

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CÁSSIA MILENE RIBEIRO LOPES

**ABORDAGEM BIOISOSTÉRICA E DE TRIAGEM VIRTUAL PARA IDENTIFICAR
INIBIDORES NATURAIS DA nsP3 DO *ALPHAVÍRUS CHIKUNGUNYA***

Alfenas/MG

2025

CÁSSIA MILENE RIBEIRO LOPES

**ABORDAGEM BIOISOSTÉRICA E DE TRIAGEM VIRTUAL PARA IDENTIFICAR
INIBIDORES NATURAIS DA nsP3 DO *ALPHAVÍRUS CHIKUNGUNYA***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia associada a bioinformática para identificação de alvos terapêuticos

Orientador: Prof. Dr. Nelson José Freitas da Silveira

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Alfenas/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca central

Lopes, Cássia Milene Ribeiro.

Abordagem bioisostérica e de triagem virtual para identificar inibidores naturais da nsp3 do Alphavírus chikungunya / Cássia Milene Ribeiro Lopes.
- Alfenas, MG, 2025.

61 f. : il. -

Orientador(a): Nelson José Freitas Da Silveira.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Chikungunya. 2. Alphavírus. 3. Molecular Docking. 4. Bioisosterismo. I. Da Silveira, Nelson José Freitas , orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo autor.

CÁSSIA MILENE RIBEIRO LOPES

ANÁLISE IN SILICO DE COMPOSTOS NATURAIS COM POTENCIAL AÇÃO ANTIVIRAL FRENTE AO ALPHAVÍRUS
CHIKUNGUNYA

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia

Aprovada em: 21 de fevereiro de 2025.

Prof. Dr. Nelson José Freitas da Silveira
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Breno Régis Santos
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Tiago Henrique
Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto



Documento assinado eletronicamente por **Nelson José Freitas da Silveira, Professor do Magistério Superior**, em 21/02/2025, às 15:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1456652** e o código CRC **EBA74D14**.

A Deus, o motivo da minha existência, a fonte inesgotável de amor e misericórdia. A minha família, em especial a Painho e Mainha - vocês são o meu motivo para continuar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela imensa misericórdia sobre minha vida, por fazer infinitamente mais do que aquilo que pedi ou pensei. Obrigada Pai, por andar comigo, por preparar pessoas para me abençoar, me livrar de todo mal e me sustentar para que eu chegasse até aqui.

A painho e mainha (Miguel e Eliene) e ao meu irmão Maicon, obrigada por me apoiarem, por sonharem os meus sonhos comigo. Obrigada, por me sustentarem em oração – hoje temos a vitória por meio de Deus, esse título é nosso, da nossa família.

A Robério, que mesmo sabendo de todos os desafios que enfrentaríamos, escolheu não soltar a minha mão. Ter você comigo é essencial para vencer os obstáculos da vida, obrigada por ser esse parceiro ímpar.

Agradeço também ao meu orientador Nelson Silveira e ao meu coorientador Luiz Felipe Leomil, os quais me auxiliaram durante todo o processo, me nortearam, tiraram minhas dúvidas e me incentivaram a seguir em frente nesta jornada árdua do conhecimento.

A Leonardo, amigo que o mestrado me deu, eu jamais chegaria até aqui sem a sua contribuição. Você foi a resposta de Deus, para uma oração que fiz pedindo ajuda em meio a tantas dificuldades. A Hilary, José Miguel, Lidiane e demais colegas, ter a companhia de vocês nas aulas tornou esse período menos solitário.

A Iolanda, Ana Livia e família, Júlia, Laudicéia e Letícia, obrigada pela amizade e companheirismo. Ter vocês comigo tornou esse período mais leve. Levarei vocês comigo para sempre!

A Primeira Igreja Batista em Alfenas- em especial ao Pr. Carlos, Leninha e família e aos amigos que ali tanto me acolheram, secaram minhas lágrimas, me receberam como filha, e me mantiveram firmes na presença de Deus. Obrigada por todo cuidado, jamais me esquecerei de vocês!

A Primeira Igreja Batista em Paus Pretos, pelas orações.

À universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade que eu (uma menina do interior da Bahia) tive de crescer e evoluir profissionalmente, de conquistar coisas com as quais eu nunca pude nem sonhar, mediante a realidade de onde vim. A todos os professores, funcionários e colaboradores desta universidade, que fazem as coisas acontecerem e por compartilhar conhecimento com tanta dedicação.

A CAPES e todas as outras agências de fomento, por possibilitar não somente

a mim, mas a tantas outras pessoas a oportunidade de mudarem suas vidas e as vidas de suas famílias por meio da educação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Financiamento 001.

A todos que estiveram ao meu lado e torceram por mim, minha eterna gratidão!

"Em algum lugar, alguma coisa incrível
está esperando para ser descoberta."

(Carl Sagan)

RESUMO

A febre Chikungunya, é caracterizada por quadro febril e dores articulares debilitantes que podem evoluir para a forma crônica. É uma doença ocasionada pelo vírus Chikungunya (CHIKV) transmitida aos humanos pela picada da fêmea do mosquito *Aedes*. Este vírus causa preocupação à saúde pública, visto que, parte da população mundial encontra-se em risco de infecção. Além de trazer efeitos negativos para a sociedade e perdas econômicas consideráveis, o quadro sintomatológico da CHIKV ainda não possui um fármaco específico para o tratamento. Dito isso, este trabalho tem como objetivo, realizar a predição (*in silico*) de compostos naturais que tenham atividade inibitória frente a uma proteína que atua na replicação viral do CHIKV. Utilizou-se a proteína não estrutural 3 do vírus como receptor, e 84.215 ligantes obtidos a partir do banco de dados ZINC20. O software *Autodock Vina* permitiu a realização da ancoragem molecular, pelos programas *LigPlot+* e *PyMol* as interações e estruturas foram observadas; o servidor *pkCSM*, foi propício para as análises de características farmacocinéticas dos compostos, possibilitando a predição de fatores como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME-Tox), por fim, o Bioisosterismo, foi executado através do servidor *MolOpt*, para melhorar a farmacocinética e desempenho dos compostos naturais identificados. Ao final das análises, foram obtidos três bioisósteros, *Chikv_bio1*, *Chikv_bio2*, *Chikv_bio3* que contemplam boas energias de ligação, farmacocinética ideal, e realizam interações com o sítio ativo da proteína, sendo considerados potenciais compostos inibitórios da nsP3. Ademais, testes *in vitro* e *in vivo*, são necessários para confirmar os resultados preditivos aqui expostos, garantindo a continuidade na busca por um fármaco eficaz no tratamento da Chikungunya, doença que atinge parte da população e impacta diretamente na qualidade de vida dos pacientes.

Palavras-chave: Chikungunya; *Alphavirus*; Molecular Docking; Bioisosterismo.

ABSTRACT

Chikungunya fever is characterized by fever and debilitating joint pain that can progress to a chronic form. It is a disease caused by the Chikungunya virus (CHIKV) transmitted to humans through the bite of the female *Aedes* mosquito. This virus is a public health concern, since part of the world's population is at risk of infection. In addition to bringing negative effects to society and considerable economic losses, the symptomatological picture of CHIKV still does not have a specific drug for treatment. That said, this work aims to predict (in silico) natural compounds that have inhibitory activity against a protein that acts on the viral replication of CHIKV. The nonstructural protein 3 of the virus was used as a receptor, and 84,215 ligands obtained from the ZINC20 database. The Autodock Vina software allowed the performance of molecular docking, through the LigPlot+ and PyMol programs the interactions and structures were observed; The pkCSM server was suitable for analyzing the pharmacokinetic characteristics of the compounds, enabling the prediction of factors such as absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). Finally, Bioisosterism was performed through the MolOpt server to improve the pharmacokinetics and performance of the identified natural compounds. At the end of the analyses, three bioisosteres were obtained, Chikv_bio1, Chikv_bio2, Chikv_bio3, which contemplate good binding energies, ideal pharmacokinetics, and interact with the active site of the protein, being considered potential inhibitory compounds of nsP3. Furthermore, in vitro and in vivo tests are necessary to confirm the predictive results presented here, ensuring continuity in the search for an effective drug in the treatment of Chikungunya, a disease that affects part of the population and directly impacts the quality of life of patients.

Keywords: Chikungunya; Alphavirus; Molecular Docking; Bioisosterism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Sinais e sintomas de Chikungunya.....	22
Figura 2 –	Estrutura dos <i>Alphavirus</i>	24
Figura 3 –	Ciclo de replicação do Alphavirus CHIKV.....	25
Figura 4 –	Preparo do receptor.....	34
Figura 5 –	Fluxograma: redocking, ancoragem molecular, análises ADME-Tox E Bioisosterismo.....	37
Figura 6 –	<i>Redocking</i>	39
Figura 7 –	Estruturas 2D dos dez compostos naturais com melhores energias de ligação e o composto controle.....	41
Figura 8 –	Compostos ligados ao sítio ativo da molécula alvo (parte 1).....	45
Figura 9 –	Compostos ligados ao sítio ativo da molécula alvo (parte 2).....	46
Figura 10 –	Representação 3D da ancoragem molecular dos bioisósteros e suas interações.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado da ancoragem molecular entre os compostos naturais e o receptor, demonstrando os dez compostos com melhores energias de ligação.....	40
Tabela 2 – Informações do alvo molecular e seu respectivo sítio ativo.....	44
Tabela 3 – Interações realizadas na ligação entre os compostos naturais e a 6W0T.....	47
Tabela 4 – Resultados das análises de predição farmacocinética ADME-Tox.....	48
Tabela 5 – Resultado da ancoragem molecular entre os bioisósteros e a 6W0T.....	51
Tabela 6 – Resultados das análises de predição farmacocinética ADME-Tox dos bioisósteros.....	52
Tabela 7 – Interações entre os bioisósteros (Chikv_bio) e a 6W0T (nsP3).....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME-tox	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
AI	Absorção Intestinal humana
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMES	Teste de toxicidade de AMES (mutagênese)
AUD	Domínio exclusivo de Alphavírus altamente conservado
BFV	Vírus Barmah Forest (Vírus da floresta de Barmah)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAS	Chemical Abstracts Service (Serviço de Resumos Químicos)
CEPI	Coalizão para Inovações de Preparação para Epidemias
CHIKV	Vírus Chikungunya
DMARD	Drogas Modificadoras do Curso da Doença
DMTR	Dose Máxima Tolerada Recomendada
3D	Três dimensões
EEEV	Encefalite Equina Oriental
E1	Proteína do envelope 1
E2	Proteína do envelope 2
E3	Proteína do envelope 3
FDA	Food and Drug Administration
hERG I e II	Gene humano de éter-a-go-go
HT	Hepatotoxicidade
HVD	Domínio hipervariável
IC	Inibidores de enzimas do citocromo
IC-50	concentração inibitória média
LT	Liberação Total
MAYV	Vírus Mayaro
Mxra8	Proteína 8 associada ao remodelamento da matriz
m7GMP	7-Metil-guanosina-5'-monofosfato
NRAMP	Proteína de macrófagos associada à resistência natural
nsP	Proteína não estrutural
nsP1	Proteína não estrutural 1
nsP2	Proteína não estrutural 2

nsP3	Proteína não estrutural 3
nsP4	Proteína não estrutural 4
OMS	Organização Mundial da saúde
ONNV	Vírus O'nyong'nyong
ORF/ORFs	Open Reading Frame (quadros de leitura aberta)
PDB	Protein Data Bank (Banco de Dados de Proteínas)
PLpro	Protease semelhante à papaína
RdRp	RNA-polimerase RNA-dependente
RMSD	Root Mean Square Deviation (Raiz do Desvio Médio Quadrático)
RNA	Ácido ribonucleico
RRV	Vírus Ross River (Vírus do rio Ross)
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase)
SINV	Vírus Sindbis
u.m.a	Unidade de massa atômica
VDss	Volume de distribuição no estado estacionário
VEEV	Vírus da encefalite equina venezuelana
VHS	Velocidade de Hemossedimentação
WEEV	Vírus encefalite equina ocidental

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo geral.....	17
1.1.2	Objetivos específicos.....	17
2	DESENVOLVIMENTO	19
2.1	ARBOVÍRUS: <i>ALPHAVÍRUS</i>	19
2.2	CHIKUNGUNYA	20
2.3	CICLO DE REPLICAÇÃO DOS ALPHAVÍRUS	23
2.4	FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS QUE ATUAM NO CICLO DE REPLICAÇÃO DO CHIKV.....	26
2.4.1	Proteínas estruturais.....	26
2.4.2	Proteínas não estruturais (nsPs).....	27
2.5	DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS UTILIZANDO FERRAMENTAS IN SILICO....	28
3	METODOLOGIA	30
3.1	MATERIAIS: SOFTWARES E PROGRAMAS UTILIZADOS	30
3.1.1	Protein Data Bank (PDB).....	30
3.1.2	AutoDock Vina	30
3.1.3	PyMol.....	30
3.1.4	Zinc20.....	31
3.1.5	SciFinder	31
3.1.6	LigPlot+.....	31
3.1.7	pkCSM.....	32
3.2	ETAPAS DE REALIZAÇÃO DOS TESTES.....	32
3.2.1	Escolha da proteína (receptor) e dos ligantes	32
3.2.2	Preparo da proteína (receptor) e do ligante co-cristalizado	33
3.2.3	Molecular Docking e <i>redocking</i>	34
3.2.4	Análise das interações receptor-ligante.....	34
3.2.5	Aplicação do Bioisosterismo.....	35
3.2.6	Análises de características farmacocinéticas – ADMET	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	DEFINIÇÃO DE RECEPTOR E LIGANTE	38
4.2	<i>REDOCKING</i>	38

4.3	DOCKING- PRINCIPAIS COMPOSTOS IDENTIFICADOS.....	39
4.4	ANÁLISE DE INTERAÇÕES: COMPOSTO E ALVO MOLECULAR.....	43
4.5	PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA ADME-TOX.....	48
4.6	BIOISOSTERISMO.....	50
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é o principal *Alphavirus* transmitido aos seres humanos pela picada da fêmea do mosquito *Aedes* (Kril *et al.*, 2021). Esse patógeno ocasiona infecção caracterizada como uma doença febril aguda, intitulada de febre Chikungunya, que se apresenta de modo geral como uma infecção autolimitada havendo ocorrência de dores nas articulações e músculo esquelético, as quais podem evoluir para a forma crônica com a doença reumática em parte dos pacientes infectados. A sintomatologia da febre Chikungunya tem efeitos notórios na qualidade de vida dos pacientes, principalmente aqueles com a doença crônica e conseqüentemente leva a ocorrência de perdas econômicas (Bartholomeeusen *et al.*, 2023). Por exemplo, um surto de CHIKV nas Ilhas Virgens Americanas em 2014 teve um custo que variou de US \$14,8 milhões a US \$33,4 milhões, resultando em um grupo significativo de pacientes com incapacidade de longo prazo (Feldstein *et al.*, 2019).

Os *Alphavirus* possuem potencial de propagação epidêmica, de causar doenças graves e conseqüentemente, sequelas debilitantes aos pacientes, como artralgia e mialgia de longa duração (no caso dos *Alphavirus* artritogênicos) (Kim; Diamond, 2022; Behnia; Bradfute, 2023). O vírus artritogênico CHIKV representa preocupação a saúde pública, e ocasiona anualmente milhões de casos ao redor de todo o mundo (Fumagalli *et al.*, 2021).

