



**instituto de química**

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Revisão sobre metalofármacos com potencial antiviral  
para o tratamento de COVID-19 e informações referentes  
ao SARS-CoV 2**

**Henrique Yahagi Hoshima**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Química da Universidade Federal  
do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de bacharel em  
Química com atribuição tecnológica.**

**Orientadora: Marciela Scarpellini (Doutora - IQ/DQI)**

**Rio de Janeiro**

**Fevereiro/2022**

**Revisão sobre metalofármacos com potencial antiviral  
para o tratamento de COVID-19 e informações referentes ao  
SARS-CoV 2**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado por**

***Henrique Yahagi Hoshima***

Projeto Final de Curso submetido ao Corpo Docente do Instituto de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico/ Químico com Atribuições Tecnológicas/ Licenciado em Química.

---

**Profa. Dra. Marciela Scarpellini**

**Orientadora**

---

**Profa. Dra. Rosane San Gil**

**Coordenadora do Curso**

**Banca examinadora**

Aprovado por:

---

**Profa. Dra. Marciela Scarpellini**

---

**Prof. Dr. José C. de Barros Neto**

---

**Prof. Dra. Magaly Girão Albuquerque**

**Rio de Janeiro, RJ-Brasil**

**Fevereiro/2022**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida e por me cercar de maravilhosas pessoas. Sou extremamente grato inclusive, pela força e saúde que me permitiram atingir meus objetivos.

Aos meus pais, que por todos esses anos me apoiaram nas conquistas de meus objetivos, me conferindo sustentabilidade financeira e um ambiente amoroso e acolhedor apesar de minhas falhas.

Agradeço imensamente à imponente instituição de ensino UFRJ por me disponibilizar suas instalações para o desenvolvimento intelectual e permitir uma vivência acadêmica fundamental para a construção do cidadão que me tornei.

Gostaria de demonstrar minha gratidão especial à minha orientadora neste trabalho, professora doutora Marciela Scarpellini, por ter me aceitado como seu orientando, por ter me apresentado uma área de pesquisa a muito de meu interesse e principalmente pelo apoio e conforto emocional que me reaproximou da academia novamente durante esses tempos sombrios de pandemia.

Ao corpo docente da UFRJ, que durante minha trajetória nessa instituição, me conduziu pelo árduo caminho de aprendizagem e conferiu conhecimento para a evolução do cientista que hoje sou. Agradeço especialmente à professora doutora Elizabeth Roditi Lachter pela oportunidade de trabalhar como seu aluno orientado de iniciação científica, que desenvolveu em mim habilidades laboratoriais extremamente valorosas.

Sou grato a todo o corpo técnico-administrativo de nossa universidade pelo árduo trabalho de manutenção da estrutura de nossa instituição.

Por fim e tão importante quanto, aqui agradeço a todos os meus amigos e colegas que sempre estiveram do meu lado durante todas as minhas crises, me lembrando da minha humanidade e me confortando durante minhas quedas.

## RESUMO

A pandemia COVID-19 apresentando seu possível início na província chinesa de Wuhan e se espalhando pelo globo em aproximadamente 4 meses, gerou até o final do ano de 2021 centenas de milhões de óbitos por todo o mundo. Devido a seriedade da nova crise de saúde internacional, cientistas iniciaram pesquisas a respeito do genoma desse novo vírus através de comparações com materiais genéticos de outras cepas virais já enfrentadas. Então foram descobertos altos níveis de compatibilidade da nova cepa com a do vírus SARS-CoV que já havia causado uma epidemia. Sendo morcegos da região oriental um reservatório natural da cepa já conhecida, especula-se que o vírus possa ter origem desse meio, migrando para o organismo humano devido a uma mutação seguida de contato com humanos. Estudos a respeito do SARS-CoV 2 e de seu ciclo viral, revelaram que se trata de um vírus encapsulado de RNA de fita única e de sentido positivo que penetra nas células hospedeiras por dois mecanismos: endossomal e fusão de membranas. Após sua entrada na célula, foi identificado que enzimas virais são responsáveis pela produção de proteínas virais e pela manipulação celular. Com as informações a respeito das proteínas, as mesmas se tornam alvos farmacológicos para estratégias terapêuticas contra o novo coronavírus. Pesquisas realizadas principalmente na base de dados da Pubmed possibilitaram a reunião de informações a respeito de fármacos que foram usados de maneira emergencial no tratamento de enfermos graves, antivirais orgânicos e metalofármacos antivirais. Todos os fármacos selecionados foram categorizados e discutidos individualmente, apresentando os principais avanços em testes realizados sobre os mesmos. Em sua maioria, os metalofármacos apresentaram bons valores de inibição da atividade viral e sobre enzimas específicas, com valores abaixo ou próximos à  $10 \mu\text{molL}^{-1}$  e valores de Docking molecular, em sua maioria, abaixo de  $-6,5 \text{ kcal/mol}$  com relação aos sítios ativos de proteínas chaves, suportando os argumentos do quão promissor esses compostos podem ser. Evidencia-se novamente a disparidade de volume de dados clínicos entre fármacos de origem puramente orgânica e os metalofármacos, apesar de apresentarem uma característica de alto interesse: a atuação de amplo espectro, o que confere maior resistência às mutações do vírus alvo. Foram encontrados 11 candidatos a fármaco, dentre os quais 4 são metalofármacos com propostas de reposicionamento e 7 compostos em estudos iniciais. Os metalofármacos apresentaram maior tendência a atuarem através da inibição de alvos farmacológicos proteicos do SARS-CoV 2 por interação tiofílica com cisteínas presentes no sítio ativo da proteína. Os principais alvos selecionados pelos grupos de pesquisa foram 3CL<sup>pro</sup>, PL<sup>pro</sup> e a proteína S. Mais estudos são necessários para explorar outros alvos e avançar a implementação dos candidatos à fase clínica.

## Índice de Figuras:

<b>Figura 1.</b> Estruturas: dexametasona (esquerda) e prednisona (pró fármaco - direita).....	12
<b>Figura 2.</b> Estrutura do losartan.....	12
<b>Figura 3.</b> Estrutura da azitromicina.....	13
<b>Figura 4.</b> Estrutura da cisplatina.....	14
<b>Figura 5.</b> Estruturas: auranofina (esquerda) e subcitrato bismuto(III) de potássico (direita)..	14
<b>Figura 6.</b> Sulfadiazina de prata.....	15
<b>Figura 7.</b> Estrutura externa do SARS-CoV 2 .....	19
<b>Figura 8.</b> Principais constituintes do SARS-CoV 2.....	20
<b>Figura 9.</b> Genoma do SARS-CoV 2: acima genoma completo e abaixo região codificante aberta com as principais proteínas não estruturais, formadas pela clivagem de ambas poliproteínas.....	20
<b>Figura 10.</b> Estruturas: cloroquina (esquerda) e hidroxicloroquina (direita).....	27
<b>Figura 11.</b> Estrutura do ivermectina.....	28
<b>Figura 12.</b> Estrutura do anidulafungina.....	29
<b>Figura 13.</b> Estruturas: procaína (esquerda) e penicilina G (direita).....	30
<b>Figura 14.</b> Estruturas: camostat (esquerda) e nafamostat (direita).....	30
<b>Figura 15.</b> Estrutura do fluvoxamina.....	31
<b>Figura 16.</b> Estrutura do remdesivir.....	33
<b>Figura 17.</b> Estrutura do favipiravir.....	33
<b>Figura 18.</b> Estrutura do ledipasvir.....	34
<b>Figura 19.</b> Estrutura do nelfinavir.....	34
<b>Figura 20.</b> Estrutura do atazanavir.....	35
<b>Figura 21.</b> Estrutura do ebselen.....	39

<b>Figura 22.</b> Estrutura do citrato de ranitidina e bismuto (III).....	41
<b>Figura 23.</b> Estrutura do doxovir.....	41
<b>Figura 24.</b> Estrutura dos compostos de metisazona.....	42
<b>Figura 25.</b> Estruturas: tiossemicarbazonas de Ni (esquerda) e Fe (direita).....	43
<b>Figura 26.</b> Estrutura tiossemicarbazonas de Pd.....	43
<b>Figura 27.</b> Estrutura do composto 34 p-diamino-2,2'bipiridinatricarbonil de rênio(I).....	44
<b>Figura 28.</b> Estrutura AREAY.....	45
<b>Figura 29.</b> Estruturas: Cloreto de pentametilciclopentadienil 1,3-dicicloexilimidazol-2-ilideno de ródio (esquerda) e cloreto de pentametilciclopentadienil dipivaloimetanato de ródio (direita).....	46
<b>Figura 30.</b> Estrutura simplificada de M-ATCUN.....	47

## Índice de quadros:

<b>Quadro 1</b> Fármacos em uso e/ou em estudo contra a COVID-19.....	26
<b>Quadro 2</b> Fármacos antivirais em teste contra a COVID-19 por reposicionamento.....	32
<b>Quadro 3</b> Metalofármacos em teste para reposicionamento contra a COVID-19.....	36
<b>Quadro 4</b> Novos candidatos à metalofármacos em teste para reposicionamento contra a COVID-19.....	37

