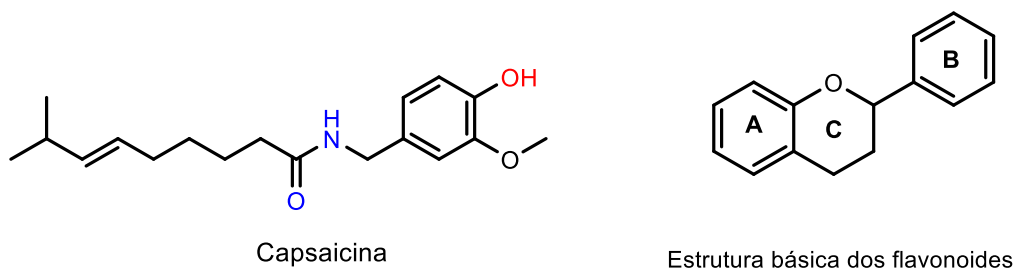


Figura 4. Estrutura dos metabolitos secundários. A esquerda é apresentada a capsaicina e seus grupos funcionais importantes em vermelho e azul. A direita é apresentada a estrutura básica para a composição dos flavonoides

A capsaicina é um alcaloide obtido das plantas do gênero *Capsicum*, é o componente ativo das pimentas e seu papel benéfico tem sido relatado na obesidade, condições cardiovasculares e gastrointestinais, vários tipos de câncer, bexiga neurogênica e condições dermatológicas. (SHARMA et al. 2013) As capsaicinas que segundo estudos *in silico* apresentaram atividades antivirais sobre o SARS-CoV-2 devido à forte ligação com a protease principal (M^{pro}). (GONZALEZ-PAZ et al. 2020)

Os flavonoides representam outro grupo de metabolitos secundários amplamente encontrados em diversas plantas. São compostos de estrutura polifenólica que possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênicas, anticancerígenas, além de serem capazes de controlar as principais funções de enzimas celulares. Devido ao amplo espectro de atividade biológica,



apresentam atividade antiviral, sendo nos últimos 60 anos identificados vários compostos com atividade antiviral (JO et al.2020; ZAKARYAN et al.2017)

Dada a relevância dos parâmetros sanitários e econômicos da pandemia de COVID-19 e da emergência de saúde pública, este presente trabalho teve como objetivo a síntese de compostos com potencial antiviral por meio de CADD. As rotas sintéticas foram propostas por meio de metodologias simples, sustentáveis e escalonáveis.

Para organização deste presente trabalho, os dados foram distribuídos por capítulos. O capítulo I engloba uma revisão bibliográfica sobre a patologia provocada pelo vírus SARS-CoV-2 e sua emergência global de saúde pública que consequentemente levaram essa urgência em buscas de novos tratamentos nesse estudo. O capítulo II apresenta as metodologias e resultados obtidos na síntese de análogos de capsaicinas derivadas do mesilato de nafamostato. O capítulo III apresenta os resultados obtidos nos análogos de flavonoides e perspectivas futuras para o tratamento da COVID-19.



2. Objetivos Gerais

Sintetizar compostos e avaliar sua atividade antiviral sob o SARS-CoV-2.

2.1. Objetivos Específicos

- Sintetizar os análogos do nafamostatato;
- Sintetizar capsaicinoides derivados do nafamostatato;
- Sintetizar os análogos de flavonoides;
- Caracterizar os análogos pelas técnicas de RMN (^1H e ^{13}C) e HRMS;
- Realizar os ensaios de inibição *in vitro* da M^{pro} ;
- Realizar ensaios de citotoxicidade com os produtos preparados.



**CAPÍTULO I: Uma breve
revisão bibliográfica sobre
COVID-19 e os análogos do
nafamostato.**

1 Revisão de Literatura

1.1 Classificação e Morfologia Viral

Os coronavírus (CoV) são vírus pertencentes a ordem *Nidovirales*, que compreende quatro famílias sendo elas: *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* e *Roniviridae*. Todos os vírus são RNA de fita simples positiva, envelopados e não segmentados. (OCHANI et al.2021) A família *Coronaviridae* é dividida em quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus*. Sendo o gênero *Betacoronavirus* responsável pela maior gravidade e letalidade das infecções causadas pelos CoV nas últimas décadas. (CORMAN et al.2018; CHENG et al.2007)

O SARS-CoV-2 é constituído por uma partícula envelopada e esférica de 100-160 nm de diâmetro. O RNA genômico possui aproximadamente 30 kb (kilobase) sendo um dos maiores vírus de RNA já identificados. (CHAN et al. 2020; BORGES et al.2020) O material genético do vírus é complexado com múltiplas cópias de nucleoproteínas formando um nucleocapsídeo helicoidal cercado por um envelope. O envelope é constituído por uma bicamada lipídica, na qual estão incorporadas as proteínas de espícula (do inglês *Spike*, ou proteína S), proteínas membrana (M), proteína do envelope (E) (**Figura 5**) (HELMY et al. 2020; LI et al. 2020)

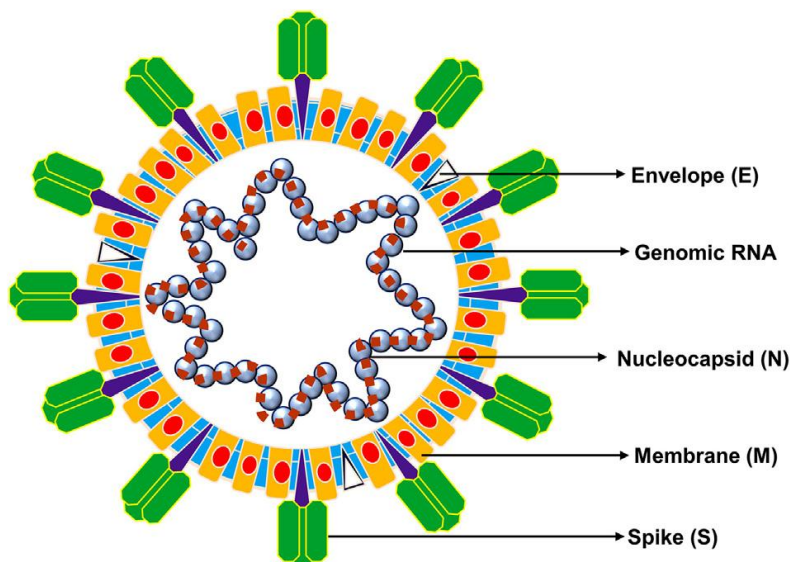


Figura 5. Estrutura do vírus SARS-Cov-2. Fonte: KIRTIPAL et al.,2020

O RNA genômico possui na sua extremidade 5' uma estrutura cap e uma cauda poli(A) na extremidade 3' (**Figura 6**). O genoma de SARS-CoV-2 contém 14 *Open Reading Frames* (ORFs), sendo as principais as ORF1a e ORF1b que ocupam cerca

de dois terços do genoma e são traduzidas para as poliproteínas pp1a e pp1b. Com o auxílio das proteases *papain-like protease* (PL^{pro}) e *3C-like main protease* (3CL^{pro} ou M^{pro}) as poliproteínas são clivadas em 16 proteínas não estruturais (NSPs). O terço restante do genoma e codifica as quatro proteínas estruturais S, M, E e N, e algumas proteínas acessórias incluindo ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF8, ORF9 e ORF10. Também foram identificadas duas regiões não codantes (UTR) nas extremidades 5' e 3' em seu genoma. (ARYA et al.2020; KIRTIPAL et al.2020)

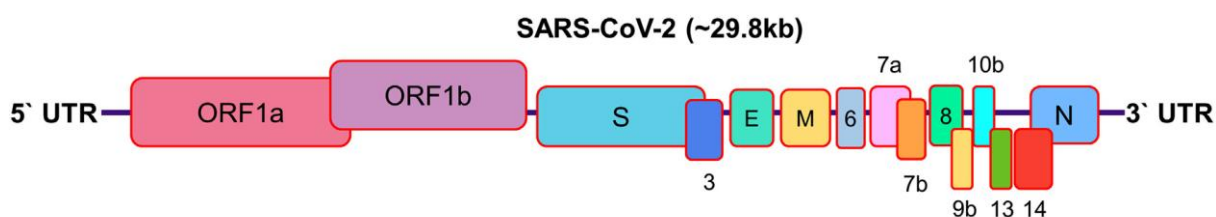


Figura 6. Organização genômica do SARS-CoV-2. Adaptado de KIRTIPAL et al.2020

A proteína estrutural S ou *spike*, forma uma espícula longa que está presente no envelope de todos os coronavírus e possui um formato de bastão, dando um formato de coroa à partícula viral (*Corona* em latim), o que dá origem ao nome de coronavírus. (SANTOS, N. et al.2015; HELMY et al.2020) A proteína S é caracterizada por ser fortemente glicosilada e conter o domínio de ligação do receptor, do inglês *Receptor Binding Domain* (RBD), que medeia a entrada viral nas células hospedeiras. Há dois tipos de proteínas S descobertos nos vírus CoV: a glicoproteína trimérica S (S) e a hemaglutinino-esterase (HE), que forma a espícula mais curta do envelope viral e é encontrada em apenas alguns coronavírus. (KIRTIPAL et al.2020)

A proteína S é dividida em duas subunidades, a S1 e S2, sendo a S1 responsável por fazer a ligação às moléculas aos receptores do hospedeiro na membrana celular, e a S2 facilita a fusão entre a célula do hospedeiro e o vírus e/ou entre células vizinhas, gerando uma fusão célula-célula, o que forma um sincício. (PRUIMBOOM 2021)

1.2. Processo de Infecção Viral

A adesão do vírus se inicia com a interação do vírus com a superfície da célula do hospedeiro via proteína glicosilada S viral, por meio da subunidade S1 que compreende os domínios de ligação ao receptor, do inglês *Receptor Binding Domain* (RBD). O principal receptor do SARS-CoV-2 é a enzima conversora de angiotensina

2 (ACE2). (FEHR & PERLMAN, 2015; SANYAL 2020) Após a interação do RBD-receptor, a proteína S sofre uma clivagem proteolítica na subunidade S1 (equivalente ao domínio N-terminal) e na subunidade S2 (equivalente ao domínio C-terminal) pelas proteases do hospedeiro. Essa proteólise parcial é mediada pela protease transmembrana serina-serina 2 (TMPRSS2), e essa etapa é crucial para o vírus entrar na célula, pois há uma exposição do peptídeo de fusão, que mediará a fusão entre envelope viral e a membrana celular (**Figura 7**). O vírus também possui uma via endocítica por meio da qual ele é clivado pelas catepsinas lisossomais B e L, que promovem uma via alternativa de entrada do vírus. (HEALD-SARGENT; GALLAGHER, 2012; GUSEV et al. 2022)

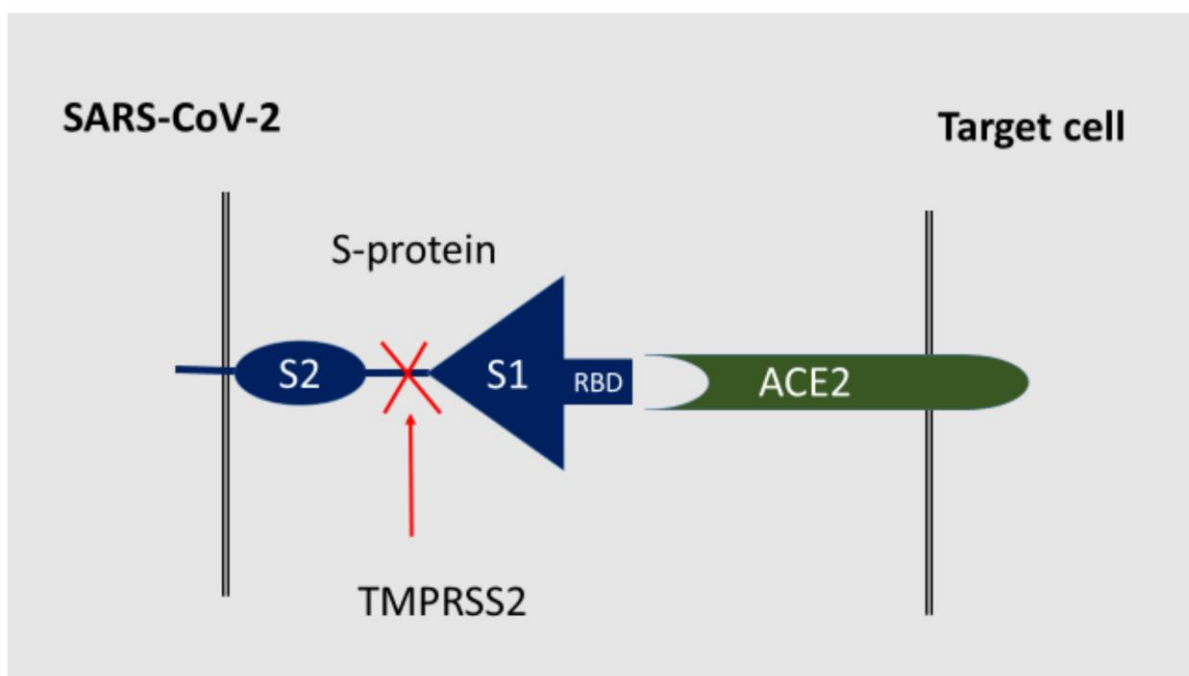


Figura 7. Representação da ligação do receptor RBD com a ACE2. Fonte: GUSEV et al. 2022

Após a entrada do vírus na célula hospedeira, o vírus libera o RNA no citoplasma celular. Como o RNA do vírus possui uma polaridade positiva, a transcrição inicia-se imediatamente pelas ORF1a e ORF1b. A ORF1a é traduzida diante de um posicionamento ribossomal do códon AUG do início e a ORF1b é traduzida a partir de um evento de deslocamento de quadro (do inglês *frameshift*), estas vão codificar para poliproteínas pp1a e pp1b por meio de proteases PL^{pro} e M^{pro} gerando as 16 nsps (nsp1-nsp16). (FEHR; PERLMAN, 2015; DE ALMEIDA, 2020) Dentro dessas NSPs compreendem várias proteínas do complexo de replicação-transcriptase como a RNA-



polimerase RNA dependente (RdRp), o domínio da RNA helicase e a exoribonuclease (ExoN). (FEHR; PERLMAN, 2015)

O complexo de replicação-transcriptase se organiza em vesículas de membrana dupla que devido a reorganização complexa das membranas do retículo endoplasmático. (GAO et al.,2020) Esse complexo possui a RdRp como sua principal proteína replicase-transcriptase para a síntese de novas fitas simples de RNA negativo baseado no RNA viral e na transcrição de RNA subgenômico de sentido negativo que atuam como RNAm, ou seja, essas fitas produzidas de RNA negativas são empregadas como molde para tradução de proteínas estruturais e genes acessórios. (KIRTIPAL et al.,2020)

Esse processo de tradução do RNA viral dentro do retículo endoplasmático das células hospedeiras resulta na formação das proteínas estruturais M, E e S, que posteriormente seguem para o Compartimento Intermediário Reticulo Endoplasmático-Golgi (Ergic) onde a proteína N empacota o RNA genômico recém produzido e molda em um nucleocapsídeo helicoidal. (KIRTIPAL et al.,2020)

A partir do brotamento do nucleocapsídeo a montagem dos vírions é iniciada pela proteína M devido às múltiplas interações proteína-proteína que auxiliam na junção das proteínas N, E e S em partículas virais. Posteriormente, o vírion formado é transportado até a superfície da célula e secretado da célula hospedeira por exocitose. (KIRTIPAL et al.,2020) A **Figura 8** apresenta uma representação esquemática da replicação viral do Coronavírus.



células T CD4+ e CD8+, elas vão causar a liberação de citocinas e quimiocinas. (KIRTIPAL et al.,2020; CHAMS et al.,2020)

A resposta do hospedeiro e eliminação do vírus é altamente dependente da expressão de interferon tipo I (T1IFN), que vai modular as respostas celulares e promover um controle da infecção e eliminação dos patógenos. Juntamente com a expressão de T1IFN através do fator regulador de interferon 3 (IRF3) são expressas citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α e NF κ B. (FELSENSTEIN et al.,2020)

Essa liberação de citocinas, se exagerada, leva ao desenvolvimento das “tempestades de citocinas”. As tempestades de citocinas já foram descritas em outros vírus como o Influenza, dengue e o SARS-CoV. Algumas pesquisas mostraram que alterações nos receptores Toll-Like (TLR) podem desempenhar um papel importante na resposta do hospedeiro a certas infecções, levando a produção dessas tempestades de citocinas. (CHAMS et al.,2020)

Sabe-se que a IL-6 possui o papel fundamental nas tempestades de citocinas com efeitos anti-inflamatórios e pró-inflamatórios. A IL-6 se liga aos receptores transmembrana e aos receptores solúveis que conseqüentemente ocorre uma ativação potencial da resposta inflamatória. (CHAMS et al.,2020)

O SARS-CoV-2 tem como alvo as células epiteliais nas cavidades nasais e orais, mas também eles podem migrar para o restante do trato respiratório como a área alveolar do pulmão. A infecção nas células alveolares tipo II, também conhecidas como pneumócitos tipo II, pode causar apoptose celular. Esses pneumócitos ocupam cerca de 10-15% das células totais do pulmão. (CHAMS et al.,2020)

Os pneumócitos tipo II são responsáveis pela produção do surfactante – uma secreção lipoproteica que mantém a tensão superficial das paredes alveolares. Com o aumento do apoptose celular dessas células resulta o dano alveolar difuso e trocas gasosas deficientes. A deficiência nas trocas gasosas causa um defeito na integridade vascular que gera um aumento da permeabilidade e extravasamento, levando a formação de edemas pulmonares, ativação da coagulação intravascular disseminada (DIC), isquemia pulmonar, insuficiência respiratória hipóxia e danos pulmonares progressivos. A **figura 9** mostra a imunopatologia na COVID-19 (CHAMS et al.,2020;)

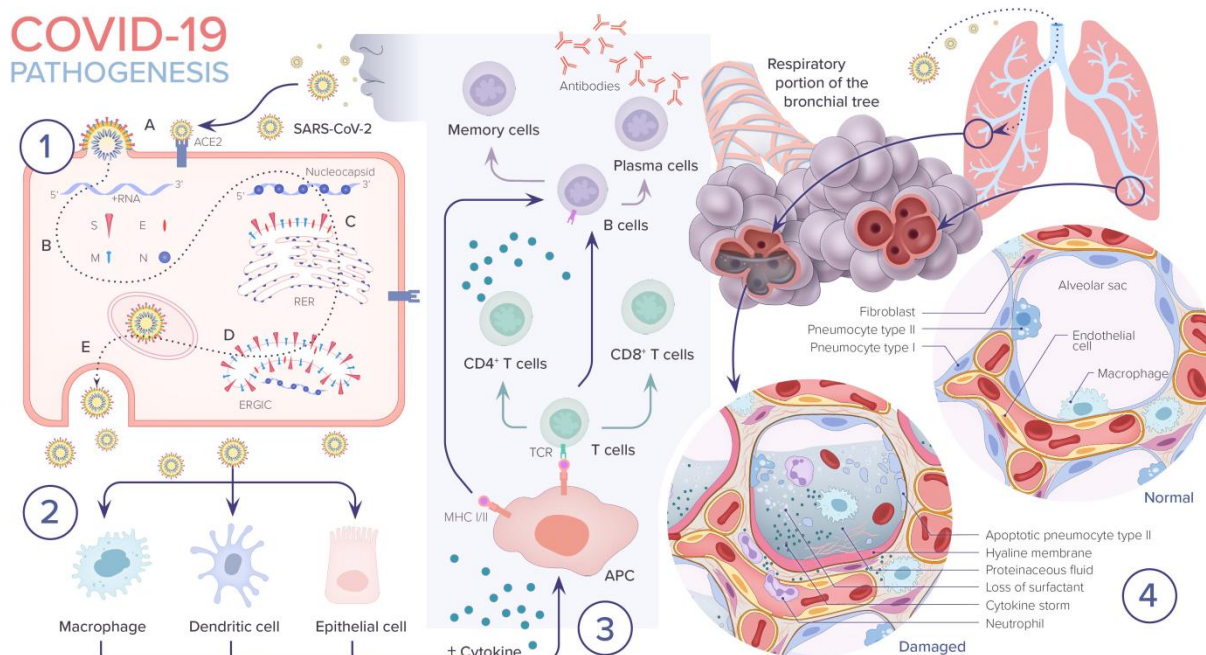


Figura 9.Imunopatologia da COVID-19. Fonte: CHAMS et al.,2020

Além do trato respiratório, o SARS-CoV-2 pode ir para outras partes do corpo como cérebro, trato gastrointestinal, coração, rins e fígado, podendo resultar em hemorragia cerebral, distúrbios neurais, acidente vascular cerebral isquêmico, coma, paralisia e até morte. Indivíduos com comorbidades como diabetes, hipertensão e doenças pulmonares são altamente impactadas, devido a um aumento da expressão do receptor ACE2 na superfície dos órgãos que está envolvida na biossíntese de angiotensinas vasodilatadoras, auxiliando na homeostasia desses órgãos. (SINGH et al.,2020; DE ALMEIDA 2020)

1.4. Alvos Terapêuticos

O COVID-19 apresentou uma rápida disseminação global que levou a busca imediata por tratamento e vacinas para prevenir e tratar a COVID-19. Atualmente existem poucos medicamentos potenciais para o tratamento devido da COVID-19. A doença é tratada com base nos sintomas dos pacientes. Alguns alvos terapêuticos vêm sendo estudados para intervenção terapêutica e obtenção de novos fármacos



antivirais para o tratamento da COVID-19. Esses alvos terapêuticos podem ser proteínas e enzimas virais ou das células do hospedeiro. (DE ALMEIDA 2020)

1.4.1. TMRSS2

A enzima protease transmembranar da serina tipo 2 (TMRSS2) é a principal maneira de entrada do vírus SARS-CoV-2 na célula hospedeira, por isso é um alvo terapêutico importante na descoberta de novos fármacos antivirais. A TMRSS2 é uma proteína presente na célula do hospedeiro que por meio de ativação e clivagem da proteína S do vírus permite a infecção das vias aéreas. (FRASER et al.2022) Ela é expressa na superfície da célula e regula as interações célula-célula e matriz-célula. A TMRSS2 apresenta em maior quantidade em células epiteliais brônquicas, mas também é encontrada no coração, fígado e trato gastrointestinal. (THUNDERS; DELAHUNT,2020; DE ALMEIDA 2020)

Estruturalmente a TMRSS2 é constituída por 492 aminoácidos, possui um domínio transmembranar tipo II, um domínio do receptor LDL classe A (LDLRA) que forma um sítio de ligação com o cálcio, um domínio extracelular rico em cisteína do receptor de eliminação (SRCR) que está envolvido na ligação com outras moléculas da superfície celular ou extracelular e possui um domínio de serina protease da família S1 que cliva em resíduos de arginina e lisina. No domínio de serina protease possui uma tríade catalítica canônica Ser441-His296-Asp345 que tem a função de clivar os receptores da membrana celular, fatores de crescimento, citocinas e componentes da matriz celular. Este domínio sofre autoclivagem, secreção para os epitélios e interage com proteínas da superfície celular, a matriz extracelular e proteínas das células vizinhas. (THUNDERS& DELAHUNT,2020; FRASER et.al,2022)

Uma ligação dissulfídica conecta domínio catalítico com a porção ligada à membrana do peptídeo, porém o domínio protease é liberado no espaço extracelular. A região N-terminal está presente no citoplasma que ao lado dele está um domínio transmembranar hidrofóbico formando um domínio intracelular que pode interagir com componentes do citoesqueleto e moléculas de sinalização. Os domínios LDLRA, SRCR e o domínio protease serina vão estar localizados no espaço extracelular que vão formar uma região de haste que pode mediar as interações proteína-proteína. Na **Figura 10** é possível ver um esquema da TMRSS2(THUNDERS& DELAHUNT,2020)

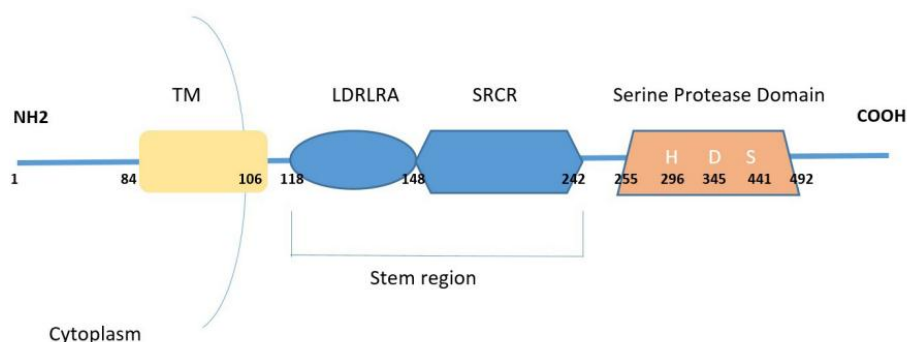


Figura 10. Esquema do peptídeo de 492 aminoácidos da isoforma 2 do TMPRSS2. O domínio TM corresponde à região transmembranar; o LDLRA representa o domínio da classe A do receptor de LDL; e o SRCR é o domínio rico em cisteína, característico dos receptores scavenger. A tríade catalítica, composta por histidina (H), ácido aspártico (D) e serina (S), é fundamental para a atividade proteolítica da enzima. Fonte: THUNDERS& DELAHUNT,2020

1.4.2. M^{pro}

Outro alvo terapêutico visado é a M^{pro} ou 3CL^{pro} que é responsável pelo processamento das poliproteínas que são sintetizadas utilizando o mecanismo de tradução da célula hospedeira que vai gerar um complexo de replicação viral. A M^{pro} é conhecida como protease principal. Ela é uma cisteinil protease e está presente nos betacoronavírus. (BANERJEE, PERERA, TILLEKERATNE,2020)

Estruturalmente ela é composta por três domínios: o domínio I (resíduos 8–101), domínio II (resíduos 102–184) e domínio III (resíduos 201–303). os domínios I e II possuem uma estrutura antiparalela do barril- β e o domínio III contém cinco α -hélices formando um aglomerado globular antiparalelo e um loop longo (resíduos 185–200) que conecta os domínios II e III. A M^{pro} do SARS-CoV-2 possui uma díade catalítica

representada pelos resíduos Cys145 e His41(Figura 11) (BANERJEE, PERERA, TILLEKERATNE,2020; DE ALMEIDA 2020)

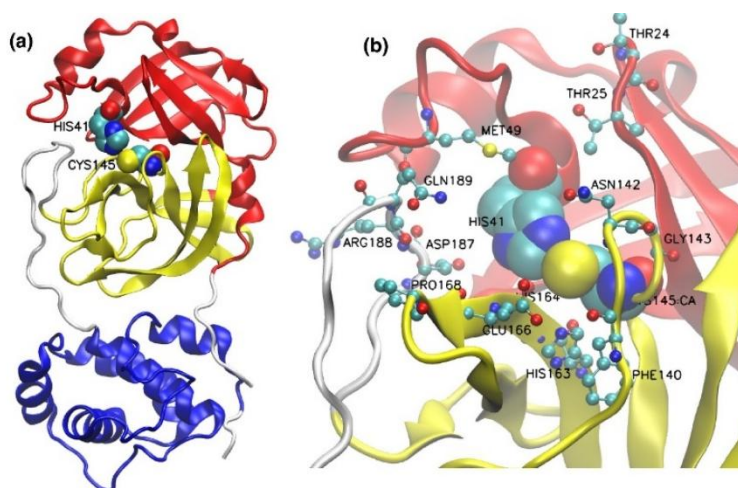


Figura 11.A) Representação da M^{pro} do SARS-CoV-2 onde os domínios I, II e III estão representados em vermelho, amarelo e azul respectivamente. A díade catalítica representadas pelos resíduos Cys145 e His41 em esfera sólida, em branco é possível ver a ligação entre os domínios II e III.B) Representação do sítio ativo da protease que estão envolvidos nas interações com um possível inibidor. Fonte: BANERJEE, PERERA, TILLEKERATNE,2020

A partir da clivagem realizada pela M^{pro} são formadas proteínas virais funcionais essenciais para os processos de replicação viral, como RNA polimerase dependente de RNA, helicase (proteína de ligação a RNA de fita simples), exoribonuclease, endoribonuclease e 2'-O-tribose-metiltransferase. Com isso conclui-se que a inibição da M^{pro} é um alvo terapêutico promissor para a inibição da replicação viral. (FAN et al.,2004; ANAND et al.,2003)

1.4.3. Catepsinas

As catepsinas ganharam grande destaque na pesquisa contra a COVID-19, pois particularmente as catepsinas B e L desempenham um papel importante na COVID-19 ao facilitar a entrada do vírus SARS-CoV-2 nas células humanas. São enzimas pertencentes a família das proteases do tipo “cisteína”, devido à classificação que se dá no resíduo do sítio ativo catalítico. (SCARCELLA et al.2022)



As catepsinas têm papel em vários processos fisiológicos no corpo humano, encontradas preferencialmente no lisossomo, como apoptose, processamentos de antígenos, remodelação da matriz extracelular e respostas imunes MHC classe II. Para ter uma maior atividade, as catepsinas como catepsinas L e B requerem um pH entre 4,5-5,0 equivalente ao pH no lisossomo. (GOMES et al.2020)

A catepsina B (CatB) é cisteína protease lisossômica pertencente à família das papaínas, que tem a função principal a proteólise intracelular, também tem sido implicada na entrada viral e pode ter um papel na ativação de pró-caspases, contribuindo para a apoptose e a inflamação. Estudos realizados em pacientes com câncer infectados pelo vírus SARS-CoV-2 mostraram que a expressão de CatB aumentou consideravelmente associando-a a uma resposta hiper inflamatória, sendo um fator contribuinte para os casos graves de COVID-19 (ALFAROUK et al.2021; BONOTTO et al.2023)

Em contrapartida, estudos mostram que a catepsina L (CatL) desempenha um papel essencial na entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira. A CatL é um candidato promissor como alvo terapêutico que tem a função na infecção por SARS-CoV-2 clivar a proteína spike do SARS-CoV-2 em um ambiente endossomal, facilitando a fusão da membrana viral com a membrana do endossoma e, assim, permitindo a entrada do genoma viral na célula hospedeira. (BONOTTO et al.2023; ZHOU et al.2021)

Devido ao seu papel na entrada viral, as catepsinas têm sido propostas como alvos terapêuticos potenciais. Inibidores de catepsinas, como a cloroquina e a hidroxicloroquina, foram investigados por sua capacidade de bloquear a ativação da proteína spike e, conseqüentemente, a infecção viral. (GOMES et al.2020)

1.5. O atual tratamento para COVID-19

O tratamento para COVID-19 evoluiu ao longo do tempo, com diferentes abordagens dependendo da gravidade da infecção, fatores de risco individuais e variantes do vírus em circulação. Algumas abordagens de tratamento vêm sendo usadas seguindo as Diretrizes da OMS "*Therapeutics and COVID-19: living guideline*". (WHO,2024)

De acordo com a ANVISA, assim como as vacinas, os medicamentos para tratamento da Covid-19 também podem ser aprovados por meio do uso emergencial, além do registro sanitário. (ANVISA,2024)

O tratamento segundo pode diferir com base na gravidade dos pacientes com COVID-19, de acordo com as definições de gravidade da OMS, sendo classificadas como: não- grave, grave e crítico (**Figura 12**). A terapia consiste principalmente de medicamentos antivirais e imunomoduladores. (WHO,2024; ANDREWS et al.2024)

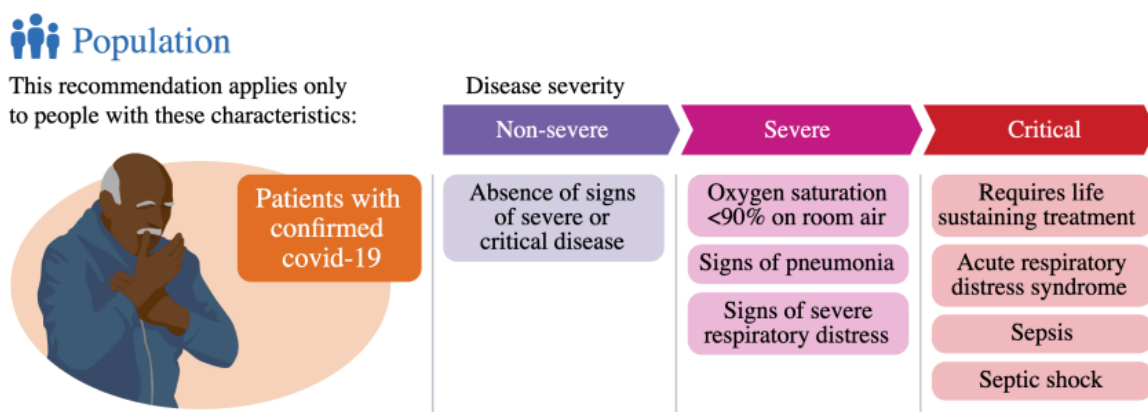


Figura 12. Recomendações de acordo com a gravidade da COVID-19 em pacientes confirmados.
Fonte: *Therapeutics and COVID-19: living guideline* – WHO,2024

1.5.1. Tratamento Antiviral

1.5.1.1. Remdesivir

O remdesivir vem sendo um dos principais antivirais utilizados para o tratamento da COVID-19. Foi descoberto em processos de triagem de agentes com atividade contra vírus de RNA. (INPI, 2020) As recomendações para utilização dessa medicação foram inicialmente publicadas em novembro de 2020 e atualizadas em abril de 2022 no *Therapeutics and COVID-19: living guideline* da WHO. (WHO,2023)

O remdesivir é um pró-fármaco nucleotídeo que apresenta um amplo espectro antiviral com atividade *in vitro* contra diversos vírus RNA, como Ebola, MERS-CoV e SARS-CoV. O remdesivir é um éster resultante de uma condensação do grupo carboxi do e N - [(S) - {[(2R, 3S, 4R, 5R) -5- (4-aminopirrolo [2,1-f] [1,2,4] triazin-7-il) - 5-ciano-3,4-di-hidroxitetrahydro-furan-2-il] metoxi} (fenoxi) fosforil] -L-alanina com o grupo hidróxi de 2- etilbutan-1-ol. Sua estrutura química pode ser observada na **Figura 13** (INPI,2020).