No Brasil (maior país da América Latina e mais populoso), grande parte da população encontra-se vulnerável ao CHIKV devido ao clima favorável e à presença abundante do vetor *Aedes aegypti*. Desde 2014, o CHIKV tem se espalhado no Brasil, inicialmente concentrado principalmente no Nordeste, porém, a partir de 2016, o país se tornou o epicentro da epidemia de Chikungunya nas Américas, com 1.659.167 casos registrados, ao contrário de outros países nas Américas, o Brasil enfrenta epidemias anuais de Chikungunya (De Souza *et al.*, 2024).

Há algum tempo, o potencial pandêmico do vírus CHIKV vem sendo observado e citado, pois ele é listado pela Coalizão para Inovações de Preparação para Epidemias (CEPI) como um patógeno prioritário para o desenvolvimento de vacinas. Além disso, em 2018, o CHIKV foi adicionado à lista da Organização Mundial da Saúde (OMS) para pesquisa e desenvolvimento prioritários (Bartholomeeusen *et al.*, 2023). A *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, aprovou em

novembro de 2023, a primeira vacina contra a Chikungunya, porém, será necessária a implementação de grandes programas de imunização, em contrapartida, antivirais específicos para tratar ou prevenir a infecção causada por CHIKV continuam indisponíveis (De Souza *et al.*, 2024).

As análises *in silico* surgem então como ferramentas importantes no reposicionamento e desenvolvimento de fármacos, pois permitem a seleção de moléculas que se apresentam como potencial terapêutico (Silva; Silva; Holanda, 2020). Essas moléculas tornam-se necessárias para controlar e combater infecções por *Alphavirus* como o CHIKV, visando melhoria da qualidade de vida das pessoas infectadas, diminuição da viremia, e conseqüentemente dos agravos e dos danos sociais e econômicos do indivíduo bem como, a prevenção da saturação do sistema público de saúde (Bartholomeeussen *et al.*, 2023; Feldstein *et al.*, 2019).

Portanto, esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo, investigar e selecionar alvos (proteínas) importantes na replicação do *Alphavirus* Chikungunya para inibição da sua replicação; bem como, testar por meio de ferramentas computacionais a interação de compostos naturais frente ao sítio ativo do alvo viral visando inibir sua ação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Esta pesquisa, visa identificar um alvo proteico crucial para a replicação do vírus Chikungunya e utilizar ferramentas computacionais para avaliar a interação de compostos naturais com o sítio ativo dessa proteína viral. O objetivo é propor novas moléculas que possam inibir a replicação do vírus e atuar como potenciais candidatos a novos fármacos.

1.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo visam direcionar a pesquisa de forma clara e estruturada, e são delineados a seguir:

- a) revisar a literatura científica para compreender a função das proteínas virais no ciclo replicação do *Alphavirus* artritogênico, CHIKV;
- b) propor proteínas do CHIKV que sejam possíveis alvos de antivirais;
- c) realizar a ancoragem molecular com 84.215 compostos naturais disponíveis na quimioteca do servidor local;
- d) selecionar os compostos que apresentaram melhor desempenho (*in silico*);
- e) submeter os compostos selecionados a estudos de farmacocinética, com predição de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade;
- f) analisar as moléculas com maior potencial inibitório e realizar bioisosterismo para melhorar seu perfil farmacológico;
- g) identificar através de ferramentas computacionais, compostos naturais com potencial ação antiviral.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 ARBOVÍRUS: *ALPHAVÍRUS*

Os vírus são parasitas que não possuem capacidade de se replicar fora das células e por isso, são considerados patógenos intracelulares obrigatórios, já que necessitam do metabolismo ativo das células para se multiplicarem (Silva *et al.*, 2023).

Os arbovírus são um grupo de vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, (carrapatos e mosquitos), para vertebrados homeotérmicos. Esses artrópodes são capazes de adquirir o vírus durante a alimentação sanguínea em um hospedeiro infectado, e estes vírus passam então a se multiplicar em seu organismo. Essas espécies de artrópodes podem transmitir o vírus para um hospedeiro não infectado, porém a infecção depende de um nível mínimo de viremia, por isso, apenas vertebrados que apresentam viremia moderada são considerados hospedeiros competentes, ou seja, capazes de amplificar a transmissão desses arbovírus (Hubálek, 2021).

Estima-se que 3,9 bilhões de pessoas (quase metade da população mundial) estejam em risco de adquirir arboviroses (Organização Mundial da Saúde, 2022) o que eleva o número de infecções sintomáticas e também de óbitos. Exemplos destes arbovírus incluem Dengue, Febre amarela, Zika, Mayaro e Chikungunya (Taylor-Robinson, 2023).

As arboviroses deixam grande parte da população brasileira em condições de risco, e em partes os números são negligenciados devido a subnotificação dos casos. Em relação ao tratamento, encontram-se medicamentos paliativos que são administrados de acordo a sintomatologia apresentada pelo paciente, como febre, dores e inflamações (Sousa *et al.*, 2023). Sendo utilizados principalmente, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), analgésicos, drogas modificadoras do curso da doença (DMARD) e corticoides (De Carvalho Cardoso *et al.*, 2022).

Por se tratarem de vírus que são transmitidos principalmente por mosquitos artrópodes, os *Alphavírus* têm se tornado motivo de preocupação devido a expansão destes vetores, o que pode resultar em maior número de indivíduos expostos (Behnia; Bradfute, 2023).

O gênero *Alphavírus* pertencente à família *Togaviridae*, compreende um conjunto de arbovírus dos quais alguns são reemergentes e afetam pessoas em todo

o mundo (Tan *et al.*, 2022). Podem ser classificados, como *Alphavírus* do Velho Mundo, os que ocasionam doenças artrítogênicas e os do Novo Mundo que causam encefalites (Strauss; Strauss, 1994).

Os artrítogênicos compreendem os vírus, Chikungunya (CHIKV), Ross River (RRV), Barmah Forest (BFV), O'nyong'nyong (ONNV), Mayaro (MAYV) e Sindbis (SINV), que desencadeiam nos seres humanos, quadros de artrite e acometimento musculoesquelético agudo e crônico, com sintomatologia que incluiu, artralgia, poliartrite aguda, mialgia, miosite, erupções cutâneas e febre (Kim; Diamond, 2022). Já os *Alphavírus* encefálicos são, os vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), encefalite equina oriental (EEEV) e encefalite equina ocidental (WEEV) (Zimmerman *et al.*, 2023). Os encefálicos, alcançam células do sistema nervoso central e ocasionam assim como o nome prediz, encefalite e meningite, que a longo prazo podem resultar em sequelas neurológicas incapacitantes ao hospedeiro (Morens; Folkers; Fauci, 2019).

A distribuição dos arbovírus é restrita pelas áreas onde são encontrados seus vetores, geralmente são regiões tropicais e subtropicais. No entanto, a expansão da gama geográfica de vetores pode levar à propagação das arboviroses para áreas ainda não afetadas. O aumento e a reemergência das arboviroses estão associados a um conjunto de fatores que incluem, urbanização, mobilidade internacional, alterações climáticas e globalização, essas condições facilitam a propagação destes vírus para novas regiões (Taylor-Robinson, 2023). De acordo com Strauss e Strauss (1994), os *Alphavírus* apresentam uma ampla distribuição geográfica, estando presentes em todos os continentes, esta rápida distribuição está associada a alterações e aumento da gama de hospedeiros dos vetores, ligada a mudanças climáticas propícias a disseminação do mosquito e ao crescimento do número de viagens por todo o mundo (Filomatori *et al.*, 2021).

2.2 CHIKUNGUNYA

A Febre chikungunya é uma doença viral, caracterizada por infecção febril que causa dores debilitantes, trata-se de uma doença transmitida pelo mosquito hematófago fêmea do gênero *Aedes*, vetor esse que se espalhou da África e Ásia para a Europa e Américas e dos trópicos e subtropicais para regiões temperadas. No Brasil, o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*, são os principais vetores, sendo que o primeiro

se encontra disseminado em todos os estados brasileiros e amplamente disperso em áreas urbanas, enquanto o segundo é encontrado em diversos municípios, exceto nos dos estados de Sergipe, Acre, Amapá e Roraima. Vale ressaltar, que a transmissão *in útero* é possível, mas rara. O maior risco de transmissão materno-fetal ocorre quando uma mãe infectada é altamente virêmica na época do parto (Bartholomeeusen *et al.*, 2023).

O nome chikungunya significa "aquele que se curva" na língua Makonde, que se deve as suas principais manifestações clínicas. Seu vírus foi isolado pela primeira vez durante surto de doença febril na Tanzânia em 1953. O vírus CHIKV é membro do complexo antigênico *Semliki forest*, composto também pelos *Alphavírus* Ross River, O'nyong-nyong, Getah, Bebaru, Semlikiforest e Mayaro. A infecção pelo vírus Chikungunya confere imunidade duradoura, possivelmente vitalícia (Teixeira *et al.*, 2021).

Alguns estudos sugerem que o vírus da chikungunya infecta diretamente a sinóvia e músculo, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e recrutamento de leucócitos, o que causa as manifestações clínicas. A sintomatologia da doença ocorre, geralmente 2 a 6 dias após a picada do mosquito, variando de 1 a 12 dias. É caracterizada por febre alta, dores articulares e musculares intensas, principalmente nos punhos, mãos, tornozelos e pés. A intensidade dos sintomas corresponde ao nível de viremia, que é mais alto durante os primeiros dias de infecção. Outros sintomas agudos incluem dor de cabeça, dor nas costas, fadiga, náusea, inchaço das articulações, conjuntivite e, em cerca de metade dos indivíduos afetados, uma erupção maculopapular eritematosa (FIGURA 1). A complicação neurológica mais comum da chikungunya é a encefalite (Vairo *et al.*, 2019).

O diagnóstico é realizado em pessoas com início agudo de febre e poliartralgia, além de exposição epidemiológica relevante. Os principais testes realizados são as técnicas moleculares RT-PCR e o qRT-PCR. As alterações laboratoriais são inespecíficas, contudo, pode ser encontrado leucopenia, Velocidade de Hemossedimentação (VHS) e Proteína C-Reativa elevada. Vale ressaltar que deve ser realizado testes para infecção pelo vírus da dengue e infecção pelo vírus Zika, como forma de descartar possíveis suspeitas. Não há um tratamento antiviral específico, portanto o manejo clínico é com repouso, fluidos, agentes anti-inflamatórios e analgésicos (Mourad; Makhani; Chen, 2022).

Figura 1 - Sinais e sintomas de Chikungunya



Fonte: <https://www.tuasaude.com/febre-de-chikungunya/> (2024, p.1).

Tratando-se de epidemiologia, nas semanas epidemiológicas 1 a 52 do ano de 2022 o vírus CHIKV foi responsável 271.006 casos em 13 países das Américas, sendo que, mais de 99% destes casos foram notificados pelos seguintes países: Brasil, contando com o maior número de casos suspeitos com uma porcentagem de 98%, o Paraguai com 0,9% e a Guatemala com 0,7% dos casos. Deve-se considerar o aumento do número destes casos, comparando-se o mesmo período em 2021 onde houve registro de 137.025 casos (Organização Pan-Americana da Saúde, 2023). Segundo o ministério da saúde, no ano de 2022 até a semana epidemiológica 52, foram registrados no Brasil 175.956 casos prováveis de Chikungunya e 100 óbitos. Já no ano de 2023 no mesmo período, foram registrados 154.800 casos prováveis de Chikungunya e 106 casos de óbito, nota-se uma pequena diminuição do número de casos e um breve aumento do número de óbitos (Brasil, 2024).

A doença possui três fases: A fase aguda que geralmente dura até vinte e um dias; em seguida inicia-se a fase pós-aguda, que se estende até o final do terceiro mês da infecção e após três meses de incômodo com persistência das dores articulares, caracteriza-se a fase crônica. Em comparação a outras arboviroses a Chikungunya ocasiona muitos sinais e sintomas aos pacientes, principalmente na fase aguda, podendo também ser sintomática nas fases pós aguda e crônica onde ocorre a poliartralgia em cerca de 40% dos indivíduos persistindo por anos sendo mais prevalente em idosos e pessoas com comorbidades. Mesmo sendo incomum existem também as formas irregulares podendo levar o paciente ao óbito (Sousa *et al.*, 2023).

Após a infecção, o CHIKV começa o processo de replicação na pele e depois passa a disseminar-se para o fígado e articulações. Além das manifestações articulares, que são típicas desta arbovirose, existem também manifestações atípicas que podem afetar indivíduos de todas as faixas etárias. Dentre essas manifestações existem as neurológicas, como encefalite, meningite e síndrome de Guillain-Barré, e as cardíacas, como arritmias, pericardites e miocardite. No entanto, também pode ocorrer acometimento do trato gastrointestinal, fígado, rins, lesões cutâneas vesiculobolhosas, bem como de células do sangue (Nicacio *et al.*, 2022).

2.3 CICLO DE REPLICAÇÃO DOS ALPHAVÍRUS

Os *Alphavirus* possuem capacidade de infectar células linfoides, células da glia, neurônios, sinóvia, tecido adiposo, além de células musculares lisas e estriadas (Strauss; Strauss, 1994).

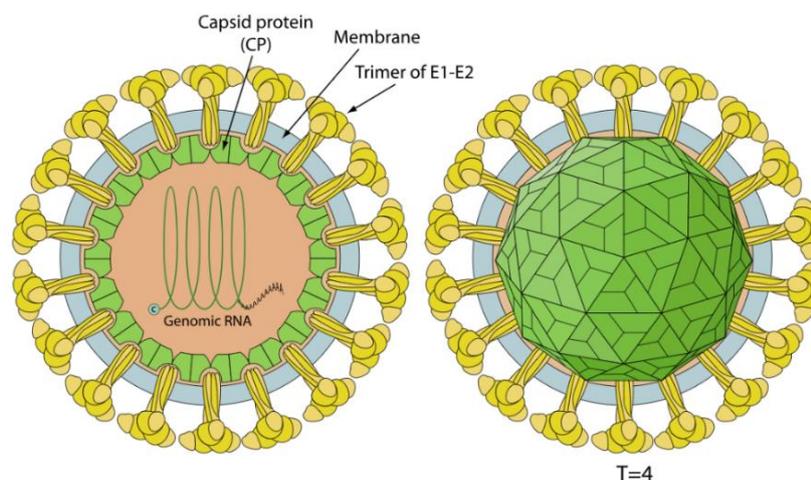
Estes vírus são caracterizados por estruturas que se assemelham e possuem um ciclo vital comum (Rangel; Stapleford, 2021). Trata-se, de vírus envelopados esféricos de simetria icosaédrica, com cerca de 65-70 nm (FIGURA 2); seu genoma é composto por RNA fita simples de polaridade positiva com comprimento de aproximadamente 12 Kb separado em dois quadros de leitura aberta (ORFs) (Krill *et al.*, 2021; Strauss; Strauss, 1994).

O primeiro ORF localizado na região 5'-terminal do genoma, codifica a poliproteína P1234 a qual é clivada originando quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) que atuam juntamente na replicação viral, fuga da ação imunológica e alterações em proteínas. Já a ORF 3'-terminal codifica as proteínas estruturais que compõem o vírus, sendo elas, proteína C (capsídeo), glicoproteínas do envelope E1, E2 e E3 a 6K e TF, que servem para a montagem da estrutura viral e participam de seu ciclo vital (Strauss; Strauss, 1994; Wang *et al.*, 2022).

Após a inoculação do vírus pela picada do mosquito infectado, este microrganismo inicia o processo de infecção e replicação (FIGURA 3) ao interagir com receptores de membranas das células hospedeiras a fim de introduzir-se no seu interior por intermédio de moléculas proteicas. A proteína E2 juntamente com a E1 desempenham papel crucial na entrada do vírus na célula, pois, a ligação de E2 a receptores de membrana desencadeia a entrada do vírus via endocitose mediada por clatrina, e na sequência o transporte para o endossomo contendo o vírus (Elmasri;

Nasal; Jose, 2021).