## **Lista de Siglas e Abreviaturas:**

3CL<sup>pro</sup>: proteína 3 tipo quimotripsina (M<sup>pro</sup>: proteína principal);

ACE2: Enzima conversora de angiotensina 2;

ASP: asparagina;

ATPase: adenisinatrilfosfatase;

bat SL-CoVZC45: coronavírus de morcego do tipo SARS cepa ZC45;

Beta-CoVs: subclassificação dos coronavírus;

Calu-3: células humanas de carcinoma pulmonar;

CC<sub>50</sub>: concentração citotóxica média;

cDNA: ácido desoxirribonucleico codificante;

COVID-19: doença coronavírus 2019;

CTC-96: composto quelado de cobalto número 96

CYS: cisteína;

CYS111: cisteína 111;

CYS145: cisteína 145;

DNA: ácido desoxirribonucleico;

EC<sub>50</sub>: concentração média de inibição viral;

ELISA: ensaio imunoabsorvente enzimático

EROS: Espécies Reativas de Oxigênio (ROS Reactive Oxygen Species);

FDA: administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos;

H.Pylori: Helicobacter pylori;

H1N1: um dos subtipos de vírus Influenza A;

HIV: vírus da imunodeficiência humana;

hPTP1B: proteína-tirosina fosfatase 1B humana;

Huh7: células humanas de carcinoma hepático;

IC<sub>50</sub>: concentração média de inibição;

ICP-MS: espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado;

IgG: imunoglobulina G;

IL-1: interleucina 1;

IL-6: interleucina 6;

K<sub>m</sub>: constante aparente de Michaelis-Menten;

LMCT: transferência de carga ligante-metal;

M-ATCUN: metal ligado a sítios de ligação amino terminais para níquel e cobre;

MERS-CoV: coronavírus da síndrome respiratória do meio leste;

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro;

ND: não disponível;

NF-κB: fator de transcrição nuclear kappa B;

NP: não possui;

nsp: proteína não estrutural;

OMS: Organização Mundial da Saúde (WHO - World Health Organization);

ORF1a: do inglês Open Reading Frame 1a;

ORF1b: do inglês Open Reading Frame 1b;

PL<sup>pro</sup>: proteína do tipo papaína;

pp1a: poliproteína 1a;

pp1ab: poliproteína 1ab;

RBC: citrato de ranitidina bismuto;

RBD: domínio de ligação receptor;

RdRp: proteína de RNA dependente de RNA;

Ref.: referência;

RNA: ácido ribonucleico;

RT-PCR: do inglês Real Time - Polymerase Chain Reaction;

RTC: complexo de replicação e transcrição;

S-ACE2: interação entre proteína spike e enzima conversora de angiotensina 2;

SARS-CoV: coronavírus da síndrome respiratória aguda;

SARS-CoV 2: coronavírus da síndrome respiratória aguda 2;

SARS-CoV Tor 2: coronavírus da síndrome respiratória aguda cepa Tor 2;

SI: índice de seletividade;

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina;

TMPRSS2: protease transmembranar serina 2;

TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa;

UTI: unidade de tratamento intensivo;

UV-Vis: região eletromagnética ultravioleta-visível;

Vero E6: células do rim de macacos verdes africanos;

# Sumário

Resumo.....	01
Índice de figuras.....	02
Índice de quadros.....	04
Lista de siglas e abreviaturas.....	05
1. Introdução.....	10
1.1. Cronologia e expansão.....	10
1.2. Intervenção farmacológica.....	11
1.3. Metalofármacos no uso clínico.....	13
2. Objetivos.....	15
3. Método.....	16
3.1. Método de pesquisa.....	16
3.2. Método de classificação de antivirais.....	16
4. Revisão bibliográfica.....	17
4.1. Epidemias, pandemias e endemias.....	17
4.2. O vírus SARS-CoV 2.....	18
4.3. A infecção celular.....	21
4.4. A tempestade de citocinas e a mortalidade.....	22
4.5. Conceitos farmacológicos.....	23
5. Perspectivas farmacológicas e a nova pandemia.....	24
5.1. Fármacos não antivirais reposicionados e/ou em estudo para o combate a COVID-19.....	25
5.2. Fármacos com propriedades antivirais em teste para reposicionamento para combate à COVID-19.....	31
5.3. Metalofármacos em estudo e reposicionados para o combate à COVID-19.....	35
5.4. Outras estratégias (“coquetéis medicinais”).....	48
6. CONCLUSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS.....	52

<b>8.</b>	<b>Apêndice.....</b>	<b>59</b>
<b>8.1.</b>	<b>Análises utilizadas no diagnóstico de pacientes.....</b>	<b>59</b>
<b>8.1.1.</b>	<b>ELISA.....</b>	<b>59</b>
<b>8.1.2.</b>	<b>RT-PCR.....</b>	<b>60</b>
<b>8.2.</b>	<b>Análise e parâmetros para a avaliação de potencial farmacológico.....</b>	<b>61</b>
<b>8.2.1.</b>	<b>Docking molecular.....</b>	<b>61</b>
<b>8.2.2.</b>	<b>Parâmetros de <math>CC_{50}</math>, <math>IC_{50}</math>, <math>EC_{50}</math>, <math>SI</math> e biodisponibilidade.....</b>	<b>61</b>
<b>8.3.</b>	<b>Referências dos anexos.....</b>	<b>62</b>

# 1. Introdução

Em dezembro de 2019, na cidade chinesa de Wuhan, se iniciava a proliferação de uma nova cepa altamente infectante em seres humanos da família *Coronaviridae*. Inicialmente, casos de pneumonia começaram a surgir na província em pessoas que tiveram contato com comerciantes do mercado local de produtos marinhos (Wuhan Huanan Seafood Wholesale Market), onde também eram vendidos animais silvestres, o que levou se considerar o mercado como o epicentro de uma nova epidemia. No início da pandemia em Wuhan, recursos clínicos foram utilizados para diagnosticar casos como: febre, sintomas agudos respiratórios e radiologia. Três casos suspeitos foram identificados no início de dezembro de 2019. O primeiro caso onde um homem, casado com uma mulher, que teve contato com o mercado de Wuhan, e seu filho foram considerados o primeiro grupo infectado pela COVID-19 (do inglês, **Coronavírus Disease 2019**). No segundo caso, uma mulher de 34 anos apresentou tromboembolia venosa e em seguida pneumonia. O terceiro caso foi de um homem de 51 anos com sintomas de resfriado, apresentando febre e alterações nas imagens de raios X dos pulmões (apresentou aumento de neutrófilos relacionados a *Mycoplasma pneumoniae*). Nesses 3 casos, os pacientes apresentaram problemas vasculares e em dois receberam diagnósticos de pneumonia. Com a posterior comprovação de casos não relacionados com o mercado de Wuhan, o estudo sugere que poderiam haver outros epicentros de infecção.<sup>1</sup>

## 1.1. Cronologia e expansão

No início do ano de 2020, os seguintes acontecimentos a respeito da COVID-19 foram notificados: em 09/01/2020 a OMS (Organização Mundial da Saúde) reportou que as autoridades chinesas determinaram que o novo surto era causado por um novo coronavírus; em 11/01/2020, a China confirmou o primeiro óbito por COVID-19; em 21/01/2020, o primeiro caso nos EUA; em 24/01/2020, os primeiros 3 casos (na França) da região europeia e em 25/01/2020, o segundo caso do continente africano foi confirmado.<sup>2</sup>

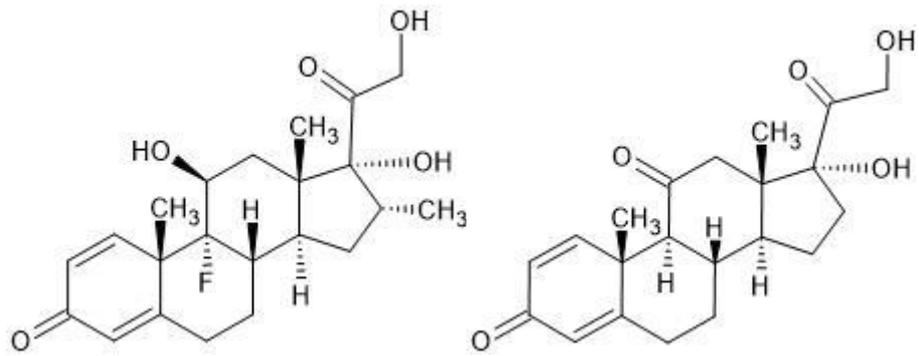
No dia 26/02/2020 foi confirmado o primeiro caso de COVID-19 no Brasil, um homem de 61 anos deu entrada no hospital Albert Sabim em São Paulo após retornar de uma viagem à região de Lombardia na Itália.<sup>3</sup>

Medidas de contenção foram tomadas pelas autoridades dos países afetados para reduzir o número de infectados e de mortes que aumentavam a cada dia, sobrecarregando os sistemas de saúde. A restrição de circulação de pessoas e contato social levaram à suspensão de atividades comerciais, industriais e de ensino, o que agravou e tornou ainda mais evidente os problemas sociais e econômicos pré-existentes em muitos países. Como exemplo, com o fechamento de portos e aeroportos houve um déficit no suprimento de matéria prima mineral, o que gerou uma estagnação de processos produtivos de diversos setores.<sup>4,5</sup>