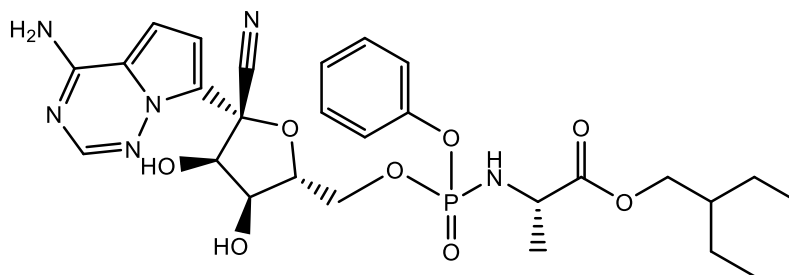


Figura 13. Estrutura química do fármaco Remdesivir.

No Brasil, de acordo com a ANVISA, é indicado para o tratamento da COVID-19 em pacientes adultos e adolescentes (com idade igual ou superior a 12 anos e com peso corporal, de pelo menos, 40kg) com pneumonia que requerem administração suplementar de oxigênio, mas que não estejam sob ventilação mecânica, e pacientes adultos que não requerem suplementação de oxigênio, mas que apresentam risco aumentado para progressão da COVID-19 grave. (ANVISA,2024) Essa medicação é indicada para uso estritamente hospitalar, onde os pacientes são monitorados pela equipe hospitalar.

O remdesivir é metabolizado nas células hospedeiras para formar um nucleosídeo trifosfato farmacologicamente ativo. Esse metabólito formado chamado trifosfato de remdesivir atua como um análogo da adenosina trifostato (ATP) que vai competir com o substrato natural de ATP pela incorporação nas cadeias de RNA nascentes pela RNA polimerase dependente do RNA do SARS-CoV-2, resultando na terminação precoce da cadeia durante a replicação do RNA viral. (GILEAD ,2024)

O trifosfato de remdesivir pode interferir na síntese do RNA viral ao ser incorporado na fita de RNA do vírus. Isso acontece porque a polimerase viral, responsável pela replicação do RNA, pode continuar a leitura mesmo na presença de concentrações mais altas de nucleotídeos. No entanto, quando o nucleotídeo do remdesivir é inserido no RNA viral, ele dificulta a incorporação do nucleotídeo complementar natural, resultando na interrupção da síntese do RNA viral. (GILEAD,2024)

O remdesivir, desenvolvido pela farmacêutica americana Gilead, é administrado por infusão intravenosa durante três dias consecutivos, o que pode ser um obstáculo para pacientes ambulatoriais que desejam evitar a hospitalização. Além disso, sua disponibilidade limitada, aliada ao alto custo de aproximadamente US\$ 3,1 mil (cerca



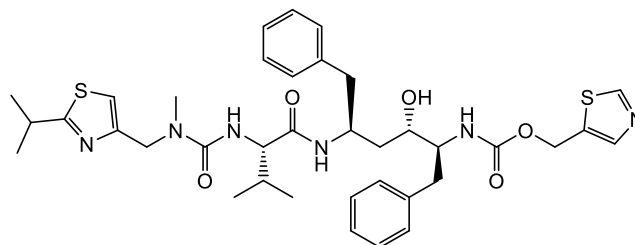
de R\$ 17 mil), impede que todos os pacientes que desejam o tratamento possam acessá-lo, especialmente em regiões com menos recursos. Isso indica que o uso do remdesivir deve ser reservado para pacientes de alto risco. Em países de baixa e média renda, os desafios relacionados ao custo elevado, acessibilidade e viabilidade do remdesivir são particularmente preocupantes. (WHO,2023)

Embora o remdesivir tenha mostrado eficácia em reduzir o tempo de recuperação em pacientes hospitalizados, sua capacidade de reduzir a mortalidade ainda é debatida, e sua eficácia pode variar dependendo do estágio da doença e de comorbidades dos pacientes.

1.5.1.2. Nirmatrelvir-ritonavir (Paxlovid®)

Paxlovid® é um medicamento antiviral desenvolvido pela Pfizer, composto por dois fármacos: nirmatrelvir e ritonavir. Foi autorizado para uso emergencial em diversos países, incluindo o Brasil e a primeira terapia antiviral oral administrada para o tratamento do coronavírus autorizada apenas por prescrição médica. (NIRAJ et al.2022; ANVISA,2022)

Nirmatrelvir é um composto azabicyclohexano (**figura 14**) que inibe a protease M^{pro} do SARS-CoV-2, interrompendo o processamento dos precursores das poliproteínas e, conseqüentemente, a replicação viral. Ele é utilizado em combinação com ritonavir, um potencializador farmacológico que não age diretamente na M^{pro}, mas inibe o metabolismo do nirmatrelvir mediado pela enzima CYP3A. Isso aumenta as concentrações plasmáticas do nirmatrelvir, potencializando sua eficácia antiviral. (ANDREWS et al.2024; PFIZER,2024)



Ritonavir

Figura 14. Estrutura química do fármaco Paxlovid®.

É indicado para o tratamento de COVID-19 leve a moderada em adultos que testaram positivo para o SARS-CoV-2 e que possuem alto risco de progressão para COVID-19 grave, incluindo hospitalização ou óbito. Porém não é autorizado para iniciar o tratamento em pacientes que necessitam de hospitalização devido à COVID-19 grave ou crítica. Além disso, não é aprovado para profilaxia pré-exposição ou pós-exposição para prevenir a COVID-19, e seu uso é limitado a um período máximo de 5 dias. (PFIZER,2024)

Devido à presença do ritonavir, um componente ativo com potente capacidade de inibir a enzima CYP3A4, acabam por limitar o uso do Paxlovid® devido a interação medicamentosa, uma vez que essa isoforma é responsável pela biotransformação de mais de 50% dos medicamentos disponíveis no mercado. A inibição da CYP3A4 pelo ritonavir tem grande relevância clínica, especialmente quando o Paxlovid® é administrado com outros medicamentos que são substratos dessa enzima, bem como com indutores ou inibidores da CYP3A4. Portanto, a prescrição e o manejo do Paxlovid devem ser cuidadosamente realizados para evitar interações medicamentosas adversas. (CARVALHO et al.2023) Outro fator limitante é o acesso que pode ser limitado em algumas regiões devido ao custo e à disponibilidade, especialmente em países de baixa e média renda. (WHO,2023)



1.5.1.3. Molnupiravir

O molnupiravir foi inicialmente desenvolvido como um potencial tratamento para o vírus influenza e alfavírus encefálicos, incluindo os vírus da encefalite equina venezuelana, oriental e ocidental, devido ao seu efeito inibitório significativo em culturas de células. Em 1º de outubro de 2021, foi anunciado que o molnupiravir, um medicamento desenvolvido em parceria pela Merck e Ridgeback Biotherapeutics, pode reduzir significativamente o risco de hospitalização ou morte em pacientes com COVID-19 leve a moderada, atraindo ampla atenção. (SINGH et al.2021; TIAN et al.2022)

O molnupiravir é um pró-fármaco análogo de nucleosídeo, um éster isopropílico e uma cetoxima (figura 15) com atividade antiviral contra o SARS-CoV-2. Após sua metabolização, ele se converte no análogo de nucleosídeo citidina (NHC), que se distribui nas células e é fosforilado para formar o trifosfato de ribonucleosídeo farmacologicamente ativo (NHC-TP). A incorporação do NHC-TP (na forma de NHC-monofosfato [NHC-MP]) no RNA do SARS-CoV-2 pela RNA polimerase viral (nsp12) resulta em um acúmulo de erros no genoma viral, levando à inibição da replicação do vírus. (SINGH et al.2021; MERCK & CO,2023)

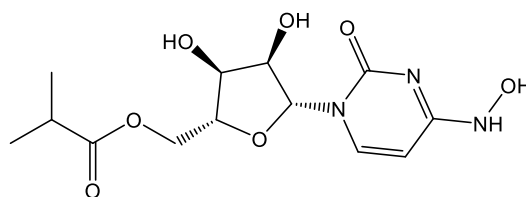


Figura 15. Estrutura química do fármaco Molnupiravir.

De uso domiciliar, é indicado para o tratamento de COVID-19 em adultos que não necessitam de oxigênio suplementar, mas estão em risco aumentado de desenvolver formas graves da doença, especialmente quando as alternativas aprovadas pela Anvisa não são acessíveis ou adequadas clinicamente. Este medicamento é destinado a adultos, disponível apenas com prescrição médica, e não deve ser utilizado durante a gravidez, amamentação ou por mulheres em idade fértil que não estejam utilizando métodos contraceptivos eficazes, uma vez que estudos em animais



mostraram que doses elevadas de molnupiravir podem afetar o desenvolvimento fetal. (ANVISA,2024)

1.5.2. Terapia Imunomoduladora

1.5.2.1. Corticoides (Dexametasona)

Em dezembro de 2022, houve a inclusão de uma nova indicação terapêutica da medicação Decadron Injetável® (Fosfato dissódico de dexametasona), fabricado pela empresa ACHÉ LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS S.A. A nova indicação do medicamento foi baseada nas recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), publicadas no documento "*Therapeutics and COVID-19: living guideline*", além das manifestações de autoridades reguladoras estrangeiras equivalentes. (ANVISA,2022)

A dexametasona (**Figura 16**) é um corticosteroide sintético fluoretado amplamente utilizado no tratamento de diversas condições clínicas, incluindo doenças reumáticas, endócrinas, dermatológicas, oftalmológicas, gastrointestinais e respiratórias, entre outras. Sua ação é predominantemente glicocorticoide, destacando-se por possuir maior efeito anti-inflamatório em comparação com outros derivados do cortisol, além de apresentar uma meia-vida mais prolongada. (MINISTÉRIO DA SAÚDE,2022)

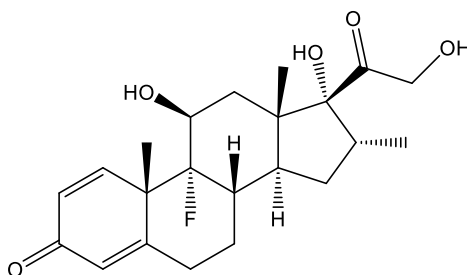


Figura 16. Estrutura química do corticoide dexametasona.

A indicação aprovada é para o tratamento de pacientes com COVID-19 em estado grave (saturação de oxigênio abaixo de 90% em ar ambiente, sinais de pneumonia e desconforto respiratório grave) ou crítico (necessidade de suporte vital, síndrome do desconforto respiratório agudo, sepse ou choque séptico). (ANVISA,2022)

Os relatos na literatura sobre o uso de corticosteroides em infecções graves por coronavírus são variados e controversos. Devido às suas propriedades



imunossupressoras e anti-inflamatórias, esses medicamentos foram prescritos para pacientes com Síndrome Respiratória Aguda Grave e comprometimento pulmonar severo, visando reduzir a inflamação associada à produção excessiva de citocinas, o edema pulmonar e o dano alveolar. Como resultado, busca-se melhorar a hipóxia e diminuir o risco de falência respiratória. (MINISTÉRIO DA SAÚDE,2022)

1.5.2.2. Baricitinibe

O Baricitinibe (**Figura 17**) é o primeiro medicamento incorporado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento da COVID-19. Já possui registro no Brasil para o tratamento de artrite reumatoide ativa moderada a grave e dermatite atópica moderada a grave. Sua liberação para uso contra a Covid-19 foi aprovada pela Anvisa e pelo Ministério da Saúde. (SES MS,2022)

O imunossupressor baricitinibe, cujo mecanismo de ação envolve a inibição seletiva e reversível das enzimas janus quinases (JAKs), em especial JAK 1 e 2, responsáveis pela comunicação das células envolvidas na hematopoese (processo de formação e desenvolvimento das células do sangue), na inflamação e na função imunológica (função de defesa do corpo). (ANVISA,2021). Dado seu mecanismo de ação e seu potencial benefício em pacientes hospitalizados com COVID-19, a *Food and Drug Administration* (FDA) emitiu, em novembro de 2020, uma autorização para uso emergencial do baricitinibe em combinação com remdesivir para o tratamento de pacientes hospitalizados com COVID-19 que necessitam de oxigênio suplementar. No segundo semestre de 2021, a bula do baricitinibe foi atualizada no Brasil, passando a incluir sua indicação para o tratamento de pacientes adultos hospitalizados com COVID-19 que necessitam de oxigênio por máscara, cateter nasal, alto fluxo de oxigênio ou ventilação não invasiva. (CONITEC,2022)

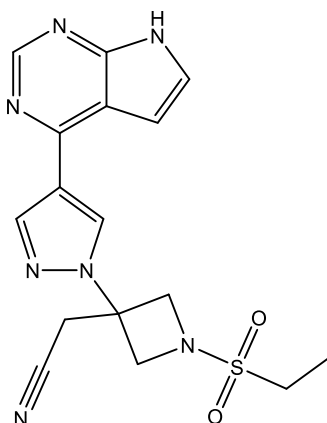


Figura 17. Estrutura química do fármaco baricitinibe.

Para esta medicação o uso é contraindicado em pacientes com hipersensibilidade conhecida ao baricitinibe ou a qualquer componente de sua fórmula, assim como em mulheres grávidas. Além disso, é recomendada a profilaxia para tromboembolismo venoso, exceto quando houver contraindicação. (CONITEC,2022)

No estado do Mato Grosso do Sul, a Comissão Intergestores Bipartite anunciou a incorporação do medicamento ao Sistema Único de Saúde (SUS). Os hospitais selecionados para recebê-lo são: Hospital Regional de Mato Grosso do Sul e Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, ambos em Campo Grande; Hospital Regional Dr. José de Simone Netto, em Ponta Porã; EBSERH Hospital Universitário de Grande Dourados; e Hospital Municipal de Naviraí. (SES MS,2022)

1.5.2.3. Tocilizumabe

O tocilizumabe já era aprovado pela Anvisa para tratar artrite reumatoide, artrite de células gigantes em adultos, artrite idiopática juvenil poliarticular e sistêmica, além da síndrome de liberação de citocinas. É indicado para o tratamento de COVID-19 em adultos hospitalizados que estão recebendo corticosteroides sistêmicos e necessitam de oxigênio suplementar ou ventilação mecânica. (ANVISA,2022)

É um anticorpo monoclonal recombinante da subclasse de imunoglobulina G1, direcionado contra o receptor da interleucina 6 (IL-6R) humana. Na COVID-19, os níveis elevados de IL-6 estão relacionados à gravidade da doença, sugerindo que a desregulação imunológica e a síndrome respiratória aguda grave (SRAG) podem ser influenciadas pela IL-6. (ANVISA,2022)



Entretanto, o uso de tocilizumabe é contraindicado em pacientes com COVID-19 que tenham outras infecções graves ativas simultaneamente. Além disso, vacinas vivas ou atenuadas não devem ser administradas concomitantemente com tocilizumabe, pois a segurança clínica dessa combinação não foi estabelecida. (ROCHE,2024)

1.6. A indústria farmacêutica no combate ao Covid-19

Ao longo dos anos, a humanidade foi afetada por diversas epidemias virais fatais, como as causadas pelo vírus Ebola, vírus Zika, vírus Nipah e, mais recentemente, por outros coronavírus (CoVs), incluindo o SARS-CoV-1 e o MERS-CoV. No entanto, a emergência de saúde pública mais significativa desde a pandemia de gripe espanhola tem sido a atual epidemia de SARS-CoV-2 (KRONENBERGER et al.2023).

A indústria farmacêutica desempenha um papel central na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos, impulsionando avanços biológicos, químicos e biomédicos por meio de suas pesquisas. Essas empresas são entidades comerciais com funções claramente definidas e responsabilidades éticas e legais na promoção da inovação médica (DE LA TORRE; ALBERICIO,2019; LA CAZE,2022).

É conhecido que o processo de desenvolvimento de novos medicamentos, desde os estudos iniciais em humanos até a obtenção da autorização de comercialização, geralmente leva vários anos. O tempo mediano de desenvolvimento é de 7,3 anos. No entanto, a velocidade desse processo depende, em parte, da obtenção das evidências necessárias sobre os benefícios e riscos em populações específicas de pacientes para aprovação comercial (MOHRLE,2024; SEOANE-VAZQUEZ et al.2024).

O custo do desenvolvimento de medicamentos sugere que trazer um novo medicamento ao mercado custa aproximadamente US\$ 880 milhões, mesmo quando são considerados o risco de fracasso e o custo de capital. Essa estimativa, baseada nos custos por paciente dos contratos de ensaios clínicos, assim como em dados sobre o tamanho, duração e probabilidade de sucesso dos ensaios, revela uma grande variação dependendo da área terapêutica (MULLARD,2024). Em junho de 2021, o governo do presidente Joe Biden destinou cerca de US\$ 3 bilhões para



acelerar a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos contra a COVID-19 (ISRAR et al.2024).

A necessidade global urgente de vacinas e tratamentos para COVID-19 mostraram que é possível acelerar os ensaios clínicos de vacinas e medicamentos, mantendo perfis de segurança comparáveis aos dos ensaios tradicionais. Em situações emergenciais, a descoberta de medicamentos e os estudos pré-clínicos, sejam novos ou já iniciados antes do surto, são conduzidos rapidamente, com grandes investimentos financeiros para acelerar o desenvolvimento clínico. Durante esse processo, as fases do desenvolvimento clínico podem ser combinadas ou realizadas de forma sobreposta, e revisões aceleradas (ou contínuas) podem ser solicitadas (JONG et al.2024).

O desenvolvimento de suas vacinas só foi possível graças a uma colaboração rápida e extraordinária com pesquisadores de universidades com grandes nomes como AstraZeneca, BioNTech, Moderna e Pfizer (NATURE,2021). Apesar da disponibilidade de vacinas eficazes, é fundamental continuar desenvolvendo novos tratamentos para a COVID-19. Isso é crucial para reduzir o impacto da doença, especialmente entre os grupos de risco, e diminuir as taxas de hospitalizações e mortes. Diversas abordagens estão sendo utilizadas para alcançar esse objetivo (ISRAR et al.2024).

Uma abordagem que foi muito utilizada foi o reaproveitamento de medicamentos que tem se desenvolvido como uma solução ágil para reutilizar medicamentos já existentes no tratamento de infecções respiratórias. Essa estratégia consiste em empregar medicamentos previamente aprovados para outros usos, oferecendo uma alternativa econômica e rápida para atender a demandas médicas urgentes (ISRAR et al.2024). Um exemplo é o mesilato de Nafamostato, que demonstrou eficácia in vitro contra o vírus SARS-CoV-2. Essa molécula foi capaz de impedir a fusão do envelope viral com a membrana das células hospedeiras ao inibir a proteína TMPRSS2 (HOFFMANN et al.2020).



1.7. Mesilato de Nafamostato

O mesilato de nafamostato é um inibidor de protease de serina sintético muito utilizado no Japão e Coreia para o tratamento de pancreatite e coagulação intravascular disseminada. As doses terapêuticas para o tratamento de cada doença variam, para o tratamento da pancreatite aguda o modo de administração é de 10mg por infusão intravenosa (IV) intermitente durante 2h. Para a coagulação intravascular é realizada uma infusão contínua de 0,06-0,20mg/kg/h. (HERNANDEZ-MITRE et al.,2022)

O nafamostato também é utilizado como anticoagulante para pacientes predispostos a ter hemorragias com terapias de substituição renal continua e circulação extracorpórea. (DRUGBANK,2022)

Farmacologicamente, o nafamostato tem ações anticoagulantes, antifibrinolítico e antiplaquetário. Ele inibe a atividade de serinoproteases geradas na cascata na coagulação e no processo inflamatório, como por exemplo fatores ativados VIIa e XIIa, calicreína, trombina, componentes do sistema complemento e tripsina. Na terapia antifibrinolítica ele inibe os ativadores de plasminogênio tipo tecidual e uroquinase. (HERNANDEZ-MITRE et al.,2022)

Estudos realizados por Yamamoto et al,2020 utilizando células Calu-3 e H3255 derivadas do epitélio pulmonar como célula-alvo mostrou que o nafamostato inibiu a fusão numa faixa de 1-10 μ M. Estudos *in sílico* utilizando o Nafamostato mostraram que o fármaco é capaz de interagir com a tríade catalítica da TMRSS2 ao interagir com os resíduos His 296, Asp 345 e Ser 441.

O grupo guanidino presente na molécula do Nafamostato em estudos *in sílico* mostrou que está localizado próximo ao resíduo da Asp 345, que mostrou uma forte interação eletrostática entre o grupo guanidino e o grupo carboxil da Asp345. O estudo também concluiu que outra parte da molécula faz uma interação covalente com a Ser 441 (**Figura 18**) (FUJIMOTO et al.,2022).

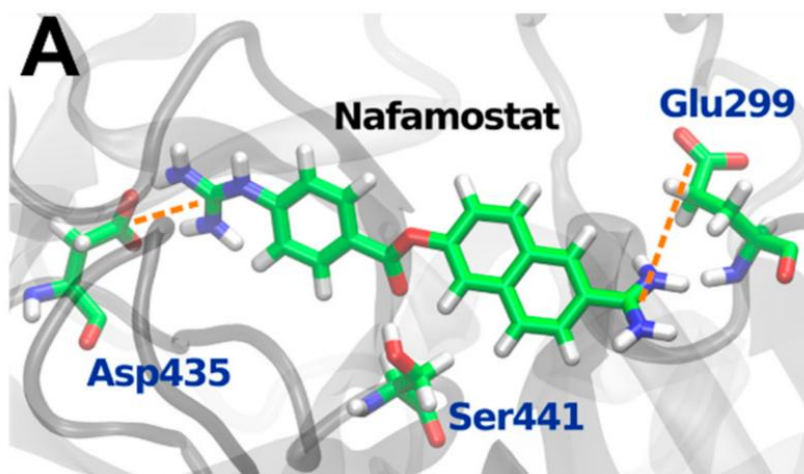


Figura 18. Interações realizadas entre o Nafamostat e a TMRSS2 em estudos in silico. Adaptado de: FUJIMOTO et al., 2022

Em um estudo comparativo entre o nafamostat e o cafamostat, ambos inibidores de serinas proteases, o nafamostat mostrou-se ser 15 vezes mais eficiente na inibição da infecção em estudos utilizando células pulmonares. Com isso, o nafamostat ganhou um maior destaque. (DE ALMEIDA 2020)

1.8. A fitoquímica na COVID-19

As plantas têm sido utilizadas ao longo da história humana para tratar diversas enfermidades e são consideradas fontes inesgotáveis de novos compostos farmacologicamente ativos. Fitoquímicos e seus derivados já foram aprovados para o tratamento de diversas condições não virais (ESPANO et al. 2021). Os produtos naturais (PNs) apresentam características únicas em relação às moléculas sintéticas convencionais, oferecendo tanto benefícios quanto desafios no desenvolvimento de novos fármacos. Eles se destacam pela ampla diversidade de esqueletos químicos e pela complexidade de suas estruturas (ATANASOV et al. 2021)

O uso de plantas medicinais para o tratamento, cura e prevenção de doenças é uma prática milenar, amplamente adotada por diversas comunidades e ainda presente em várias regiões do mundo. Estima-se que cerca de 80% da população global dependa dos remédios tradicionais para atender às suas necessidades de saúde (GADELHA et al. 2013; SRUTHI et al. 2023). Nesse contexto, as intervenções fitoterápicas surgem como uma alternativa viável para o tratamento da COVID-19,



especialmente em países subdesenvolvidos onde a falta de recursos médicos pode dificultar o acesso às estratégias de tratamento amplamente aceitas internacionalmente (SRUTHI et al.2023).

Apesar de suas vantagens, os PNs também apresentam desafios no processo de descoberta de novos fármacos, como dificuldades técnicas relacionadas à triagem, isolamento, caracterização e otimização. Esses obstáculos levaram a uma redução no interesse da indústria farmacêutica por esses compostos a partir da década de 1990. No entanto, nos últimos anos, avanços tecnológicos e científicos — como ferramentas analíticas mais avançadas, estratégias inovadoras de mineração e engenharia genômica, além de progressos na cultura microbiana — têm superado essas barreiras e criado oportunidades. Como resultado, o interesse pelos produtos naturais como potenciais fármacos têm sido revitalizado, especialmente no combate à resistência antimicrobiana (ATANASOV et al. 2021)

A triagem virtual de compostos bioativos é uma ferramenta valiosa na pesquisa de produtos naturais, pois permite reduzir o tempo necessário para a análise fitoquímica de diversos extratos. Essa abordagem, conhecida como análise *in silico* por *docking* molecular, facilita a identificação de compostos com potencial terapêutico. Diante da busca por um tratamento eficaz contra a COVID-19 que possa ser produzido rapidamente e amplamente distribuído, os produtos naturais surgem como uma solução promissora. Eles são amplamente utilizados na indústria farmacêutica devido à sua bioatividade, incluindo propriedades antivirais, além de apresentarem, em geral, baixa toxicidade (ANTONIO et al.2020).

Uma variedade de bioprodutos antivirais já foi identificada por sua eficácia contra diversos vírus, incluindo Dengue, Coronavírus, Enterovírus, Hepatite B, Vírus Influenza e HIV (LIANG-TZUNG et al.2014). Entre os metabólitos secundários testados, destacam-se os flavonoides, ácidos graxos, taninos, terpenos e alcaloides. A diversidade dessas classes químicas está diretamente relacionada aos diferentes mecanismos de ação que cada uma delas emprega na inibição dos vírus (ANTONIO et al.2020)



1.9. Capsaicinas

As capsaicinas são protoalcaloides encontrados na pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) (**Figura 19**). Comercialmente a capsaicina pode ser sintetizada pela reação com a vanilamina ou isolado da paprica, pode ser obtido também por meio de moagem de frutos secos da pimenta malagueta. (SHARMA et al.,2013)

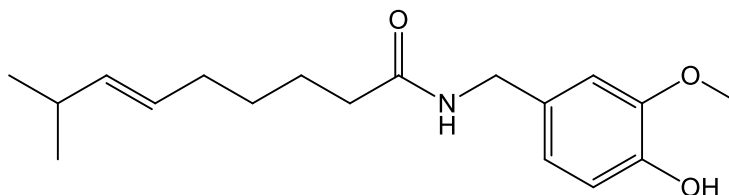


Figura 19. Estrutura química das capsaicinas.

As capsaicinas têm sido agentes farmacológicos abrangentes por sua utilização na clínica que vem sendo bastante explorada. O receptor para as capsaicinas é o TRPV1 conhecido como potencial receptor transitório vaniloide 1. Ele é frequentemente encontrado em neurônios sensoriais e interagem para modular sua função, também são encontrados em neuropeptídeos e possuem um limiar baixo para alguns mediadores inflamatórios como bradicinina, histaminas e eicosanoides. Podem ser expressos em células neuronais, mas também no músculo liso vascular, monócitos, linfócitos, queratinócitos e células epiteliais e endotélio. (SHARMA et al.,2013; BOUSQUET et al.,2021; LIVEIRO et al.,2021)

As relações entre estrutura e atividade (SAR) dos agonistas da capsaicina, substâncias que se ligam a receptores celulares e desencadeiam respostas biológicas, foram analisadas dividindo a molécula em três regiões distintas: anel aromático, ligação amida e cadeia lateral hidrofóbica (Figura 12). Estudos indicam que os substituintes nas posições 3 e 4 do anel aromático são fundamentais para a atividade agonista, com destaque para o grupo fenólico 4-OH, cujas propriedades de doação e aceitação de ligações de hidrogênio desempenham um papel crucial nessa atividade. (REYES-ESCOGIDO et al.2011)

Os capsaicinoides, que somam mais de vinte compostos conhecidos, são amidas resultantes da condensação entre vanililamina e ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia. As variações naturais desses compostos dependem do número de átomos de carbono na cadeia lateral (R) e da presença ou ausência de

insaturações (**Figura 20**). A biossíntese dos capsaicinóides ocorre naturalmente na placenta dos frutos de pimenta, por meio de uma condensação enzimática entre a vanililamina e cadeias de ácidos graxos de diferentes tamanhos, que são posteriormente alongadas por uma sintase de ácidos graxos (REYES-ESCOGIDO et al.2011).