Figura 2 – Estrutura dos *Alphavirus*



Fonte: https://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species (2018, p.1).

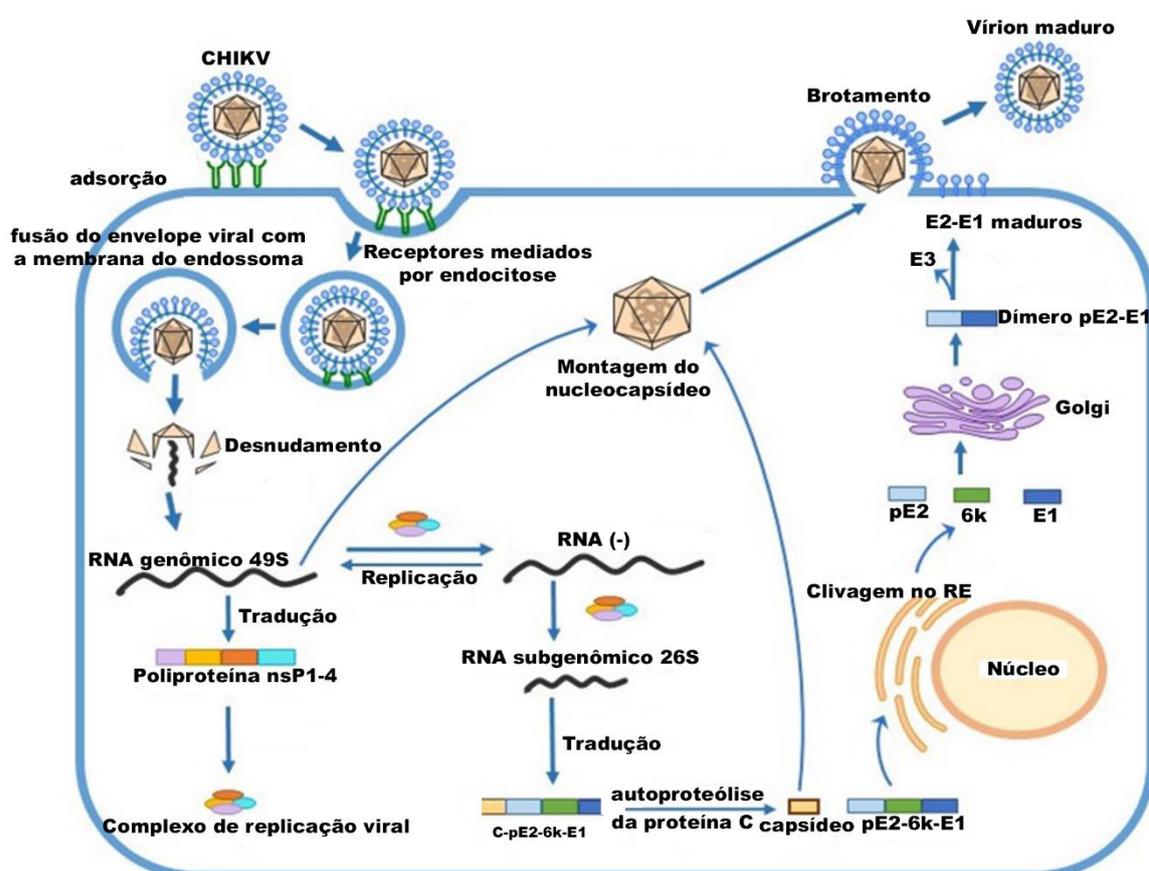
A maturação do endossomo causa um rearranjo conformacional irreversível das glicoproteínas de superfície, devido ao pH ácido presente. Isso faz com que o heterodímero formado pela junção de E2-E1 se dissocie em homodímeros. Em consequência, o peptídeo de fusão de E1 é exposto e inserido na membrana do endossomo, formando um poro. Esse poro leva à liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma celular. Enquanto os vírus do Novo Mundo permanecem nos vacúolos até atingirem o estágio endossômico, os vírus do Velho Mundo escapam do compartimento endossômico primário (Skidmore; Bradfute, 2023).

Sabe-se que, as lectinas do tipo C, o sulfato de heparina e receptores de fosfatidilserina também são fatores de ligação envolvidos na entrada viral, mesmo havendo ainda questões não totalmente elucidadas sobre as interações realizadas pelos vírus no momento de sua inserção às células, algumas proteínas de superfície celular vem sendo citadas por estarem envolvidas, como a proteína de macrófagos associada à resistência natural (NRAMP) como um receptor do SINV e a proteína 8 associada ao remodelamento da matriz (Mxra8) sendo receptor para CHIKV, RRV e MAYV (Basore *et al.*, 2019).

Ao alcançar o citoplasma da célula do hospedeiro, são iniciados os eventos que levam à formação de novas partículas virais (replicação). Inicialmente, o nucleocapsídeo se dissocia no citoplasma liberando o RNA viral e então é iniciada a tradução, onde os peptídeos virais serão sintetizados. Os vírus constituintes desse gênero possuem um genoma com dois quadros de leitura aberta (ORFs) que

codificam as proteínas estruturais e não estruturais (nsP), assim, a tradução direta das proteínas não estruturais a partir do RNA viral geram as poliproteínas P123 e P1234, sendo então processadas por proteases presentes na nsP2. O polipeptídeo 123 processado associa-se a nsP4 formando um complexo replicativo, o qual sintetiza uma fita intermediária de RNA negativa que servirá como molde para a síntese do RNA positivo e para transcrição do RNA da região subgenômica para que contém as proteínas estruturais do vírus. Após o processamento das nsP em nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, a junção destes peptídeos forma um complexo de replicação para a síntese de novas fitas de RNA (Skidmore *et al.*, 2020).

Figura 3 – Ciclo de replicação do *Alphavirus* CHIKV



Fonte: Adaptado de Abdelnabi *et al.* (2015).

Legenda: A figura demonstra os processos adsorção, endocitose mediada por Clatrina, fusão de membrana, desnudamento, replicação, empacotamento do genoma, montagem do nucleocapsídeo e brotamento dos vírions.

O RNA subgenômico atua como RNA mensageiro (mRNA) para a formação das proteínas estruturais. A proteína do capsídeo (CP) é liberada e então, a poliproteína continua a ser processada no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático. A

poliproteína pE2 é clivada pela furina formando as glicoproteínas do envelope E2 e E3. Ao fim, as CP interagem diretamente com o RNA, encapsulando o genoma viral originando os nucleocapsídeos, que são transportados para a membrana plasmática onde ocorre o brotamento juntamente com a membrana do hospedeiro e a liberação dos novos vírus no organismo (Abdelnabi; Delang, 2020).

2.4 FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS QUE ATUAM NO CICLO DE REPLICAÇÃO DO CHIKV

2.4.1 Proteínas estruturais

A proteína do Capsídeo (CP), é a primeira proteína a ser traduzida e é também, produzida em maior quantidade do que as demais. É responsável pela formação primária da estrutura dos vírions, originando o nucleocapsídeo, onde o RNA viral encontra-se cercado pela CP. Possui atividade patogênica, atuando no bloqueio dos poros nucleares, e com isso, passa a impedir a tradução de novas proteínas das células, resultando em maior efeito citopático, aumento da patogênese viral e facilita a fuga contra mecanismos imunológicos do hospedeiro (Skidmore; Bradfute, 2023). Por fim, os vírions formados possuem três camadas: o nucleocapsídeo, composto por 240 cópias da proteína CP; membrana lipídica derivada do hospedeiro ao redor deste núcleo e espículas de glicoproteína trimérica (E1 e E2) localizadas na superfície (Button; Mukhopadhyay, 2020).

As glicoproteínas do envelope E1, E2 e E3, são formadas durante a infecção por *Alphavírus*, auxiliam na fusão das membranas (viral e do hospedeiro) além, de contribuir para a liberação do genoma viral no citoplasma (Holmes *et al.*, 2020). E2 é a principal proteína atuante na ligação do vírus aos receptores, E1 possui uma alça que possibilita a fusão da membrana viral e endossômica na célula recém infectada com o intuito de liberar o material genético do vírus no citoplasma celular, é também, capaz de induzir a formação de poros na membrana induzindo alterações fisiológicas celulares e forma heterodímeros com E2 originando as glicoproteínas *spike*. A E3 atua como uma sequência de sinais que após a clivagem do capsídeo, guia a poliproteína estrutural para o retículo endoplasmático, além disso, previne a liberação antecipada da alça de fusão da E1 permitindo sua secreção na superfície celular (Bartholomeeusen *et al.*, 2023; Skidmore; Bradfute, 2023).

As proteínas 6K e TF também são de grande importância neste ciclo viral, a 6K atua na mediação do brotamento dos vírions maduros, já a TF é uma pequena proteína formada a partir do gene 6K, geralmente é encontrada incorporada ao vírus após sua liberação e está associada a evasão do interferon. Ambas atuam na liberação eficiente dos vírus, e tem importância na virulência, pois os vírus que não possuem essas proteínas apresentam doenças menos graves (Rogers *et al.*, 2020; Skidmore; Bradfute, 2023).

2.4.2 Proteínas não estruturais (nsPs)

Conforme Jones *et al.* (2021), a proteína não estrutural 1 (nsP1) possui uma estrutura em forma de anel dodecamérico, o que facilita seu acesso à organela viral e contribui para o processo de tamponamento do RNA, além disso, essa nsP interage de forma direta com a membrana (Laurent *et al.*, 2022). Dentre os mecanismos utilizados por essa enzima para o processo de tamponamento de RNA podem ser citadas seu potencial em atividades de guanilação e metiltransferase que auxiliam principalmente na possível adição de m⁷GMP na extremidade 5' do RNA alphaviral. Esta proteína também funciona como um fator contribuinte para virulência em infecções causadas por *Alphavirus*, sendo associado a sintomas como inflamação no sistema músculo esquelético em quadros causados por RRV, outro *Alphavirus* artritogênico (Rangel; Stapleford, 2021).

A nsP2, é a maior proteína madura dos Alphavirus e é essencial para o ciclo de replicação e transcrição do material genético desse conjunto de vírus. Trata-se de uma proteína responsável por executar diversas funções, como o processamento da poliproteína não estrutural (por meio de sua região C-terminal cisteína protease), atua como helicase no processo replicativo, possuindo ainda, atividades de trifosfatase (RNA trifosfatase e nucleotídeo trifosfatase) (Law *et al.*, 2021). Nas células infectadas, esta proteína encontra-se presente principalmente no citoplasma e núcleo. No núcleo, a nsP2 pode inibir fatores associados à sinalização antiviral, é capaz de reter a maquinaria responsável pela transcrição da célula hospedeira, além de levar células vertebradas a efeitos citopáticos (Law *et al.*, 2019).

A proteína nsP3 contém cerca de 469-570 aminoácidos e três domínios principais, o macrodomínio N-terminal, o AUD (domínio central único de ligação de zinco) que são proteínas globulares, e o HVD que é uma região altamente variável,

capaz de realizar diversas interações e modificar a biologia e funcionamento das células hospedeiras. Essa nsP possui diversas funções, como: mediação de interações *Alphavirus*-proteínas do hospedeiro necessária no processo de replicação, na qual sua região HVD, liga-se a células do hospedeiro permitindo a iniciação da montagem da nsP3-RC que atua diretamente no processo de replicação; é também, um fator de especificidade de vetores, pois está relacionado à capacidade dos *Alphavirus* (tanto do velho mundo quanto do novo mundo) de se adaptarem a diferentes espécies de mosquitos vetores. Atua ainda, como fator de virulência viral e modulador da resposta de estresse do hospedeiro, limitando a formação dos grânulos de estresse (Abdullah *et al.*, 2021).

Já a *Alphavirus* nsP4, é também atuante no processo de replicação viral onde desempenha papel crucial, mediante sua atividade de RNA dependente e RNA polimerase (RdRp), além de possuir funcionalidade como adeniltransferase terminal. Trata-se de uma proteína longa, composta por cerca de 610 aminoácidos, no qual seu domínio C-terminal carrega o sítio catalítico, e a região N-terminal, é caracterizado como uma porção desorganizada com potencial de interação com outras proteínas não estruturais. Sugere-se ainda, que essa enzima esteja relacionada ao desligamento da tradução do hospedeiro (Pareek *et al.*, 2022).

2.5 DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS UTILIZANDO FERRAMENTAS IN SILICO

O desenvolvimento de novos medicamentos envolve diversas etapas, desde a identificação de alvos até a realização de testes pré-clínicos e clínicos (Tripathi *et al.*, 2021). Para que um novo medicamento seja lançado no mercado farmacêutico é necessário um grande investimento, cerca de US\$ 2,6 bilhões além de um tempo estimado entre 10 a 15 anos, sendo que, ao fim, apenas uma pequena parcela, de aproximadamente 13% consegue aprovação. Conforme Sarkar *et al.* (2023) o desenho de fármacos *in silico*, que pode trazer benefícios e otimizar este processo de desenho de fármacos, pois permite a realização de uma avaliação sistemática dos ligantes que podem ser candidatos à novos fármacos, sendo assim, podem ser criadas moléculas otimizadas, além da realização análises de características físico-químicas, bioatividade, efeitos colaterais, seletividade, bem como a observação de parâmetros farmacocinéticos como, absorção, distribuição, metabolismo, excreção e

toxicidade(ADME-T) (Sahu; Mishra; Kushwaha, 2021).

A ancoragem molecular (*Molecular Docking*) é um método *in silico*, que está inserido entre as metodologias desenvolvidas para o desenho de novos fármacos ou "planejamento de fármacos baseado em estrutura". Este método permite a predição de formas de ligação de compostos ativos utilizando bibliotecas digitais com grande número de informações, trata-se de uma técnica rápida e barata, a qual auxilia na redução de custos e tempo no desenvolvimento de novos fármacos. O acoplamento de moléculas, baseia-se principalmente na análise da orientação (pose) de moléculas no sítio ativo de uma macromolécula para prever as interações moleculares formadas (Torres *et al.*, 2019).

O *Molecular Docking* é um método que consiste na predição em larga escala, de estruturas formadas por complexos entre proteína (ou receptor) e ligante. É uma técnica semelhante ao modelo chave-fechadura da teoria enzimática, onde o ligante é correspondente à “chave” e o receptor atua como a “fechadura”. Permite ainda, a classificação de modo hierarquizado dos compostos (De Azevedo Jr, 2019).

Grande parte das doenças está associada a disfunções proteicas, e para a descoberta de tratamentos podem ser utilizadas diversas técnicas que abordam a estrutura dessas macromoléculas, com o intuito de encontrar sítios ativos existentes nestes alvos. Apesar de muito importante, a resolução de estruturas tridimensionais das proteínas é ainda um processo caro e que demanda tempo, neste contexto, surge as técnicas computacionais auxiliam no desenvolvimento mais rápido na avaliação e desenvolvimento das estruturas 3D (Zhong *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de novos medicamentos envolve a busca de moléculas seguras e com alta qualidade, e dentre os estudos realizados estão os de farmacocinética e toxicidade. Muitas moléculas ativas já foram encontradas, porém poucas são aprovadas pela FDA devido a reações adversas, propriedades inadequadas e falta de eficácia, tornando necessária a otimização e avaliação precoce das propriedades destas moléculas para suprir estas limitações (Merlot, 2010). A análise e predição computacional das propriedades ADME-T é considerada uma abordagem preferível visto sua rapidez e baixo custo, comparado com testes em animais (Tripathi *et al.*, 2021).