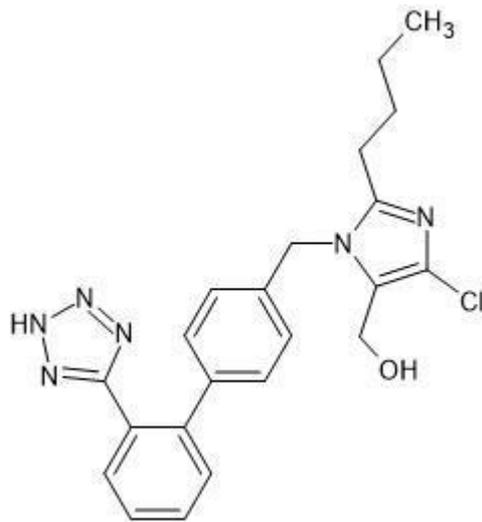
As medidas de contenção desempenharam um papel fundamental de ganhar tempo para que a comunidade científica encontrasse uma solução de longo prazo. Em todo o mundo, instituições de diversas esferas, privada e pública, uniram forças para a pesquisa do novo vírus, com o intuito de desenvolver novos e mais eficazes métodos de diagnóstico, medicamentos para o tratamento de pacientes e vacinas para que a crise sanitária seja superada.<sup>4,6,7</sup>

## **1.2. Intervenção farmacológica**

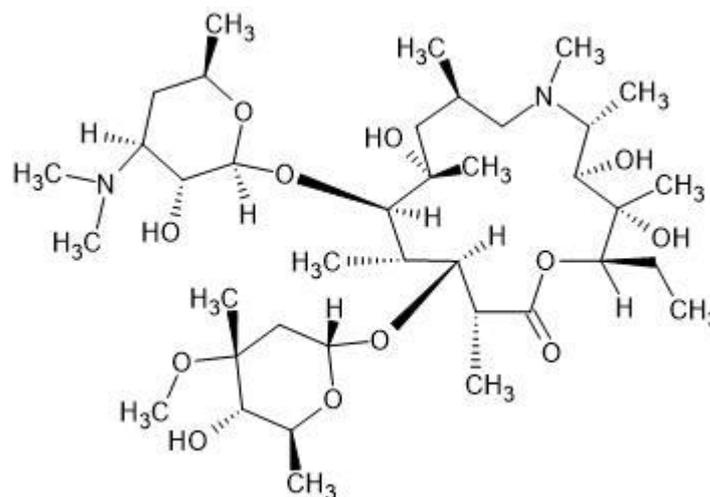
Devido à urgência da situação, medicamentos já conhecidos e que possuem atuação sobre os principais danos causados por esse novo vírus foram reposicionados com a intenção de amenizar os sintomas críticos que levam a óbito. A seguir nas figuras 1 a 3 são apresentados fármacos e pró fármaco corticoides, como a Dexametasona e Prednisona, anti-hipertensivo, como Losartan e antibiótico, Azitromicina, utilizados em pacientes críticos com o intuito de auxiliar a recuperação. Os corticoides agiriam sobre a produção das citocinas pró inflamatórias, o Losartan agiria sobre a angiotensina 2 e a Azitromicina foi ministrada para combater infecções bacterianas paralelas.<sup>4</sup>



**Figura 1.** Estruturas: dexametasona (esquerda) e prednisona (pró fármaco - direita).



**Figura 2.** Estrutura do losartan.



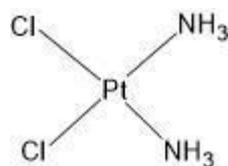
**Figura 3.** Estrutura da azitromicina.

De modo geral, os medicamentos utilizados atualmente são em sua maioria de natureza orgânica, obtidos de extratos naturais de plantas, ou moléculas sintéticas que mimetizam compostos naturais. Muitos desses medicamentos não combatem diretamente o microrganismo invasor, estes auxiliam o organismo do paciente no combate à enfermidade amenizando sintomas, ou sensibilizando o antígeno à neutralização pelos anticorpos. Considerando os medicamentos de natureza inorgânica e principalmente baseados em complexos metálicos, apresentam uma grande escassez de textos científicos e dados clínicos <sup>6,7</sup>. Uma estratégia empregada por essa área é a formação de um composto de coordenação entre moléculas de fármacos conhecidos e metais, que pode resultar em um aumento da atividade desses fármacos, ou até promover novas interações com bioalvos devido à nova estrutura formada. Então, um metalofármaco se trata de um fármaco com a presença de átomos metálicos em sua estrutura.<sup>6</sup>

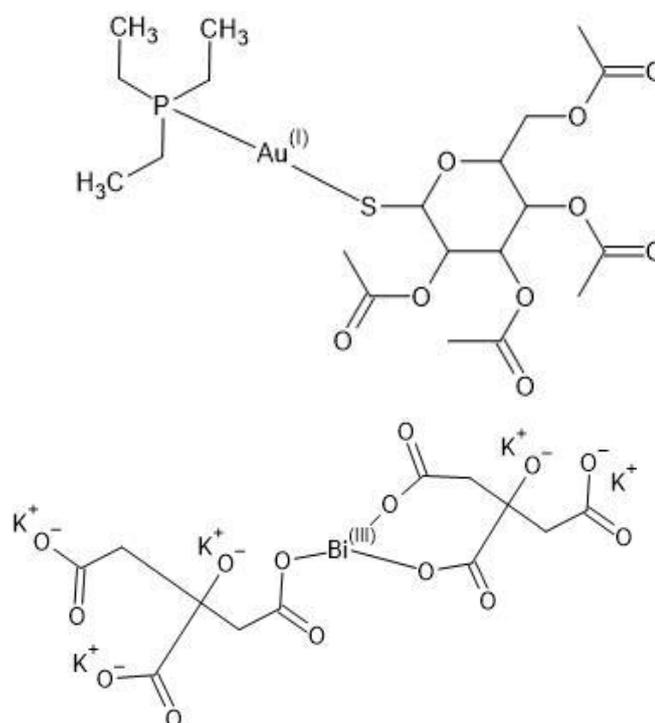
### **1.3. Metalofármacos no uso clínico**

Dos muitos possíveis candidatos a metalofármacos desenvolvidos, poucos chegaram a ser aplicados extensivamente em fase clínica. Atualmente, os dois aprovados mais conhecidos são: a cisplatina (o metalofármaco mais utilizado em quimioterapia no tratamento de câncer de próstata)<sup>6</sup> e o Auranofina (um medicamento popular na medicina védica à base de ouro (Au) e aprovado pela FDA (Food and Drug Administration, o órgão regulador de alimentos de

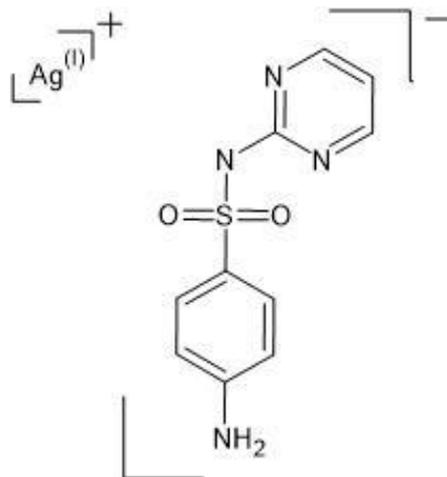
medicamentos dos Estados Unidos), que é utilizado para tratar pacientes diagnosticados com artrite reumatoide)<sup>6,7</sup>. Considerando a classe dos antivirais, a seguir algumas estruturas de metalofármacos aprovados para uso e disponíveis no mercado:



**Figura 4.** Estrutura da cisplatina.



**Figura 5.** Estruturas: Auranofina (acima) e subcitrato bismuto(III) potássico (abaixo).



**Figura 6.** Sulfadiazina de prata.

A sulfadiazina de prata ilustrada na figura 6, é um metalofármaco, comercializado pelo nome de Dermazine<sup>®</sup> Silvestre, de uso tópico para o tratamento de escaras, queimaduras e ferimentos pós cirúrgicos, que possui propriedades cicatrizantes e bactericida. Outro medicamento com sulfadiazina de prata em combinação com nitrato de cério é comercializado e indicado para as mesmas enfermidades, onde o nitrato de cério possui uma propriedade imunomodulatória. Ambos medicamentos foram produzidos por muitos anos pela farmacêutica Silvestre Labs<sup>®</sup>, localizada na cidade universitária da UFRJ, e que junto ao grupo Axis Biotec, se dedica a pesquisa e desenvolvimento de negócios no setor de saúde brasileira.<sup>53,54</sup>

Devido ao reduzido número de metalofármacos com atividade antiviral e à urgente necessidade de reposicionamento de medicamentos para o combate à pandemia da COVID-19.