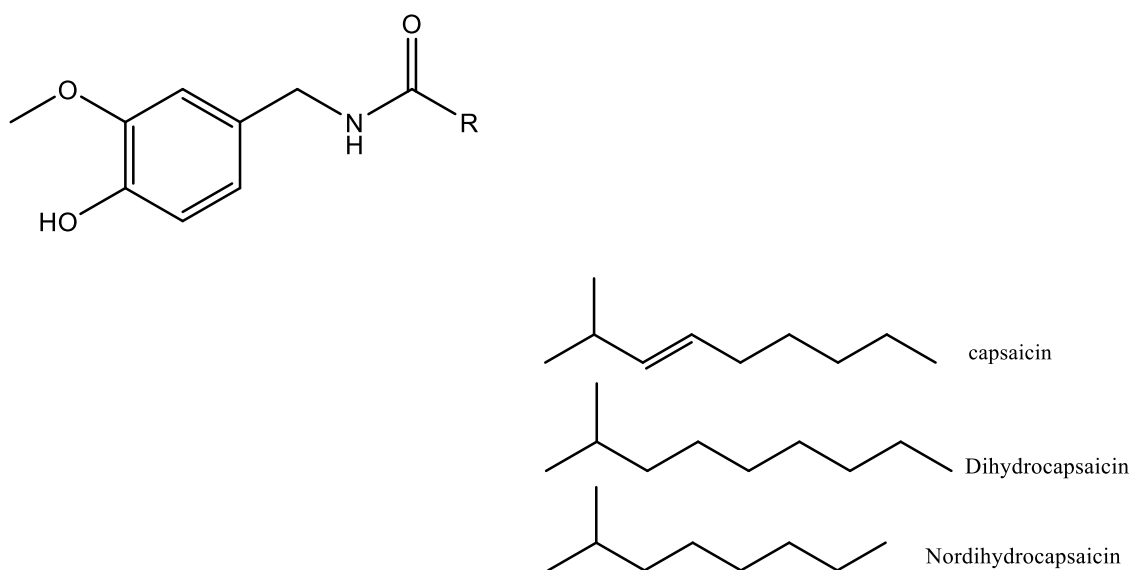


Figura 20. Estrutura química de diferentes capsaicinóides e seus análogos.

Estudos *in silico* com a capsaicina mostraram que ela possui uma grande interação com a M^{pro}, fazendo interações de hidrogênio com o resíduo Asp 153 e interações com a Lys 102. Outros estudos mostraram que a capsaicina promove mudanças estruturais na M^{pro} induzindo dobramento da enzima. (GONZALEZ-PAZ et al.,2020)

Um estudo realizado por Nag et al,2021 testou vários compostos naturais em experimentos *in silico* como potenciais inibidores da proteína S, e mostrou que a capsaicina não seriam bons inibidores diretos da proteína S, o que reforça sua interação com a M^{pro}.

De acordo com registros de Bal et al. 2022, o acoplamento molecular da RdRp, uma enzima chave na replicação viral, mostrou uma ligação à capsaicina com uma energia livre de -7,3 kcal/mol. Esse valor é comparável ao do fármaco remdesivir, cuja energia livre de ligação é de -9,0 kcal/mol. Esses resultados indicam que a capsaicina



pode ser um alvo promissor na busca por novos agentes terapêuticos para a COVID-19. Assim, os estudos sugerem que a capsaicina, por si só, apresenta um potencial antiprotease suficiente para inibir a replicação do vírus SARS-CoV-2.

1.10. Flavonoides

Atualmente, centenas de medicamentos modernos são desenvolvidos a partir de compostos ativos extraídos de plantas. Os flavonoides, também conhecidos como polifenóis, representam o maior grupo de metabólitos secundários, sendo encontrados em vegetais, frutas, sementes, nozes, especiarias, caules, além do vinho tinto e do chá (ZAKARYAN et al.2017).

Quimicamente, os flavonoides possuem uma estrutura composta por quinze átomos de carbono, formada por dois anéis benzênicos (A e B, como ilustrado na **Figura 21**) conectados por um anel heterocíclico pirano (C) (KUMAR & PANDEY,2013). As diferentes classes de flavonoides variam em relação ao nível de oxidação e ao padrão de substituição do anel pirano. Por outro lado, os compostos individuais dentro de cada classe se diferenciam pelo padrão de substituição nos anéis benzênicos (ZAKARYAN et al.2017)

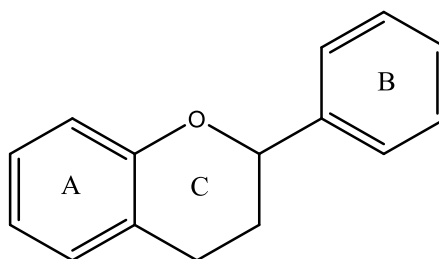


Figura 21.Estrutura do núcleo químico dos flavonoides (C6–C3–C6)

Nos últimos anos, o interesse pelo potencial terapêutico das plantas medicinais tem crescido significativamente, principalmente devido à presença de compostos fenólicos, em especial os flavonoides. Esses compostos possuem amplas propriedades biológicas que contribuem para a promoção da saúde humana e a redução do risco de diversas doenças. Eles apresentam uma variedade de efeitos bioquímicos e antioxidantes, estando associados à prevenção e ao tratamento de enfermidades como câncer, Alzheimer e aterosclerose. Esses benefícios estão relacionados às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênicas



e anticancerígenas, além da capacidade de regular funções enzimáticas essenciais nas células. Além disso, é interessante notar que alguns flavonoides também demonstram atividade antiviral. (KUMAR & PANDEY,2013; JO et al.2019)

Os flavonoides podem ser obtidos principalmente por meio de síntese química, biossíntese ou extração de plantas. Esses compostos têm demonstrado grande potencial na inibição do SARS-CoV-2 e podem ser explorados como possíveis opções terapêuticas para a COVID-19. Por exemplo, o EGCG (*Epigallocatechin gallate*) mostrou-se capaz de impedir a ligação do vírus ao receptor ACE2. Além disso, flavonoides como baicaleína, luteolina e quercetina têm a capacidade de inibir enzimas essenciais para a replicação viral, incluindo a protease 3CL^{pro}, a protease PL^{pro} e a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). Outros flavonoides, como kaempferol, hesperidina e isorhamnetina, também demonstraram atividade inibitória contra o SARS-CoV-2, reforçando seu potencial no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (YANG et al.2023).

Não há dúvida de que os flavonóides têm grande potencial no tratamento da COVID-19. No entanto, grande parte das pesquisas atuais ainda se encontra em fase inicial e teórica. Portanto, são necessários mais estudos para avaliar de forma abrangente a eficácia e a segurança desses compostos no combate ao SARS-CoV-2. (YANG et al.2023)



2. Referências Bibliográficas

ACTEMRA: solução injetável. **Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.** 2024. 61p. Disponível em: [Actemra - bula para profissionais da saúde \(ambas as formulações\)](#). Acesso em: 04 set. 2024

ALFAROUK, K. O. et al. Pathogenesis and Management of COVID-19. **Journal of Xenobiotics**, v. 11, n. 2, p. 77–93, 2021.

ANAND, K. et al. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. **Science**, v. 300, n. 5626, p. 1763-1767, 2003.

ANDREWS, H. S.; HERMAN, J. D.; GANDHI, R. T. Treatments for COVID-19. **Annual Review of Medicine**, v. 75, p. 145-157, jan. 2024.

ANTONIO, Ananda; WIEDEMANN, Larissa; VEIGA, Valdir. Natural products' role against COVID-19. **RSC Advances**, v. 10, p. 23379-23393, 2020.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Anvisa aprova o uso da dexametasona injetável para a Covid-19.2022** Disponível em:< Anvisa aprova o uso da dexametasona injetável para a Covid-19 — Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa> acesso em: 31 ago. 2024

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Baricitinibe**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/baricitinibe>. Acesso em: 2 set. 2024.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Medicamentos aprovados para tratamento da Covid-19**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/medicamentos-aprovados>. Acesso em: 6 nov. 2024.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Molnupiravir**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/molnupiravir>. Acesso em: 29 ago. 2024.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Paxlovid (nirmatrelvir + ritonavir)**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/paxlovid>. Acesso em: 28 ago. 2024.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Remdesivir**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/remdesivir>. Acesso em: 24 ago. 2024.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Tocilizumabe**. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/tocilizumabe>. Acesso em: 3 set. 2024.

ARYA, R. et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 2, 2021.



ASSELAH, T. et al. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. **Journal of Hepatology**, v. 74, n. 1, p. 168–184, 2021.

ATANASOV, A. G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, p. 200–216, 2021.

BAL, S. et al. Biomedical and Antioxidant Potentialities in Chilli: Perspectives and Way Forward. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6380, 2022.

BANERJEE, R.; PERERA, L.; TILLEKERATNE, L. M. V. Potential SARS-CoV-2 main protease inhibitors. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 3, p. 804–816, 2021.

BONOTTO, Rafaela Milan et al. Cathepsin inhibitors nitroxoline and its derivatives inhibit SARS-CoV-2 infection. **Antiviral Research**, v. 216, 2023.

BORGES, A. A. et al. SARS-CoV-2: origem, estrutura, morfogênese e transmissão. In: BARRAL-NETTO, M. et al. (org.). **Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais**. Salvador: Edufba, v. 1, 2020.

BOUSQUET, J. et al. Potential Interplay between Nrf2, TRPA1, and TRPV1 in Nutrients for the Control of COVID-19. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 182, n. 4, p. 324–338, 2021.

CARVALHO, A. A.; LIMA, K. S.; MESQUITA, A. O. D. Paxlovid: development, pharmacology and implications for pharmaceutical practice. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 5, p. e18112541699, 2023.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. COVID-19 Treatments and Medications. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/your-health/treatments-for-severe-illness.html>. Acesso em: 6 nov. 2024.

CHAMS, N. et al. COVID-19: A Multidisciplinary Review. **Frontiers in Public Health**, v. 8, 2020.

CHAN, J. et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerg. Microbes Infect.**, v. 9, n. 1, p. 221-236, 2020.

CHENG, V. C. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 4, p. 660-694, 2007.

CONITEC. **Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde**. Baricitinibe para tratamento de pacientes adultos com Covid-19 hospitalizados que necessitam de oxigênio por máscara ou cateter nasal, ou que necessitam de alto fluxo de oxigênio ou ventilação não invasiva. 2022. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/relatorios/20220331_relatorio_723_baricitinibe_covid-19.pdf. Acesso em: 3 set. 2024.

CORMAN, V. M. et al. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 100, p. 163-188, 2018.



COVID has shown the power of science-industry collaboration. **Nature**, v. 594, n. 7863, p. 302, jun. 2021.

DE ALMEIDA, J. O. COVID-19: Physiopathology and Targets for Therapeutic Intervention. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 6, 2020.

DE JONG, H. K. et al. Factors associated with acceleration of clinical development for infectious diseases: a cross-sectional analysis of 10-year EMA registration data. **The Lancet Regional Health – Europe**, v. 43, 2024.

DE LA TORRE, B. G.; ALBERCIO, F. The pharmaceutical industry in 2018. An analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. E809, 2019.

DRUGBANK. **Nafamostat**. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB12598>. Acesso em: 6 nov. 2022.

ESPAÑO, E. et al. Phytochemicals for the treatment of COVID-19. **Journal of Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 959-977, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12275-021-1467-z>. Acesso em: 6 nov. 2024.

FAN, K. et al. Biosynthesis, purification, and substrate specificity of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3C-like proteinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 3, p. 1637-1642, 2004.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1282, p. 1-23, 2015.

FELSENSTEIN, S. et al. COVID-19: Immunology and treatment options. **Clinical Immunology**, v. 215, 2020.

FRASER, B. J. et al. Structure and activity of human TMPRSS2 protease implicated in SARS-CoV-2 activation. **Nature Chemical Biology**, v. 18, p. 963–971, 2022.

FUJIMOTO, K. J. et al. In silico analysis and synthesis of nafamostat derivatives and evaluation of their anti-SARS-CoV-2 activity. **Viruses**, v. 14, n. 2, 2022.

GAO, Y. et al. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. **Science**, v. 368, n. 6492, p. 779-782, 2020.

GADELHA, C. S. et al. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 208–212, 2013.

GOMES, C. P. et al. Cathepsin L in COVID-19: From Pharmacological Evidences to Genetics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 589505, 2020.

GONZALEZ-PAZ, L. A. et al. Theoretical Molecular Docking Study of the Structural Disruption of the Viral 3CL-Protease of COVID19 Induced by Binding of Capsaicin, Piperine and Curcumin Part 1: A Comparative Study with Chloroquine and Hydrochloroquine Two Antimalaric Drugs. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5179, 2020.



GUSEV, E.; SARAPULTSEV, A.; SOLOMATINA, L.; CHERESHNEV, V. Sars-Cov-2-specific immune response and the pathogenesis of COVID-19. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, 2022.

HEALD-SARGENT, T.; GALLAGHER, T. Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. **Viruses**, v. 4, n. 4, p. 557-580, 2012.

HELFRICH, Y. R. et al. Topical nafamostat mesylate in the treatment of atopic dermatitis: a phase IIa randomized, double-blind, vehicle-controlled study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 72, n. 1, p. 134-141, 2015.

HELMS, J. et al. Nafamostat mesylate for the treatment of COVID-19 in critically ill patients: A structured summary of a study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 21, n. 1, p. 862, 2020.

HELMY, Y. A. et al. The COVID-19 pandemic: A comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 1225, 2020.

HERNÁNDEZ-MITRE, M. P. et al. Nafamostat Mesylate for Treatment of COVID-19 in Hospitalised Patients: A Structured, Narrative Review. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 61, n. 10, p. 1331–1343, 2022.

HOFFMANN, M. et al. Nafamostat Mesylate Blocks Activation of SARS-CoV-2: New Treatment Option for COVID-19. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 10, p. e00754-20, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL - INPI. REMDESIVIR: Mecanismo de ação, ensaios clínicos e pedidos de patentes depositados no INPI. Disponível em: <Estudo3_Remdesivir.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2024.

ISRAR, J.; ALAM, S.; KUMAR, A. Drug repurposing for respiratory infections. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 207, p. 207-230, 2024.

JO, S. et al. Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 145-151, 2020..

KAUSHIK, S. et al. The Indian perspective of COVID-19 outbreak. **Virus Disease**, v. 31, n. 2, p. 146–153, 2020.

KESSLER, A.; KALSKE, A. Plant Secondary Metabolite Diversity and Species Interactions. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 49, p. 115-139, 2018.

KIRTIPAL, N. et al. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, 2020.

KRONENBERGER, Thales; LAUFER, Stefan A.; PILLAIYAR, Thanigaimalai. COVID-19 therapeutics: Small-molecule drug development targeting SARS-CoV-2 main protease. **Drug Discovery Today**, v. 28, n. 6, 2023.



KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 162750, 2013.

LA CAZE, A. Determining the obligations of the pharmaceutical industry during the pandemic. **Anaesthesia, Critical Care & Pain Medicine**, v. 41, n. 1, p. 100988, 2022.

LAGEVRIO: cápsulas. **Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda.**, 15 p., 2024. Disponível em: https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/l/lagevrio/lagevrio_pro.pdf. Acesso em: 29 ago. 2024.

LIN, L. T.; HSU, W. C.; LIN, C. C. Antiviral natural products and herbal medicines. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 24-35, jan. 2014

LIVIERO, F. et al. Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1: Potential Role in Infection, Susceptibility, Symptoms and Treatment of COVID-19. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 2021.

MACALINO, S. J. Y. et al. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, p. 1686–1701, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dexametasona para tratamento de pacientes com COVID-19**. 2022. Disponível em: <nota-tecnica-dexametasona.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2024.

MÖHRLE, J. J. How long does it take to develop a new drug? **The Lancet Regional Health - Europe**, v. 43, p. 100998, 2024.

MULLARD, A. Per-patient approach to calculating drug development costs yields lower estimate. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 23, n. 9, p. 650, 2024.

NAG, A.; PAUL, S.; BANERJEE, R.; KUNDU, R. In silico study of some selective phytochemicals against a hypothetical SARS-CoV-2 spike RBD using molecular docking tools. **Computers in Biology and Medicine**, v. 137, 2021.

NHS. **National Health Service UK**. Treatments for coronavirus (COVID-19). Disponível em: <https://www.nhs.uk/conditions/coronavirus-covid-19/self-care-and-treatments-for-coronavirus/treatments-for-coronavirus/>. Acesso em: 6 nov. 2024.

NIRAJ, N. et al. Paxlovid: A promising drug for the challenging treatment of SARS-COV-2 in the pandemic era. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 452-458, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.4103/ijp.ijp_291_22. Acesso em: 6 nov. 2024.

OCHANI, R. K. et al. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. **Le Infezioni in Medicina**, v. 20, 2021.

PAXLOVID: comprimido. **Pfizer Brasil Ltda.**, 30 p., 2024. Disponível em: <https://www.pfizer.com.br/profissionais-de-saude/paxlovid>. Acesso em: 28 ago. 2024.

Peterlin-Mašič, L.; Kikelj, D. **Tetrahedron**, v. 57, p. 7073-7105, 2001.



PRUIMBOOM, L. SARS-CoV 2; Possible alternative virus receptors and pathophysiological determinants. **Medical Hypotheses**, v. 146, 2021.

RAMSAY, R. R. et al. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. **Clinical and Translational Medicine**, v. 7, n. 1, p. 3, 2018.

REYES-ESCOGIDO, M. de L. et al. Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1253-1270, 2011.

SANTOS, N. et al. **Virologia Humana**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SANYAL, S. How SARS-CoV-2 (COVID-19) spreads within infected hosts - What we know so far. **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 4, n. 4, p. 383–390, 2020.

SCARCELLA, M. et al. The Key Role of Lysosomal Protease Cathepsins in Viral Infections. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9089, 2022.

SES MS. **Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul**. SES autoriza retirada de primeiro medicamento usado em hospitais para tratamento de Covid-19. 2022. Disponível em: <https://www.saude.ms.gov.br/ses-autoriza-retirada-de-primeiro-medicamento-usado-em-hospitais-para-tratamento-de-covid-19/>. Acesso em: 2 set. 2024.

SEOANE-VÁZQUEZ, E.; RODRIGUEZ-MONGUIO, R.; POWERS, J. H. Analysis of US Food and Drug Administration new drug and biologic approvals, regulatory pathways, and review times, 1980–2022. **Scientific Reports**, v. 14, p. 3325, 2024.

SHARMA, S. K.; VIJ, A. S.; SHARMA, M. Mechanisms and clinical uses of capsaicin. **European Journal of Pharmacology**, v. 720, n. 1–3, p. 55–62, 2013.

SINGH, A. K. et al. Molnupiravir in COVID-19: A systematic review of literature. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 15, n. 6, p. 102329, 2021.

SINGH, S. P. et al. Microstructure, pathophysiology, and potential therapeutics of COVID-19: A comprehensive review. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 1, p. 275-299, 2021.

SRUTHI, D. et al. Curative Potential of High-Value Phytochemicals on COVID-19 Infection. **Biochemistry (Moscow)**, v. 88, n. 1, p. 64-72, 2023.

THUNDERS, M.; DELAHUNT, B. Gene of the month: TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2). **Journal of Clinical Pathology**, v. 73, n. 12, p. 773-776, 2020.

TIAN, L. et al. Molnupiravir and Its Antiviral Activity Against COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 855496, 2022.

VEKLURY: pó liofilizado para solução injetável. **Gilead Sciences Farmacêutica do Brasil Ltda.**, 24 p., 2024. Disponível em: https://www.gilead.com/-/media/files/pdfs/medicines/veklury/veklury_en_2.pdf. Acesso em: 24 ago. 2024.



Felsenstein, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155–170, 2021.

WHO. **World Health Organization**. Therapeutics and COVID-19: Living guideline. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/therapeutics-and-covid-19-living-guideline>. Acesso em: 18 ago. 2024.

WHO. **World Health Organization**. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 21 jul. 2024.

YAMAMOTO, M. et al. The anticoagulant nafamostat potently inhibits SARS-CoV-2 S protein-mediated fusion in a cell fusion assay system and viral infection in vitro in a cell-type-dependent manner. **Viruses**, v. 12, n. 6, 2020.

YAMAMOTO, M. et al. Identification of nafamostat as a potent inhibitor of Middle East respiratory syndrome Coronavirus S protein-mediated membrane fusion using the split-protein-based cell-cell fusion assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6532–6539, 2016.

YANG, J. Y. et al. A Comprehensive Review of Natural Flavonoids with Anti-SARS-CoV-2 Activity. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2735, 2023.

ZAKARYAN, H. et al. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. **Archives of Virology**, v. 162, n. 9, p. 2539-2551, 2017

ZHANG, W.-X.; XU, L.; XI, Z. Recent development of synthetic preparation methods for guanidines via transition metal catalysis. **Chemical Communications**, v. 51, n. 2, p. 254–265, 2015.

ZHOU, Y. W. et al. Therapeutic targets and interventional strategies in COVID-19: mechanisms and clinical studies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, p. 317, 2021



CAPÍTULO II: Síntese de análogos de capsaicinas derivadas do mesilato de nafamostato



Resumo

Em dezembro de 2019, emergiu em Wuhan, China, uma nova doença respiratória, COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, vírus da família *Coronaviridae*, que apresenta semelhanças genômicas com o SARS-CoV. A infecção ocorre através da interação da proteína spike com o receptor RBD e a enzima TMPRSS2 na célula hospedeira. Apesar de alguns medicamentos para casos leves a moderados terem sido autorizados pela FDA, as terapias atuais apresentam limitações significativas. Estudos recentes demonstraram que o mesilato de nafamostatato inibe a fusão celular dependente de TMPRSS2, e que as capsaicinas possuem forte afinidade pela M^{pro} do SARS-CoV-2. Investigações *in silico* conduzidas pela equipe indicam o potencial das moléculas-alvo propostas como inibidores tanto da M^{pro} quanto da TMPRSS2. Nesse contexto, o presente trabalho visa a síntese de análogos de capsaicinas derivados do mesilato de nafamostatato, utilizando rotas sintéticas simples, sustentáveis e escalonáveis. Embora desafios tenham sido enfrentados, como a formação indesejada de N-vanililformamida, a introdução do grupo guanidino demonstrou resultados promissores.

Palavras-chave: COVID-19, mesilato de nafamostatato, capsaicina, SARS-CoV-2.



Abstract

In December 2019, a new respiratory disease, COVID-19, emerged in Wuhan, China, caused by SARS-CoV-2, a virus belonging to the *Coronaviridae* family that exhibits genomic similarities to SARS-CoV. Infection occurs through the interaction of the spike protein with the RBD receptor and the TMPRSS2 enzyme on the host cell. Although some drugs for mild to moderate cases have been authorized by the FDA, current therapies present significant limitations. Recent studies have demonstrated that nafamostat mesylate inhibits TMPRSS2-dependent cell fusion and that capsaicinoids exhibit strong affinity for the SARS-CoV-2 M^{pro}. *In silico* investigations conducted by our team indicate the potential of the proposed target molecules as inhibitors of both M^{pro} and TMPRSS2. In this context, the present work aims to synthesize capsaicinoid analogs derived from nafamostat mesylate using simple, sustainable, and scalable synthetic routes. Although challenges were encountered, such as the undesired formation of N-vanililformamide, the introduction of the guanidino group demonstrated promising results.

Keywords: COVID-19, nafamostat mesylate, capsaicin, SARS-CoV-2.



1. Introdução

Em dezembro de 2019, uma nova doença respiratória infecciosa, denominada COVID-19 e causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, surgiu em Wuhan, na China (HUANG et al., 2020; WANG et al., 2020; ZHU et al., 2020; ZHOU et al., 2021). Diante da rápida disseminação do vírus, impulsionada pelas viagens internacionais, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 como pandemia em 11 de março de 2020.

O SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae* e é genomicamente homólogo o SARS-CoV. Os coronavírus são vírus de RNA de fita simples positiva (+ssRNA), envelopados, esféricos e de grande tamanho, variando entre 100 e 160 nm (ASSELAH et al., 2020; KAUSHIK et al., 2020). Esse vírus possui quatro proteínas estruturais: spike (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N) (ROMANO et al., 2020). A proteína S facilita a entrada do vírus na célula ao se ligar ao receptor RBD (Receptor Binding Domain) e promover a fusão celular, enquanto a proteína N regula o processo de replicação viral (UZUNIAN, 2020).

A adesão do SARS-CoV-2 à célula ocorre por meio da ligação da proteína spike (S) ao receptor ACE2 (enzima conversora de angiotensina), presente na membrana plasmática. Durante esse processo, a proteína S é clivada em duas subunidades, S1 e S2, por uma protease chamada furina. Em seguida, a subunidade S2 sofre uma nova clivagem pela enzima TMPRSS2 (serina-serina protease transmembranar 2), promovendo a fusão do vírus com a célula hospedeira (DE ALMEIDA et al., 2020; YAMAMOTO et al., 2020).

A FDA autorizou vários medicamentos antivirais para o tratamento da COVID-19 leve a moderada em pessoas com maior risco de desenvolver formas graves da doença (CDC, 2024). No entanto, os tratamentos disponíveis ainda enfrentam diversas limitações e desafios, como a eficácia limitada de antivirais, potenciais interações medicamentosas e a falta de terapias específicas para pacientes graves (CDC, 2024; IDSA, 2024). Apesar dessas dificuldades, a combinação de vacinação, antivirais, imunomoduladores e suporte clínico tem sido fundamental para reduzir a gravidade da COVID-19. Contudo, a busca por tratamentos mais eficazes e acessíveis continua a ser um grande desafio para a comunidade científica.

A indústria farmacêutica é fundamental no desenvolvimento de novos medicamentos, mas esse processo é longo e oneroso, levando de 12 a 15 anos



(MOHS; GREIG, 2017). Para acelerar esse processo, adota-se a estratégia de reposicionamento de fármacos (*drug repurposing*), que envolve o uso de medicamentos já aprovados pelo FDA para tratar novas doenças. Isso reduz custos e tempo experimental, sem necessidade de novas avaliações toxicológicas ou farmacocinéticas (DURÃES; PINTO; SOUSA, 2018; SUN et al., 2017).

Um estudo recente realizado no Japão demonstrou que o mesilato de Nafamostatato, um inibidor sintético da serina protease utilizado no tratamento de pancreatite aguda e coagulação intravascular disseminada (YAMAMOTO, 2016), foi capaz de inibir a fusão celular dependente da TMPRSS2, com uma concentração inibitória de 50% (IC₅₀) em torno de 30 µM (YAMAMOTO, 2020).

Outra classe de compostos de destaque são as capsaicinas, que, segundo estudos *in silico*, demonstraram uma forte ligação com a M^{pro} do COVID-19 (GONZALEZ-PAZ et al., 2020). Os metabólitos secundários são reconhecidos como compostos multialvo, uma vez que apresentam uma ampla gama de atividades terapêuticas e atuam por meio de diversos mecanismos de ação (KESSLER; KALSKE, 2018). As capsaicinas, que se enquadram nesse perfil, têm sido investigadas utilizando a abordagem de "*multitarget drugs*", que busca descobrir novos fármacos com base na complexidade das patologias, reconhecendo que tratamentos que agem em um único alvo podem ser insuficientes para atingir os efeitos terapêuticos desejados (RAMSAY et al., 2018).

Dada a relevância dos aspectos sanitários e econômicos relacionados à pandemia de COVID-19, este trabalho teve como objetivo a síntese de análogos de capsaicinas derivadas do mesilato de nafamostatato, que demonstraram potencial promissor como inibidores de M^{pro} e TMPRSS2 em estudos *in silico* realizados pela equipe. A abordagem proposta foi a síntese desses análogos por meio de rotas sintéticas simples, sustentáveis e escalonáveis.



2. Objetivos Gerais

Sintetizar análogos da capsaicina derivado do mesilato de nafamostato e avaliar sua atividade como inibidor de M^{pro} e TMPRSS2.

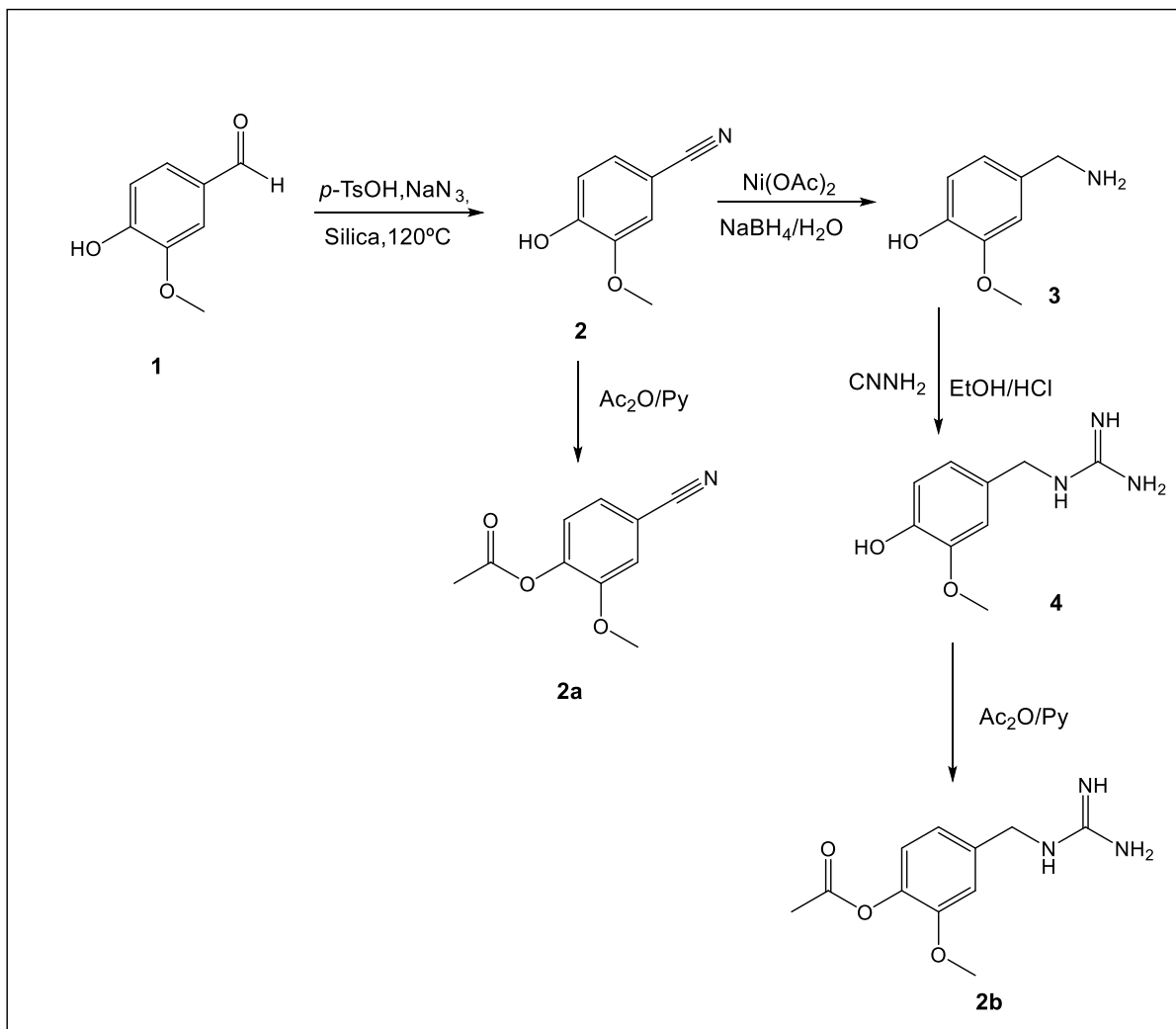
2.1. Objetivos Específicos

- Sintetizar os análogos da capsaicina;
- Caracterizar os análogos pelas técnicas de RMN (¹H e ¹³C) e HRMS;
- Realizar os ensaios de inibição *in vitro* da TMPRSS2 e M^{pro};
- Realizar ensaios de citotoxicidade com os produtos preparados.