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS: SOFTWARES E PROGRAMAS UTILIZADOS

3.1.1 Protein Data Bank (PDB)

O *Protein Data Bank* foi o primeiro banco de dados biológicos digital com acesso aberto, e atualmente é o único arquivo a nível global de dados de estruturas de macromoléculas 3D e seus complexos com ligantes. Dados do PDB são utilizados para pesquisa básica aplicada em diversas áreas da ciência, como publicação de livros, desenvolvimento de métodos computacionais, descoberta de drogas entre outras aplicações (Young *et al.*, 2018). No PDB, é possível acessar coordenadas atômicas 3D das moléculas, dados experimentais e metadados que descrevem o modelo e seus detalhes, como nome, sequência de aminoácidos, estrutura química, fórmula, nome químico, métodos e estatísticas de construção de modelos e etc. Há também, informações sobre as estruturas dos ligantes complexados às macromoléculas que fornecem conhecimento a nível atômico auxiliando na descoberta de fármacos (Berman *et al.*, 2002).

3.1.2 AutoDock Vina

O *molecular docking* é largamente utilizado em práticas de desenvolvimento de fármacos mediante interações entre proteínas e ligantes (Eberhardt *et al.*, 2021). O *AutoDock Vina* é uma ferramenta usada para prever a conformação e a energia livre de moléculas ao alvo. *Vina* é um software de encaixe computacional de ancoragem de código aberto. Baseia-se em pontuação simples e pesquisa de otimização de gradiente (Trott; Olson, 2010).

3.1.3 PyMol

O *PyMol* é um programa de gráficos moleculares utilizado para a geração de imagens e visualização de interações. As imagens geradas nesse programa, são geralmente de estruturas de proteínas e ligantes, as quais são muito úteis e informativas, principalmente em publicações de revistas e em palestras. O *PyMol*

permite analisar a estrutura 3D de uma proteína, interagir, avaliar, além de possuir uma interface flexível que auxilia na obtenção de imagens bonitas (Jones, 2021).

3.1.4 Zinc20

O Zinc20, trata-se de um banco de dados disponível ao público, o qual possui uma série de compostos catalogados e comercialmente disponíveis. Esta biblioteca de moléculas disponibiliza também uma série de estruturas em duas dimensões (2D) e três dimensões (3D), além de permitir a execução rápida das pesquisas. O banco *Zinc* (link de acesso: <https://zinc20.docking.org/>) tem sua aplicabilidade voltada para o *molecular docking*, mas também possui vertentes voltadas para abordagens baseadas no princípio da similaridade molecular, com intuito da identificação de compostos análogos em forma e atividade (Irwin *et al.*, 2020).

3.1.5 SciFinder

O *SciFinder*, trata-se de uma plataforma de acesso aberto e que pode ser acessada por meio do uso acadêmico no site do periódico CAPES na lista de “bases e coleções” pelo acesso CaFe seguido de um rápido cadastro. Este banco de dados de informações científicas e de tecnologia foi desenvolvido pelo CAS- serviço de resumos químicos, do inglês, *Chemical Abstracts Service*. A plataforma dispõe de informações sobre as mais diversas áreas da Química, Bioquímica, Engenharia, Farmacologia, Biologia, Medicina etc. O *SciFinder* (link de acesso: <https://sso.cas.org/as/authorization.oauth2>) permite a busca por referências como em patentes, livros, artigos; por substância, que pode ser pelo nome da substância, número CAS, fórmula molecular além de outras, e também por reações químicas (Scifinder, 2024).

3.1.6 LigPlot+

O software *LigPlot+* permite a visualização de interações (em duas dimensões) formadas pela proteína e o ligante, os resultados das análises permitem a avaliação de interações intermoleculares e as forças de ligação de forma simplificada (Haider *et al.*, 2021). Este programa possibilita a sobreposição de diagramas, em situações onde

existem complexos ligante-proteína semelhantes, permitindo a exibição dos diagramas sobrepostos e geração de diagramas com interações resíduo-resíduo, estes diagramas demonstram interações com hidrogênio, interações hidrofóbicas entre ligantes e elementos das cadeias principal e lateral das proteínas. Essas opções favorecem por exemplo, a análise de diversas moléculas que se ligam a mesma proteína e de um ligante que se liga a proteínas homólogas (Laskowski; Swindells, 2011).

3.1.7 pkCSM

A farmacocinética define as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo excreção e toxicidade (ADMET) do composto, e um dos filtros utilizados para analisar os novos candidatos à fármacos é a regra dos 5 de Lipinski, que auxilia na predição dos parâmetros de ADME a partir de suas estruturas moleculares (Pires; Blundell; Ascher, 2015a). Nesta regra, as moléculas devem seguir alguns parâmetros pré descritos para serem absorvidas no organismo dos seres humanos e realizar a ação desejada. As moléculas devem contar com as principais características: aceptores de ligação de Hidrogênio com número menor ou igual a 10 e doadores menor ou igual a 5; um log P maior ou semelhante ao número 5; e apresentar massa molecular inferior ou igual a 500 u.m.a., a molécula obtida poderá “violar” apenas um destes parâmetros pré-estabelecidos (Lipinski; Dominy; Feeney, 1997). As análises ADMET de forma experimental são atualmente demoradas e caras. Esses impasses levaram a busca de novas abordagens para predição de propriedades farmacocinéticas. Neste contexto, surgem ferramentas *in silico* que otimizam todo este processo como o *pkCSM* (link de acesso: <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>), uma plataforma de predição de propriedades ADMET, que auxilia na otimização de predição de propriedades farmacocinéticas e de toxicidade de moléculas, possuindo 30 preditores que envolvem absorção, distribuição. Metabolismo, excreção e toxicidade (Pires; Blundell; Ascher, 2015a).

3.2 ETAPAS DE REALIZAÇÃO DOS TESTES

3.2.1 Escolha da proteína (receptor) e dos ligantes

Inicialmente, foram realizadas buscas no *Protein Data Bank* (PDB), com o intuito de identificar as principais estruturas cristalinas já disponíveis para as proteínas não estruturais de CHIKV. As nsPs foram escolhidas por atuarem diretamente no processo de replicação deste gênero viral, dentre elas, foi selecionada como alvo de estudo nesta pesquisa a proteína não estrutural 3 (nsP3), a qual possui o código de 6W0T no PDB.

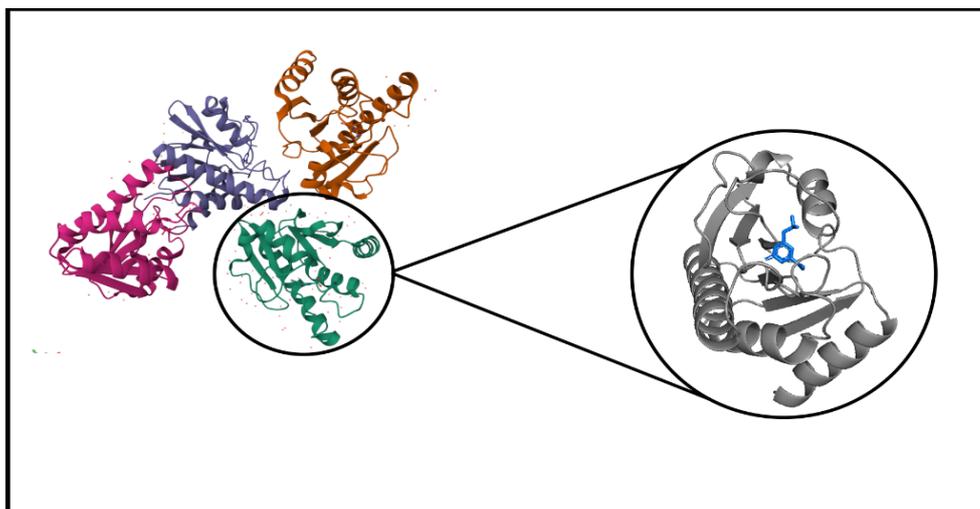
Os principais critérios utilizados para a seleção do receptor foram, a obtenção de uma estrutura a qual um ligante co-cristalizado com valores de concentração inibitória média (IC₅₀) definidos, boa resolução com valores inferiores a dois angstroms. Os ligantes foram no total 84.215 produtos naturais, obtidos a partir do banco de dados *ZINC20* (Irwin *et al.*, 2020).

3.2.2 Preparo da proteína (receptor) e do ligante co-cristalizado

Após determinar qual seria a proteína utilizada, foi então realizado o download da estrutura do PDB para o servidor local, e em seguida iniciou-se o preparo do ligante e do receptor utilizando o *software MGLTools*.

Em relação ao receptor, foi realizado um tratamento da estrutura, no qual foram deletadas três cadeias da proteína (já que a molécula possui quatro cadeias idênticas: A, B, C e D) a fim de facilitar e melhorar a visualização no processo como um todo, restando apenas a cadeia A (FIGURA 4), a qual foi selecionada para prosseguir com os testes. Foram também removidas moléculas de água e proteínas que não são de interesse; adicionados cargas de Kollman e Hidrogênios aos átomos polares, e por fim, foi feito um rastreio de possíveis átomos ausentes nas cadeias de aminoácidos. O ligante co-cristalizado presente no sítio ativo da estrutura da proteína/receptor foi isolado e salvo em um arquivo separado para ser posteriormente utilizado na etapa de *redocking*. Ao final do processo de preparação, tanto o ligante quanto o receptor foram salvos em documentos independentes, ambos no formato PDBQT necessário para a execução dos próximos passos.

Figura 4 – Preparo do receptor



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Legenda: a esquerda observa-se a proteína com quatro cadeias iguais (imagem do PDB) e a direita a cadeia A extraída para os testes.

3.2.3 Molecular Docking e *redocking*

Na etapa do *molecular docking* também realizada no *MGLTools*, o arquivo do receptor em formato PDBQT é aberto para a criação da *GridBox*, neste processo cria-se uma caixa ao redor do ligante co-cristalizado, onde possivelmente é o sítio ativo do receptor, delimitando a caixa com dimensões próximas as extremidades do ligante, em seguida deve-se salvar as informações da caixa. Após a delimitação da *GridBox* é iniciada a etapa de *redocking* utilizando o *software Autodock Vina* (Eberhardt *et al.*, 2021; Trott; Olson, 2010). Nesta etapa, o ligante co-cristalizado e o receptor previamente preparados tem sua ancoragem refeita, com o intuito de obter resultados controle buscando assim, uma maior confiabilidade e reprodutividade dos resultados (Barreiro; Fraga, 2015).

Finalizada a etapa de *redocking*, foi realizada a ancoragem molecular dos 84.215 compostos naturais (ligantes) com a 6W0T e então, após 20 dias desta rodada de testes, a ancoragem foi concluída, e os resultados obtidos neste processo foram classificados em ordem decrescente, onde os menores valores de energia representam as melhores ligações e interações entre o ligante e o receptor.

3.2.4 Análise das interações receptor-ligante

Para a análise das interações foi utilizado o *software LigPlot+* onde os resultados mais satisfatórios obtidos no *molecular docking* foram selecionados (Laskowski; Swindells, 2011). A avaliação das ligações projetadas pelo *software Autodock Vina* entre a proteína e o ligante considerou principalmente, pontes de hidrogênio, bem como, pontes de dissulfeto, de sal e externas, interações hidrofóbicas e interações pi-pi, as quais foram calculadas e contrastadas com as interações de compostos com os aminoácidos presentes no sítio ativo da proteína, conforme cita a literatura. Também foram realizadas buscas em bancos de dados de compostos como o *ZINC20* e *SciFinder* em busca de informações mais detalhadas dos compostos com os melhores resultados de interação, para obter-se maior conhecimento sobre esses compostos e realizar uma busca na literatura para identificar se esses compostos naturais já são destinados a alguma utilização.

3.2.5 Aplicação do Bioisosterismo

Os resultados mais promissores até esta etapa, foram então submetidos ao tratamento de bioisosterismo, onde regiões passíveis de alterações foram selecionadas para a substituição de fragmentos com propriedades físico-químicas semelhantes, para a obtenção de novas estruturas moleculares (Borba *et al.*, 2023; Elias; De Oliveira; Da Silveira, 2018). O bioisosterismo, permite a melhora do desempenho molecular com as modificações estruturais realizadas, que tornam possível a melhoria de propriedades farmacocinéticas do fármaco, como meia vida, absorção e toxicidade, sendo imprescindíveis na análise e descoberta de novos medicamentos (Da Silveira *et al.*, 2021).

O servidor utilizado para a realização da etapa de bioisosterismo foi o *MolOpt* disponível no <https://xundrug.cn/molopt>. Este servidor é utilizado para o desenho de medicamentos utilizando a regra de substituição bioisostérica, regra esta, que é muito utilizada para modular características relacionadas a seletividade e potência dos compostos, avaliando fatores de farmacocinética para melhorar o desempenho dos fármacos a fim de excluir efeitos indesejáveis dos mesmos (Shan; Ji, 2019).

A técnica de bioisosterismo também foi aplicada aos resultados que se apresentaram pouco efetivos, os quais demonstraram predição de alguns interferentes como, a não interação com aminoácidos do sítio ativo da do receptor e até mesmo, possível toxicidade, hepatotoxicidade, ou baixa absorção intestinal a fim

de realizar modificações estruturais que pudessem melhorar essas limitações. Em seguida, essas moléculas foram submetidas novamente ao *MGLTools*, onde a ancoragem com a proteína alvo foi refeita e os valores obtidos foram comparados aos valores obtidos na primeira etapa de ancoragem.