## 2. Objetivo

O objetivo geral deste trabalho foi realizar um levantamento bibliográfico sobre metalofármacos com atividade antiviral e com potencial para serem aplicados como método profilático e/ou no tratamento de infecções para a atual pandemia da COVID-19, além de outras infecções virais. Após o levantamento bibliográfico, buscou-se categorizar os compostos encontrados de acordo com o método de classificação de fármacos antivirais. Neste trabalho, também foram discutidas informações mais atuais sobre a pandemia de COVID-19, conceitos

de epidemias e pandemias e reposicionamento de metalofármacos que apresentam promissores resultados *in vitro*<sup>6,7</sup>. Para finalizar, acredita-se que as informações reunidas e organizadas no presente trabalho auxiliarão no avanço das pesquisas nessa área que ainda é tão pouco explorada pela medicina moderna.

### **3. Método**

Motivado pela crise de saúde que ainda persiste e medidas sanitárias que restringem os trabalhos experimentais, optou-se por um trabalho de conclusão de curso na modalidade de revisão bibliográfica sobre metalofármacos no possível combate à COVID-19.

#### **3.1. Método de pesquisa**

O tema do trabalho foi decidido iniciando-se pesquisas em duas bases de dados mundialmente reconhecidas: Pubmed e Web of Science. Alguns textos foram obtidos de outras fontes como: Scielo, Journal of Virology, Virology Journal, Nature Microbiology e Chemical RXIV. Para a seleção de artigos com temas correlatos à ideia principal do trabalho foram utilizadas palavras chaves para as buscas, tais como: metalofármacos, metallodrugs, antiviral, metallopharmaceuticals, COVID-19 e SARS-CoV 2. Artigos que discutiam metais ou metalofármacos empregados no tratamento de infecções virais ou da própria COVID-19 foram selecionados para este trabalho, assim como artigos que apresentavam termos ou técnicas específicas da área. A etapa de pesquisa foi realizada, em sua maioria, entre os meses de junho e dezembro de 2021.

#### **3.2. Método de classificação de antivirais**

Em uma primeira aproximação, a classificação dos metalofármacos foi realizada a partir dos seus grupos metálicos. Porém, no campo da virologia foi observado que a classificação

desse ramo se dá através dos bioalvos virais (alvos farmacológicos), sendo este o mais adequado para a abordagem deste trabalho.<sup>6</sup>

## **4. Revisão Bibliográfica**

### **4.1. Epidemias, pandemias e endemias**

Desde de antes de Cristo, infestações de pragas e infecções afligem diversos povos. Naquela época, devido à precariedade dos sistemas sanitários e de saúde era inevitável que doenças contagiosas se proliferassem facilmente, causando impactos, como crises financeiras e na saúde.

Atualmente, com relação às crises de saúde, a OMS define 3 níveis de acordo com o alcance de contágio, sendo elas surto, epidemia e pandemia. Um surto é a menor área de contaminação de pessoas, podendo ocorrer dentro de um hospital, por exemplo. Epidemia se trata de contágios que atingem escalas estaduais e até federais, enquanto pandemia se caracteriza pela dispersão da infecção por outros continentes, ou o mundo todo e de maneira sustentada de pessoa para pessoa. Outro termo utilizado é endemia, que se trata de uma epidemia que perdura durante muito tempo em uma determinada região, como a dengue no Brasil. Essas infecções geralmente são de natureza viral, bacteriana ou protozoótica.<sup>8</sup>

Durante a história, pandemias tem feito milhões de vítimas, como a varíola nos 2 primeiros séculos D.C. (Peste Antonia e Peste Cipriano); a peste bubônica iniciada nos anos 500 e reaparecendo por volta de 1300; a gripe espanhola causada pelo vírus H1N1 que em 2 anos apenas (1918-1920), apresentou projeção de mortos de cerca de 100 milhões de pessoas e atualmente, a COVID-19 que ainda vem causando milhares de óbitos.<sup>9</sup>

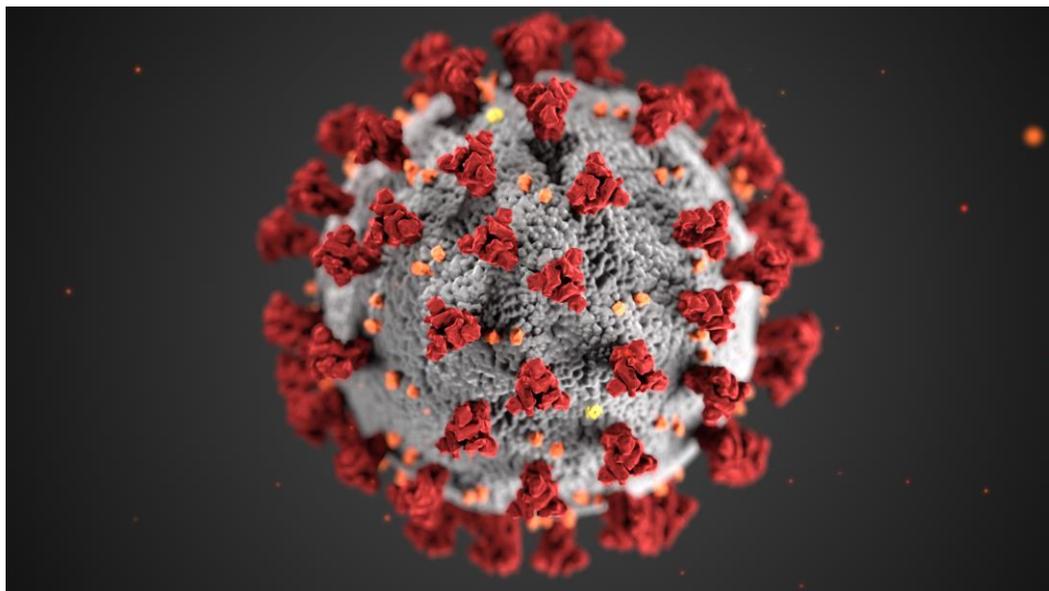
Além das medidas de contenção já mencionadas, seguindo as recomendações da OMS, propagandas informativas com relação ao que já se sabe e o que não se sabe sobre a atual crise de saúde mundial foram divulgadas com o intuito de acalmar a população e reduzir “epidemias de falsas notícias”, que poderiam levar à omissão por parte da população na realização das medidas sanitárias necessárias<sup>10</sup>. Pode-se citar exemplos de medidas sanitárias como: o uso de

máscaras (para conter o aerossol contaminante), frequente higiene das mãos (para evitar contaminações ao tocar mucosas), etiqueta respiratória (cobrir a boca ao tossir) e monitoramento de pessoas doentes e de seus círculos sociais.<sup>11</sup>

Até outubro de 2021, de acordo com a OMS (2021), o total de infectados atingiu 340 milhões e levou a óbito mais de 5,5 milhões de pessoas pelo mundo<sup>12</sup>. O Brasil, apesar de ser um dos países que tiveram tardiamente seus ápices de infecções, por um longo período apresentou taxas de mortes diárias em milhares. No momento, a mortalidade diária está por volta de 200 pessoas, com um total de mais de 23 milhões de casos confirmados e atingindo a faixa de 622 mil óbitos.<sup>13</sup>

## 4.2. O vírus SARS-CoV 2

O novo SARS-CoV 2 é classificado no gênero *betacoronavírus* (Beta-CoVs, havendo outros 3 gêneros: alfa, gama e delta) e no subgênero *Sabercovirus*. Os *betacoronavírus* são vírus envelopados em uma membrana plasmática de mesma natureza da membrana da célula hospedeira, com material genético de natureza RNA de fita única e de sentido positivo (5' → 3')<sup>14</sup>. A fisiologia do vírus é constituída de 4 proteínas principais: a **proteína S** (*Spike glycoprotein*), a **proteína M** (a proteína abundante de membrana), a **proteína E** (proteína do envelope viral) e a **proteína N** (constitui o nucleocapsídeo), imagens das estruturas nas figuras 7 e 8.<sup>15,16</sup>



**Figura 7.** Estrutura externa do SARS-CoV 2.<sup>49</sup>

Para estudos de alvos terapêuticos foram identificadas as regiões codificantes de proteínas não estruturais como: protease tipo papaína (do inglês: papain-like protease, PL<sup>PRO</sup>), protease tipo 3-quimotripsina (do inglês: 3-chymotrypsin-like protease, M<sup>PRO</sup> ou 3CL<sup>PRO</sup>), helicase (H) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), ver Figura 9.<sup>15,16</sup>