3. Resultados e Discussão

3.1. Síntese

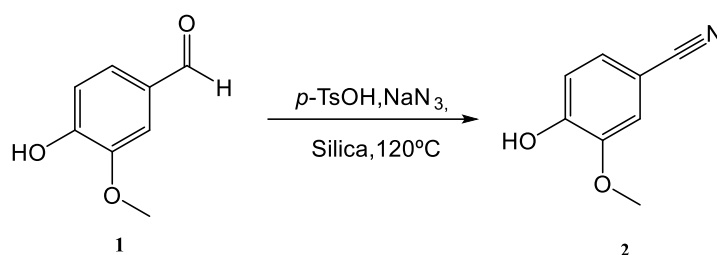
A rota sintética para preparação dos análogos é constituída pelas seguintes etapas que está representada no **Esquema 1**.



Esquema 1. Rota sintética geral para a preparação dos análogos da capsaicina.

O **Esquema 1** apresenta a rota sintética selecionada para a preparação dos análogos, escolhida por sua facilidade de execução após a avaliação de diversas metodologias. Para a síntese desses compostos, a vanilina foi utilizada como material de partida para a obtenção do intermediário comum (**2**). A formação do composto **2b** exigiu a redução da nitrila para permitir a introdução do grupo guanidino, essencial para a atividade antiviral. A etapa final na síntese dos compostos **2a** e **2b** envolveu uma reação de acilação, empregando métodos clássicos descritos na literatura.

Para a obtenção do composto **2**, foi seguida a metodologia descrita por Mitra et al. (2017), utilizando a reação entre vanilina comercial, azida de sódio e ácido p-toluenossulfônico em sílica gel 60-120 mesh, sob aquecimento a 120°C por 3,5 horas, conforme ilustrado no **Esquema 2**. A análise espectroscópica por RMN de ^1H e ^{13}C indicou a não formação do produto esperado, e o composto apresentou um rendimento de 20%



Esquema 2. Reação para preparação do composto **2**

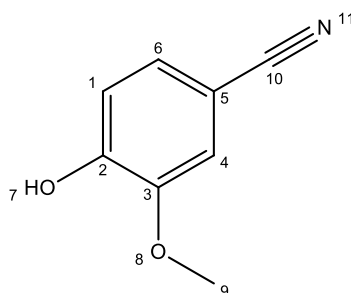
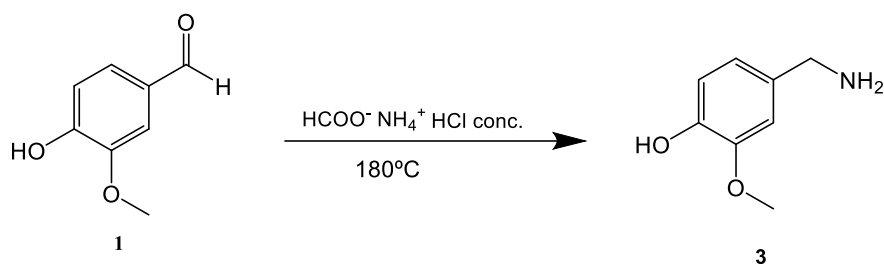


Figura 22. Estrutura química esperada do composto **2**

Diante das dificuldades encontradas para obtenção de um intermediário contendo uma amina primária, foram realizadas tentativas diretas partindo da vanilina, utilizando a reação clássica de Leuckart (**Esquema 3**). Seguindo essa metodologia, vanilina e formiato de amônio foram adicionados, seguidos da adição de HCl concentrado.



Esquema 3. Rota sintética esperada do composto **3**

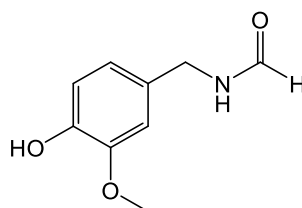
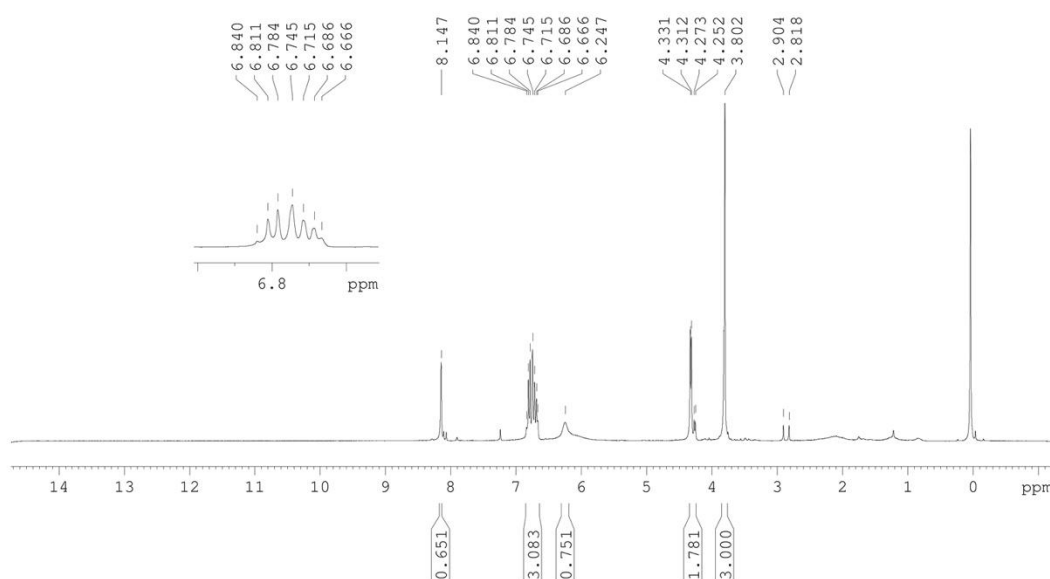


Figura 23. Estrutura do composto obtido

A estrutura do produto foi analisada por espectroscopia de RMN de ^1H , DEPT 135 e ^{13}C , apresentados nos espectros 1, 2 e 3 respectivamente.

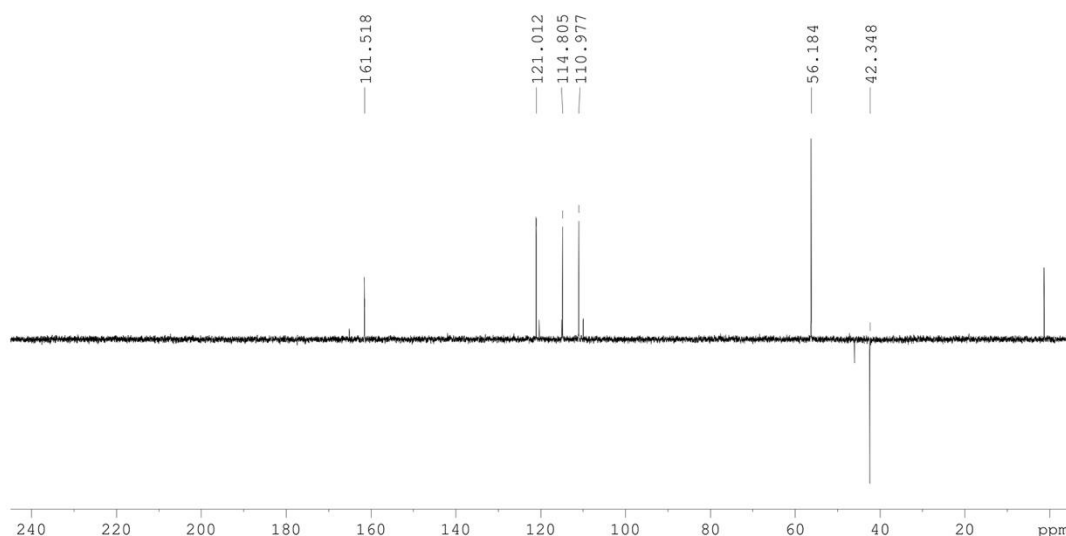


Espectro 1. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) da *N*-vanililformamida

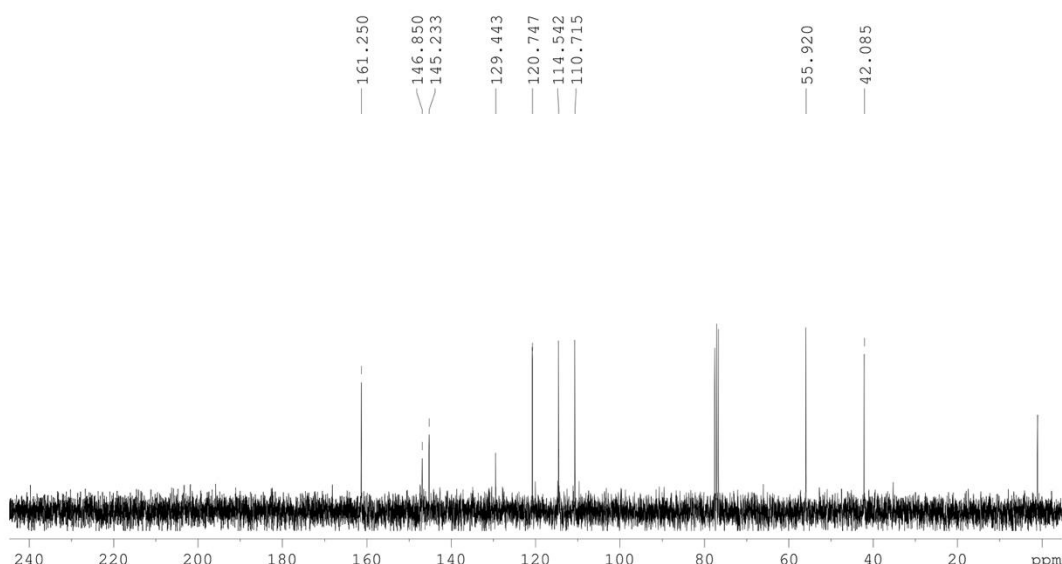


A elucidação espectroscópica confirmou a formação da N-vanililformamida. No espectro de ^1H , observa-se um sinal em δ 8,14 (simpleto) referente ao hidrogênio da carbonila, além de um duplete em δ 4,32 correspondente ao grupo CH_2 , indicando a redução da carbonila da vanilina.

Os dados obtidos por DEPT 135 mostram a presença do sinal CH_2 , essencial para a estrutura do produto. No espectro de ^{13}C , a formação do composto é corroborada pelo sinal em δ 161,2, referente ao carbono da carbonila, e pelo sinal em δ 42,0, atribuído ao CH_2 esperado para a redução do aldeído da vanilina.

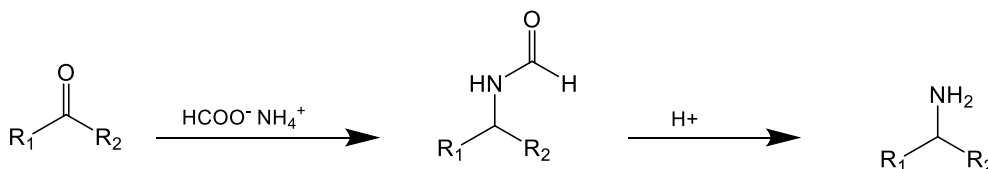


Espectro 2.Espectro de RMN de DEPT 135 (75 MHz em CDCl_3) da N-vanililformamida



Espectro 3. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) da N-vanililformamida

De acordo com Kaga et al. (1989), a reação de Leuckart utilizando vanilina e formiato de amônio pode resultar na formação de cloridrato de vanililamino puro. Uma alternativa à reação de aminação reductiva direta (DRA) é a reação de Leuckart, na qual um aldeído ou cetona é aquecido na presença de formiato de amônio, formamida ou uma mistura de formamida com ácido fórmico. (**Esquema 4**) O produto obtido dessa reação é, geralmente, o derivado formamida da amina desejada, o qual requer hidrólise ácida para gerar a amina final. (KAGA et al.1989; O'CONNER et al.2011).



Esquema 4. Rota sintética da reação de Leuckart

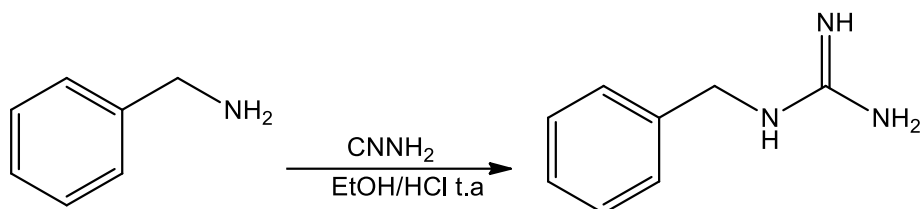
Um mecanismo único capaz de explicar todas as variações do processo de Leuckart pode ser proposto com base na decomposição do sal de amônio ou da amida, por meio de aquecimento, gerando ácido fórmico e amônia ou uma amina. A base formada pode reagir com o composto carbonílico, resultando em um produto de

adição, que é posteriormente reduzido pelo ácido fórmico a uma amina. A reação dessa amina com mais ácido fórmico resulta na formação de um sal ou amida. Essas transformações parecem ser as únicas responsáveis pela formação de uma amina terciária a partir de um composto carbonílico e do formato ou derivado formil de uma amina secundária, embora existam diversos intermediários possíveis na síntese de aminas primárias e secundárias. (MOORE, 1949)

Também foi realizada uma reação teste para verificar a formação do grupo guanidina no composto final esperado, considerando sua importância para a atividade antiviral deste estudo.

A síntese da guanidina foi baseada na metodologia empregada na obtenção do fármaco mesilato de nafamostatato (GUODONG, 1982), reconhecida por seu alto rendimento e baixo custo.

O teste foi conduzido utilizando benzilamina e cianamida em meio ácido, conforme ilustrado no **Esquema 5**. O composto obtido teve sua estrutura confirmada por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C .



Esquema 5. Rota sintética da reação teste para formação da guanidina

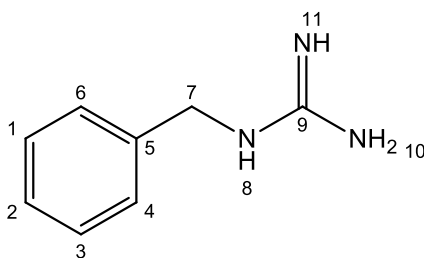


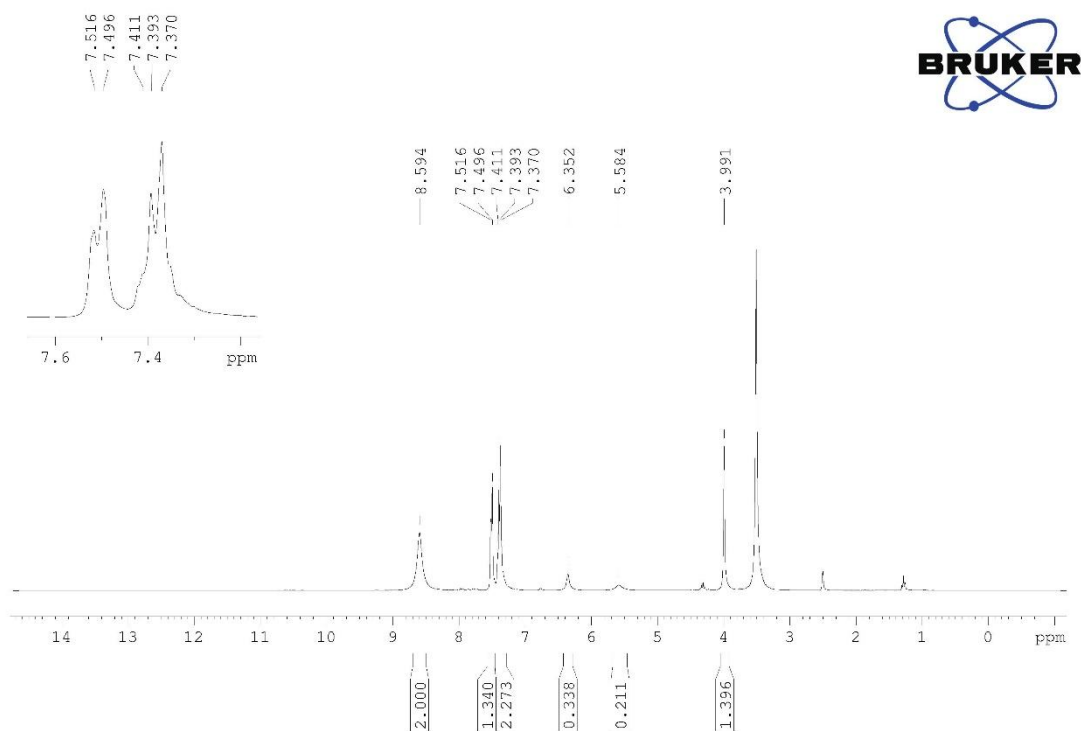
Figura 24. Estrutura química do composto com a guanidina

O teste com a benzilamina apresentou um resultado positivo e pode ser confirmado pelo **espectro 4**, principalmente pela presença dos dois simpletos em δ 5,58 e 6,35, cada um com integral 1H, confirmando a existência dos nitrogênios que compõe o grupo guanidino. O duplete mais protegido em δ 7,38 foi atribuído aos hidrogênios equivalentes 4 e 6, e o duplete em δ 7,50 pertences aos hidrogênios

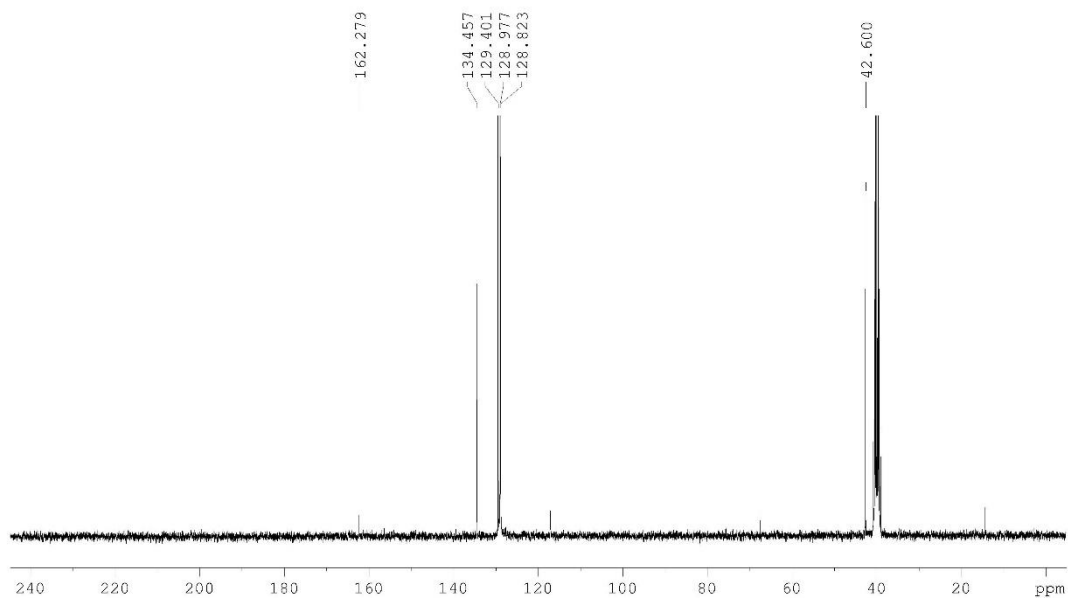


equivalentes 1 e 3. O simpleto em δ 8,59 foi atribuído a amina primaria do grupo guanidino.

O RMN de ^{13}C (**espectro 5**) corrobora a caracterização do composto guanidinico, onde é possível verificar um sinal em δ 162,2 atribuído ao carbono da guanidina. Os sinais em δ 128,8, 128,9, 129,4 e 134,4 são referentes aos carbonos do anel aromático. E o sinal em δ 42,6 é referente ao C7.



Espectro 4.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em $\text{DMSO}-d_6$) do composto teste



Espectro 5.Espectro de RMN de ^{13}C (75MHz em DMSO-d_6) do composto teste



4. Parte Experimental

4.1. Materiais e Métodos

As análises em cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio e sílica gel 60 F₂₅₄-Macherey-Negel Sil G/UV254. Para a visualização dos compostos nas análises em CCD foi utilizada luz ultravioleta (254 nm). Todos os compostos submetidos a análises espectroscópicas de RMN de ¹H e ¹³C foram solubilizados em DMSO-d₆ e CDCl₃ e os mesmos foram utilizados como referência interna. A aquisição dos espectros de RMN de ¹H 300 MHz e ¹³C (BBD) em 75 MHz foi realizada em espectrômetro Bruker AVANCE DPX-300 do Laboratório de Pesquisa de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química – UFMS. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz).

4.2. Síntese dos Capsaicinoides

4.2.1. Procedimento geral para síntese do composto 2

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 1mmol de vanilina, 2mmol de azida sódica e 3mmol de ácido *p*-toluenossulfônico em 1g de sílica gel 60-120 mesh. A reação ficou sob agitação durante 3,5h a 120°C. Então o meio reacional foi resfriado até atingir a temperatura ambiente e foi extraído com AcOEt (4x15 mL) e lavada várias vezes com água. Em seguida, a fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio, seca com MgSO₄ anidro e o solvente foi evaporado à pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel 60-120 mesh usando CH₂Cl₂/AcOEt.

4.2.2. Procedimento geral da síntese da guanidina

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 1mmol de benzilamina que foi solubilizado em 0,5ml de etanol. Durante a agitação, adicionou-se ácido clorídrico concentrado (0,08 ml). Em seguida, uma solução aquosa de cianamida (0,458 ml, 0,055 mmol) foi adicionada gota a gota a uma temperatura de 10 a 15 ° C. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 10 h. A mistura foi então filtrada e extraída com AcOEt (3x 15ml). A fase aquosa foi evaporada sob pressão reduzida, a formação do composto não requereu purificação.



4.2.3. Procedimento geral da reação da vanililamida

Foram adicionados 1mmol de vanilina, 3.2 mmol de formiato de amônia em um balão de fundo redondo. A reação ficou sob agitação durante 3 horas à 180°C. Posteriormente, HCl concentrado foi adicionado e a mistura reacional foi mantida em agitação e em refluxo por 1 hora e evaporado até que o odor de HCl desaparecesse. A reação foi acompanhada por CCD usando AcOEt/Hex 8:2. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel 60-120 mesh usando AcOEt/Hex.



5. Conclusão

Com base na estrutura da capsaicina, a rota sintética para a obtenção de análogos mostrou-se promissora, devido à sua conformação e à introdução de grupos farmacofóricos relatados na literatura como potenciais inibidores da TMPRSS2. No entanto, o intermediário 2 não foi obtido. Ao tentar a aminação direta, observou-se a formação da N-vanililformamida, possivelmente devido ao excesso ou decomposição do sal de amônio, o que impediu a obtenção do intermediário 3.

A síntese teste para a introdução do grupo guanidino, etapa chave deste estudo, apresentou resultados positivos, demonstrando ser uma metodologia viável, de baixo custo e com potencial de escalonamento.



6. Referências Bibliográficas

ASSELAH, T. et al. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *Journal of Hepatology*, v. 74, n. 1, p. 168–184, 2021.

CDC. *Centers for Disease Control and Prevention*. Types of COVID-19 Treatment. 2024. Disponível em: [Types of COVID-19 Treatment | COVID-19 | CDC](#). Acesso em: 30 jan. 2025.

DE ALMEIDA, J. O. COVID-19: Physiopathology and Targets for Therapeutic Intervention. *Revista Virtual de Química*, v. 12, n. 6, 2020.

DURÃES, F.; PINTO, M.; SOUSA, E. Old drugs as new treatments for neurodegenerative diseases. *Pharmaceuticals*, v. 228, p. 4050, 2018.

GONZALEZ-PAZ, L. A. et al. Theoretical Molecular Docking Study of the Structural Disruption of the Viral 3CL-Protease of COVID-19 Induced by Binding of Capsaicin, Piperine and Curcumin. *Comparative Study with Chloroquine and Hydrochloroquine*. 2020.

GUODONG, L. Y. W. X. W. W. Y. Y. Y. X. Z. Preparation method of nafamostat mesylate, 1982.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, v. 395, n. 10223, p. 15, 2020.

IDSA. *Infectious Diseases Society of America*. IDSA Guidelines on the Treatment and Management of Patients with COVID-19. 2024. Disponível em: [IDSA Guidelines on the Treatment and Management of Patients with COVID-19](#). Acesso em: 30 jan. 2025.

KAGA, H.; MIURA, M.; ORITO, K. A facile procedure for synthesis of capsaicin. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 54, n. 14, p. 3477–3478, 1989.



KAUSHIK, S. et al. The Indian perspective of COVID-19 outbreak. *Virus Disease*, v. 31, n. 2, p. 146–153, 2020.

KESSLER, A.; KALSKE, A. Plant Secondary Metabolite Diversity and Species Interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 49, p. 115-139, 2018.

MITRA, B.; PARIYAR, G. C.; SINGHA, R.; GHOSH, P. *p*-TsOH mediated solvent and metal catalyst free synthesis of nitriles from aldehydes via Schmidt reaction. *Tetrahedron Letters*, v. 58, n. 23, p. 2298–2301, 2017.

MOHS, R. C.; GREIG, N. H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, v. 3, n. 4, p. 651–657, 2017.

MOORE, M. L. The Leuckart reaction. *Organic Reactions*, v. 5, p. 301-330, 1949.

O'CONNOR, D.; LAURIA, A.; BONDI, S. P.; SABA, S. Direct Leuckart-type reductive amination of aldehydes and ketones: a facile one-pot protocol for the preparation of secondary and tertiary amines. *Tetrahedron Letters*, v. 52, n. 1, p. 129–132, 2011.

RAMSAY, R. R. et al. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clinical and Translational Medicine*, v. 7, n. 1, p. 3, 2018.

UZUNIAN, A. Coronavírus SARS-CoV-2 e Covid-19. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 56, p. 1-4, 2020.

WANG, C. et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *The Lancet*, v. 396, n. 10223, p. 470, 2020.

YAMAMOTO, M. et al. The anticoagulant nafamostat potently inhibits SARS-CoV-2 S protein-mediated fusion in a cell fusion assay system and viral infection *in vitro* in a cell-type-dependent manner. *Viruses*, v. 12, n. 6, 2020.



YAMAMOTO, M. et al. Identification of nafamostat as a potent inhibitor of Middle East respiratory syndrome coronavirus S protein-mediated membrane fusion using the split-protein-based cell-cell fusion assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 11, p. 6532–6539, 2016.

ZHOU, Y. W. et al. Therapeutic targets and interventional strategies in COVID-19: mechanisms and clinical studies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 6, p. 317, 2021.

ZHU, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, v. 382, p. 727, 2020.



CAPÍTULO III: Síntese de flavonoides e sua atividade inibitória sobre a COVID-19



Resumo

Em dezembro de 2019, a COVID-19 surgiu em Wuhan, China, e foi declarada pandemia em março de 2020. Embora medicamentos antivirais autorizados estejam disponíveis, suas limitações como interações medicamentosas, necessidade de administração intravenosa e eficácia restrita, destacam a urgência por novos tratamentos. Nesse cenário, o uso de métodos de desenho de fármacos assistido por computador (CADD) tem se mostrado uma estratégia eficaz para o desenvolvimento de compostos bioativos, contribuindo para a redução de custos e agilização do processo de descoberta de fármacos. Entre os agentes estudados, os flavonoides têm ganhado destaque devido às suas propriedades antivirais e à capacidade de atuar em múltiplos alvos, representando aproximadamente 50% dos medicamentos em uso clínico. Estudos *in vitro*, *in vivo* e *in silico* demonstraram que certos flavonoides podem interferir em etapas essenciais do ciclo viral, inclusive na inibição da M^{pro}, uma protease fundamental para a replicação do SARS-CoV-2. Contudo, a síntese de compostos bioativos frequentemente enfrenta desafios relacionados à complexidade dos processos e aos baixos rendimentos. Diante disso, este trabalho propôs a síntese de análogos de flavonoides por meio de rotas sintéticas simples, sustentáveis e escalonáveis, visando avaliar sua atividade inibitória sobre a M^{pro} do SARS-CoV-2. Embora as estratégias sintéticas adotadas tenham se mostrado versáteis e economicamente viáveis, os compostos obtidos apresentaram inibição máxima de 31±1%, para o composto EM_3C, evidenciando a necessidade de aprimoramento. Dados comparativos com a literatura sugerem que a presença de múltiplos grupos hidroxila ou a forma glicosilada são determinantes para a eficácia antiviral dos flavonoides.

Palavras-chave: COVID-19, flavonoides, mpro, SARS-CoV-2.



Abstract

In December 2019, COVID-19 emerged in Wuhan, China, and was declared a pandemic in March 2020. Although authorized antiviral medications are available, their limitations, such as drug interactions, the need for intravenous administration, and restricted efficacy, highlight the urgency for new treatments. In this context, the use of computer-aided drug design (CADD) methods has proven to be an effective strategy for developing bioactive compounds, contributing to cost reduction and speeding up the drug discovery process. Among the agents studied, flavonoids have gained attention due to their antiviral properties and ability to act on multiple targets, accounting for approximately 50% of currently used clinical drugs. *In vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies have shown that certain flavonoids can interfere with essential steps of the viral cycle, including inhibition of M^{pro}, a protease critical for SARS-CoV-2 replication. However, the synthesis of bioactive compounds often faces challenges related to process complexity and low yields. Therefore, this study aimed to synthesize flavonoid analogs using simple, sustainable, and scalable synthetic routes, to evaluate their inhibitory activity against SARS-CoV-2 M^{pro}. Although the synthetic strategies adopted were versatile and economically viable, the compounds obtained showed a maximum inhibition of 31±1% for compound EM_3C, indicating the need for improvement. Comparative data from the literature suggest that the presence of multiple hydroxyl groups or the glycosylated form is crucial for the antiviral efficacy of flavonoids.