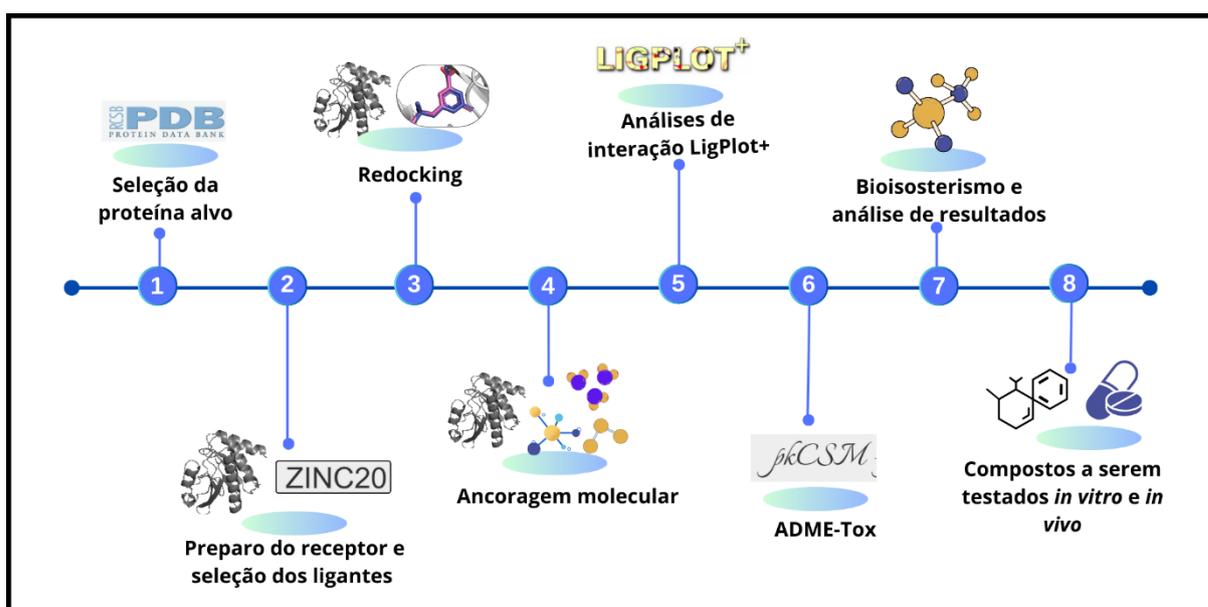
3.2.6 Análises de características farmacocinéticas – ADMET

As estruturas dos ligantes que apresentaram melhores resultados nas etapas anteriores, foram submetidas a predição de suas características farmacocinéticas, as quais envolvem a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e a toxicidade (ADMET), utilizando para isso o servidor *pkCSM* (Pires; Blundell; Ascher, 2015a). Para este estudo, foram analisados os seguintes fatores disponíveis no *pkCSM*:

- 1) Absorção intestinal: o intestino é um dos primeiros locais de absorção dos medicamentos administrados via oral, e é então muito importante para a compreensão da farmacocinética do composto estudado. Neste modelo, a taxa de absorção menor que 30% significa que o fármaco é pouco absorvido.
- 2) Volume de Distribuição em estado estacionário (VD_{ss}): valor teórico da dose de um fármaco, para que ele seja uniformemente distribuído entre tecidos e o plasma. Valores abaixo de -0.15 considera-se um VD_{ss} baixo, e aqueles acima de 0.45 representam um VD_{ss} alto.
- 3) Metabolismo: nesta análise é possível propor se a molécula estudada pode vir a inibir enzimas, como as do citocromo P450, que são de suma importância para a metabolização dos compostos, e para a desintoxicação do organismo humano. São considerados inibidores do citocromo P450, compostos que a concentração necessária para levar a 50% da inibição seja inferior a 10 μ M.
- 4) Excreção: análise e predição da capacidade excreção do medicamento, etapa farmacocinética que é realizada pelos rins.
- 5) Toxicidade: teste de AMES- avalia o potencial mutagênico e cancerígeno do composto. AMES positivo confirma esse potencial.
 - Dose máxima tolerada recomendada (DMTR): permite estimar o limiar da dose tóxica para seres humanos, auxiliando na indicação da dose inicial do fármaco. DMTR inferior ou igual a 0,477 $\log(\text{mg}/\text{kg}/\text{dia})$ é baixo, superior a 0,477 $\log(\text{mg} / \text{kg} / \text{dia})$ é considerado baixo.

- Hepatotoxicidade: o modelo auxilia na predição da capacidade do fármaco de ser hepatotóxico causar danos ao fígado. Na figura 5, é possível observar a representação gráfica da metodologia de forma resumida a qual é descrita de forma mais detalhada no texto acima.

Figura 5 – Fluxograma: redocking, ancoragem molecular, análises ADME-Tox e Bioisosterismo



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DEFINIÇÃO DE RECEPTOR E LIGANTE

Estudos na literatura referentes à estrutura do vírus CHIKV e seu ciclo de replicação, demonstraram algumas proteínas (estruturais e não estruturais) de grande importância, tanto para sua replicação, quanto para formação da estrutura de novos vírions. Por possuírem ligação direta com a replicação do material genético e partículas virais, as proteínas não estruturais nsp1, nsp2, nsp3 e nsp4 foram priorizadas. Em seguida foi realizada uma busca no *Protein Data Bank* (PDB) a fim de identificar a estrutura tridimensional dessas proteínas e então, algumas estruturas foram pré-selecionadas: 6Z0V (proteína não estrutural 1), 4ZTB e 3TRK (proteína não estrutural 2), 6W0T (proteína não estrutural 3).

Ao fim da análise das estruturas no PDB, a proteína nsP3 com código corresponde de 6W0T foi selecionada e preparada para a realização dos testes de CHIKV, porque apresenta um ligante já co-cristalizado à sua estrutura com valores de IC-50 determinados e, entre as pré-selecionadas é a que possui a melhor resolução, sendo de 1.95 Å, partindo do pressuposto que as resoluções consideradas ideais são aquelas com valor abaixo de 2.0 Å (Barreiro; Fraga, 2015). O artigo base deste receptor que se encontra indexado no PDB foi utilizado para determinar o sítio ativo da 6W0T e os aminoácidos que realizam interações com o ligante co-cristalizado. Já os ligantes utilizados para a ancoragem molecular, foram obtidos a partir do banco de dados *Zinc20* onde encontra-se presente uma biblioteca online composta por 84.215 compostos naturais da biblioteca *IBScreenNP* de 2015 presente no servidor local.

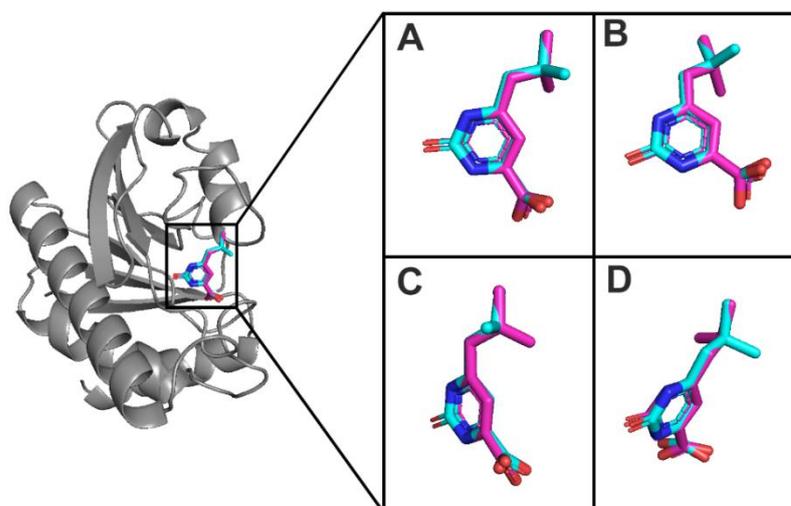
4.2 REDOCKING

A etapa de realização do *redocking* é de suma importância para a validação de todo o processo e baseia-se na remoção do composto co-cristalizado na proteína e em seguida este composto é novamente ancorado ao sítio ativo pela técnica de *molecular docking*, neste processo utiliza-se a Raiz do Desvio Médio Quadrático (RMSD), do inglês, *Root Mean Square Deviation* como fator de avaliação, sendo considerados como favoráveis os valores abaixo de 2,0 Å, não desconsiderando também a avaliação visual das posições obtidas. O resultado esperado são posições

da estrutura do ligante iguais ou similares à original (Barreiro; Fraga, 2015; Schneider *et al.*, 2012).

Neste estudo, foram encontradas posições muito similares do ligante no sítio ativo da proteína (FIGURA 6), com RMSD de 0.001 sendo considerado muito satisfatório, tornando o processo válido e possibilitando a reprodutibilidade dos resultados posteriormente obtidos.

Figura 6 - *Redocking*



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Legenda: O ligante é representado na cor azul e o redocking pela cor magenta, A e B vista frontal, C e D vista lateral e superior.

4.3 DOCKING- PRINCIPAIS COMPOSTOS IDENTIFICADOS

Após a realização da ancoragem molecular, os dez compostos com melhores energias de ligação (TABELA 1) foram selecionados para análise e discussão.

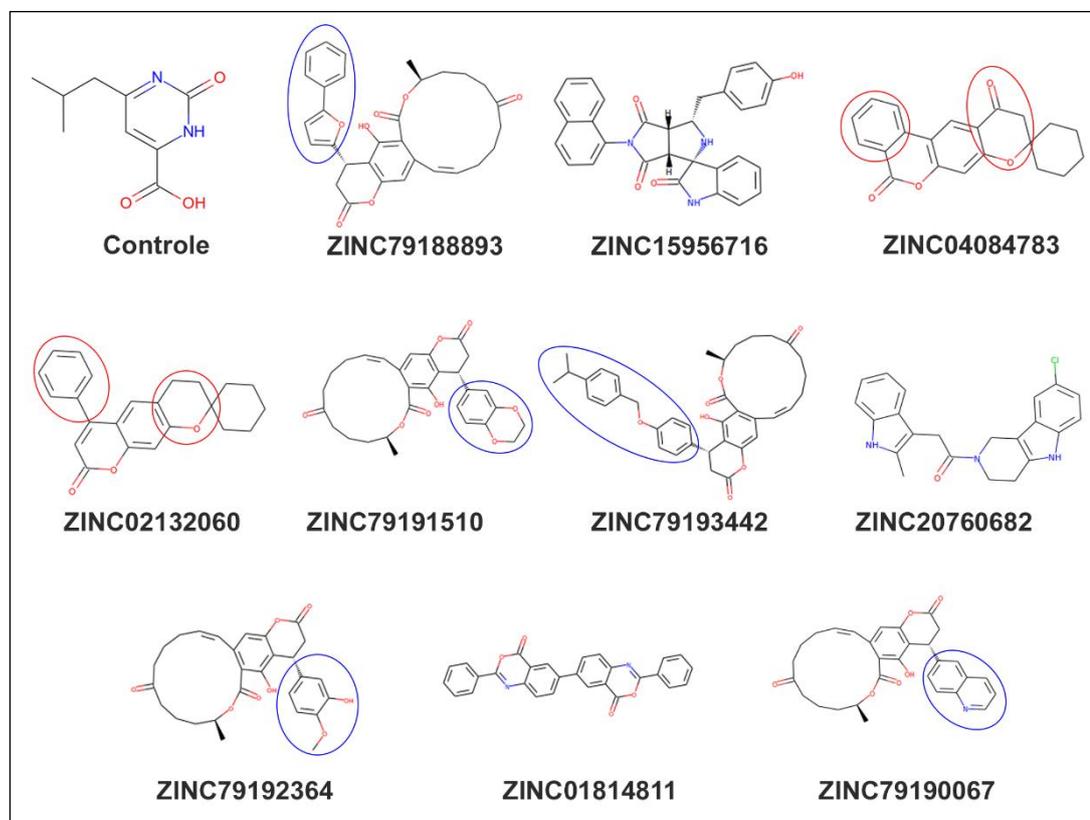
Tabela 1 - Resultado da ancoragem molecular entre os compostos naturais e o receptor, demonstrando os dez compostos com melhores energias de ligação

Identificação	Energia de ligação (Kcal/mol)
Controle	-7.8
ZINC79188893	-12.2
ZINC15956716	-12.1
ZINC04084783	-11.9
ZINC02132060	-11.7
ZINC79191510	-11.6
ZINC79193442	-11.6
ZINC20760682	-11.6
ZINC79192364	-11.5
ZINC01814811	-11.5
ZINC79190067	-11.5

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Na figura 7, é possível visualizar as estruturas dos dez compostos selecionados após a ancoragem molecular. Observa-se que há semelhança estrutural entre alguns deles, como os compostos circulados em azul, ZINC79188893, ZINC79191510, ZINC79193442, ZINC79192364 e ZINC79190067 os quais possuem estruturas muito similares, havendo apenas algumas modificações em suas extremidades, porém a base da estrutura é igual. Os compostos circulados em vermelho, ZINC04084783 e ZINC02132060 também são estruturalmente parecidos, e apresentam energias de ligação com valores muito próximos, essas similaridades podem ser sugestivas de que estes compostos apresentem também atividade biológica parecida frente ao alvo molecular. Finalmente os três compostos, ZINC15956716, ZINC20760682 e ZINC01814811 não circulados, apresentam estruturas diferentes das demais, essa característica pode ser responsável pela maior energia de ligação destes compostos em relação ao composto controle.

Figura 7- Estruturas 2D dos dez compostos naturais com melhores energias de ligação e o composto controle



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

O composto controle trata-se do ligante que está co-cristalizado à estrutura da 6W0T (receptor) no PDB, no qual ele recebe a sigla de S6Y e o nome de 6-(2-metilpropil)-2-oxidanilideno-5-{H}-pirimidina-4-ácido carboxílico. Nas buscas pelo *SciFinder* ele recebe o nome de ácido 4-pirimidinacarboxílico, 2,3-diidro-6-(2-metilpropil)-2-oxo-, foram encontrados 35 fornecedores deste composto, duas patentes e citações na literatura. Em uma das patentes o composto é mencionado como um dos análogos de pirimidona que apresentam atividade antiviral contra *Alphavírus*. Esta substância é estudada para o desenvolvimento de novos agentes antivirais eficazes contra esses tipos de vírus (Pathak *et al.*, 2021). Em um dos estudos este composto é avaliado como potencial inibidor do vírus Chikungunya. Ele é identificado como um fragmento que interage com a macrodomínio nsP3 do vírus, uma proteína importante no ciclo de replicação do vírus (Zhang *et al.*, 2021).

Os primeiros três compostos, ZINC79188893 com a nomenclatura 2*H*,6*H*-Pirano[2,3-*o*][2]benzoxaciclotetradecina-2,6,12(3*H*)-triona, 4,8,9,10,11,13,14,15-octaidro-5-hidroxi-8-metil-4-(5-fenil-2-furanil); ZINC15956716 de nome Espiro[3*H*-

indol-3,1'(2'*H*)-pirrolo[3,4-*c*]pirrol]- 2,4',6'(1*H*,3'*H*,5'*H*)-triona,3'*a*,6'*a*-diidro-3'-[(4-hidroxifenil)metil]-5'-(1-naftalenol)-; ZINC04084783 chamado de Espiro[5*H*,9*H*-Benzo[*d*]pirano[3',2':4,5]benzo[1,2-*b*]Piran-9,1'-ciclohexano]-5,11(10*H*)-diona. Assim como todos os dez compostos, foram analisados com o auxílio dos bancos de dados *Zinc20*, *SciFinder*, além de buscas realizadas no google, PubMed e não foram encontradas citações na literatura, patentes ou quaisquer outras informações adicionais. Foram encontrados apenas em sites que disponibilizam a venda de compostos, não existindo estudos descritivos sobre suas atividades químicas e/ou biológicas, essas informações podem indicar que se trata de compostos naturais de caráter inédito ainda não estudados de forma aprofundada ou utilizados.

O composto ZINC02132060 descrito como Espiro[2*H*,8*H*-Benzo[1,2-*b*:5,4-*b'*]dipirano-2,1'-ciclohexano]-8-ona, 3,4-diidro-6-fenil-, nas buscas pela literatura foi encontrado sendo citado como um derivado da 4-arilspirodihidropiranocromina-2-ona (Moskvina *et al.*, 2007). Foram encontrados também, sites que disponibilizam a venda deste composto no *SciFinder*.

Já os compostos ZINC79191510 que possui o nome 2*H*,6*H*-Pirano[2,3-*o*][2]benzoxaciclotetradecina-2,6,12(3*H*)-triona,4-(2,3-diidro-1,4-benzodioxina-6-il)-4,8,9,10,11,13,14,15-octaidro-5-hidroxi-8-metil-; ZINC20760682 nomeado como Etanona,1-(8-cloro-1,3,4,5-tetraidro-2*H*-pirido[4,3-*b*]indol-2-il)-2-(2-metil-1*H*-indol-3-il); ZINC79192364 chamado de 2*H*,6*H*-Pirano[2,3-*o*][2]benzoxaciclotetradecina-2,6,12(3*H*)-triona,4,8,9,10,11,13,14,15-octaidro-5-hidroxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-8-metil-; ZINC79190067 de nome 2*H*,6*H*-Pirano[2,3-*o*][2]benzoxaciclotetradecina-2,6,12(3*H*)-triona,4,8,9,10,11,13,14,15-octaidro-5-hidroxi-8-metil-4-(6-quinolinila)-, também foram submetidos à buscas nas bases de dados e na literatura, e nas análises realizadas não foram encontradas informações como artigos e patentes que descrevam as características de atividade química ou biológica destes compostos, observou-se apenas empresas que disponibilizam a venda destes compostos, podendo tratar-se também de compostos inéditos.