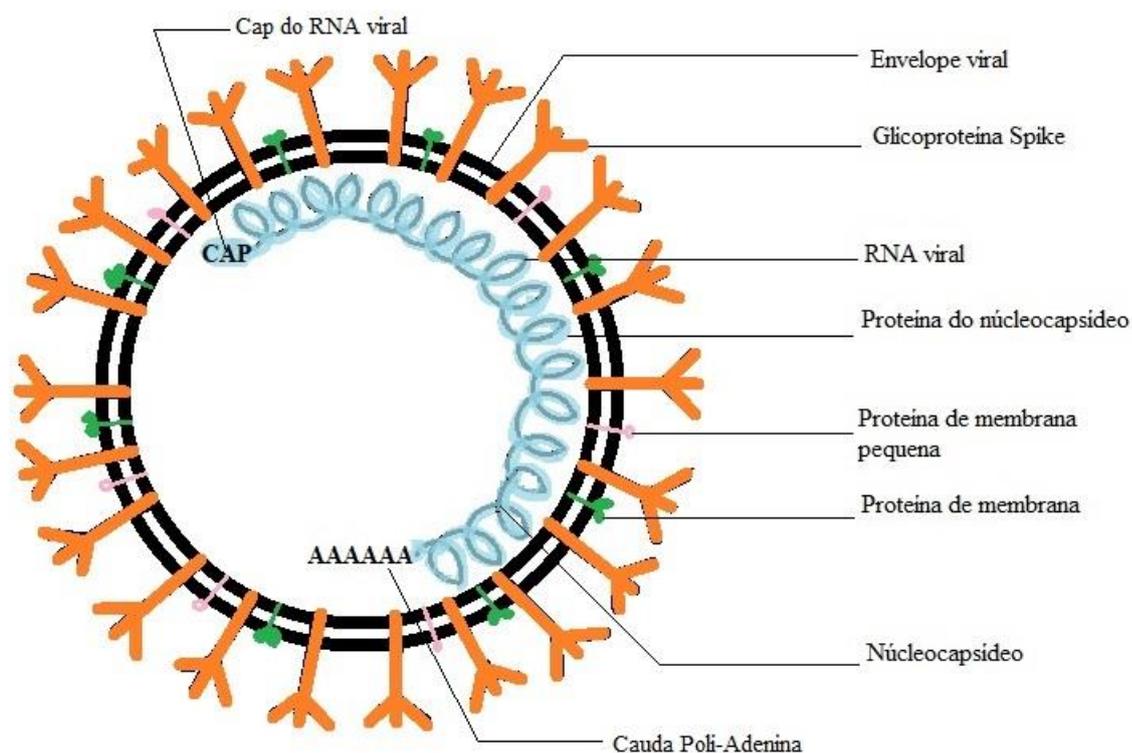


Figura 8. Principais constituintes do SARS-CoV 2.

### Genoma do SARS-CoV 2

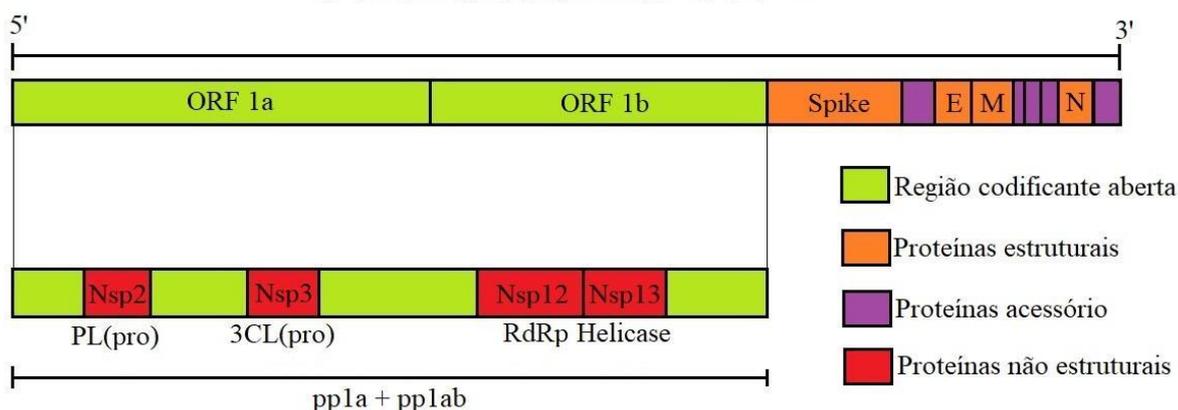


Figura 9. Genoma do SARS-CoV 2: acima genoma completo e abaixo região codificante aberta com as principais proteínas não estruturais, formadas pela clivagem de ambas poliproteínas.

De um dos primeiros pacientes chineses da província de Wuhan, foram coletadas amostras do fluido de lavagem bronquioalveolar e realizados estudos de filogenia sobre o material genético obtido. A sequência genômica foi determinada através da transcrição-reversa

por reação em cadeia de polimerase (do inglês: reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR). A organização genômica do SARS-CoV 2 foi obtida através da comparação com outras duas sequências de membros representativos do grupo beta coronavírus: SARS-CoV Tor2 (relacionado à infecções em humanos) e bat SL-CoVZC45 (um coronavírus presente em morcegos). O novo coronavírus apresentou uma correspondência de aminoácidos com o bat SL-CoVZC45 de 89,1% em uma das faixas genômicas, o que gerou a suspeita de que o vírus tenha origem neste reservatório natural. Com o avanço dos estudos, foram encontradas altas similaridades no código genético do novo coronavírus com o SARS-CoV na região que codifica o domínio do receptor de ligação (do inglês: receptor-binding domain RBD). Essa descoberta auxiliou a comunidade científica a compreender a infecciosidade do novo vírus, que utiliza o mesmo receptor do SARS-CoV, a enzima conversora de angiotensina 2 (do inglês: angiotensin-1-converting enzyme-2, ACE2). A ACE2 interage com a proteína S na superfície do coronavírus permitindo a entrada do vírus na célula.<sup>14</sup>

### **4.3. A infecção celular**

O meio de entrada mais discutido do vírus na célula é pela interação da proteína Spike S do invólucro viral com o receptor ACE2 da membrana celular. A proteína S se trata de um trímero que sofre uma clivagem em duas subunidades: S1 e S2. A proteína S, que contém as RBD, entra em contato com a ACE2 e sofre uma clivagem (pela TMPRSS2, furina ou catepsina), expondo RBD e liberando as subunidades S1 e S2. A subunidade S2 é clivada em dois domínios, HR1 e HR2, que participam da composição da estrutura de pós transfusão. Essas duas unidades introduzem os peptídeos de fusão na membrana celular, promovendo a fusão entre as membranas e abrindo um poro para a entrada do vírion.<sup>17</sup>

O SARS-CoV 2 assim como outros vírus possui o método de entrada em células através de endocitose. Com a subunidade S1 interagindo com a ACE2, há a formação de um endossoma (compartimento membranoso) que envolve o vírus. Dentro do endossoma, a Catepsina L (presente na membrana celular) possui o papel de promover a fusão entre as membranas viral e endossomal de maneira dependente de pH. Após iniciar o processo, as subunidades S1 e S2 procedem pelo mesmo método da entrada pela fusão de membranas anteriormente discutido.<sup>17,18</sup>

Após a entrada na célula, o nucleocapsídeo é rompido liberando o material genético do vírus no citoplasma celular. O RNA viral é traduzido em suas regiões de leitura abertas (ORF1a e ORF1b) produzindo 2 poliproteínas, pp1a e pp1ab. Então por clivagens proteolíticas, são liberadas as proteínas nsp1, PL(pro) e 3CL(pro), onde a nsp1 irá coordenar a maquinaria celular de proteossíntese para traduzir o genoma viral. As PL(pro) e 3CL(pro), perpetuam a clivagem das pp1a e pp1ab, do qual desta última se tratam de 16 proteínas não estruturais (nsp1-16) e novas proteínas estruturais N, S, E e M (a atuação dessas duas proteínas principais é fundamental, pois é responsável pela síntese do complexo de replicação e transcrição (RTC)). O RNA é transcrito em novas fitas complementares de RNA viral de sentido negativo com o auxílio das proteínas RdRp e helicase, gerando posteriormente as novas fitas de sentido positivo. As proteínas virais e as novas fitas de RNA sintetizadas pelo RTC são translocadas para a membrana do retículo endoplasmático e são armazenadas em compartimentos intermediários do aparato de Golgi (como “exossomas”). Nessa organela, o RNA viral transcrito é combinado com o nucleocapsídeo e sofre exocitose, recebendo seu envelope viral na saída através dos compartimentos vesiculares secretores do complexo de Golgi.<sup>15</sup>

#### **4.4. A tempestade de citocinas e a mortalidade**

O SARS-CoV 2 acomete tecidos do sistema respiratório e digestivo em diferentes extensões, causando inflamações e posteriormente lesões em órgãos, principalmente sobre os do sistema respiratório. A alta inflamação que acomete os tecidos epiteliais gera disfunções e lesões de órgãos acometidos, como as vias nasais e os alvéolos pulmonares, o que causa a perda de sensibilidade olfativa e de paladar, além da redução da eficiência das trocas gasosas gerando os principais sintomas da doença.<sup>4</sup>

As inflamações severas causadas por infecções são denominadas “**síndrome de tempestade de citocinas**”. As citocinas (proteínas sinalizadoras pró-inflamatórias) junto com os interferons (glicoproteínas com atividade antiviral) são os dois principais tipos de espécies químicas presentes em altas concentrações durante os processos inflamatórios gerados pela COVID-19. Esta síndrome, no caso de infecções respiratórias, é causada pela atuação excessiva de mastócitos (leucócitos granulares). Esse quadro não se trata de uma doença em si, mas de uma exaustão do sistema imune que leva à falência de órgãos. A intensificação ou

prolongamento dessa síndrome, causa apoptose dos tecidos epiteliais e endoteliais dos pulmões resultando em trombozes e síndrome aguda respiratória.<sup>19</sup>

Os mastócitos se tratam de células de defesa que funcionam como sensores às infecções virais e bacterianas no trato respiratório, liberando sinalizadores pró-inflamatórios, como as citocinas, quimiocinas e histamina. Segundo Hafezi et. al (2021) os mastócitos possuem um papel fundamental na entrada do SARS-CoV 2 nas células das mucosas, pois essas células de defesa produzem ACE2 serine protease (uma enzima responsável em transformar a angiotensina 1 em angiotensina 2 que é importante para a entrada do vírus nas células), TMPRSS2 (proporciona o *priming* da proteína Spike) e serina protease triptase derivada dos mastócitos (enzima essencial para a entrada do vírus na célula).<sup>19</sup>

O ponto de alta importância é a diferenciação das respostas imunológicas desreguladas das respostas efetivamente protetivas, pois inicialmente a presença das citocinas se trata de uma defesa natural do organismo à infecção. Neste cenário, se faz necessário o uso de fármacos para um tratamento conjunto cuidadoso que combata o vírus e a inflamação excessiva dos tecidos, em uma combinação de antivirais com anti-inflamatórios.<sup>19</sup>

#### **4.5. Conceitos farmacológicos**

Antes de começarmos a discussão sobre o tema principal do trabalho é importante apresentar algumas definições que serão extensamente utilizadas.