Keywords: COVID-19, flavonoids, mpro, SARS-CoV-2.



1. Introdução

A pandemia de COVID-19 (*Coronavirus Disease-19*) teve seus primeiros casos relatados em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China (BOGOCH et al.2020). Em 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 como uma pandemia (MACHADO et al.2021). O agente causador da doença é o vírus SARS-CoV-2, pertencente à família *Coronaviridae*, devido à sua homologia genômica com o SARS-CoV (ASSELAH et al.2021).

Atualmente, já existem medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA para o tratamento da COVID-19. No entanto, os antivirais disponíveis apresentam algumas limitações, como interações medicamentosas no caso do nirmatrelvir combinado com ritonavir, necessidade de administração intravenosa para o remdesivir e eficácia restrita do molnupiravir. Dessa forma, há uma demanda por novos antivirais que superem essas limitações e ofereçam opções terapêuticas mais eficazes e acessíveis (GULICK et al.2024).

A utilização de métodos de desenho de fármacos assistido por computador (*Computer-Aided Drug Design – CADD*) tem se destacado como uma abordagem eficiente no desenvolvimento de compostos bioativos, representando uma colaboração estratégica entre a indústria e instituições de pesquisa. Essa técnica permite projetar novas moléculas a partir da análise das interações intermoleculares com o receptor-alvo. Como resultado, possibilita a redução de custos e do tempo necessário para experimentação, além de minimizar a quantidade de testes biológicos exigidos para a caracterização completa da atividade terapêutica (MACALINO et al., 2015).

Geralmente, os fármacos atuam sobre um único alvo molecular. No entanto, alguns compostos podem exercer múltiplas atividades terapêuticas e interagir por diferentes mecanismos de ação. Devido a essa versatilidade, tais moléculas têm sido amplamente estudadas por meio da abordagem conhecida como *multitarget drugs*. Esse conceito na descoberta de fármacos leva em consideração a complexidade das doenças, sugerindo que substâncias com ação específica em apenas um alvo podem não ser suficientes para alcançar os efeitos terapêuticos desejados (RAMSAY et al., 2018).



Metabólitos secundários, como os flavonoides, são exemplos de compostos com potencial para atuar em múltiplos alvos (KESSLER; KALSKE, 2018). O interesse no estudo dessas moléculas se deve ao papel fundamental que desempenham no desenvolvimento de novos fármacos, evidenciado por sua significativa contribuição entre as novas entidades moleculares recentemente aprovadas. Além disso, esses compostos representam cerca de 50% dos medicamentos atualmente em uso clínico (PATRIDGE et al., 2016).

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que os flavonoides possuem atividade antiviral contra uma ampla variedade de vírus de DNA e RNA (LALANI; POH, 2020; ZAKARYAN et al., 2017). Esses compostos podem atuar por diferentes mecanismos, incluindo a inibição do reconhecimento e da entrada viral na célula, além da interferência no processo de replicação do vírus (LALANI; POH, 2020). Devido a essa versatilidade em afetar múltiplas vias, os flavonoides se destacam como candidatos promissores para o desenvolvimento de terapias contra infecções virais, como a COVID-19.

A M^{pro}, uma protease essencial para a maturação do SARS-CoV-2, tem sido amplamente estudada como um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos. De acordo com Khaerunnisa et al. 2020, análises *in silico* indicam que certos flavonoides, como kaempferol, quercetina, luteolina-7-glicosídeo, naringenina, apigenina-7-glicosídeo e epicatequina-galato, destacam-se entre os metabólitos secundários com potencial para inibir a M^{pro} do SARS-CoV-2, tornando-se candidatos promissores para o tratamento da COVID-19.

Estes resultados indicaram que a suplementação com flavonoides pode representar uma estratégia promissora para a proteção contra infecções e doenças pulmonares (MEYER; JASPERS, 2015). No entanto, a síntese de compostos bioativos muitas vezes envolve metodologias complexas, com baixos rendimentos e dificuldades para escalonamento. Diante disso, o planejamento de moléculas com potencial bioativo, aliado a estudos computacionais, torna-se essencial. Além disso, o desenvolvimento de rotas sintéticas que garantam flexibilidade na preparação e otimização dos processos é fundamental. Considerando a urgência imposta pela COVID-19, esta proposta buscou a síntese de compostos com potencial antiviral por meio de CADD, utilizando rotas sintéticas de baixo custo, escalonáveis e eficientes.



2. Objetivos Gerais

Sintetizar análogos de flavonoides e avaliar sua atividade como inibidor de M^{pro} sob o vírus SARS-Cov-2

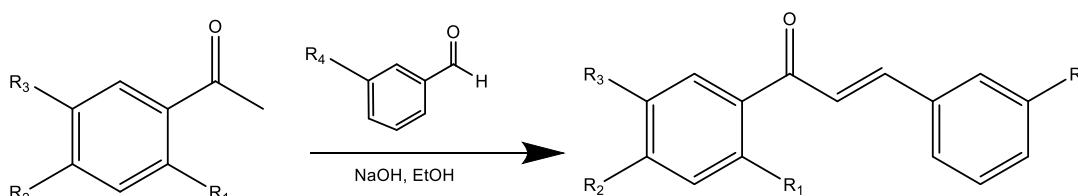
2.1. Objetivos Específicos

- Sintetizar análogos de flavonoides através de rota sintética simples, sustentável e escalonável;
- Caracterizar os compostos sintetizados por métodos espectroscópicos e espectrométricos;
- Realizar ensaios de inibição *in vitro* da M^{pro};

3. Resultados e Discussões

3.1. Síntese

As chalconas foram sintetizadas por meio da reação de Claisen-Schmidt, uma condensação entre aldeídos e compostos carbonílicos, resultando em cetonas α,β -insaturadas, na presença de uma base ou ácido de Bronsted, conforme descrito por BORSARI et al. (2019) (**Esquema 6**). Foram selecionados benzaldeídos e acetofenonas de baixo custo. Doze chalconas foram sintetizadas e todas identificadas por análise espectroscópica de RMN de ^1H e ^{13}C , apresentando bons rendimentos. (**Tabela 1**)



Esquema 6. Rota sintética das chalconas

Tabela 1. Rendimentos da reação da chalconas.

Entrada	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rendimentos
1	H	Cl	H	-OCH ₃	67% (1a)
2	H	Cl	H	-OCH ₂ O	86% (1b)
3	H	Cl	H	-N(CH ₃) ₂	73% (1c)
4	OH	H	H	-OCH ₃	77% (2a)
5	OH	H	H	-OCH ₂ O	71% (2b)
6	OH	H	H	-N(CH ₃) ₂	82% (2c)
7	OH	H	Cl	-OCH ₃	90% (3a)
8	OH	H	Cl	-OCH ₂ O	87% (3b)
9	OH	H	Cl	-N(CH ₃) ₂	82% (3c)
10	OH	H	F	-OCH ₃	84% (4a)



11	OH	H	F	-OCH ₂ O	77% (4b)
12	OH	H	F	-N(CH ₃) ₂	96% (4c)

A condensação de Claisen-Schmidt começa quando a base remove um hidrogênio da acetofenona, formando um enolato, uma espécie química estabilizada por deslocalização. Esse enolato então ataca a carbonila do aldeído, gerando um intermediário alcóxido. Esse íon recebe um próton da água, formando um álcool. Na etapa final, ocorre a desidratação (perda de água) em meio básico. Durante esse processo, a hidroxila ligada ao carbono sp^3 é eliminada, e ocorre um rearranjo de cargas. Isso leva à formação de uma enona, resultando no produto: a chalcona (MANCHANAYAKAGE, 2016).

A etapa final da reação também apresenta estereosseletividade, pois as chalconas podem ser formadas em duas configurações distintas. No entanto, devido à presença de dois anéis aromáticos em sua estrutura, a configuração *cis* (*Z*) da chalcona possui maior impedimento estérico que o isômero *E*, o que reduz sua estabilidade. Como resultado, a síntese de chalconas ocorre de forma estereosseletiva, favorecendo a formação predominante do isômero *trans* (*E*) (**Figura 25**) (GOMES et al. 2017). O mecanismo dessa reação pode ser observado na **Figura 26**.

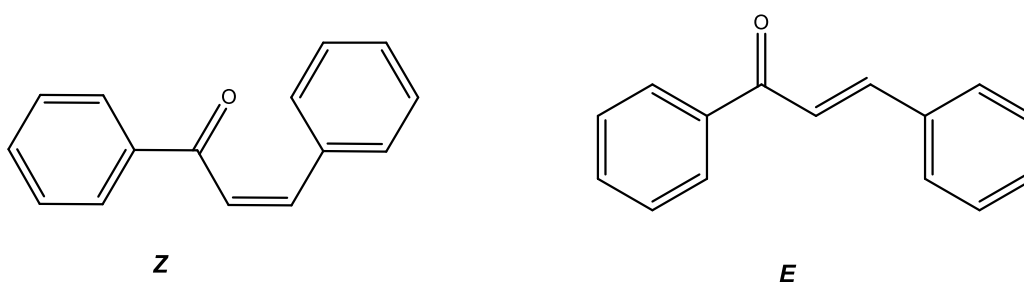
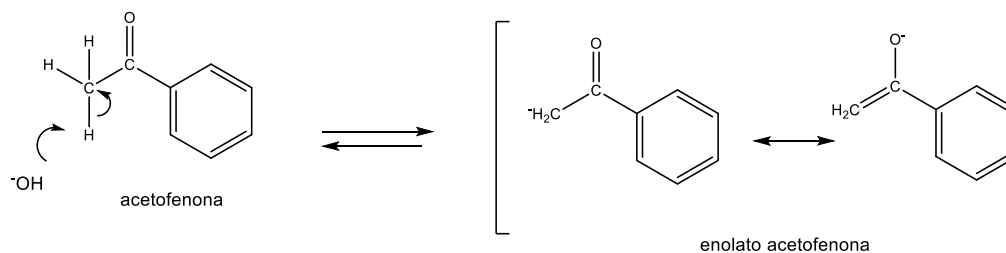
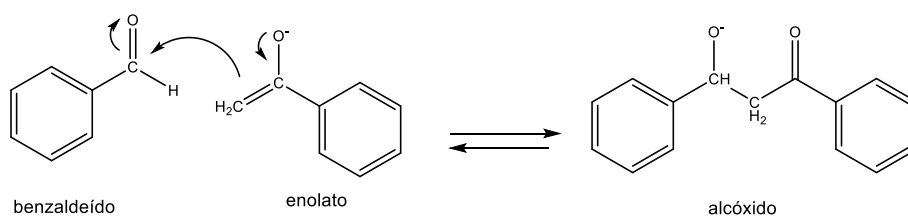


Figura 25. Estrutura química das chalconas nas formas isômeras *Z* e *E*, respectivamente.

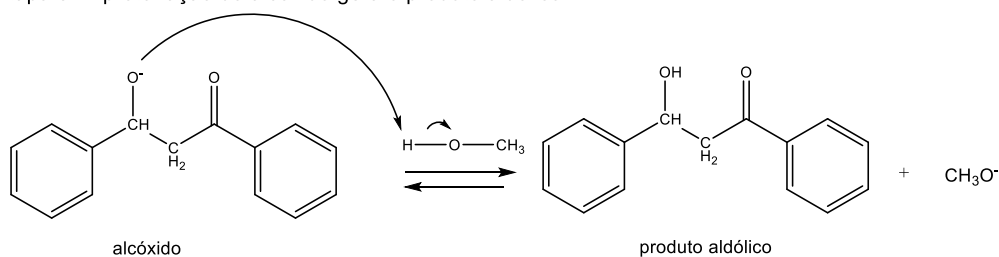
Etapa 1: A base remove um próton α do acetofenona, formando um íon enolato.



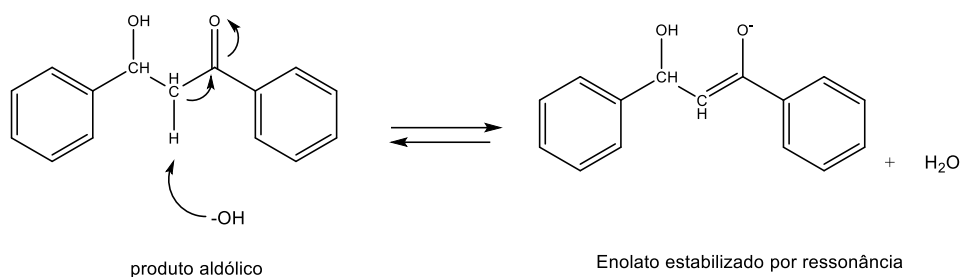
Etapa 2: O enolato da acetofenona adiciona-se ao carbono carbonílico do benzaldeído.



Etapa 3: A protonação do alcóxido gera o produto aldólico.



Etapa 4: A remoção de um próton α



Etapa 5: A eliminação do hidróxido forma o produto da condensação aldólica (cetona α,β -insaturada).

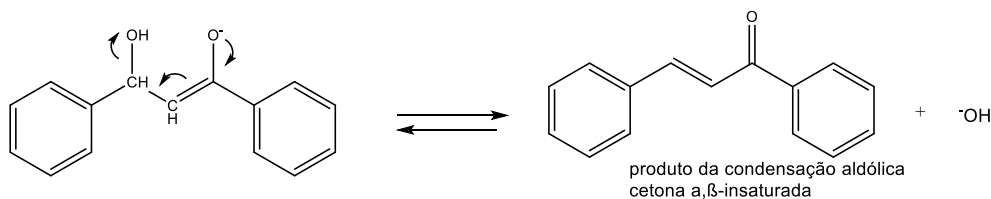
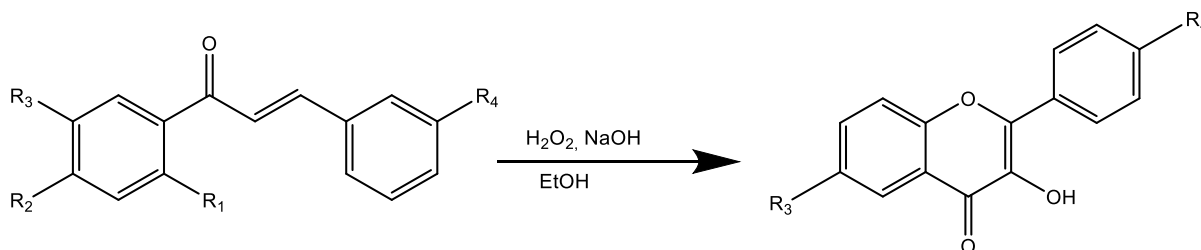


Figura 26. Representação do mecanismo de reação da condensação de Claisen-Schmidt. Fonte: MANCHANAYAKAGE, 2016

De acordo com os espectros de RMN de ^1H , as chalconas exibiram sinais do grupo CH α , β insaturado na região de δ 7,30 a 7,90, com constantes de acoplamento (J) de 15,3 Hz, confirmando a formação do isômero *trans* e indicando a presença da ligação α , β -insaturada. Os espectros referentes às chalconas estão apresentados no ANEXO 1.

Os flavonóis foram sintetizados por meio da reação de Algar Flynn-Oyamada, que se baseia na ciclização oxidativa de derivados de chalcona (Oyamada, 1935). Para que a ciclização intramolecular ocorra, é necessário que os derivados utilizados como reagentes possuam um grupo hidroxila na posição *orto* em relação à carbonila. A reação ocorre em meio etanólico à temperatura ambiente, com a adição de $\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq.})$ como agente oxidante (**Esquema 5**) (Bhattacharyya; Hatua, 2014).



Esquema 7. Síntese de flavonoides através da metodologia de Algar-Flynn-Oyamada. Fonte: Adaptado de Oyamada (1935)

Os análogos da chalcona foram usados na síntese de moléculas semelhantes a flavonóis com bons rendimentos (**tabela 2**) e todas identificadas por análise espectroscópica de RMN de ^1H e ^{13}C .

Tabela 2. Rendimentos das reações dos flavonoides

Entrada	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rendimentos
9	-	H	H	-OCH ₃	71% (f12a)
10	-	H	H	-OCH ₂ O	70% (f12b)
11	-	H	H	-N(CH ₃) ₂	79% (f12c)
12	-	H	Cl	-OCH ₃	86% (f13a)
13	-	H	Cl	-N(CH ₃) ₂	79% (f13c)

De acordo com os espectros de RMN os sinais presentes nas chalconas referente ao grupo CH α , β insaturado de δ 7,30 a 7,90 não foram detectados nos



espectros dos flavonóis. Além disso, os compostos **f12a–f13c** exibiram um sinal correspondente ao grupo OH na faixa de δ 9,60–9,30, sugerindo o desaparecimento da hidroxila fenólica presente na chalcona. Esse deslocamento químico mais elevado é característico da formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular com o grupo carbonila. Os espectros referentes aos compostos sintetizados são possíveis ver em ANEXO 1.

3.2. Ensaios Enzimáticos com a M^{pro} do SARS-CoV-2

A expressão e purificação da enzima M^{pro} foram realizadas pela estudante Mariana Ortiz de Godoy e fornecidas pelo Prof. Dr. Rafael V. C. Guido, do Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo de São Carlos), seguindo a metodologia de Noske et al. 2022. Foram realizados testes com os análogos da chalcona (**1a – 4c**) e os flavonóis (**f12a – f13c**).

Inicialmente, foram realizados testes de solubilidade com os compostos sintetizados para a triagem viral. No entanto, devido a problemas de solubilidade, os compostos **1c – 2c** não foram utilizados nos ensaios enzimáticos. Observou-se que, na concentração de 100 μ M, ocorreu precipitação devido à baixa solubilidade dos compostos em água. Por esse motivo, a triagem foi conduzida na concentração de 20 μ M.

Quando os compostos foram avaliados em um ensaio fluorimétrico contra a enzima recombinante do SARS-CoV-2, na concentração de 20 μ M (ou 50 μ M, no caso do EM_3C), a maior inibição da M^{pro} observada foi de 31 $\pm$ 1%. Devido à baixa capacidade inibitória dos compostos, nenhum teste adicional foi realizado. Os resultados podem ser analisados na **tabela 3**.

Tabela 3. Porcentagem de inibição da M^{pro} em experimentos com pré-incubação dos compostos com a enzima.

Compostos	% de inibição da M ^{pro} (média $\pm$ erro padrão da média)
1A	20$\pm$5
1B	17$\pm$3
3A	22$\pm$3



3B	15±4
3C	31±1^c
4A	22±2
4B	24±2
4C	17±4
F12A	7±6
F12B	na^d
F12C	na^d
F13A	na^d
F13C	na^d

^a Valores determinados na presença de 20 µM do composto e uma concentração final de 0,5% de DMSO, com exceção dos compostos para os quais outra concentração é especificada.

^b Valores referentes à média e ao erro padrão da média, baseados em dois experimentos independentes, realizados em triplicata.

^c Valor determinado a 50 µM do composto e concentração final de 5% de DMSO.

^d na, não ativo.

Diante da ausência de inibição da enzima M^{pro} pelos compostos testados e das dificuldades de solubilidade observadas, surge a seguinte discussão. Nos vegetais, os flavonoides podem ser encontrados em duas formas: livre (aglicona) e conjugada com açúcares (trissacarídeos). Dentro das formas conjugadas, é relevante destacar a distinção entre os O-heterosídeos e os C-heterosídeos. (KUMAR & PANDEY, 2013).

Os flavonoides na forma de agliconas são solúveis em solventes orgânicos apolares. Quando possuem hidroxila, tornam-se solúveis em soluções alcalinas devido à formação de fenóxidos. Sua solubilidade depende da quantidade de hidroxilas e da ionização no meio. Já os heterosídeos, por conterem açúcares na estrutura, apresentam maior solubilidade em água, soluções hidroalcoólicas e solventes polares, sendo os flavonoides C- ou O-glicosilados especialmente solúveis nesses meios. (SIMOES et al. 2007)

A baixa solubilidade dos flavonoides em água frequentemente representa um desafio para suas aplicações medicinais, conforme apontado por outros grupos de pesquisa. Havsteen (2002) menciona que, devido a esse problema, estão sendo



desenvolvidos flavonoides semissintéticos solúveis em água, como alternativa para o tratamento de hipertensão e microhemorragias. Entre os exemplos desses flavonoides estão os rutósidos hidroxietílicos e o quercetina inositol-2-fosfato.

De acordo com os estudos de Denny et al. (2002), níveis mais elevados de inibição enzimática de L1 metallo- β -lactamase não foram atingidos devido a problemas de solubilidade do inibidor. A galangina, assim como a maioria dos flavonoides, tem baixa solubilidade em água à temperatura ambiente, embora tenha mostrado uma leve melhora na solubilidade a 37°C. No entanto, os estudos de controle indicaram que a adição de maiores volumes de DMSO para aumentar a solubilidade interferiu na proteína.

Em relação aos testes de inibição da M^{pro} descritos na literatura, diversos flavonoides foram validados como capazes de se ligar à M^{pro} do SARS-CoV-2, com destaque aos flavonoides conjugados, utilizando métodos distintos dos ensaios enzimáticos. Por exemplo, Su et al. (2020) investigaram novos inibidores do M^{pro} usando um ensaio de protease FRET e descobriram que a baicaleína e a baicalina exibem um efeito inibitório significativo sobre a M^{pro}.

De acordo com Silva et al. (2020), os resultados sugerem que a rutina, a nicotiflorina e seus possíveis metabólitos humanos podem desempenhar um papel crucial como inibidores do M^{pro} e RdRp do SARS-CoV-2. Esses derivados, que se espera que estejam presentes no plasma, são, de fato, os compostos mais prováveis de atingir essas proteínas virais por meio da ingestão oral desses glicosídeos flavonoides.

O grupo de pesquisa de Lin et al. (2023) examinou 1.019 flavonoides diversos em relação à sua capacidade de inibir o SARS-CoV-2 M^{pro}. Diversas relações estrutura-atividade foram identificadas entre os compostos ativos, com destaque para a baicaleína, que demonstrou inibir a replicação do SARS-CoV-2. A análise do mecanismo de ação da baicaleína revelou que, além de inibir o M^{pro}, ela interfere na fosforilação oxidativa de forma dependente do poro de permeabilidade mitocondrial. Atualmente, a baicaleína é o único flavonoide testado *in vivo* que demonstrou efeito anti-SARS-CoV-2.

Os testes *in vivo* sob a baicaleína, foram realizados por Song et al. 2021, resultados mostraram que a baicaleína inibiu o dano celular induzido pelo SARS-CoV-2 e melhorou a morfologia das células Vero E6 em uma concentração de 0,1 μ M e



acima. Além disso, a baicaleína inibiu significativamente a perda de peso corporal, a replicação do vírus e aliviou as lesões do tecido pulmonar em camundongos transgênicos hACE2 infectados com SARS-CoV-2.

Esses dados corroboram a hipótese de que flavonoides glicosilados ou com maior quantidade de grupos hidroxilas apresentam um grande potencial no tratamento da COVID-19, além de possuírem maior solubilidade, o que facilita a execução dos testes enzimáticos.



4. Parte Experimental

4.1. Materiais e Métodos

As análises em cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio e sílica gel 60 F₂₅₄-Macherey-Negel Sil G/UV254. Para a visualização dos compostos nas análises em CCD foi utilizada luz ultravioleta (254 nm). Todos os pontos de fusão foram determinados utilizando um instrumento Quimis® do Brasil, modelo Q340S. Os compostos foram submetidos a análises espectroscópicas de RMN de ¹H e ¹³C foram solubilizados em DMSO-d₆ e CDCl₃ e os mesmos foram utilizados como referência interna. A aquisição dos espectros de RMN de ¹H 300 MHz e ¹³C (BBD) em 75 MHz foi realizada em espectrômetro Bruker AVANCE DPX-300 e os espectros de RMN de ¹H 500MHz e ¹³C (BBD) em 125MHz foi realizada em espectrômetro AVANCE NEO-500 do Laboratório de Pesquisa de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química – UFMS. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz).

4.2. Síntese de chalconas através da reação de condensação de Claisen-Schmidt

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados acetofenona substituída (1mmol), etanol (2 mL) e NaOH (3M, 1,6 mL). Em seguida, 1,2 eq de benzaldeído substituído foi lentamente adicionado. A reação permaneceu sob agitação em temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, a mistura reacional foi resfriada em banho de gelo, e HCl concentrado foi adicionado até atingir pH = 2,0. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água fria e purificado por recristalização com etanol.

4.3. Síntese de flavonóis e derivados esterificados através da reação Algar Flynn-Oyamada

Em um balão de fundo redondo, foi adicionada uma solução aquosa de NaOH (1M, 2 mL) a 1 mmol de chalcona em EtOH (5 mL). A solução foi resfriada até a formação de uma suspensão gelada. Em seguida, uma solução aquosa de H₂O₂ (35%, 250 μ L) foi adicionada à suspensão gelada; a mistura foi então deixada aquecer até a temperatura ambiente e agitada por 1–2 horas. Após esse período, foram



adicionados 3 mL de água destilada. A mistura reacional foi acidificada com HCl concentrado (37%) até pH = 2, sob banho de gelo e agitação vigorosa. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água fria e purificado por recristalização com etanol.

(E)-1-(4-clorofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (EM_1a): Cristal amarelo pálido. Rendimento: 67%. Pf 118–120 °C. ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm 7.92 (2H, d, J = 8.5, ArH), 7.75 (1H, d, J = 15.7 Hz, C=CH), 7.56 (2H, d, J = 8.8, ArH), 7.43 (2H, d, J = 8.3, ArH), 7.33 (1H, d, J = 15.7 Hz, C=CH), 6.90 (2H, d, J = 8.7, ArH), 3.82 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm 189.1, 161.8, 145.1, 138.9, 136.7, 130.3, 129.8, 128.8, 127.4, 119.1, 114.4, 55.4.

(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(4-clorofenil)prop-2-en-1-ona (EM_1b): Cristal amarelo pálido. Rendimento: 86%. Pf 126–130 °C. ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm 7.91 (2H, d, J = 8.5, ArH), 7.70 (1H, d, J = 15.7 Hz, C=CH), 7.43 (2H, d, J = 8.5, ArH), 7.28 (1H, d, J = 15.5 Hz, C=CH), 7.12 (1H, d, J = 1.6 Hz, ArH), 7.0,9 (1H, dd, J = 8.1, J = 1.4, ArH), 6.81 (1H, d, J = 8.1, ArH), 6.00 (2H, s, $-\text{OCH}_2\text{O}$); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm 188.9, 150.0, 148.4, 145.1, 139.0, 136.6, 129.8, 129.1, 125.4, 119.4, 108.6, 106.6, 101.6.

(E)-1-(4-clorofenil)-3-(4-(dimetilamino)fenil)prop-2-en-1-ona (EM_1c): Pó amorfo amarelo. Rendimento: 73%. Pf 138–140 °C. ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm 7.92 (2H, d, J = 8.6, ArH), 7.77 (1H, d, J = 15.5 Hz, C=CH), 7.51 (2H, d, J = 8.9, ArH), 7.42 (2H, d, J = 8.6, ArH), 7.25 (1H, d, J = 15.5 Hz, C=CH), 6.66 (2H, d, J = 8.9, ArH), 3.02 (6H, s, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm 189.2, 152.1, 146.3, 138.4, 137.3, 130.5, 129.7, 128.7, 122.4, 116.1, 111.7, 40.1.

(E)-1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (EM_2a): Pó amorfo amarelo. Rendimento: 77%. Pf 90–94 °C. ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm 12.93 (1H, s, OH), 7.88 (1H, dd, J = 2.3, 8.6 Hz, ArH), 7.84 (1H, d, J = 15.5 Hz, C=CH), 7.59 (2H, d, J = 8.6 Hz, ArH), 7.53 (1H, d, J = 15.5 Hz, C=CH), 7.48–7.43 (1H, m, ArH), 7.00 (1H, d, J = 8.4 Hz, ArH), 6.98 (2H, d, J = 8.4 Hz, ArH), 7.01–6.90 (1H, m, ArH), 3.83 (3H, s, OCH_3); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm 193.6, 163.5, 162.0., 145.3, 136.1, 130.5, 129.5, 127.3, 120.1, 118.7, 118.5, 117.5, 114.5, 55.4.



(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona (EM_2b): Pó amorfo amarelo. Rendimento: 71%. Pf 138–140 °C. ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm 12.87 (1H, s, OH), 7.85 (1H, J = 1.7, 8.1 Hz, ArH), 7.78 (1H, d, J = 15.5 Hz, ArH), 7.46 (1H, ddd, J = 1.7, 7.9, 8.1 Hz, ArH), 7.42 (1H, d, J = 15.5 Hz, ArH), 7.14 (1H, d, J = 1.7 Hz, ArH), 7.10 (1H, dd, J = 1.7, 8.1 Hz, ArH), 7.00 (1H, d, J = 8.1 Hz, ArH), 6.90 (1H, t, J = 7.2, 7.5 Hz, ArH), 6.82 (1H, d, J = 7.9 Hz, ArH), 6.00 (2H, s, $-\text{OCH}_2\text{O}$); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm 193.5, 163.5, 150.2, 148.5, 145.3, 136.2, 129.5, 129.0, 125.7, 120.0, 118.7, 118.5, 117.9, 108.7, 106.7, 101.7.

(E)-3-(4-(dimetilamino)fenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona (EM_2c): Cristais roxo. Rendimento: 82 %. Pf 178–181 °C. ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm 13.21 (1H, s, OH), 7.91 (1H, d, J = 15.4, C=CH), 7.87 (1H, d, J = 5.2 Hz, ArH), 7.53 (2H, d, J = 8.9 Hz, ArH), 7.45 (1H, d, J = 5.2 Hz, ArH), 7.40 (1H, d, J = 15.4, C=CH), 6.98 (1H, d, J = 7.9 Hz, ArH), 6.90 (1H, t, J = 7.7 Hz, ArH), 6.65 (2H, d, J = 8.9 Hz, ArH), 3.02 (6H, s, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm 193.4, 163.4, 152.2, 146.5, 135.5, 130.8, 129.3, 122.2, 120.3, 118.5, 118.3, 114.1, 111.7, 40.0.

(E)-1-(5-cloro-2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (EM_3a): Pó amorfo amarelo. Rendimento: 90%. Pf 108–109 °C. ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm 12.86 (1H, s, OH), 7.88 (1H, d, J = 15.5, C=CH), 7.82 (1H, s, ArH), 7.61 (2H, d, J = 8.1 Hz, ArH), 7.42–7.38 (2H, d, J = 15.5, C=CH, ArH), 6.94 (3H, m, ArH), 3.84 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ ppm 192.2, 161.9, 161.6, 146.0, 135.4, 130.4, 128.3, 126.6, 122.9, 120.3, 119.7, 116.3, 114.1, 55.0.