ZINC79193442 de nome 2*H*,6*H*-Pirano[2,3-*o*][2]benzoxaciclotetradecina-2,6,12(3*H*)-triona, 4,8,9,10,11,13,14,15-octaidro-5-hidroxi-8-metil-4-[4-[[4-(1-metiletil)fenil]metoxi]fenil]-, é descrito na patente chinesa CN111329858A (juntamente com o ZINC79196213 que é um código diferente, mas que refere-se a este mesmo composto), a qual o artigo demonstra a aplicação de um inibidor de molécula pequena na inibição de proteínas supressoras do silenciamento viral. Este composto é utilizado

no estudo para verificar sua eficácia na inibição da atividade de proteínas específicas envolvidas no silenciamento viral, podendo ser um potencial candidato para o desenvolvimento de terapias antivirais (Fan *et al.*, 2020).

ZINC01814811 identificado como 2,2'-Difenil[6,6'-bi-4H-3,1-benzoxazina]-4,4'-diona, em uma busca no *SciFinder* foi observada uma patente francesa FR1523133 de Sillion e Gaudemaris (1968) que cita este composto ele também encontra-se disponível para venda por alguns fornecedores. Há alguns estudos que o mencionam, como o de síntese e caracterização de polímeros, onde este composto atua fornecendo ligações covalentes na formação da cadeia de um polímero e contribuindo nas características físico-químicas do produto final, como exemplo a estabilidade térmica (Suthar; Patel, 1981). Em outro estudo, este composto serviu como monômero para a síntese de novas polibenzoxazinonas, sendo capaz se passar por ciclopolicondensação resultando em polibenzoxazinonas aromáticas com bons graus de conversão e alto peso molecular (Yoda; Ikeda; Kurihara, 1967). Este composto é também relatado como um dos intermediários sintéticos utilizados para a obtenção de 4H-3,1-benzoxazin-4-onas e 4-(3H) quinazolinonas, a partir de ácidos antranílicos e seus derivados. O composto é formado pela reação desses ácidos com o uso de trifenilo fosfito e piridina (Rabilloud; Sillion, 1980). Uma outra pesquisa discute o uso de computação de alto desempenho para prever possíveis produtos naturais com capacidade inibitória contra o SARS-CoV-2, que é o vírus causador da COVID-19, neste trabalho, o 2,2'-Difenil[6,6'-bi-4H-3,1-benzoxazina]-4,4'-diona foi identificado entre 58 compostos naturais previstos como principais ligantes no sítio de ligação da protease semelhante à papaína (PLpro) é uma enzima essencial para o SARS-CoV-2 (Byler; Landman; Baudry, 2020).

4.4 ANÁLISE DE INTERAÇÕES: COMPOSTO E ALVO MOLECULAR

As análises de interação (TABELA 2) foram realizadas considerando as interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio observadas no *LigPlot+* (Haider *et al.*, 2021). Já as possíveis ligações π - π foram analisadas no *PyMol* (Jones, 2021). Essas interações de cada composto, foram avaliadas tendo como base a ligação do composto controle ao sítio ativo da molécula alvo.

Tabela 2 - Informações do alvo molecular e seu respectivo sítio ativo

Alvo molecular	Código PDB	Resolução	Aminoácidos do sítio ativo	Referência
NSP3 do CHIKV	6W0T	1.95 Å	T111, L108, W108, S110, L109, G70, A23, N24, G30, D31, G29, Y114, V113, G112	Zhang <i>et al.</i> , 2021

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

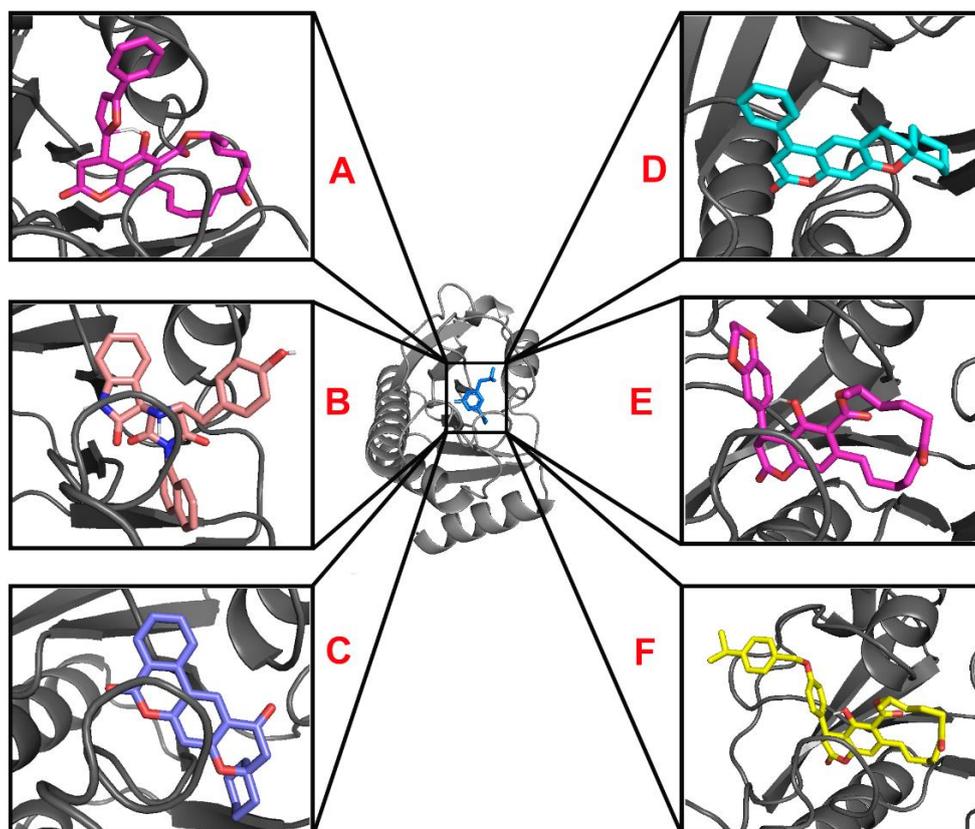
Nas análises no *LigPlot+* foi possível observar os dez compostos naturais que demonstraram melhores resultados na ancoragem molecular e então identificar quais foram as interações realizadas por cada composto para se ligarem ao alvo molecular, como as pontes de hidrogênio, as interações hidrofóbicas, bem como os aminoácidos presentes nestas interações (TABELA 3), permitindo então, entender quais dos dez compostos realizaram ligações no sítio ativo do alvo. As imagens das ligações entre os compostos e o alvo molecular podem ser observadas nas figuras 8 e 9.

Na ancoragem molecular, o composto que apresentou a melhor energia de ligação, o ZINC79188893 realizou 10 interações hidrofóbicas, sendo 4 presentes no sítio ativo, além de 3 pontes de hidrogênio, das quais duas (S110 e G70) ocorrem nos mesmos aminoácidos do composto controle. Nas análises realizadas, o composto ZINC15956716 apresentou 15 interações hidrofóbicas e 1 ponte de hidrogênio. Das interações hidrofóbicas, 4 encontram-se no sítio ativo.

O ZINC04084783 realizou 10 interações hidrofóbicas, sendo 3 envolvidos no sítio ativo, bem como 3 pontes de hidrogênio, sendo 1 (S110) presente em um aminoácido comum ao do composto controle. O composto ZINC02132060, demonstrou 10 interações hidrofóbicas, sendo 5 envolvidas no sítio ativo, além disso, formou 3 pontes de hidrogênio, das quais 2 estão em aminoácidos que o composto controle também realiza pontes de hidrogênio.

Já o ZINC79191510 exibiu 11 interações hidrofóbicas, com delas 4 situadas no sítio ativo. Houveram também, 4 pontes de hidrogênio sendo 2 em aminoácidos iguais aos do controle utilizado. ZINC79193442 realizou 15 interações hidrofóbicas, estando 5 no sítio ativo, em relação às pontes de hidrogênio, o composto realizou um total de 4 pontes, estando 2 delas nos mesmos aminoácidos do composto controle.

Figura 8 - Compostos ligados ao sítio ativo da molécula alvo (parte 1)



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Legenda: imagem 3D da ancoragem molecular dos compostos.

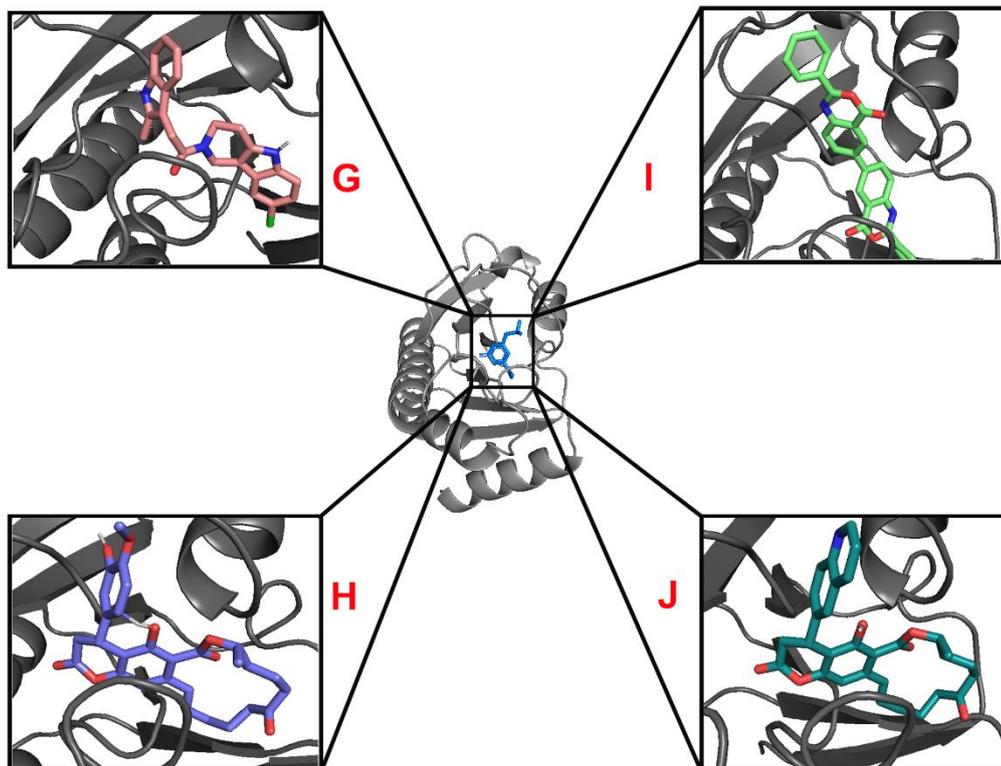
a) ZINC79188893, b) ZINC15956716, c) ZINC04084783

d) ZINC02132060, e) ZINC79191510 e f) ZINC79193442.

Nas interações de ZINC20760682, foi possível observar 11 interações hidrofóbicas, das quais 3 encontram-se no sítio ativo, e ainda 3 pontes de hidrogênio, sendo em comum com o composto controle 1 ponte de hidrogênio no aminoácido A23, (diferente dos outros compostos que compartilham pontes de hidrogênio com os aminoácidos S110 e G70). O composto ZINC79192364, apresentou 10 interações hidrofóbicas, estando 5 delas presentes no sítio ativo, as pontes de hidrogênio foram 5 e 2 delas, acontecem nos mesmos aminoácidos do composto tido como controle neste estudo.

Analisando o ZINC01814811 observa-se no total 14 interações, sendo 11 interações hidrofóbicas, das quais 2 localizam-se no sítio ativo do alvo molecular e 3 pontes de hidrogênio. Finalmente, o composto ZINC79190067 conta com 12 interações hidrofóbicas, e 5 destas interações estão no sítio ativo. Já as pontes de hidrogênio são 3 e delas 2 são comuns com os aminoácidos do composto controle.

Figura 9 - Compostos ligados ao sítio ativo da molécula alvo (parte 2)



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Legenda: imagem 3D da ancoragem molecular dos compostos.

g) ZINC20760682, h) ZINC79192364, i) ZINC01814811 e j) ZINC79190067.

Tabela 3 - Interações realizadas na ligação entre os compostos naturais e a 6W0T

Composto	Interações		
	Interação ÿ-ÿ	Pontes de hidrogênio	Interações hidrofóbicas
Controle	Y114	V113, S110, G70, A23	T111, L108, W108, L109, N24, G30, D31, G29, G112
ZINC79188893	0	V33, S110, G70	T111, R144, G32, V113, D31, A23, Y114, A22, L109, L108
ZINC15956716	0	T111	Y142, L108, S110, C143, W148, G112, V113, D31, G32, A23, Y114, A22, L109, V33, P107
ZINC04084783	0	S110, T111, V33	Y114, A23, A22, D31, G32, C143, Y142, L108, P107, G112
ZINC02132060	0	G70, S110, T111	A23, Y114, N24, V113, D31, G112, V33, L108, L109, A22
ZINC79191510	0	G70, D31, V33, S110	A23, C34, G30, Y114, A22, V113, G32, R144, T111, L108, L109
ZINC79193442	0	D31, V33, S110, G70	R26, N24, L28, G30, V113, L108, R144, G32, P107, T111, A22, L109, Y114, A23, C34
ZINC20760682	0	G112, A23, T111	N24, D31, A22, V113, V33, Y142, R144, C143, L108, S110, Y114
ZINC79192364	0	V33, S110, G70, C34, A22	R144, T111, L108, L109, Y114, A23, N24, G30, V113, G32
ZINC01814811	0	N24, T111, G112	A23, D31, Y114, V113, V33, Y142, P107, C143, L108, S110, A22
ZINC79190067	0	G70, V33, S110	A22, Y114, A23, V113, G30, C34, D31, G32, R144, T111, L108, L109

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Desta maneira, a partir das análises de interação é possível observar e identificar que, os compostos ZINC02132060, ZINC79193442, ZINC79192364 e ZINC79190067 realizaram um maior número de interações que se encontram em

aminoácidos presentes no sítio ativo do alvo molecular. Comumente, cada um destes quatro compostos naturais realizou 2 pontes de hidrogênio em aminoácidos que o controle também realiza estas pontes, sendo eles S110 e G70, além de compartilharem 5 interações hidrofóbicas em aminoácidos que o controle também faz ligações. Sendo assim, é possível prever que estes compostos possuem maior interação com o sítio ativo da nsP3, não excluindo os outros 6 compostos que possuem menos interações em comum ao controle, pois estes também se encontram ligados ao sítio ativo nas imagens observadas nas figuras 8 e 9, as quais demonstram que os dez compostos naturais identificados na ancoragem molecular se posicionam no sítio ativo da proteína não estrutural 3 do *Alphavirus* CHIKV.

4.5 PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA ADME-TOX

A análise de predição de características farmacocinéticas destes compostos (TABELA 4), também é de suma importância, visto que, dentre os dez compostos com melhores resultados a maioria são compostos ainda pouco explorados ou inéditos, o que torna esse estudo de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME-Tox) imprescindível para melhor entendimento de suas propriedades farmacocinéticas e terapêuticas. Estas análises foram realizadas através do servidor *pkCSM*.