Segundo a FDA (2021), fármacos são produtos utilizados no diagnóstico, cura, mitigação de efeitos, tratamento ou prevenção de doenças, ou afetar estruturas ou funções no homem ou outros animais.<sup>20</sup>

Outro conceito muito utilizado na área farmacológica é a de pró-fármaco, que se trata de substâncias que são administradas ao paciente e através de um processo metabólico, são convertidas ou produzem um fármaco no organismo do paciente.<sup>21</sup>

Dentro do amplo conjunto de produtos definidos como fármacos, neste trabalho, os classificados como antivirais são os principais focos. Antivirais são fármacos utilizados no controle e prevenção de infecções virais e geralmente agem diretamente sobre componentes

fundamentais nos ciclos virais. Na área da virologia, esses componentes fundamentais para o ciclo viral são denominados alvos farmacológicos (ou alvos terapêuticos).<sup>21</sup>

Metalofármaco é a classe de fármacos que possui pelo menos um átomo metálico em sua estrutura. Esses compostos podem atuar como pró fármacos, sofrendo reações de substituição de ligantes e/ou reações redox antes de alcançar o alvo biológico. Alguns exemplos dessas atuações seriam: a interação com biomoléculas como o DNA, a utilização de um centro metálico para liberação controlada de um fármaco ou a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).<sup>22</sup>

Quatro principais parâmetros são fundamentais na avaliação da viabilidade de um composto como fármaco: biodisponibilidade, concentração de citotoxicidade (CC50), concentração de inibição (IC50) e índice terapêutico (IT50/CC50)<sup>21</sup>. Uma discussão com mais detalhes é tratada na seção de anexos.

## **5. Perspectivas farmacológicas e a nova pandemia**

Para as discussões a seguir, algumas informações podem ser úteis para compreender melhor as comparações feitas:

1. Uma revisão da literatura até o momento indica que faixas de valores de IC<sub>50</sub> e EC<sub>50</sub> que classificam como apropriado o candidato a fármaco não foram encontradas, porém valores abaixo de 30 µmolL<sup>-1</sup> foram considerados aceitáveis e valores bons devem estar próximos ou abaixo de 10 µmolL<sup>-1</sup> para o vírus SARS-CoV 2.
2. Para o parâmetro de CC<sub>50</sub>, valores acima de 100 µmolL<sup>-1</sup> são considerados aceitáveis para o vírus SARS-CoV 2.
3. Valores de Docking menores que -6,5 kcal/mol podem ser considerados como ligações entre fármaco e alvo farmacológico.<sup>38</sup>
4. A maioria dos estudos de EC<sub>50</sub> realizados foram em células Vero E6 (células de rins de macaco africano), porém em alguns estudos células como Caco-2(células de adenocarcinoma colorretal humano), Huh7(linha celular de carcinoma

derivada de hepatócitos) e Calu-3 (linha celular epitelial de câncer de pulmão humano) foram empregadas, além da citada anteriormente.

### **5.1. Fármacos não antivirais reposicionados e/ou em estudo para o combate à COVID-19**

Além daqueles citados na Introdução, a seguir, são apresentados outros fármacos que foram empregados em uso emergencial contra a COVID-19, ou estão sob estudo. Na Quadro 1, são apresentadas mais informações sobre os fármacos que vêm sendo utilizados em pacientes em estado crítico e outros que estão em testes in vitro.

**Quadro 1-** Lista de fármacos reposicionados e/ou em estudo contra a COVID-19.

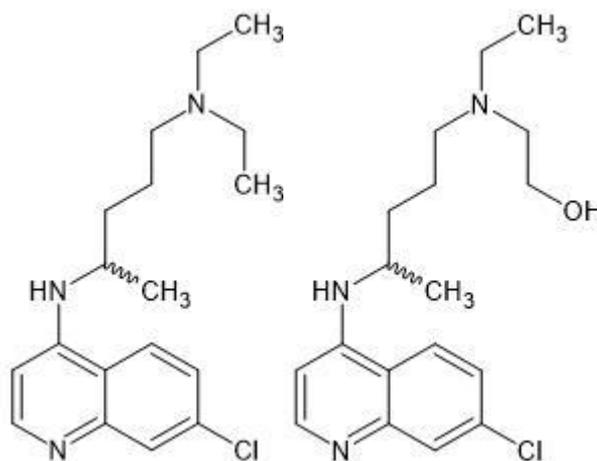
Fármaco	Aplicação atual	Classe de fármaco	Quadro clínico e/ou alvos farmacológicos	IC <sub>50</sub> ou EC <sub>50</sub> (μmolL <sup>-1</sup> )	Ref.
dexametasona	inflamações e alergias	corticosteroide	inflamação	ND*	17
prednisona	inflamações e alergias	corticoide	inflamação; M	ND	23
losartan	hipertensão arterial	bloqueador de receptor de angiotensina 2	inflamação; M	ND	23,42
cloroquina	antimalárico	antimicrobiano	IL-6 e TNFα; PL(pro)	1,1 (EC <sub>50</sub> )	24
hidroxicloroquina	antimalárico	antimicrobiano	IL-6 e TNFα; PL(pro)	4,5-17,0 (EC <sub>50</sub> )	24
ivermectina	vermífugo	antiparasitário	proteína Spike	2,0	24
anidulafungina	contra cândida	antifúngico	helicase, RdRp, S, N	4,6 (helicase)	23
penicilina G procaína	contra sífilis	antibiótico	3CL(pro)	ND	25
azitromicina	contra pneumonia	antibiótico	IL-1 e IL-3	ND	25
camostat	contra pancreatite	inibidor de serina protease	inibição da TMPRSS2	ND	23,28
nafamostat	contra pancreatite e esofagite	inibidor de serina protease	inibição da TMPRSS2	22,5(EC <sub>50</sub> )	23,28
fluvoxamina	S. Depressão Maior	recaptação de serotonina	inibição de citocinas	ND	23

\*ND- não disponível pela referência ou não encontrado para esse trabalho.

Com os sintomas evidentes de inflamação pulmonar nos pacientes de UTI (unidade de tratamento intensivo), uma das primeiras alternativas para auxiliar o tratamento desses enfermos são os anti-inflamatórios. Dos muitos que foram usados, tem-se como exemplo o corticosteroide dexametasona e o corticoide prednisona (Figura 1). Esperava-se que esses fármacos promovessem a vasodilatação nos tecidos inflamados, evitando o rompimento dos canais sanguíneos e o conseqüente desenvolvimento do quadro de fibrose pulmonar. Além desse efeito, alguns estudos investigam a atuação desses compostos sobre a inibição da produção das citocinas pró inflamatórias.<sup>17,23</sup>

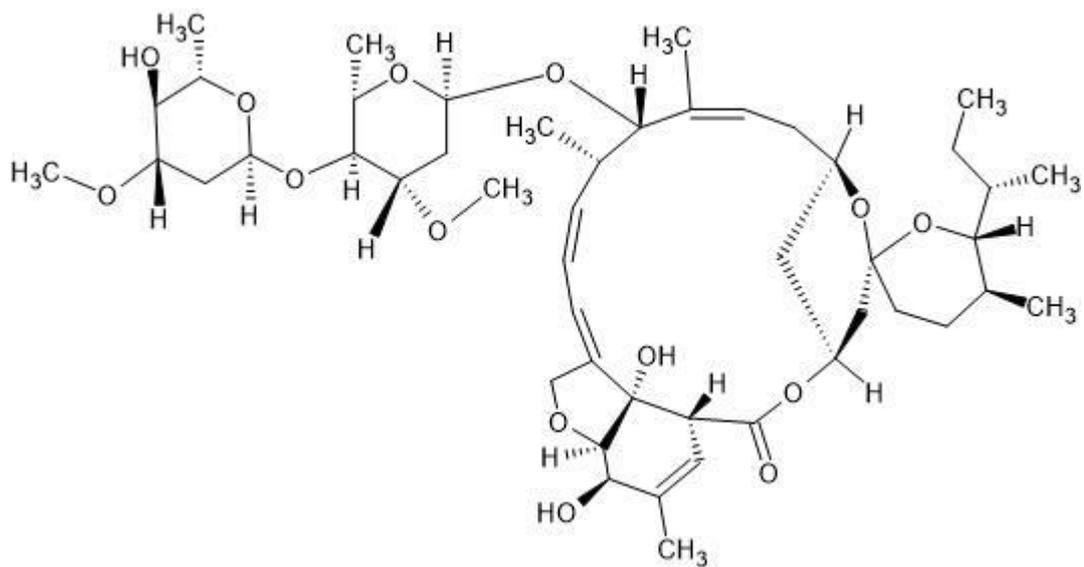
Outro fármaco conhecido que foi utilizado foi a losartan (Figura 2), que se trata de um anti-hipertensivo, que possui a função bloqueadora sobre os receptores de angiotensina 2. Não foram encontrados dados clínicos ou *in vitro* sobre esse fármaco.<sup>23,42</sup>