(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(5-cloro-2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona

(EM_3b): Pó amorfo amarelo. Rendimento 87%. Mp 142–146. ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm 12.77 (1H, s, OH), 7.84 (1H, d, J = 15.3 Hz, C=CH), 7.81 (1H, d, J = 2.5 Hz, ArH), 7.39 (1H, d, J = 8.9, 2.5 Hz, ArH), 7.36 (1H, d, J = 15.3 Hz, C=CH), 7.19 (1H, d, J = 1.7 Hz, ArH), 6.94 (1H, d, J = 8.9 Hz, ArH), 6.84 (1H, J = 8.1 Hz, ArH), 6.05 (2H, s, $-\text{OCH}_2\text{O}$); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ ppm 192.6, 162.1, 150.7, 148.6, 146.5, 136.0, 128.8, 128.7, 126.2, 123.5, 120.2, 120.06, 117.3, 108.9, 106.9, 101.9.



(E)-1-(5-cloro-2-hidroxifenil)-3-(4-(dimetilamino)fenil)prop-2-en-1-ona (EM_3c):

Cristal roxo. Rendimento 82%. Mp 161–163 °C. ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm 13.14 (1H, s, OH), 7.92 (1H, d, J = 15.1 Hz, C=CH), 7.81 (1H, d, J = 2.1 Hz, ArH), 7.54 (2H, d, J = 8.7 Hz, ArH), 7.41 (1H, dd, J = 8.8, 2.2 Hz, ArH), 7.32 (1H, d, J = 15.1 Hz, C=CH), 6.94 (1H, d, J = 8.8 Hz, ArH), 6.65 (2H, d, J = 8.7 Hz, ArH), 3.03 (6H, s, $-\text{OCH}_3$); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm 192.4, 162.0, 152.6, 147.6, 135.4, 131.2, 128.6, 123.2, 122.1, 121.1, 120.1, 113.4, 111.8, 40.1.

(E)-1-(5-flúoro-2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (EM_4a):

Pó amorfo amarelo. Rendimento 84%. Mp 124–125 °C. ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm 12.64 (1H, s, OH), 7.91 (1H, d, J = 15.3 Hz, C=CH), 7.62 (2H, J = 8.7 Hz, ArH), 7.59 (1H, dd, J = 9.2, 3.0 Hz, ArH), 7.40 (1H, d, J = 15.3 Hz, C=CH), 7.22 (1H, m, ArH), 6.94 (3H, m, ArH), 3.8 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm 192.7, 162.2, 159.6, 156.4, 146.2, 130.7, 127.0, 123.4, 119.7, 119.7, 116.9, 114.5, 114.2, 55.4.

(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(5-flúoro-2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona

(EM_4b): Pó amorfo amarelo. Rendimento 77%. Mp 168–171 °C. ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm 12.61 (1H, s, OH), 7.89 (1H, d, J = 15.3 Hz, C=CH), 7.58 (1H, dd, J = 9.2, 2.8 Hz, ArH), 7.38 (1H, d, J = 15.3 Hz, C=CH), 7.29 (1H, m, 1H), 7.23–7.15 (2H, m, ArH), 7.01 (1H, dd, J = 9.1, 4.6 Hz, ArH), 6.88 (1H, d, J = 7.9 Hz, ArH), 6.05 (2H, s, $-\text{OCH}_2\text{O}$); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm 192.7, 159.8, 156.5, 150.6, 148.6, 146.3, 128.9, 126.1, 123.9, 119.9, 117.5, 114.3, 108.9, 106.9, 101.9.

(E)-3-(4-(dimetilamino)fenil)-1-(5-flúoro-2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona (EM_4c):

Cristal vermelho. Rendimento 96%. Mp 186–189 °C. ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm 12.95 (1H, s, OH), 7.94 (1H, d, J = 15.1 Hz, C=CH), 7.56 (3H, d, J = 8.7 Hz, ArH), 7.31 (1H, d, J = 15.1 Hz, C=CH), 7.20–7.15 (1H, m, ArH), 6.97 (1H, dd, J = 4.5, 9.1 Hz, ArH), 6.68 (2H, d, J = 8.5 Hz, ArH), 3.04 (6H, s, $-\text{OCH}_3$); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm 192.6, 159.7, 156.5, 152.7, 147.6, 131.2, 122.9, 122.2, 119.7, 119.6, 114.3, 113.6, 111.9, 40.2.

3-hidroxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromeno-4-ona (EM_f12a):

Pó amorfo amarelo. Rendimento 71%. Mp 233–235 °C. ^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ ppm 9.23 (1H, s, OH), 8.17 (2H, dt, J = 8.9, 3.0, 2.1 Hz, ArH), 8.10 (1H, dd, J = 6.3, 1.5 Hz, ArH), 7.76



(1H, dt, $J = 7.8, 1.0$ Hz, ArH), 7.71 (1H, dd, $J = 8.6, 1.0$ Hz, ArH), 7.45 (1H, dt, $J = 7.8, 1.0$ Hz, ArH), 7.11 (2H, dt, $J = 8.9, 3.0, 2.1$ Hz, ArH), 3.84 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ ppm 172.4, 160.3, 154.3, 145.5, 137.9, 133.2, 129.2, 124.5, 124.2, 123.4, 121.2, 118.0, 113.9, 55.2.

2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-hidroxi-4H-cromeno-4-ona (EM_f12b): Pó amarelo. Rendimento 70%. Mp 213–215 °C. ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ ppm 9.52 (1H, s, OH), 8.10 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.84 (1H, dd, $J = 8.5, 1.6$ Hz, ArH), 7.78–7.75 (3H, m, ArH), 7.47 (1H, td, $J = 8.1, 6.4, 1.7$ Hz, ArH), 7.11 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, ArH), 6.12 (2H, s, $-\text{OCH}_2\text{O}$); ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ ppm 172.6, 154.3, 148.5, 147.5, 145.0, 138.3, 133.5, 125.0, 124.6, 122.7, 121.2, 118.3, 108.4, 107.5, 101.6.

2-(4-(dimetilamino)fenil)-3-hidroxi-4H-cromeno-4-ona (EM_f12c): Cristal laranja. Rendimento 79%. Mp 182–183 °C. ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ ppm 9.16 (1H, s, OH), 8.12 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, ArH), 8.09 (1H, dd, $J = 7.8, 1.4$ Hz, ArH), 7.69–7.75 (2H, m, ArH), 7.44 (1H, t, $J = 7.3, 7.4$ Hz, ArH), 6.83 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, ArH), 2.99 (6H, s, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$); ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ ppm 171.9, 154.2, 151.0, 146.8, 137.2, 133.0, 128.9, 124.6, 124.3, 121.4, 118.1, 117.9, 111.4, 39.6.

6-cloro-3-hidroxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromeno-4-ona (EM_f13a): Pó amarelo. Rendimento 86%. Mp 207–208 °C. ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ ppm 9.44 (1H, s, OH), 8.19 (2H, dt, $J = 9.2, 2.9$ Hz, ArH), 8.02 (1H, t, $J = 1.4$ Hz, ArH), 7.79 (2H, d, $J = 1.8$ Hz, ArH), 7.12 (2H, dt, $J = 9.2, 2.9$ Hz, ArH), 3.85 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ ppm 171.3, 160.5, 152.8, 146.1, 138.1, 133.1, 129.3, 128.7, 123.1, 122.3, 120.6, 113.9, 55.2.

6-cloro-2-(4-(dimetilamino)fenil)-3-hidroxi-4H-cromeno-4-ona (EM_f13c): Cristal laranja. Rendimento 79%. Mp 235–238 °C. ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ ppm 8.98 (1H, s, OH), 8.11 (2H, dt, $J = 9.1, 3.0$ Hz, ArH), 7.99 (1H, t, $J = 1.7$ Hz, ArH), 7.73–7.71 (2H, m, ArH), 6.83 (2H, dt, $J = 9.1, 3.0$ Hz, ArH), 7.11 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, ArH), 3.01 (6H, s, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$); ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ ppm 170.5, 152.5, 151.0, 147.2, 137.0, 132.4, 128.7, 128.4, 123.1, 122.3, 120.2, 117.4, 111.1, 39.2.



4.4. Ensaios Enzimáticos com a M^{pro} do SARS-CoV-2

A expressão e purificação da enzima M^{pro} foram realizadas pela estudante Mariana Ortiz de Godoy e fornecidas pelo Prof. Dr. Rafael V. C. Guido, do Instituto de Física - São Carlos (Universidade de São Paulo de São Carlos).

Os ensaios enzimáticos foram conduzidos em placas de 96 poços de fundo plano, em triplicata, com fluorescência medida em 320/410 nm utilizando um Cytation 5 Cell Imaging (Biotek). Os testes foram realizados em uma solução tampão de TRIS-HCl 20 mM, pH 7,3, contendo 1 mM de EDTA, 0,5% de DMSO, 5 mM de DTT, 0,01% de Triton X-100, 20 nM da enzima M^{pro} e 10 μ M do substrato MCA-AVLQSGFR-LyS(Dnp)-Lys (Sigma), em um volume final de 100 μ L.

A inibição relativa dos compostos foi calculada com base na taxa inicial de reação na presença de DMSO. A triagem inicial foi realizada a 20 μ M devido à baixa solubilidade dos compostos. O composto EM_3C apresentou solubilidade no tampão do ensaio a 50 μ M, na presença de 5% de DMSO na solução tampão, e também foi testado nessa condição.

Os compostos foram pré-incubados por 10 minutos na presença da enzima, seguida da adição da solução contendo o substrato. A taxa de reação foi monitorada imediatamente por 5 minutos a 37 °C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e conduzidos em duas repetições independentes.



5. Conclusão

Nossas estratégias sintéticas demonstraram ser versáteis, escaláveis, de fácil reprodução e economicamente viáveis, permitindo a obtenção de altos rendimentos de derivados de flavonoides. No entanto, os compostos avaliados não apresentaram atividade significativa, sendo a maior inibição da M^{pro} observada de $31 \pm 1\%$ para o composto EM_3C, o que justificou a não realização de testes adicionais.

A comparação com dados da literatura revelou que flavonoides potencialmente ativos possuem um elevado número de substituições por grupos hidroxila ou estão na forma de flavonoides glicosilados. Dessa forma, conclui-se que a presença de grupos hidroxila é um fator determinante na relação estrutura-atividade dos flavonoides com a enzima M^{pro} .



6. Referências Bibliográficas

ASSELAH, T. et al. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *Journal of Hepatology*, v. 74, n. 1, p. 168–184, 2021.

BHATTACHARYYA, S.; HATUA, K. Computational insight of the mechanism of Algar-Flynn-Oyamada (AFO) reaction. *RSC Advances*, v. 4, n. 36, p. 18702-18709, 2014.

BOGOCH, I. I. et al. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. *Journal of Travel Medicine*, v. 27, n. 2, p. taaa008, 13 mar. 2020.

BORSARI, C. et al. SAR studies and biological characterization of a chromen-4-one derivative as an anti-*Trypanosoma brucei* agent. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2019.

DA SILVA, F. M. A. et al. Flavonoid glycosides and their putative human metabolites as potential inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease (Mpro) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 115, p. e200207, 2020.

DENNY, B. J.; LAMBERT, P. A.; WEST, P. W. J. The flavonoid galangin inhibits the L1 metallo- β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 208, n. 1, p. 21–24, fev. 2002.

GOMES, M. N. et al. Chalcone derivatives: Promising starting points for drug design. *Molecules*, v. 22, n. 8, p. 1210, 2017.

GULICK, R. M. et al. National Institutes of Health COVID-19 Treatment Guidelines Panel: Perspectives and Lessons Learned. *Annals of Internal Medicine*, v. 177, n. 11, p. 1547-1557, 2024.



HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 96, n. 2-3, p. 67–202, 2002.

KESSLER, A.; KALSKE, A. Plant secondary metabolite diversity and species interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 49, p. 115, 2018.

KHAERUNNISA, S. et al. Potential inhibitor of COVID-19 main protease (Mpro) from several medicinal plant compounds by molecular docking study. *Preprints*, 2020.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, v. 2013, p. 162750, 2013.

LALANI, S.; POH, C. L. Flavonoids as antiviral agents for enterovirus A71 (EV-A71). *Viruses*, v. 3, n. 1, p. 167, 2020.

LIN, L. et al. Plant flavonoid inhibition of SARS-CoV-2 main protease and viral replication. *iScience*, v. 26, n. 9, p. 107602, 10 ago. 2023

MACALINO, S. J. Y. et al. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Archives of Pharmacal Research*, v. 38, p. 1686, 2015.

MACHADO, B. A. S. et al. The main molecular and serological methods for diagnosing COVID-19: an overview based on the literature. *Viruses*, v. 13, n. 40, 2021.

MANCHANAYAKAGE, R. One-pot synthesis of chalcone epoxides via Claisen-Schmidt condensation and epoxidation. *Green Chemistry Experiments in Undergraduate Laboratories*, p. 111–122, 2016.

MEYER, M.; JASPERS, I. Respiratory protease/antiprotease balance determines susceptibility to viral infection and can be modified by nutritional antioxidants.



American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, v. 308, n. 12, p. 1189–1201, 2015.

NOSKE, G. D. et al. Structural basis of nirmatrelvir and ensitrelvir resistance profiles against SARS-CoV-2 main protease naturally occurring polymorphisms. *bioRxiv*, 2022.

OYAMADA, T. A new general method for the synthesis of the derivatives of flavonol. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v. 10, n. 5, p. 182-186, 1935.

PATRIDGE, E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, v. 21, n. 2, p. 204–207, 2016.

RAMSAY, R. R. et al. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clinical and Translational Medicine*, v. 7, n. 1, 2018.

SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6^a ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SONG, J. et al. The comprehensive study on the therapeutic effects of baicalein for the treatment of COVID-19 in vivo and in vitro. *Biochemical Pharmacology*, v. 183, p. 114302, jan. 2021

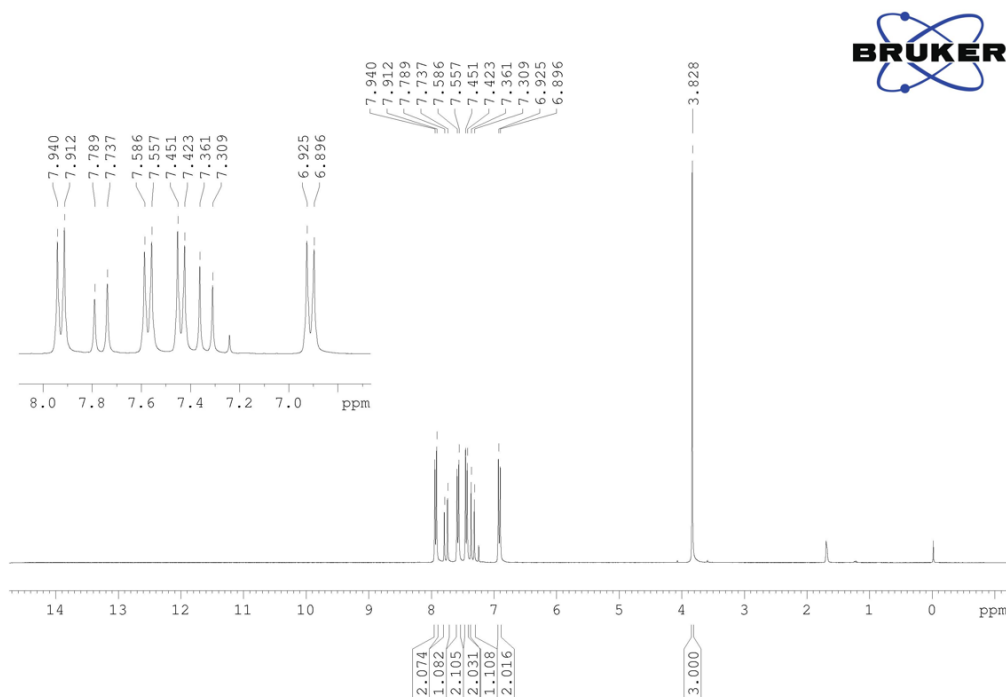
SU, H. X. et al. Discovery of baicalin and baicalein as novel, natural product inhibitors of SARS-CoV-2 3CL protease in vitro. *bioRxiv*, 2020

ZAKARYAN, H. et al. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Archives of Virology*, v. 162, n. 9, p. 2539, 2017.

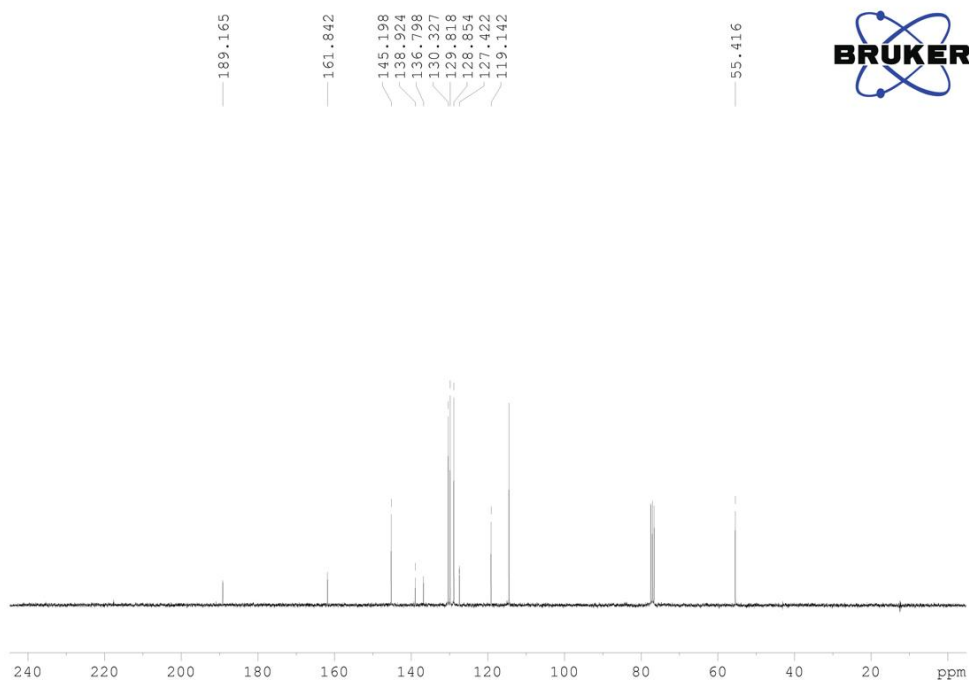


7. ANEXOS 1

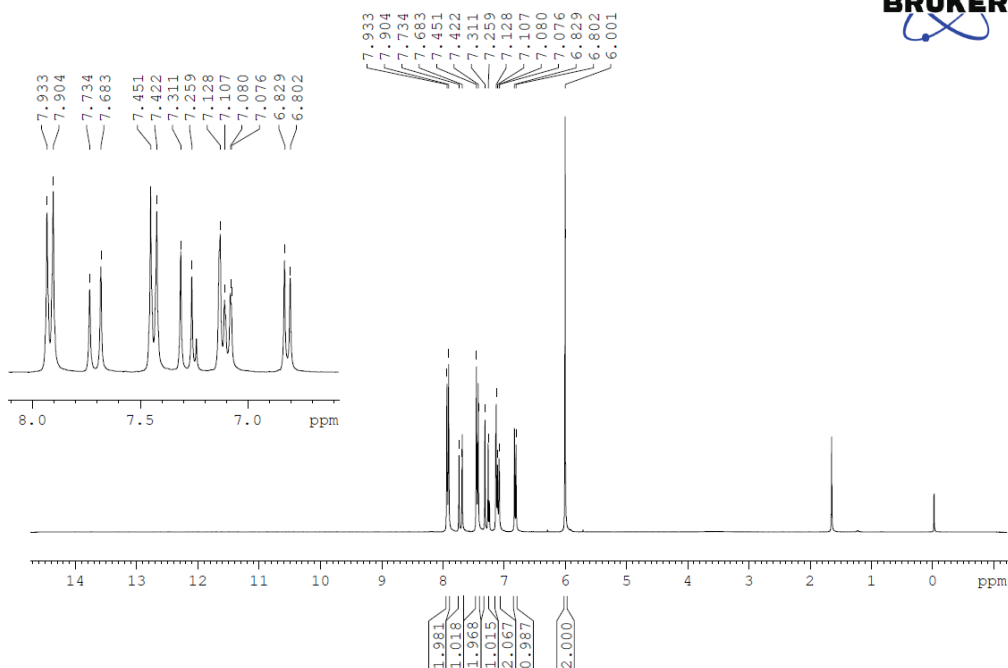
Espectros de RMN ^1H e ^{13}C



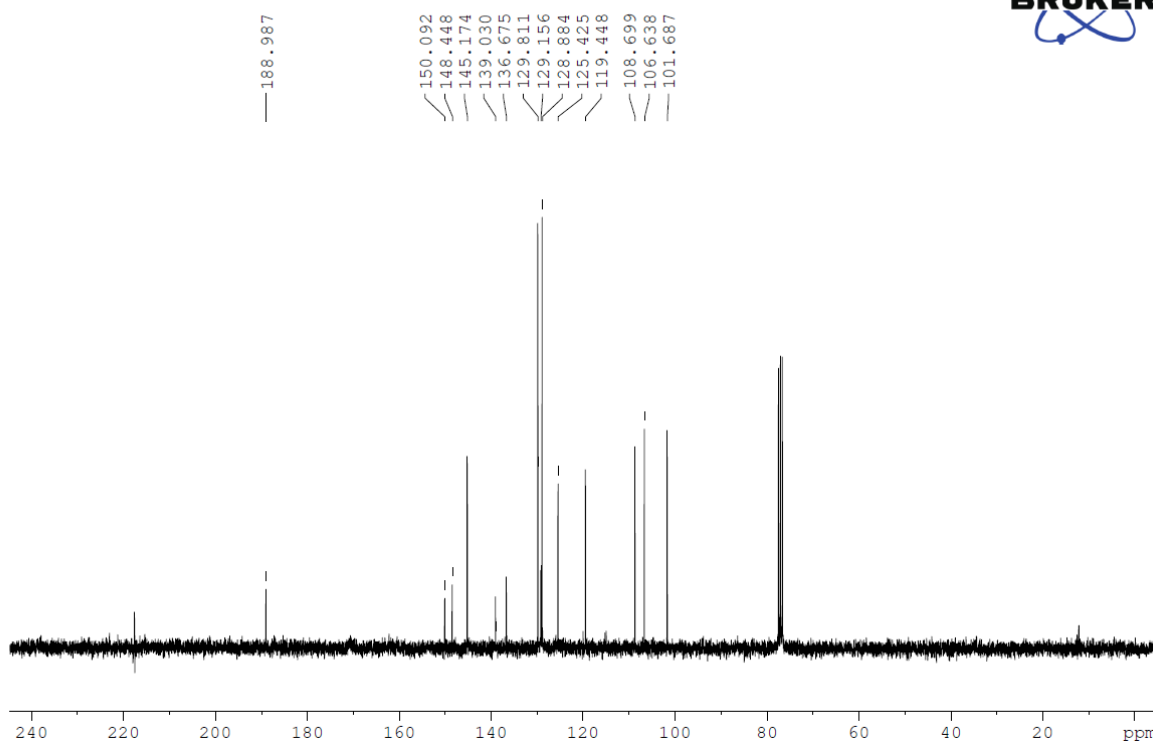
Espectro 6. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto **EM_1a**



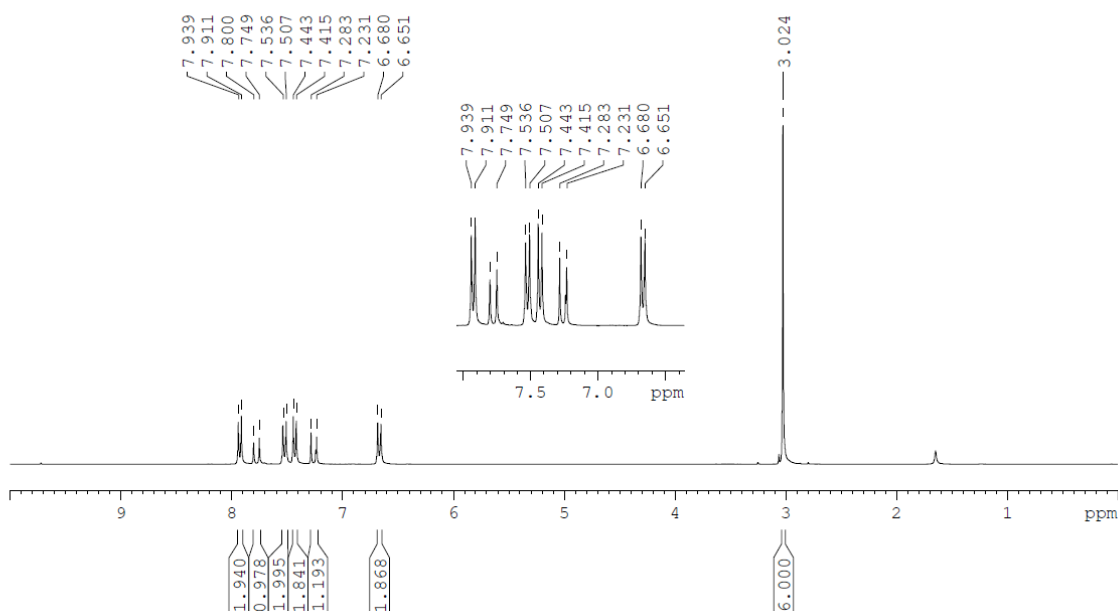
Espectro 7. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto **EM_1a**



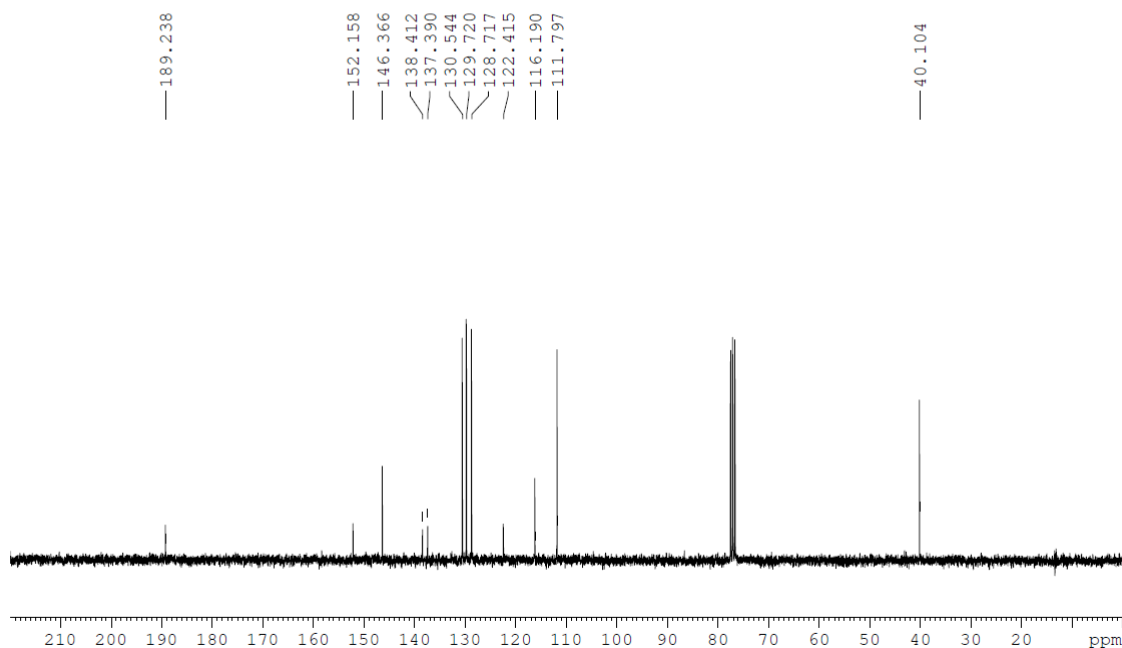
Espectro 8.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto **EM_1b**



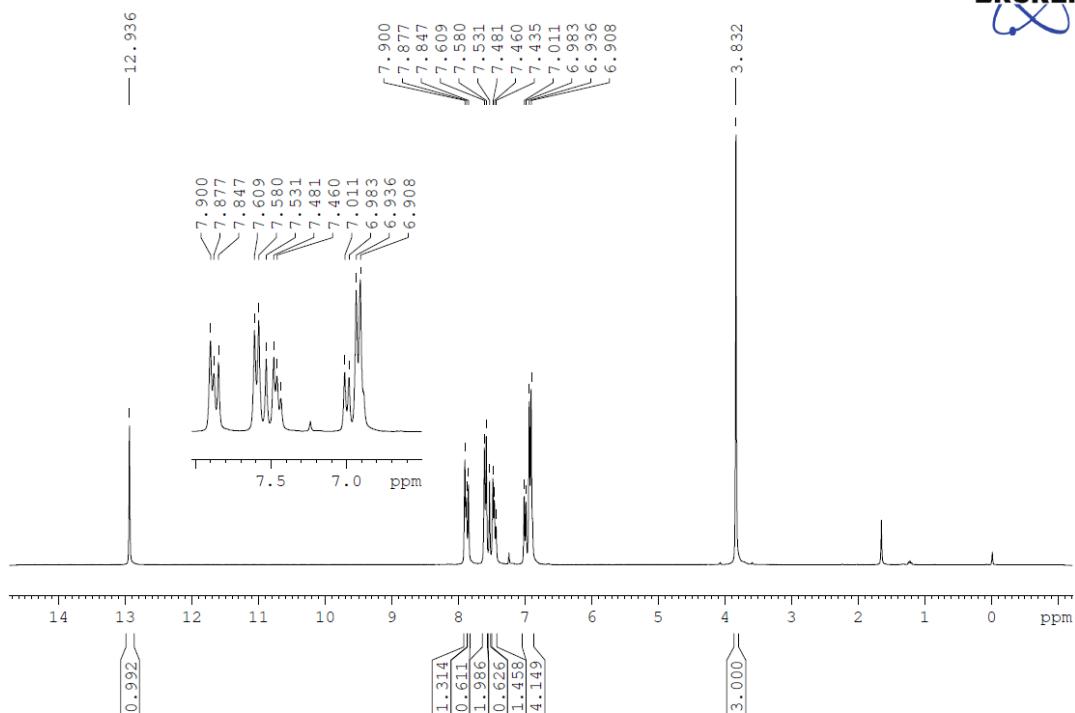
Espectro 9.Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto **EM_1b**