Tabela 4-Resultados das análises de predição farmacocinética ADME-Tox

Composto	AI (%)	VDss (log)	IC	LT (mL/min/kg)	AMES	DMTR (mg/kg/dia)	HT
ZINC79188893	100	0.408	sim	0.157	não	-0.248	não
ZINC15956716	97.826	-0.847	sim	0.451	sim	-0.137	sim
ZINC04084783	97.021	0.376	sim	0.699	não	-0.262	sim
ZINC02132060	96.401	0.626	sim	0.89	sim	-0.036	não
ZINC79191510	100	0.18	sim	0.113	não	-0.598	não
ZINC79193442	100	-0.692	sim	0.018	não	-0.118	sim
ZINC20760682	85.85	0.181	sim	0.173	sim	0.574	sim
ZINC79192364	100	0.121	sim	0.286	não	-0.739	não
ZINC01814811	100	-0.599	sim	1.071	não	0.475	sim
ZINC79190067	100	0.251	sim	0.027	não	-0.121	sim

Fonte: Elaborada pela Autora (2024).

Legenda: AI= Absorção Intestinal humana; VDss= Volume de distribuição no estado estacionário; IC= Inibidores de enzimas do citocromo; LT= Liberação Total; AMES= Teste de toxicidade de AMES (mutagênese); DMTR= Dose máxima tolerada recomendada; HT= Hepatotoxicidade.

O *pkCSM* possui uma aba de informações que permite a interpretação destes dados numéricos proporcionando melhor entendimento à cerca das propriedades farmacocinéticas de cada composto. Na absorção intestinal (AI), fator muito importante na absorção de medicamentos administrados por via oral, os compostos que apresentem valores inferiores a 30% são considerados mal absorvidos (Pires; Blundell; Ascher, 2015b). É possível observar na tabela 4 que todos os compostos naturais avaliados possuem excelente AI atingindo porcentagens que variam entre 85.85% e 100%.

Em relação ao Volume de distribuição no estado estacionário (VDss) relaciona a dose administrada inicialmente, com a real presente na circulação (XIONG *et al.*, 2021), considera-se os seguintes valores: VDss < -0,15 é considerado baixo e VDss > 0,45 é considerado alto. A maioria dos compostos possuem um VDss alto sendo então mais distribuídos nos tecidos, pois quanto maior o VDss mais o composto distribui-se nos tecidos do que no plasma (Pires; Blundell; Ascher, 2015b). Apenas três demonstram valores baixos (ZINC15956716, ZINC79193442 e ZINC01814811) e um (ZINC79191510) apresenta um valor que fica entre os valores de referência podendo ser um composto que se distribui de forma igual entre tecido e plasma.

As análises de Inibidores de enzimas do citocromo P450 (IC), são de grande importância na avaliação da capacidade de um composto de inibir o CYP450, enzima que atua na desintoxicação do organismo. A inibição e a indução de CYP pode ocasionar efeitos adversos e resultar no aumento das concentrações plasmáticas levando à toxicidade, principalmente medicamentos que são coadministrados com outros medicamentos (Ouzounis *et al.*, 2023). Observa-se na tabela 4, que dos dez compostos todos apresentam inibição de isoenzimas do CYP.

A Liberação Total (LT) está relacionada à depuração do fármaco combinada a depuração hepática e renal, associada a biodisponibilidade é um fator importante para determinar as dosagens para a atingir concentrações desejadas. Este preditor apenas cita a liberação total do composto em mL/min/kg. Já o teste de Toxicidade de AMES, permite analisar o potencial mutagênico, ou seja, se dado composto pode atuar ou não como cancerígeno (Pires; Blundell; Ascher, 2015a). Na tabela, observa-se que

apenas três dos dez compostos são positivos para o teste de AMES.

A Dose Máxima Tolerada recomendada (DMTR), fornece dados que permitem estimar o limiar de toxicidade da dose auxiliando na predição e orientação de uma possível dose inicial máxima. Valores de DMTR menor ou igual a 0,477 (mg/kg/dia) são considerados baixos e acima de 0,477 (mg/kg/dia) são altos (Pires; Blundell; Ascher, 2015b). Dentre os compostos naturais aqui citados, apenas ZINC20760682 possui DMTR alta. Em relação a hepatotoxicidade (HT), trata-se da predição da possibilidade de um composto de estar associado à função normal interrompida do fígado, 6 dos compostos analisados apresentaram-se como hepatotóxicos. Ao observar a tabela, nota-se que, os compostos ZINC79188893 e ZINC79192364 demonstraram melhor desempenho nas análises farmacocinéticas, visto que possuem apenas inibição de isoenzimas do CYP450 e a DMRT baixa.

4.6 BIOISOSTERISMO

Analisando a tabela 4, é possível observar que todos os compostos possuem pelo menos uma característica indesejável, alguns são hepatotóxicos, ou tem sua dose máxima tolerada baixa, outros são inibidores ou substratos de isoenzimas do citocromo P450, tem volume de distribuição ruim ou até mesmo apresentam teste de AMES positivo.

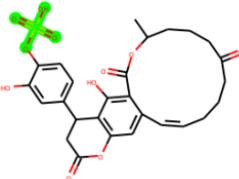
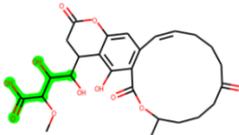
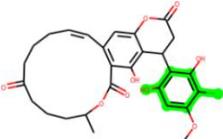
Diante destas questões, e visando a busca de uma molécula considerada ideal em sua farmacocinética, surge o Bioisosterismo, que permite a modificação estrutural dos compostos a partir da substituição de fragmentos moleculares para melhorar a atividade e parâmetros farmacocinéticos dos compostos alvo (Da Silveira *et al.*, 2021). Para a realização do bioisosterismo foi utilizado o servidor *MolOpt*, no qual nove dos dez compostos aqui estudados foram analisados, houve a exceção apenas do ZINC04084783 visto que, o *MolOpt* não encontrou nenhum grupo substituível para formação de bioisómeros desse composto natural. Durante a realização do bioisosterismo, foram obtidos através dos nove compostos naturais um total de 11.362 bioisómeros com as mais diversas variações em suas estruturas, sendo analisados minuciosamente.

Dentre as variações estruturais obtidas nos 11.362 bioisómeros, foi possível observar que 70 deles eram moléculas muito próximas do composto “ideal”, pois apresentavam quase todas as características satisfatórias, porém, em todos estes 70

a DMTR era baixa, não sendo iguais ou maiores que 0,477 o que desclassificou tais compostos. Houveram ainda, alguns que foram excluídos devido apenas ao volume de distribuição que apresentavam valores baixos. Boa parte também apresentou hepatotoxicidade ou inibição de isoenzimas do citocromo P450.

Ao final das análises das mais de 11 mil variações estruturais, foram encontrados três bioisómeros que possuem valores satisfatórios para todos os fatores analisados (absorção intestinal, volume de distribuição, inibição do citocromo, liberação total, testes de AMES e hepatotoxicidade), estes três compostos são provenientes de variações realizadas pelo bioisosterismo do composto natural ZINC79192364, que foi um dos compostos listados com melhor interação e farmacocinética apresentando apenas ação sobre enzimas do citocromo e DMTR baixa. Os bioisómeros foram nomeados utilizando a sigla do vírus (Chikv) acrescido de “_bio” e o número de acordo sua ordem de análise, ao final sendo chamados de: Chikv_bio1, Chikv_bio2 e Chikv_bio3. Os compostos selecionados foram submetidos à ancoragem molecular (TABELA 5) com a nsP3 (PDB: 6W0T) do CHIKV para avaliação de sua energia de ligação e possível potencial inibitório.

Tabela 5 - Resultado da ancoragem molecular entre os bioisómeros e a 6W0T

Identificação	Estrutura	Energia de ligação (Kcal/mol)
Chikv_bio1		-8.8
Chikv_bio2		-8.7
Chikv_bio3		-9.2

Os valores à cerca da farmacocinética das novas estruturas moleculares descritos na tabela 6, demonstram que, a absorção intestinal apresentou uma redução em todos os Chikv_bio em relação ao composto original ZINC79192364, porém todos ainda permanecem acima de 30% que é um valor satisfatório para a absorção intestinal. Todos demonstraram VDss dentro do valor de referência, para a distribuição nos tecidos, sendo todos acima de 0,45, e o Chikv_bio1 demonstrou ainda um aumento de VDss.

Em relação às isoenzimas do CYP450, os três bioisómeros demonstraram sucesso, pois não são substratos de CYP2D6 e CY3A4 e também não inibem nenhuma isoforma do citocromo, sendo assim, estes compostos não ocasionam nenhuma modificação ou alteração no processo de metabolização pois não interferem na ação do CYP450. A liberação total, não tem um valor de referência listado, mas observa-se que todos os valores são positivos, havendo a liberação dos compostos do organismo em mL/min/Kg.

Em totalidade, os compostos demonstram ser seguros quanto a toxicidade, não apresentando hepatotoxicidade, e teste de AMES negativo, ou seja, não são mutagênicos. Os três também apresentam ótimos valores de DMTR (todos acima de 0,477 mg/kg/dia), além disso, não são inibidores dos canais de potássio codificados pelo hERG (gene humano de éter-a-go-go) I e II.

Tabela 6 - Resultados das análises de predição farmacocinética ADME-Tox dos bioisómeros

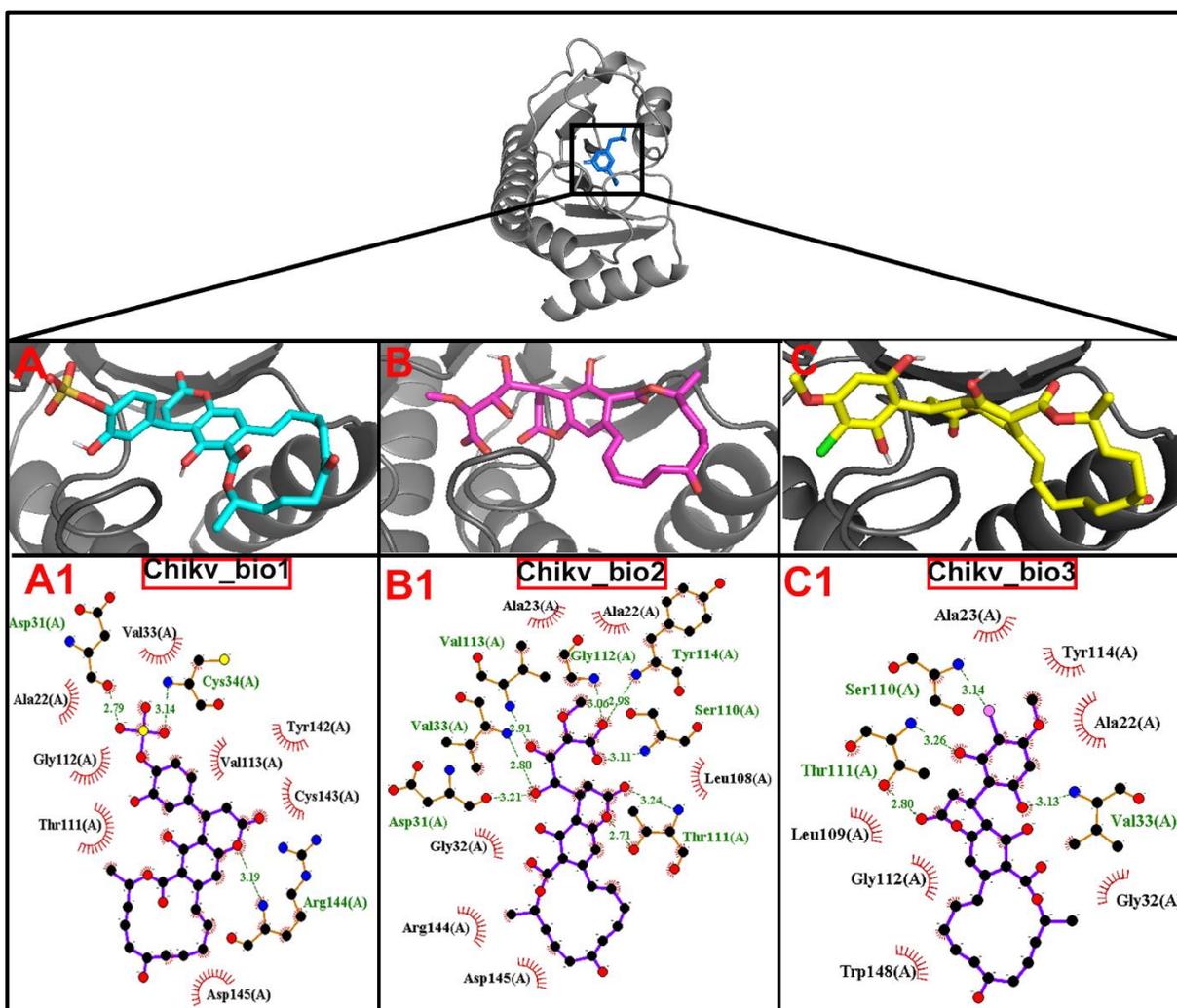
Composto	AI (%)	VDss (log)	IC	LT (mL/min/kg)	AMES	DMTR (mg/kg/dia)	HT
ZINC79192364	100	0.121	sim	0.286	não	-0.739	não
Chikv_bio1	51.266	0.656	não	0.003	não	0.536	não
Chikv_bio2	32.923	0.217	não	0.764	não	0.836	não
Chikv_bio3	86.898	0.202	não	0.09	não	0.493	não

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Legenda: AI= Absorção Intestinal humana; VDss= Volume de distribuição no estado estacionário; IC= Inibidores de enzimas do citocromo; LT= Liberação Total; AMES= Teste de toxicidade de AMES (mutagênese); DMTR= Dose máxima tolerada; HT= Hepatotoxicidade.

As interações destes três compostos foram também contabilizadas e avaliadas (FIGURA 10), sendo listadas na tabela 7. Neste contexto foram analisadas as interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e possíveis de interações π - π .

Figura 10- Representação 3D da ancoragem molecular dos bioisósteros e suas interações



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Legenda: a, b e c visualização 3D da ancoragem molecular dos Chikv_bio1, Chikv_bio2 e Chikv_bio3, em a1, b1 e c1 é possível observar as interações realizadas por estes bioisósteros.

O composto Chikv_bio1, possui um total de 8 interações hidrofóbicas e 3 pontes de hidrogênio. Das interações hidrofóbicas, 2 encontram-se presentes no sítio ativo da proteína.

O bioisósteros Chikv_bio2, realizou 6 interações hidrofóbicas, das quais 1 está situada no sítio ativo do alvo molecular, em relação às pontes de hidrogênio, houve a formação de 7, sendo 2 delas presentes em aminoácidos comuns ao do composto controle (V113 e S110).

O composto, Chikv_bio3, apresentou 7 interações hidrofóbicas, e 2 delas se localizam no sítio ativo, já as pontes de hidrogênio somaram 3 no total e 1 acontece

em um aminoácido que o composto controle também realiza ponte de hidrogênio.

Tabela 7 - interações entre os bioisósteros (Chikv_bio) e a 6WOT (nsP3)

composto	Interações		
	Interações ÿ-ÿ.	Pontes de hidrogênio	Interações hidrofóbicas
Controle	Y114	V113, S110, G70, A23	T111, L108, W108, L109, N24, G30, D31, G29, G112
Chikv_bio1	0	D31, C34, R144	V33, V113, Y142, C143, D145, T111, G112, A22
Chikv_bio2	0	D31, V33, V113, G112, Y114, S110, T111	A22, A23, L108, D145, R144, G32
Chikv_bio3	0	T111, S110, V33	A22, A23, Y114, G32, W148, G112, L109

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Foram também realizadas buscas no banco de dados *SciFinder*, correspondentes aos três compostos utilizando seus respectivos códigos de identificação (smiles), nestas análises à cerca dos bioisósteros Chikv_bio1, Chikv_bio2 e Chikv_bio3, não foram encontradas informações como artigos, patentes ou fornecedores, o que torna possível sugerir que estas são moléculas de caráter inédito ainda não exploradas.