Dois fármacos muito discutidos foram a cloroquina e a hidroxicloroquina (Figura 10). Estes compostos são utilizados no tratamento de malária. A hidroxicloroquina se trata de uma versão menos tóxica da cloroquina. Ambos fármacos antimicrobianos possuem caráter levemente alcalino, que inibe a ativação de proteínas de transporte da membrana dos endossomas (como as catepsinas). Como já discutido, o mecanismo de entrada do SARS-CoV 2 por meio de endossomas é dependente do pH intra endossomal. Devido a essa propriedade, este fármaco foi considerado promissor para o tratamento emergencial nas UTI. Entretanto, os resultados clínicos da utilização deste medicamento são contraditórios, o que levou à suspensão de sua aprovação para uso emergencial pela FDA e a contraindicação pela comunidade científica.<sup>24</sup>



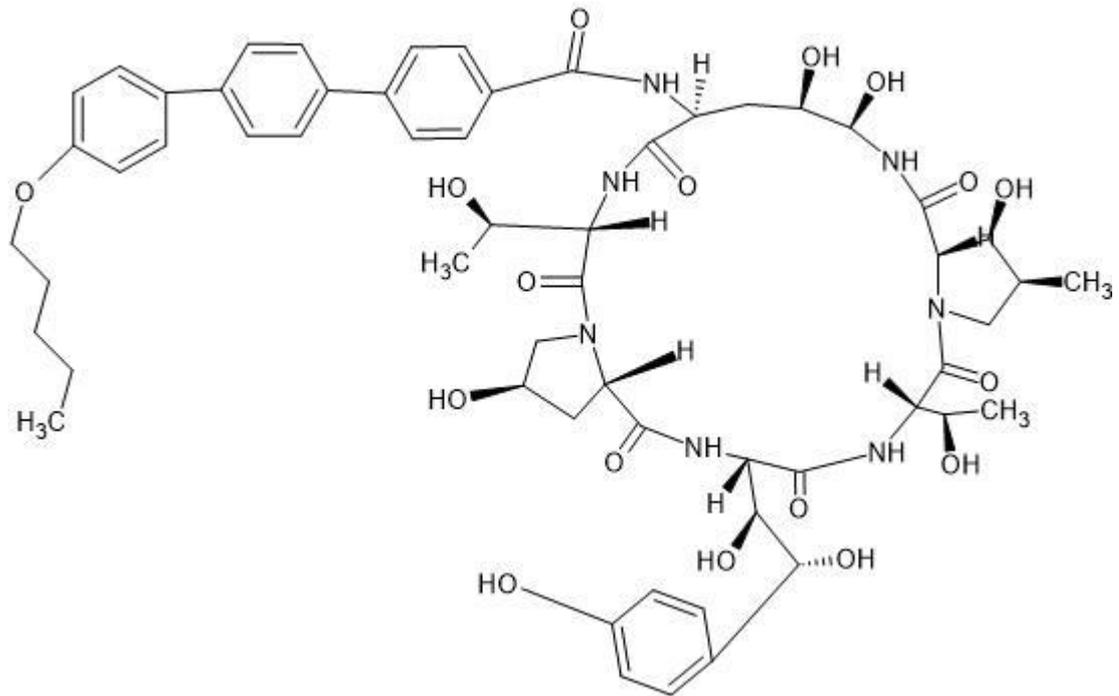
**Figura 10.** Estruturas: Cloroquina (esquerda) e hidroxicloroquina (direita).

A ivermectina (Figura 11) é um antiparasitário de uso veterinário. Esse fármaco age pelo aumento da permeabilidade da membrana nuclear das células parasitárias, induzindo a apoptose dos parasitas. Porém, alguns estudos evidenciaram atividade antiviral em cepas de dengue e chikungunya. Nas células humanas, esse fármaco induz a inibição de importação de proteínas virais pelo núcleo celular, impedindo o acesso do vírus à maquinaria intracelular.<sup>24</sup>



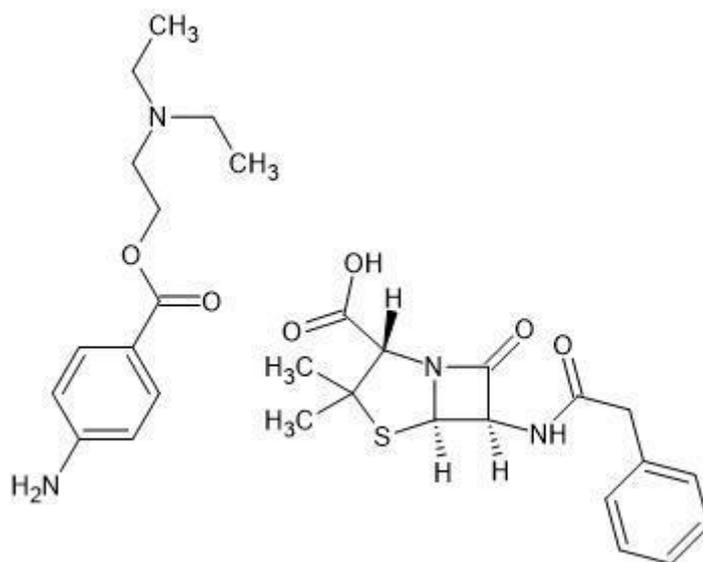
**Figura 11.** Estrutura do ivermectina.

Dentre os compostos selecionados para a discussão, foi incluído um antifúngico (anidulafungina, Figura 12) que é utilizado contra infecções invasivas, como a candidíase. Estudos indicaram que esse composto possui potencial inibitório sobre proteínas chaves da SARS-CoV 2, como a S, a P, a RdRp e a helicase. Contra a inibição da atividade da helicase foi obtido um valor promissor de  $IC_{50}$  de  $4,6 \mu\text{molL}^{-1}$ .<sup>23</sup>



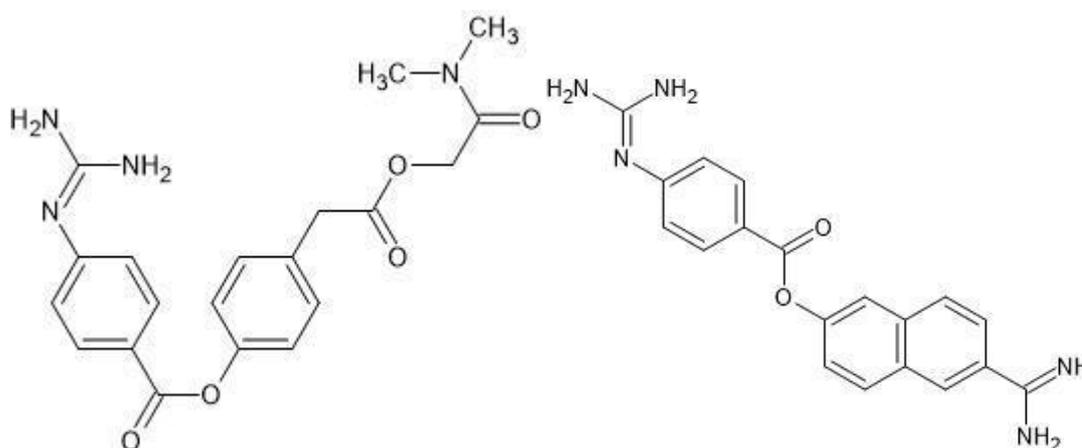
**Figura 12.** Estrutura do anidulafungina.

Da classe dos antibióticos, a Quadro 1 apresenta a penicilina G procaína (figura 13) e a azitromicina (figura 3). A representante das penicilinas apresentou atividade contra a 3CL(pro), enquanto a Azitromicina atua na amenização de inflamações nos tecidos pela diminuição da produção das citocinas IL-1 e IL-3 (IL- interleucina). Ambos medicamentos são utilizados para o tratamento de infecções bacterianas, porém são mais utilizados especialmente contra sífilis e pneumonia. A azitromicina vem sendo usada em tratamento profilático conjunto com outros medicamentos em pacientes em estado grave da COVID-19.<sup>25,26</sup>



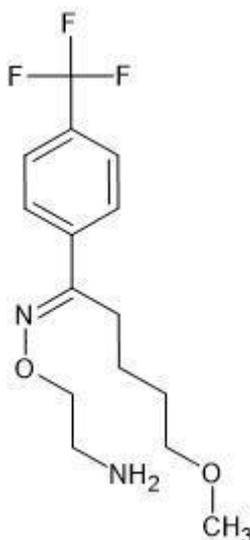
**Figura 13.** Estruturas: procaína (esquerda) e penicilina G (direita).