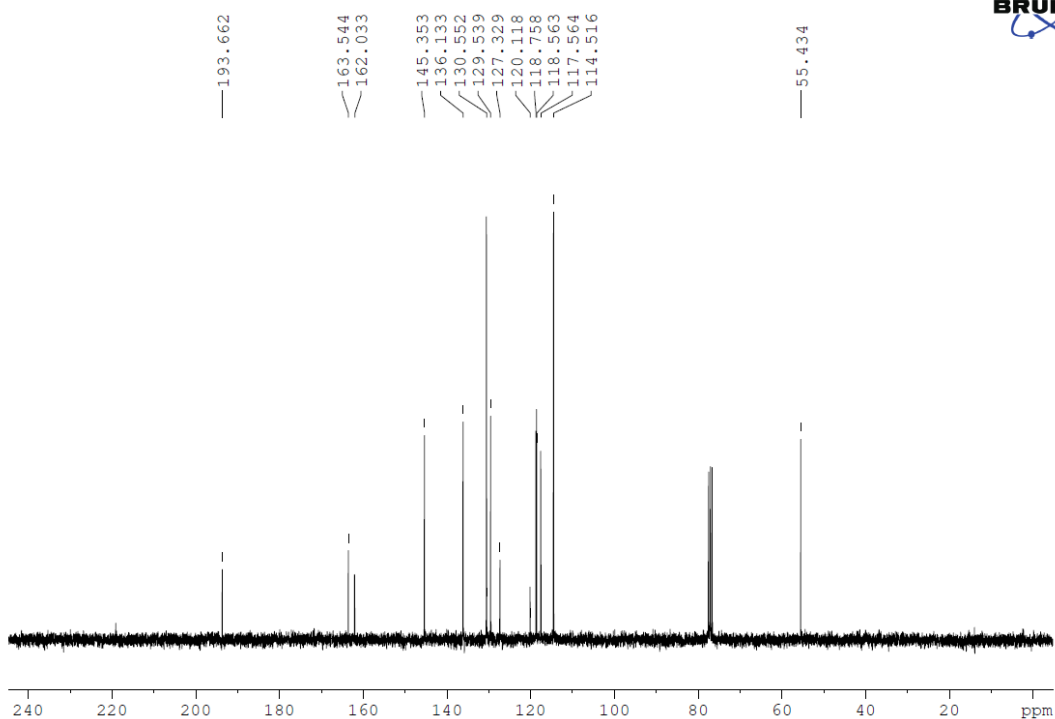
Espectro 10. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_1c



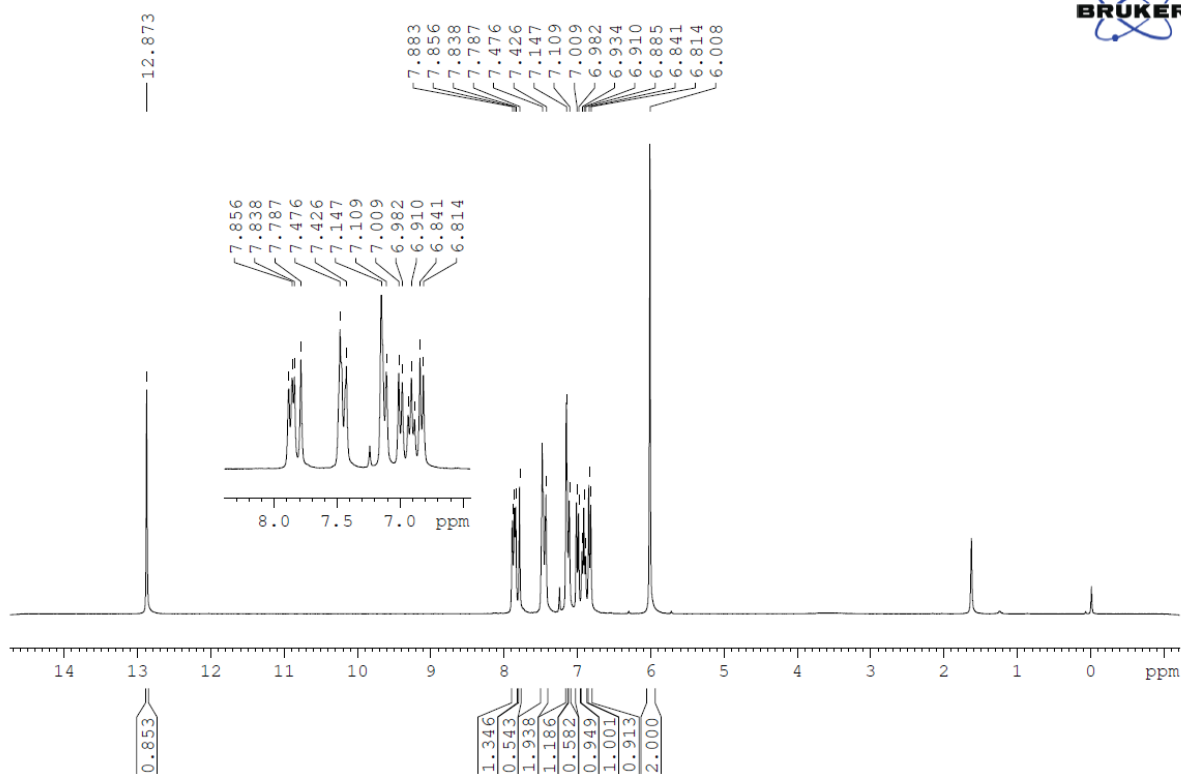
Espectro 11. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_1c



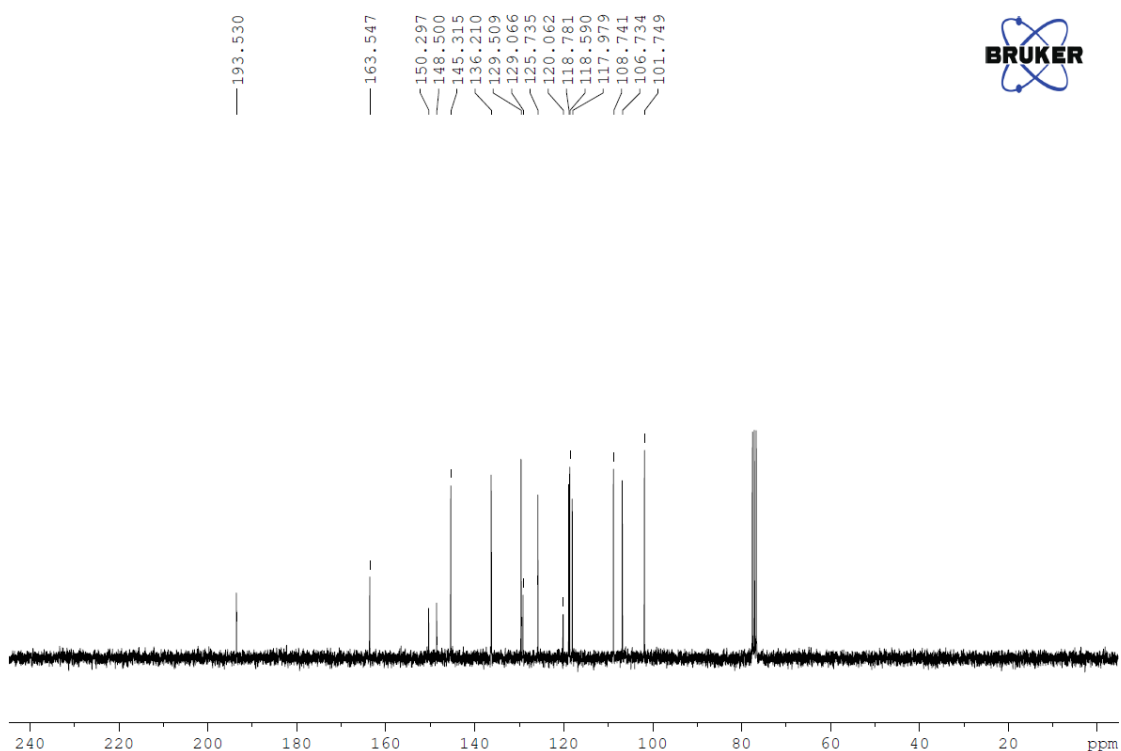
Espectro 12. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_2a



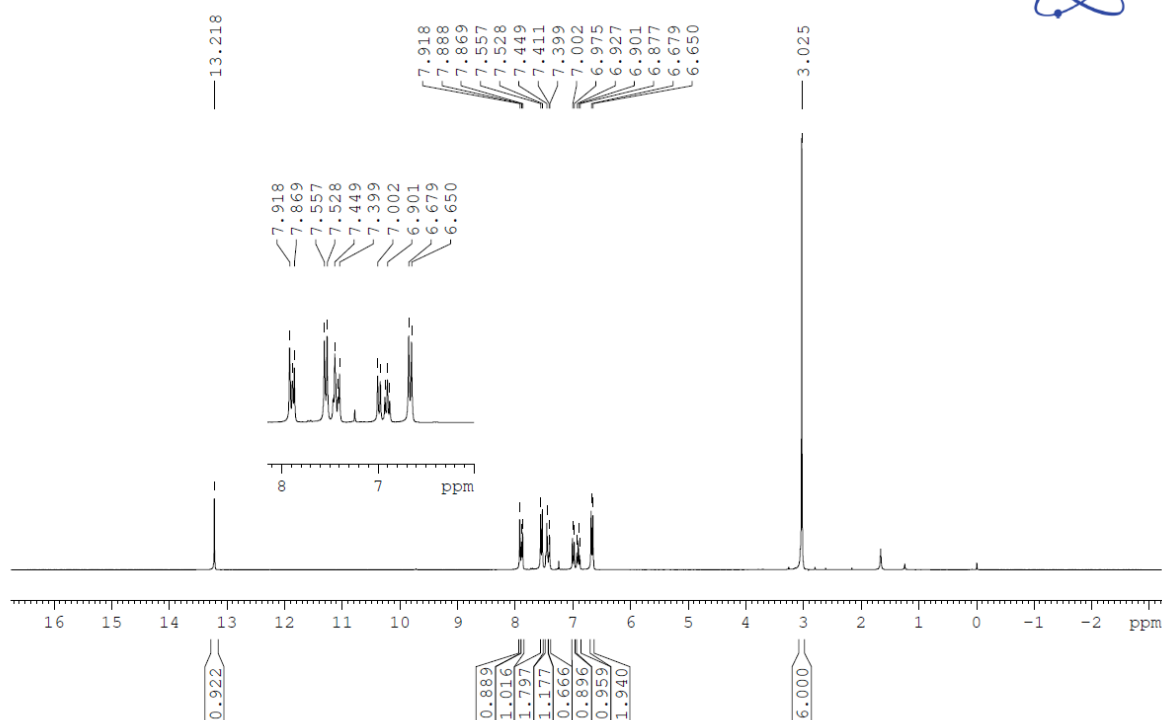
Espectro 13. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_2a



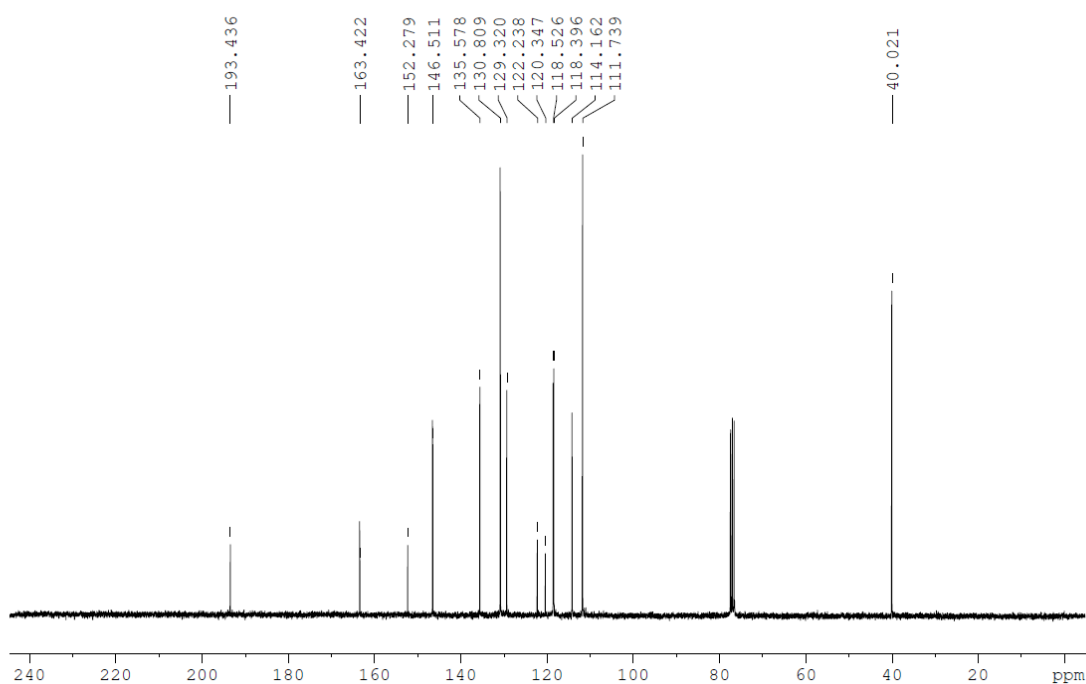
Espectro 14. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz em CDCl₃) do composto EM₂b



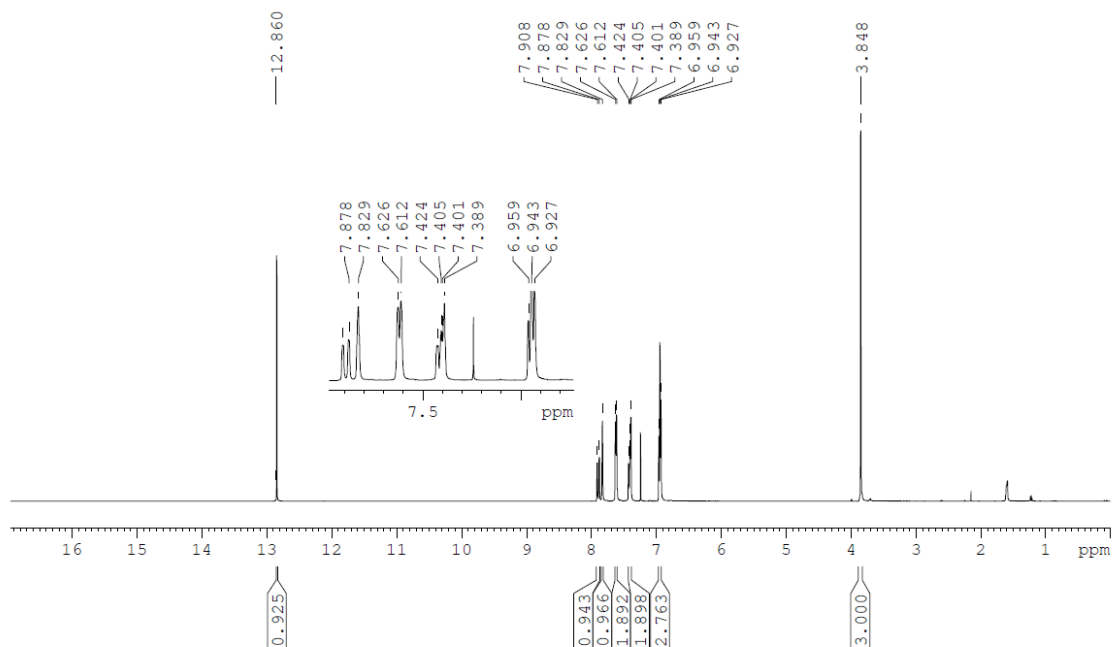
Espectro 15. Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz em CDCl₃) do composto EM₂b



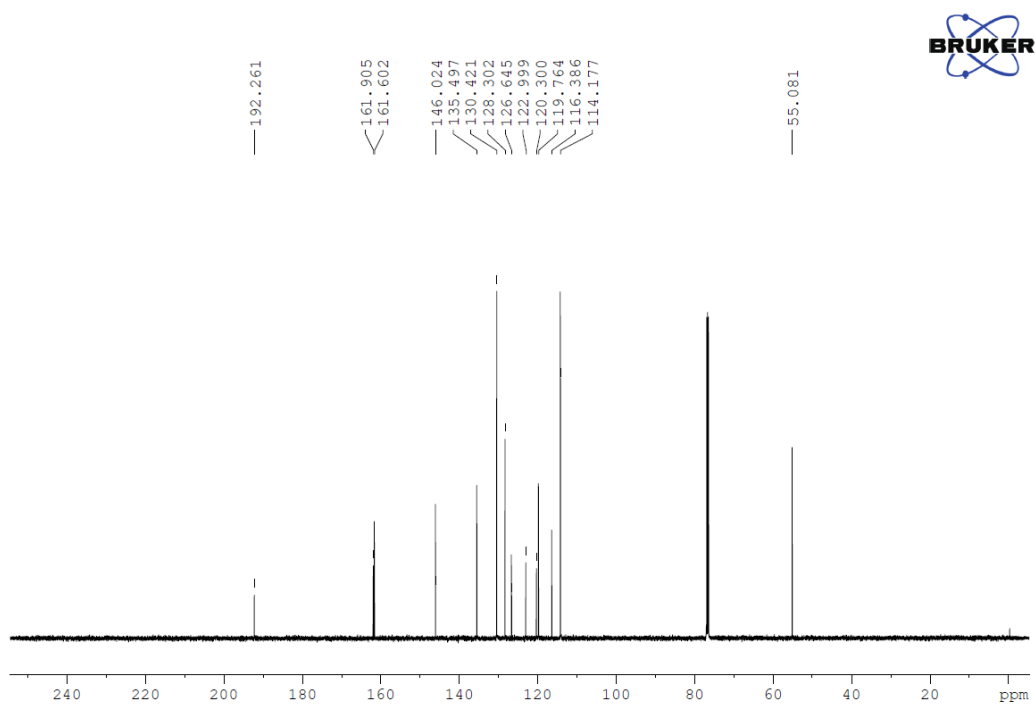
Espectro 16. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_2c



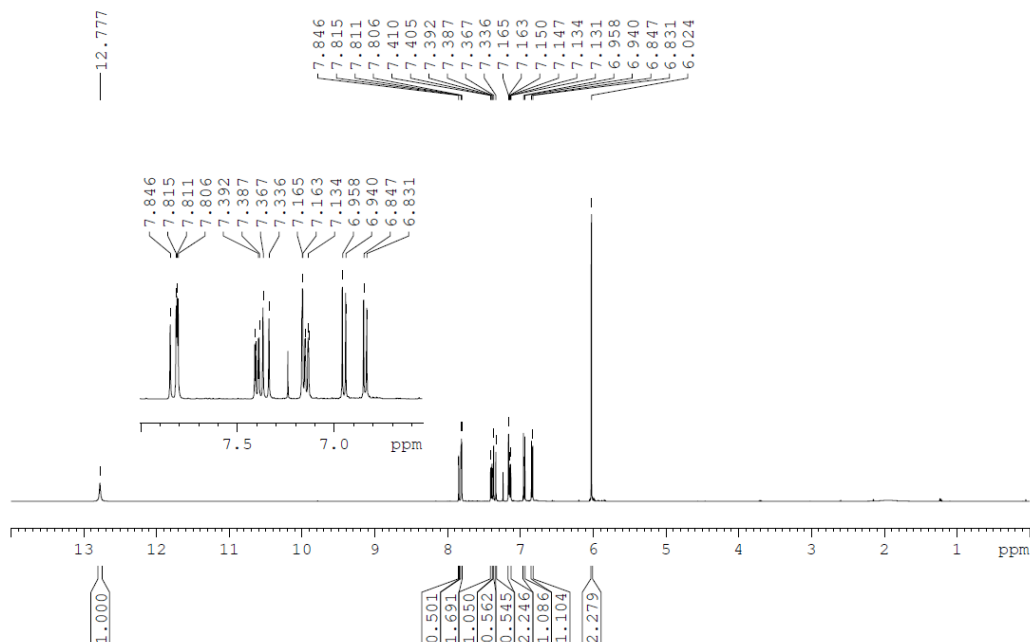
Espectro 17. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_2c



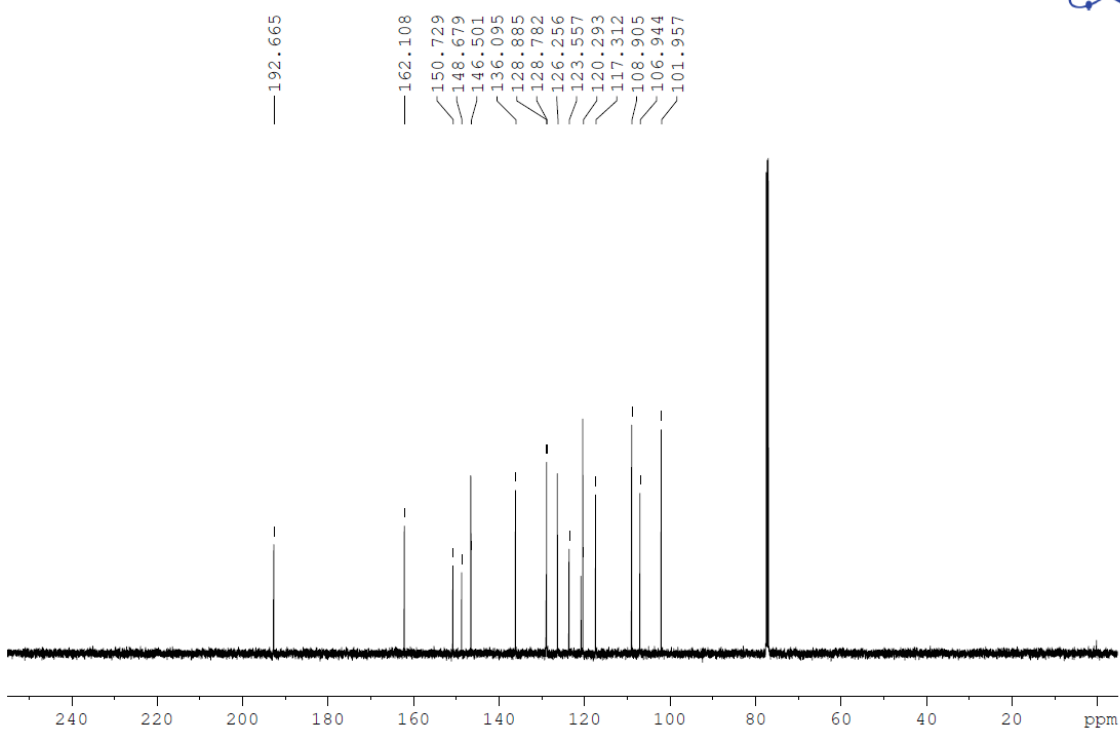
Espectro 18.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_3a



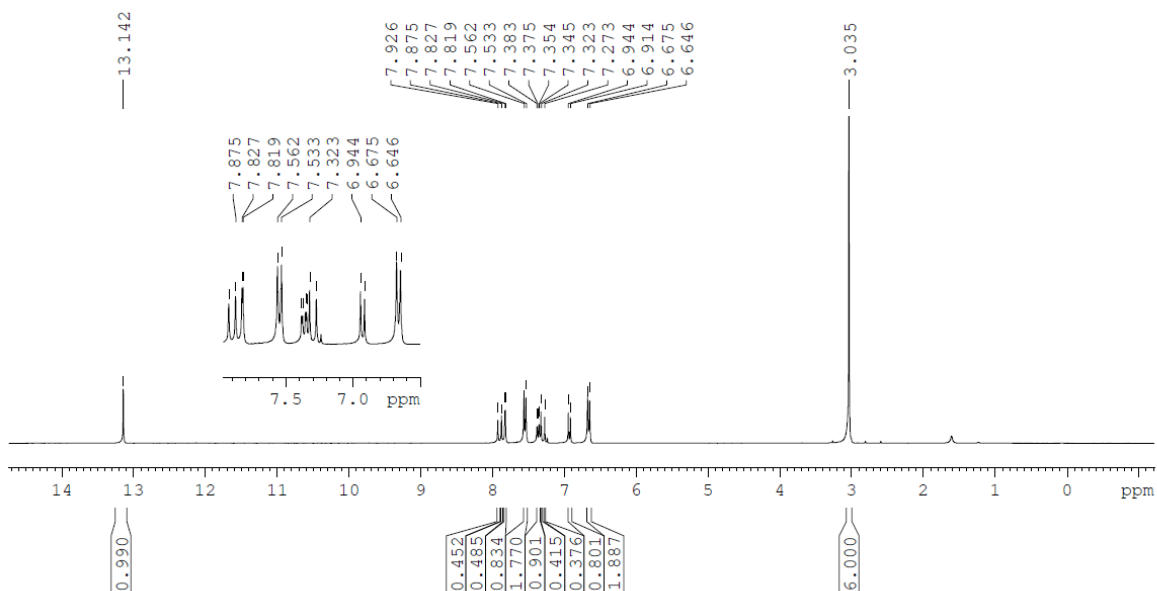
Espectro 19.Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_3a



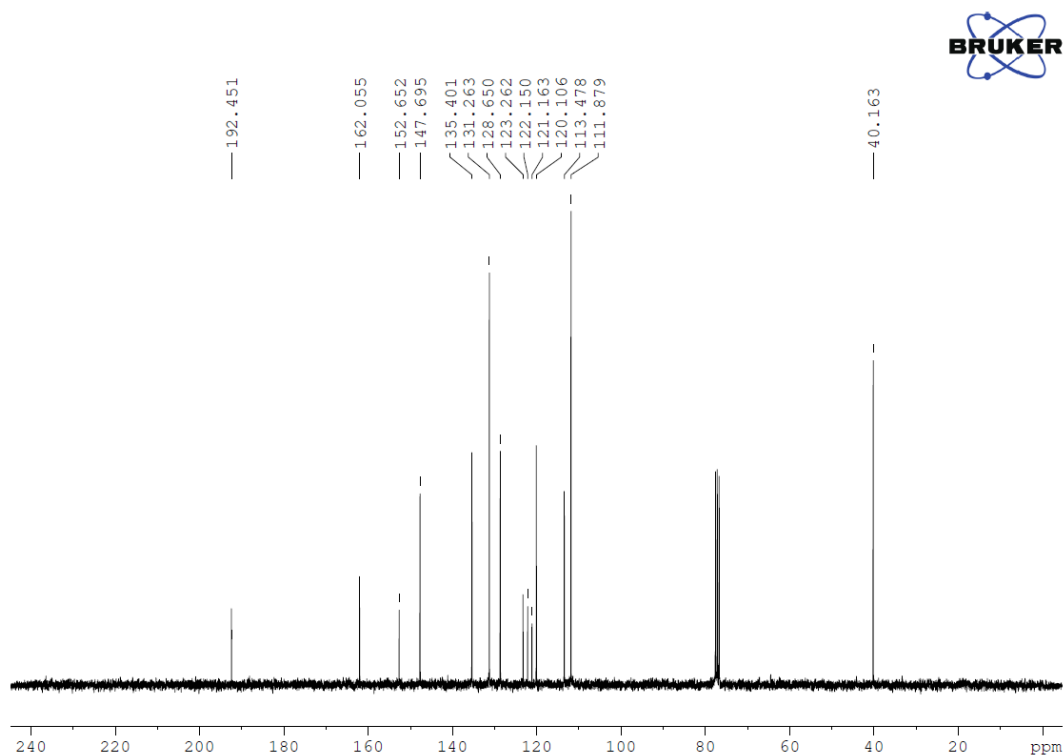
Espectro 20.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_3b



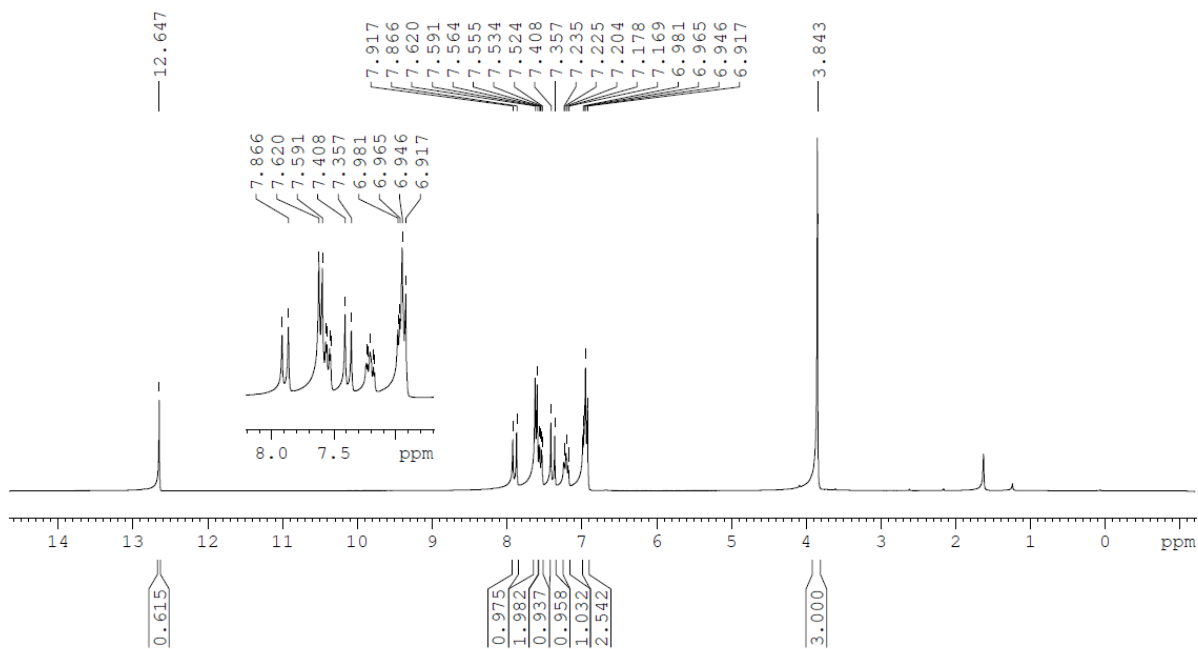
Espectro 21.Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_3b



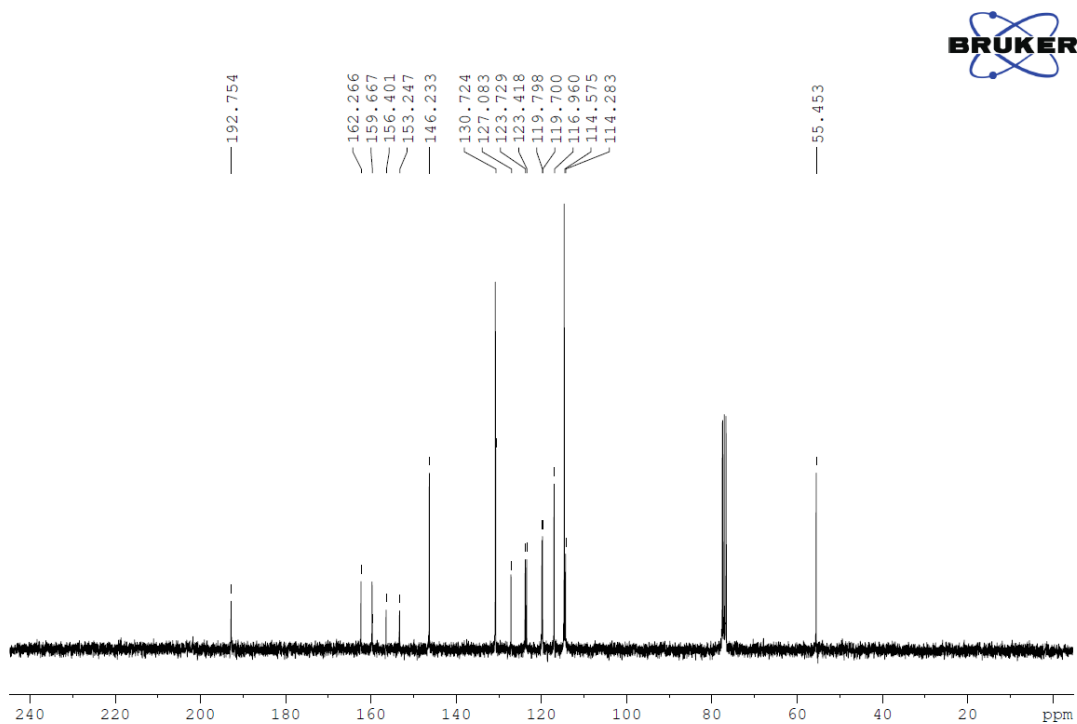
Espectro 22.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto **EM_3c**