Os resultados expressão então, que os três compostos selecionados após as modificações de bioisosterismo (Chikv_bio1, Chikv_bio2 e Chikv_bio3) apresentam características como farmacocinética, as interações e o resultado da ancoragem satisfatórias, demonstrando um potencial promissor como putativos inibidores da proteína viral nsP3.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A febre chikungunya, é uma doença que ocasiona uma sintomatologia diversa e que pode trazer sequelas crônicas aos pacientes, além disso, trata-se de uma arbovirose da qual grande parte da população brasileira está sob risco de infecção. Na atualidade, ainda não existem fármacos aprovados para seu tratamento. Esta pesquisa usou análises *in silico*, ancoragem molecular, avaliação farmacocinética e bioisosterismo para explorar compostos naturais como potenciais tratamentos.

Ao final da ancoragem molecular entre a proteína nsp3 (6W0T) e os 84.215 compostos naturais foram selecionados os dez compostos com melhor desempenho, seguindo para as análises de ADME-Tox foram identificados alguns parâmetros negativos na farmacocinética destes compostos que foram então corrigidos via bioisosterismo, o qual possibilitou a obtenção de três compostos promissores.

Os compostos modificados Chikv_bio1, Chikv_bio2 e Chikv_bio3 foram avaliados em relação à farmacocinética, ancoragem molecular e as interações realizadas apresentando-se como inibidores virtuais da nsp3. Sendo assim, novas abordagens podem ser propostas e análises adicionais podem ser realizadas para confirmar os resultados obtidos, bem como, testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar a ação destas moléculas em diferentes modelos biológicos.

REFERÊNCIAS

- ABDELNABI, R.; DELANG, L. Antiviral strategies against arthritogenic alphaviruses. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 1–18, 1 Sept. 2020.
- ABDULLAH, N. *et al.* The putative roles and functions of indel, repetition and duplication events in alphavirus non-structural protein 3 hypervariable domain (Nsp3 hvd) in evolution, viability and re-emergence. **Viruses**, [s. l.], v. 13, n. 6, 1 June 2021.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- BARTHOLOMEEUSEN, K. *et al.* Chikungunya fever. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 9, n. 1, 1 Dec. 2023.
- BASORE, K. *et al.* Cryo-EM Structure of Chikungunya virus in complex with the Mxra8 Receptor. **Cell**, [s. l.], v. 177, n. 7, p. 1725–1737.e16, 13 June. 2019.
- BAXTER, V. K.; HEISE, M. T. Genetic control of alphavirus pathogenesis. **Mammalian Genome**, [s. l.], v. 29, n. 7–8, p. 408–424, 1 Aug. 2018.
- BEHNIA, M.; BRADFUTE, S. B. The Host Non-Coding RNA Response to Alphavirus Infection. **Viruses**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 2–22, 1 Feb. 2023.
- BERMAN, H. M. *et al.* The protein data bank. **Acta crystallographica section d: biological crystallography**, [s. l.], v. 58, n. 6 I, p. 899–907, 2002.
- BORBA, J. R. B. de M. *et al.* Applying the bioisosterism strategy to obtain lead compounds against SARS-CoV-2 cysteine proteases: An in-silico approach. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 45, 1–12, Aug. 2023.
- BRASIL. Ministério Da Saúde. **Chikungunya_casos_prováveis_Série histórica_atualizado_óbitos confirmados SE52**. Brasília-DF: MS, [2023].
- BUTTON, J. M.; MUKHOPADHYAY, S. Removing the polyanionic cargo requirement for assembly of alphavirus core-like particles to make an empty alphavirus core. **Viruses**, [s. l.], v. 12, n. 8, 1 Aug. 2020.
- BYLER, K.; LANDMAN, J.; BAUDRY, J. High performance computing prediction of potential natural product inhibitors of SARS-CoV-2 key targets. **ChemRxiv.**, [s. l.], 1–24, [2020].
- DA SILVEIRA, N. J. F. *et al.* Bioinformatics approach on bioisosterism softwares to be used in drug discovery and development. **Current Bioinformatics**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 19–30, 26 May 2021.
- DE AZEVEDO JR, W. F. **Docking screens for drug discovery**. New York, NY: Springer, 2019.
- DE CARVALHO CARDOSO, R. *et al.* Role of arbovirus infection in arthritogenic pain manifestation—A systematic review. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 7, n. 11, 1 Nov. 2022.

- DE SOUZA, W. M. *et al.* Chikungunya: a decade of burden in the Americas. **Lancet Reg Health Am**, [s. l.], v.30, 1-11, Feb. 2024.
- EBERHARDT, J. *et al.* AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and Python bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 61, n. 8, p. 3891–3898, 23 Aug. 2021.
- ELIAS, T. C.; DE OLIVEIRA, H. C. B.; DA SILVEIRA, N. J. F. MB-Isoster: A software for bioisosterism simulation. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 39, n. 29, p. 2481–2487, 5 Nov. 2018.
- ELMASRI, Z.; NASAL, B. L.; JOSE, J. Alphavirus-induced membrane rearrangements during replication, assembly, and budding. **Pathogens**, [s. l.], v. 10, p. 1-19, 1 Aug. 2021.
- FAN, H. *et al.* Application of small molecule inhibitor in inhibiting virus silencing inhibiting protein. **Chemical Abstracts Service- CAS**, [s. l.], p. 1-13, June 2020.
- FELDSTEIN, L. R. *et al.* Estimating the cost of illness and burden of disease associated with the 2014–2015 chikungunya outbreak in the U.S. Virgin Islands. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 1–14, 1 July 2019.
- FILOMATORI, C. V. *et al.* Impact of alphavirus 3'UTR plasticity on mosquito transmission. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], p. 1-8, Mar. 2021.
- FUMAGALLI, M. J. *et al.* Chikungunya virus exposure partially cross-protects against mayaro virus infection in mice. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 95, n. 23, p. 1–16, 9 Nov. 2021.
- HAIDER, M. *et al.* Application of in silico methods in the design of drugs for neurodegenerative diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 995–1011, June 2021.
- HOLMES, A. C. *et al.* A molecular understanding of alphavirus entry. **Plos Pathogens**, [s. l.], v.16, p.1-20, 22 Oct. 2020.
- HUBÁLEK, Z. History of arbovirus research in the czech republic. **Viruses**, [s. l.], v. 13, n. 11, Nov. 2021.
- IRWIN, J. J. *et al.* ZINC20 - A free ultralarge-scale chemical database for ligand discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 60, n. 12, p. 6065–6073, 28 Dec. 2020.
- JONES, D. Student tutorial for Pymol: for educational use visualising proteins using molecular graphics. **School of Biosciences, Cardiff University**, Feb. 2021.
- JONES, R. *et al.* Capping pores of alphavirus nsP1 gate membranous viral replication factories. **Nature**, [s. l.], v. 589, n. 7843, p. 615–619, 28 Jan. 2021.
- KIM, A. S.; DIAMOND, M. S. A molecular understanding of alphavirus entry and antibody protection. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 21, p. 396–407, June 2022.

KRIL, V. *et al.* New Insights into chikungunya virus infection and pathogenesis. **Annual reviews of virology**, [s. l.], v. 8, p. 327–347, 2021.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 24 Oct. 2011.

LAURENT, T. *et al.* Architecture of the chikungunya virus replication organelle. **eLife**, [s. l.], v. 11, p. 1-25, Oct. 2022.

LAW, Y. S. *et al.* Structural insights into RNA recognition by the chikungunya virus nsP2 helicase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 116, n. 19, p. 9558–9567, 7 May 2019.

LAW, Y.-S. *et al.* Interdomain Flexibility of Chikungunya Virus nsP2 Helicase-Protease Differentially Influences Viral RNA Replication and Infectivity. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 95, n. 6, 24 Feb. 2021.

LIPINSKI, C. A.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Drug delivery reviews experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 23, p. 3–25, Aug. 1997.

MERLOT, C. Computational toxicology—a tool for early safety evaluation. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 15, n. 1–2, p. 16–22, Jan. 2010.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. Eastern equine encephalitis virus — another emergent. **N Engl J Med**, [s. l.], v. 381, p. 1989–1992, 2019.

MOSKVINA, V. S. *et al.* Synthesis and structure of 4-arylspiro-dihydro-pyranochromen-2-one derivatives. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 518–527, 2007.

MOURAD, O.; MAKHANI, L.; CHEN, L. H. Chikungunya: an emerging public health concern. **Current Infectious Disease Reports**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 217–228, 1 Dec. 2022.

NICACIO, J. M. *et al.* Heart disease and arboviruses: a systematic review and meta-analysis. **Viruses**, [s. l.], v.14, p.1-14, Sept. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Lançamento da iniciativa global de Arbovírus**. [s. l.]: OMS, 31. Mar. 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/events/detail/2022/03/31/default-calendar/global-arbovirus-initiative>>. Acesso em: 26 dez. 2023.

ORGANIZAÇÃO PAN- AMERICANA DA SAÚDE. **Atualização epidemiológica Dengue, Chikungunya e Zika**. [s. l.]: OPAS, 2023.

OUZOUNIS, S. *et al.* A robust machine learning framework built upon molecular representations predicts CYP450 inhibition: toward precision in drug repurposing. **A Journal of Integrative Biology**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 305–314, 1 July 2023.

- PAREEK, A. *et al.* Alphavirus antivirals targeting RNA-dependent RNA polymerase domain of nsP4 divulged using surface plasmon resonance. **FEBS Journal**, [s. l.], v. 289, n. 16, p. 4901–4924, 1 Aug. 2022.
- PARVATHANENI, V. *et al.* Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 2076–2085, 1 Oct. 2019.
- PATHAK, A. *et al.* Novel 2-pyrimidone analogs as potent antiviral agents against alphaviruses. **Chemical Abstracts Service- CAS**. [s. l.], p.1-237, 7 Oct. 2021.
- PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 14 May 2015a.
- PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. **pkCSM: predicting small molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures: theory-How to interpret pkCSM results**. [s. l.: s. n.], May 2015b, p.1-4.
- RABILLOUD, G.; SILLION, B. Synthesis of 4H-3,1Benzoxazin-4-ones and 4-(3H)quinazolinones from anthranilic acids and their derivatives by the use of triphenyl phosphite and pyridine. **J. Heterocyclic Chem.**, [s. l.], v. 17, p. 1065–1068, 1980.
- RANGEL, M. V.; STAPLEFORD, K. A. Alphavirus virulence determinants. **Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 8, 1 Aug. 2021.
- ROGERS, K. J. *et al.* TF protein of Sindbis virus antagonizes host type I interferon responses in a palmitoylation-dependent manner. **Virology**, [s. l.], v. 542, p. 63–70, 1 Mar. 2020.
- SAHU, A.; MISHRA, J.; KUSHWAHA, N. Artificial Intelligence (AI) in drugs and pharmaceuticals. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 1818–1837, 8 Dec. 2021.
- SARKAR, C. *et al.* Artificial intelligence and machine learning technology driven modern drug discovery and development. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v.2, p.1-40, 19 Jan. 2023.
- SCHNEIDER, N. *et al.* Substantial improvements in large-scale redocking and screening using the novel HYDE scoring function. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 701–723, Dec. 2012.
- SCIFINDER, C. Quick start guide for performing a search. **American Chemical Society**, [s. l.], 2024.
- SHAN, J.; JI, C. MolOpt: a web server for drug design using bioisosteric transformation. **Current Computer-Aided Drug Design**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 460–466, 5 July 2019.
- SILLION, B.; GAUDEMARIS, G. Poly-arylenes-(aryl-quinazolones), their manufacturing process and applications. FR1523133A. **French Institute of Petroleum, Fuels, and Lubricants**, p. 1-5, France, 3 May 1968.

SILVA, A. S. *et al.* Propriedades gerais dos vírus. In: **Tópicos em Virologia** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2023. p. 29-45.

SILVA, W. V.; SILVA, W. V.; HOLANDA, V. N. Estudo in silico do potencial de fármacos azólicos sobre Sars-Cov-2: uma abordagem química-medicinal. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 636–648, 5 nov. 2020.

SKIDMORE, A. M. *et al.* Benzamidine ML336 inhibits plus and minus strand RNA synthesis of venezuelan equine encephalitis virus without affecting host RNA production: amidine ML336 inhibits VEEV RNA synthesis. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 174, 1 Feb. 2020.

SKIDMORE, A. M.; BRADFUTE, S. B. The life cycle of the alphaviruses: from an antiviral perspective. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 209, 1 Jan. 2023.

SOUSA, S. S. DA S. *et al.* Características clínicas e epidemiológicas das arboviroses epidêmicas no Brasil: Dengue, Chikungunya e Zika. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [s. l.], v. 23, n. 7, 31 jul. 2023.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological Reviews**. California, v. 58, p. 491–562, 1994.

SUTHAR, B. P.; PATEL, S. R. New organic polymers: synthesis and characterization of poly[3,3'-(6,6'-bis-(2-substituted-4-quinazolonediy)) alkylene]s **Die angewandte Makromolekulare Chemie**. India, v.93, p.199-209, Mar. 1980.

TAN, Y. B. *et al.* Crystal structures of alphavirus nonstructural protein 4 (nsP4) reveal an intrinsically dynamic RNA-dependent RNA polymerase fold. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 1000–1016, 25 Jan. 2022.

TAYLOR-ROBINSON, A. W. Harnessing artificial intelligence to enhance key surveillance and response measures for arbovirus disease outbreaks: the exemplar of Australia. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 14, p.1-5, 25 Oct. 2023.

TEIXEIRA, A. F. *et al.* Simultaneous circulation of zika, dengue, and chikungunya viruses and their vertical co-transmission among *Aedes aegypti*. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 215, 1 Mar. 2021.

TORRES, P. H. M. *et al.* Key topics in molecular docking for drug design. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 18, 2 Sept. 2019.

TRIPATHI, N. *et al.* Applications of artificial intelligence to drug design and discovery in the big data era: a comprehensive review. **Molecular Diversity**, [s. l.], v. 25, p.1643-1664, 1 Aug. 2021.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v.31, p. 455-461, 30 Jan. 2010.

VAIRO, F. *et al.* Chikungunya: Epidemiology, pathogenesis, clinical features, management, and prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 1003–1025, 1 Dec. 2019.

WANG, M. *et al.* Structural insights into alphavirus assembly revealed by the cryo-em structure of getah virus. **Viruses**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 1–15, Feb. 2022.

XIONG, G.-L. *et al.* Explanation information ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. **Computational Biology & Drug Design Group**, [s. l.], p. 1-17, [2021].

YODA, N.; IKEDA, K.; KURIHARA, M. cyclopolycondensations. VI. fully aromatic polybenzoxazinones from aromatic aoly (amic Acids). **Journal Of Polymer Science**. Japan, p.2359-2364, 1967.

YOUNG, J. Y. *et al.* Worldwide protein data bank biocuration supporting open access to high-quality 3D structural biology data. **Database**, [s. l.], p.1-17, 2 Jan. 2018.

ZHANG, S. *et al.* Pyrimidone inhibitors targeting chikungunya virus nsP3 macrodomain by fragment-based drug design. **Plos One**, [s. l.], v. 16, n. 1, 1 Jan. 2021.

ZHONG, F. *et al.* Artificial intelligence in drug design. **Science China Life Sciences**, China, v.61, n.10, p.1191-1204, July 2018.

ZIMMERMAN, O. *et al.* Entry receptors — the gateway to alphavirus infection. **J of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 113, p. 1–12, 2023.