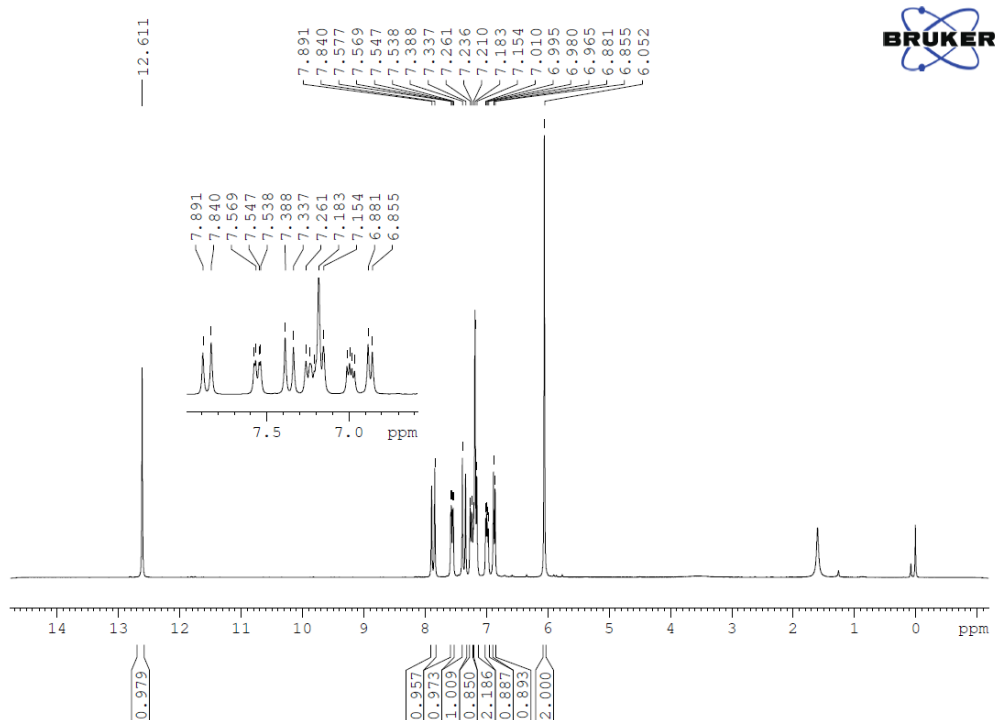
Espectro 23.Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto **EM_3c**



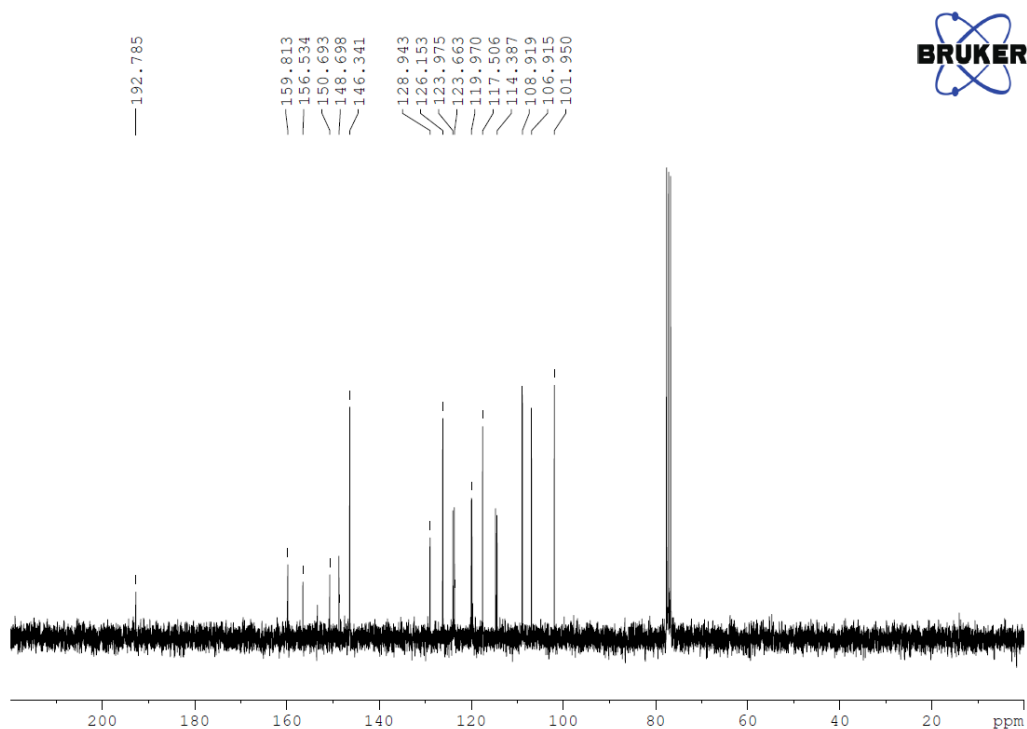
Espectro 24.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto **EM_4a**



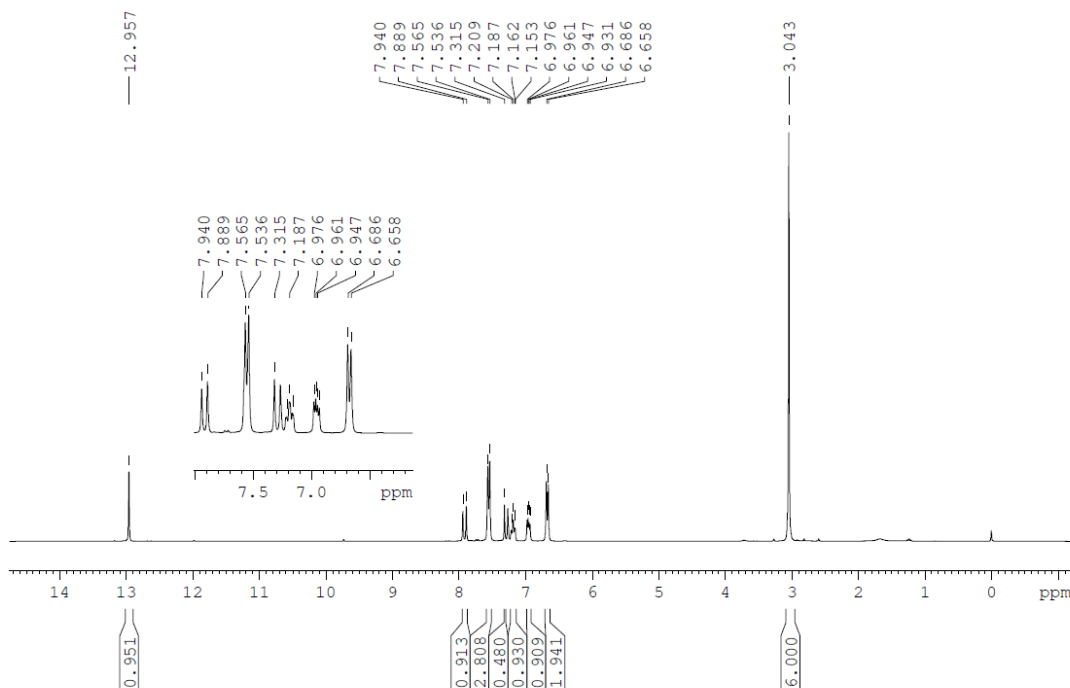
Espectro 25.Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto **EM_4a**



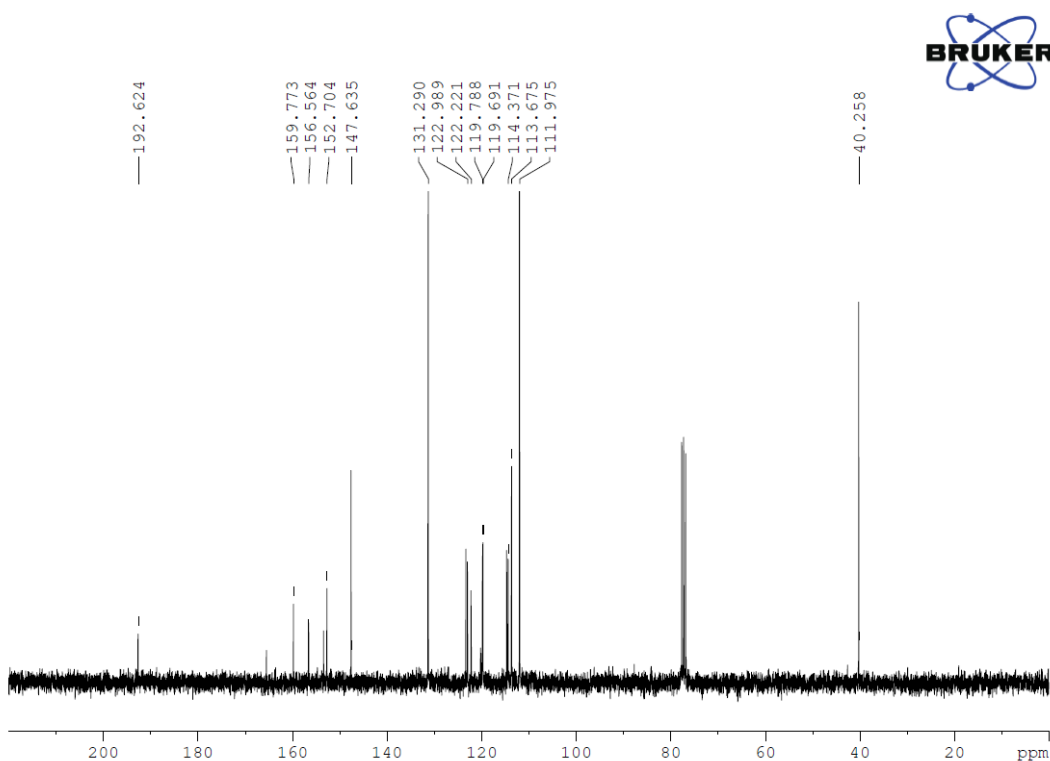
Espectro 26.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_4b



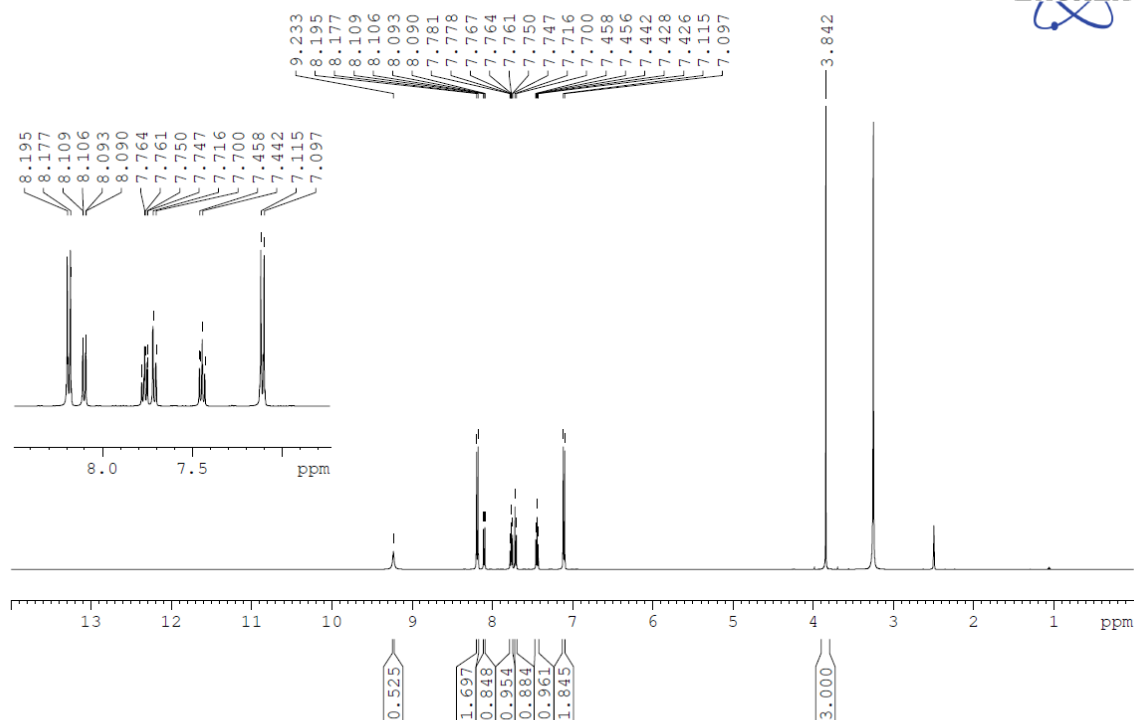
Espectro 27.Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_4b



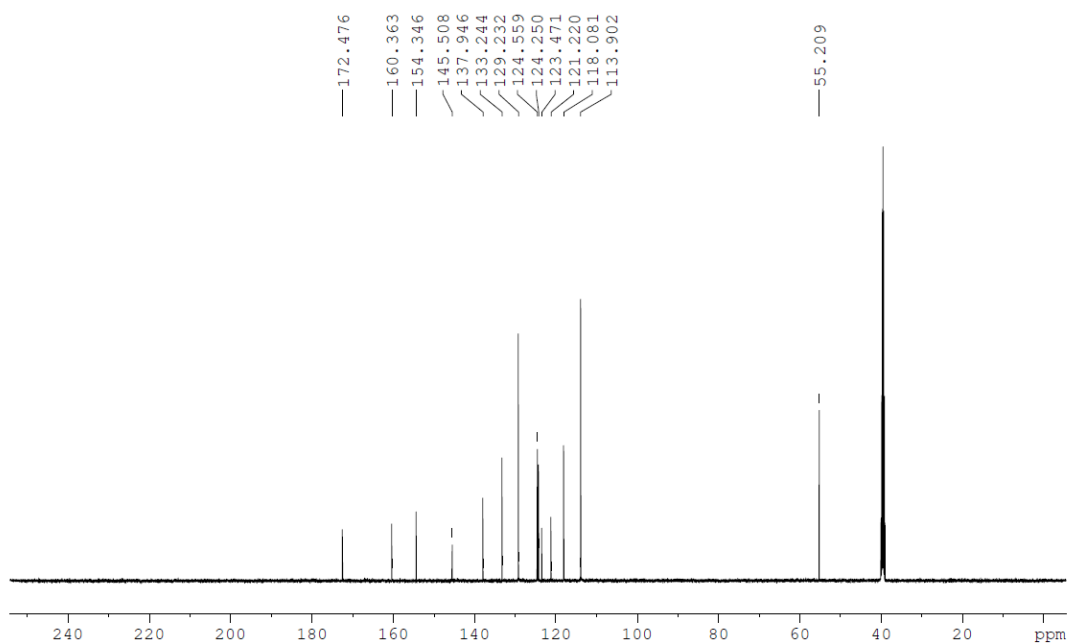
Espectro 28. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em CDCl_3) do composto EM_4c



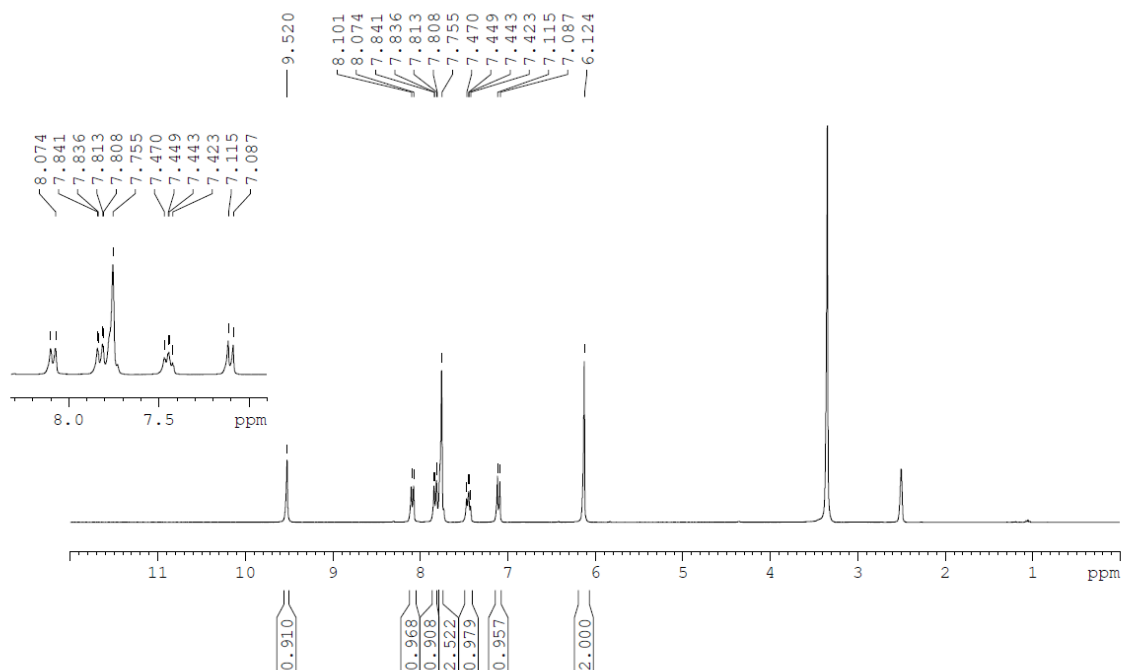
Espectro 29. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) do composto EM_4c



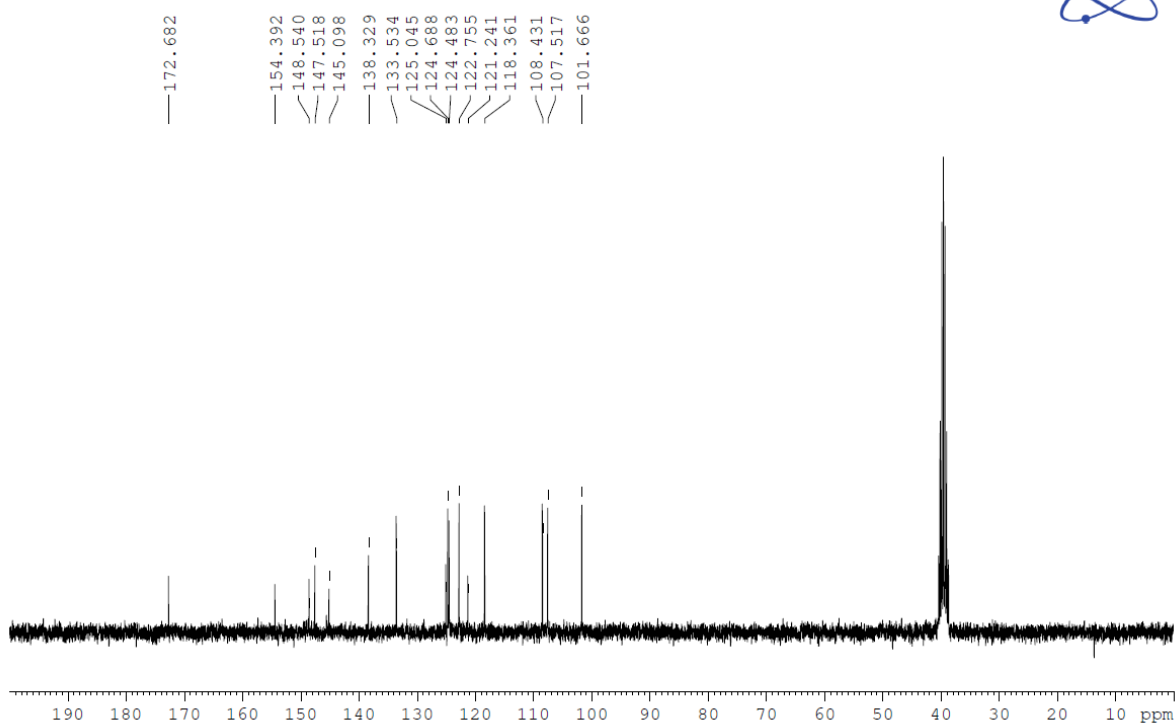
Espectro 30.Espectro de RMN de ¹H (300 MHz em DMSOd₆) do composto EM_F12a



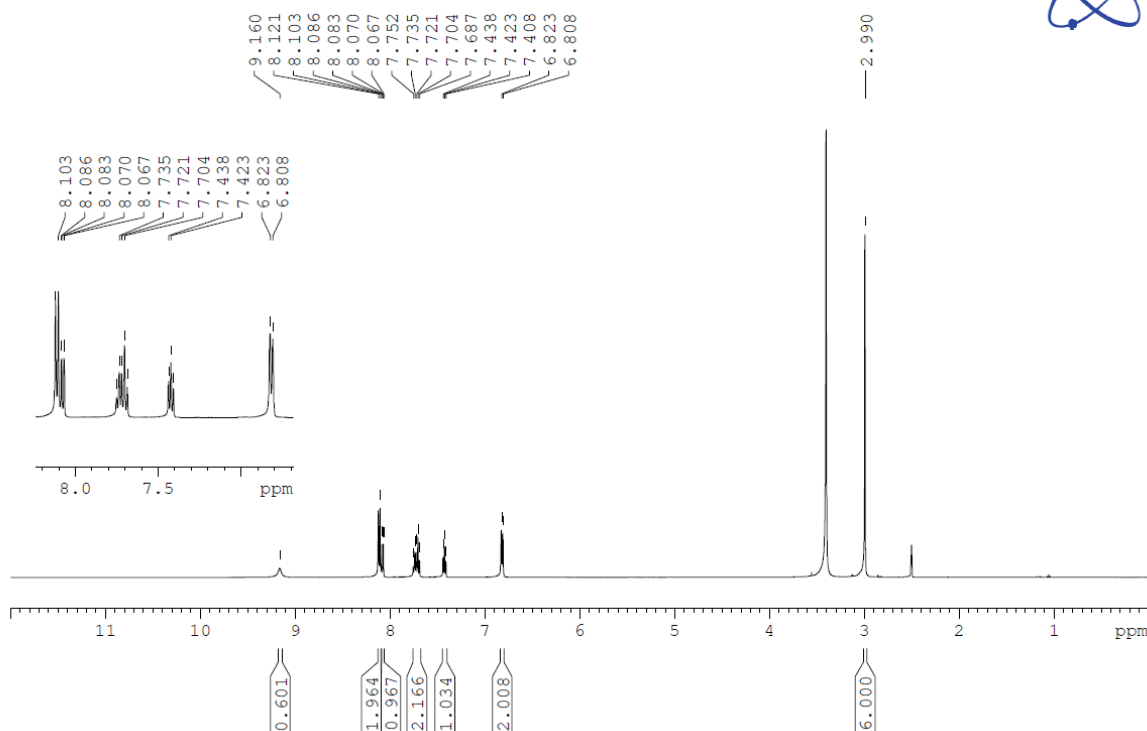
Espectro 31.Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz em DMSOd₆) do composto EM_F12a



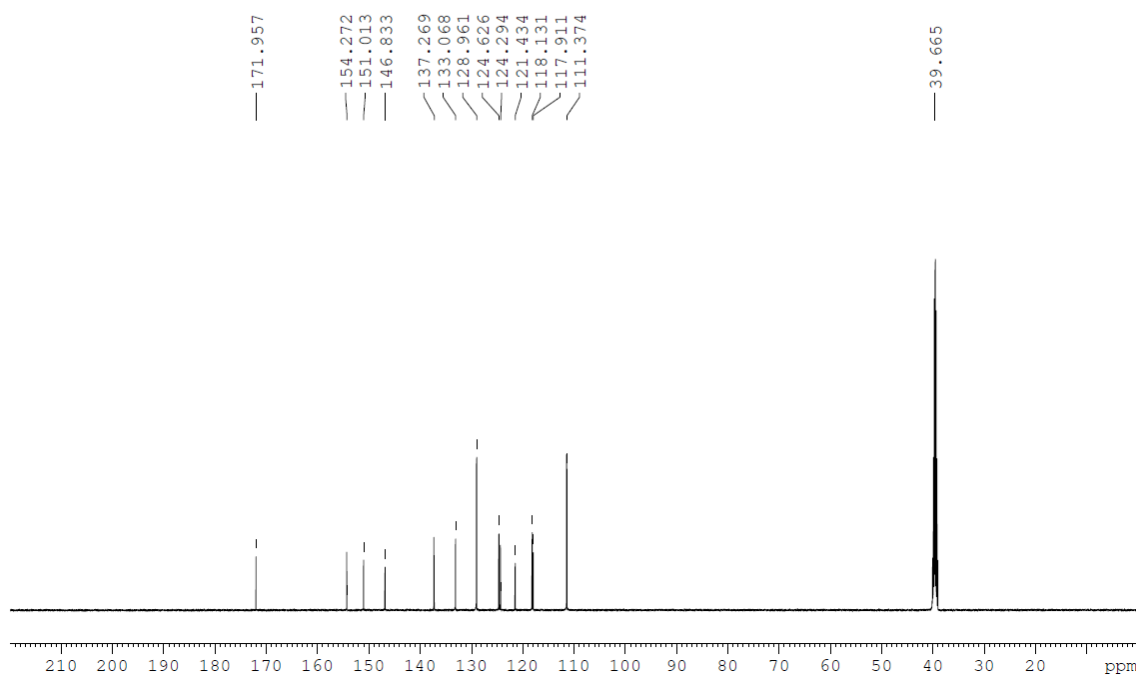
Espectro 32.Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em DMSO-d_6) do composto EM_F12b



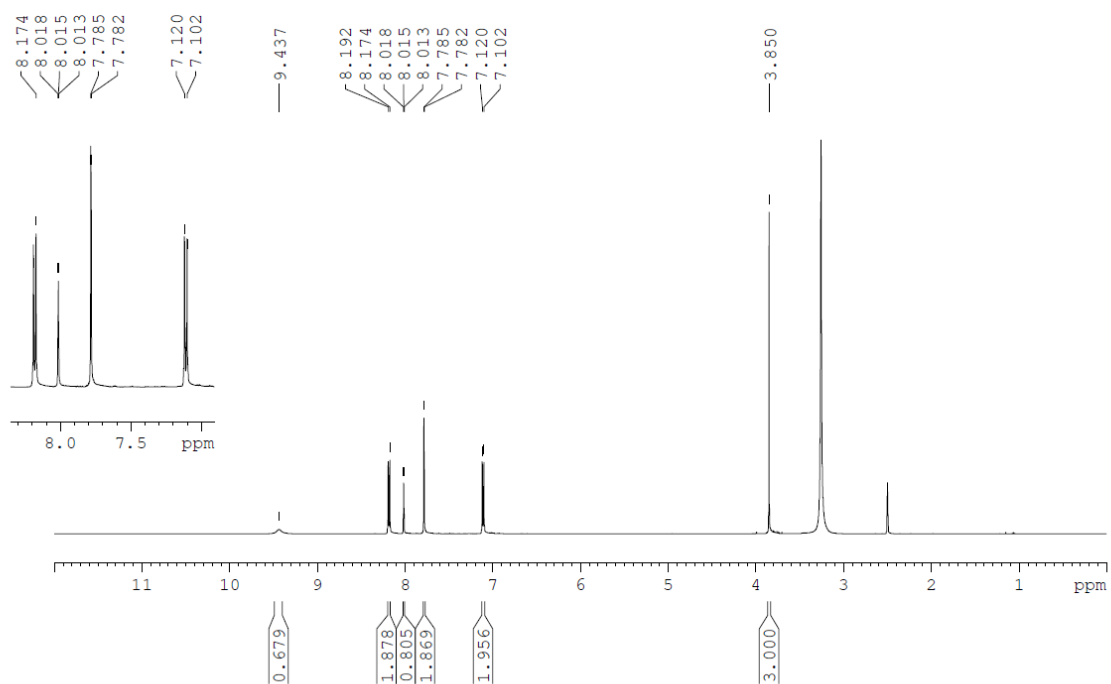
Espectro 33.Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em DMSO-d_6) do composto EM_F12b



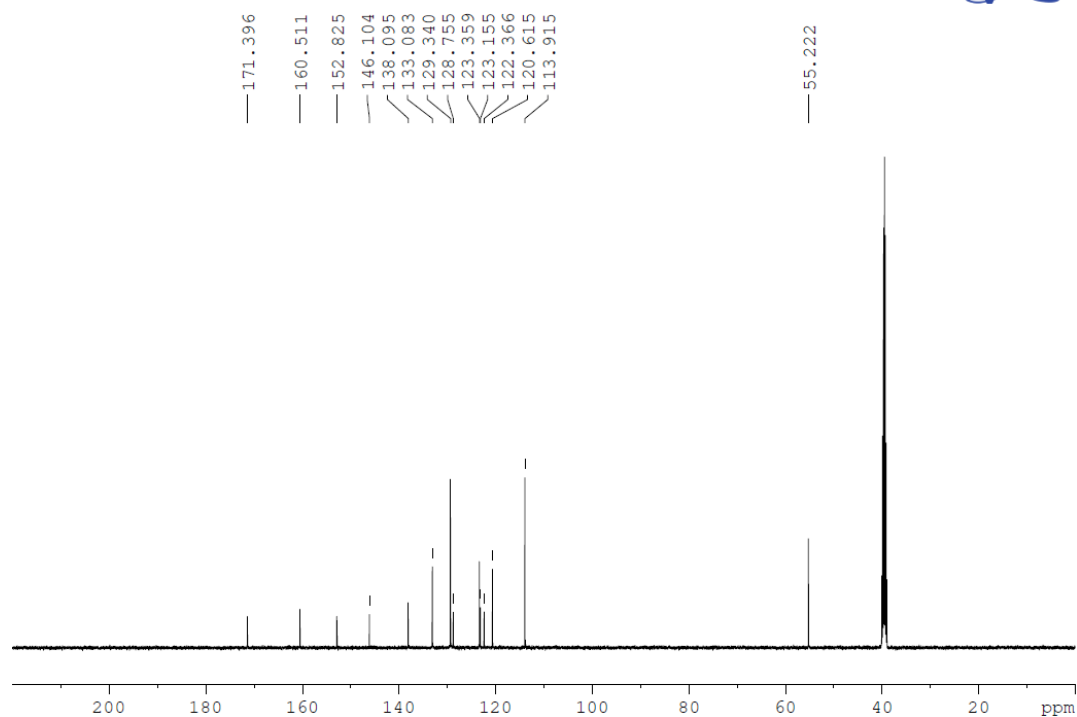
Espectro 34.Espectro de RMN de ^1H (500 MHz em DMSO-d_6) do composto EM_F12c



Espectro 35.Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz em DMSO-d_6) do composto EM_F12c



Espectro 36.Espectro de RMN de ^1H (500 MHz em DMSO-d_6) do composto EM_F13a



Espectro 37.Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz em DMSO-d_6) do composto EM_F13a



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