Camostat e nafamostat (Figura 14) são dois inibidores de receptores de serina protease que vêm sendo estudados para aplicação clínica contra a COVID-19. Esses medicamentos geralmente são usados para o tratamento de doenças gástricas relacionadas ao vírus *Helicobacter pylori*. Os estudos com o SARS-CoV-2 evidenciam que estes fármacos atuam sobre a TMPRSS2 impedindo a clivagem da proteína S e a interação efetiva S-ACE2. Para o Nafamostat, um estudo apresentou um bom valor de  $EC_{50}$  igual a  $22,5 \mu\text{molL}^{-1}$  em uma cultura de células Vero E6.<sup>23,28</sup>



**Figura 14.** Estruturas: camostat (esquerda) e nafamostat (direita).

Além dos danos causados às células do sistema respiratório, foram descobertas lesões à células nervosas pelo novo coronavírus. A fluvoxamina (Figura 15), um antidepressivo da classe dos recaptadores de serotonina, está em estudo para reduzir o processo inflamatório neural e as sequelas neurológicas em pacientes graves.<sup>23</sup>



**Figura 15.** Estrutura do fluvoxamina.

## **5.2. Fármacos com propriedades antivirais em teste para reposicionamento para combate à COVID-19**

Até o momento, ainda não foram desenvolvidos fármacos criados com a função específica de combater o SARS-CoV 2. Muitos grupos de pesquisas ao redor do mundo se esforçam para projetar, aperfeiçoar e levar para a fase de testes clínicos novos fármacos para que se alcance o controle da pandemia.

Como anteriormente já discutido, a estratégia adotada para um enfrentamento a curto prazo por essa classe de compostos se baseia no reposicionamento de antivirais já conhecidos e aprovados para uso no mercado. No Quadro 2 são apresentados alguns fármacos e seus alvos farmacológicos que foram propostos por pesquisadores da área para serem reposicionados para o tratamento de pacientes diagnosticados com COVID-19.

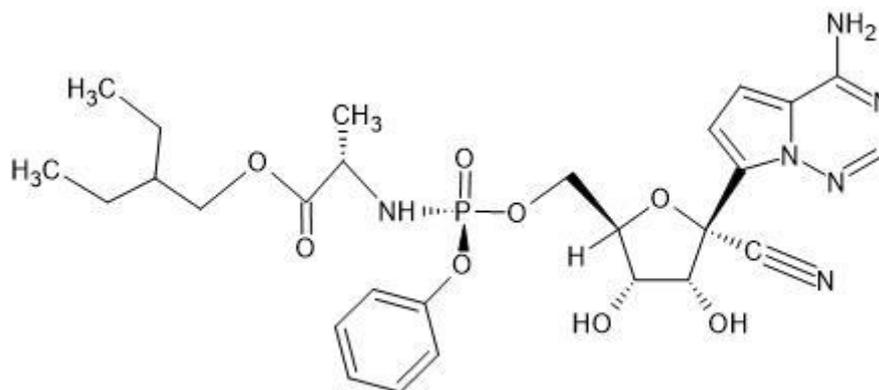
**Quadro 2-** Lista de fármacos antivirais em teste contra a COVID-19 por reposicionamento.

Fármaco	Aplicação atual	Classe de fármaco	Alvo farm. contra COVID-19	IC50 e (EC <sub>50</sub> ) (μmolL <sup>-1</sup> )	CC50 (μmolL <sup>-1</sup> )	Docking (kcal/mol)	Ref.
remdesivir (FDA ap.)	contra Ebola	antiviral	RdRp	6,6; 0,77 (EC <sub>50</sub> )	>100	-8,3	26,27
favipiravir	contra H1N1	antiviral	RdRp	61,6 (EC <sub>50</sub> )	~400	ND*	26
ledipasvir	contra hepatite C	antiviral	RdRp	34,6 (IC <sub>50</sub> )	>100	-8,9	27
nelfinavir	contra HIV	antiviral	3CL(pro)	2,9 (EC <sub>50</sub> )	ND	ND	28
atazanavir	contra HIV	antiviral	3CL(pro)	2,0 (EC <sub>50</sub> )	ND	ND	28

\*ND- não disponível pela referência ou não encontrado para esse trabalho.

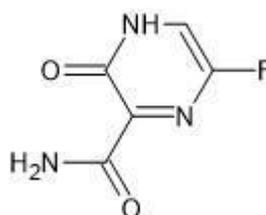
FDA ap. – aprovado pela FDA.

Dos antivirais estudados para o combate ao coronavírus, o remdesivir (Figura 16) foi o primeiro e único até o momento a obter a aprovação pela FDA e a ser amplamente divulgado na mídia. Este fármaco se trata de um análogo de nucleotídeo utilizado recentemente para o tratamento de enfermos infectados com Ebola. Este fármaco interage com a proteína viral RdRp, forçando uma terminação prematura no processo de tradução de proteínas virais. Os valores de EC<sub>50</sub> encontrados para esse fármaco foram de 0,77 μmolL<sup>-1</sup> por contagem de material genético (como em RT-PCR) e de 6,6 μmolL<sup>-1</sup> por uso de anticorpos contra proteínas do vírus em culturas de Vero E6. Estudos de Docking molecular apresentaram resultados de energia livre de -8,3 kcal/mol entre o Remdesivir e a RdRp, o que se classifica como uma interação efetiva entre as estruturas.<sup>26,27</sup>



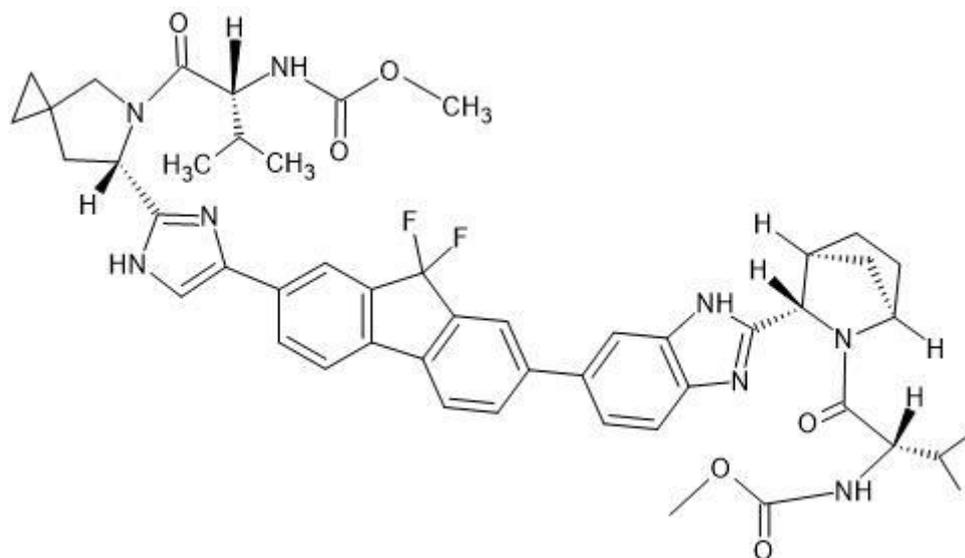
**Figura 16.** Estrutura do remdesivir.

Favipiravir (Figura 17) é utilizado no combate ao vírus da gripe comum, H1N1. Esse fármaco tem como alvo farmacológico a proteína RdRp. Em testes celulares de linhagem Vero E6, apresentou  $EC_{50}$  de  $61,6 \mu\text{molL}^{-1}$ . Devido às similaridades da gripe comum à COVID-19, é natural que medicamentos utilizados contra *influenza vírus* sejam submetidos a testes para reposicionamento.<sup>26</sup>



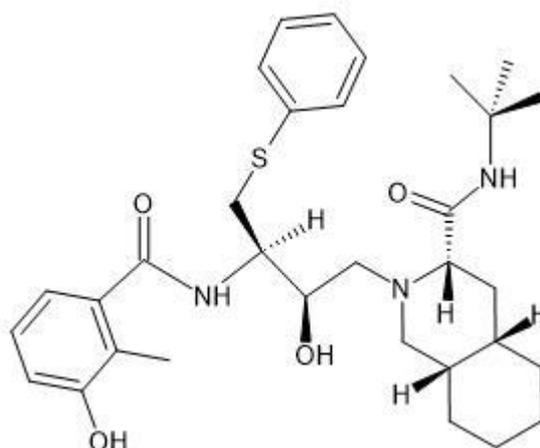
**Figura 17.** Estrutura do favipiravir.

Ledipasvir (Figura 18) é um antiviral utilizado no tratamento de hepatite C tipo 1, atuando sobre a proteína de RdRp, também presente no novo coronavírus. Em seu estudo foi determinada a  $IC_{50}$  entre o fármaco e a RdRp, apresentando um valor de  $34,6 \mu\text{molL}^{-1}$  em linhagens de Vero E6.<sup>27</sup>

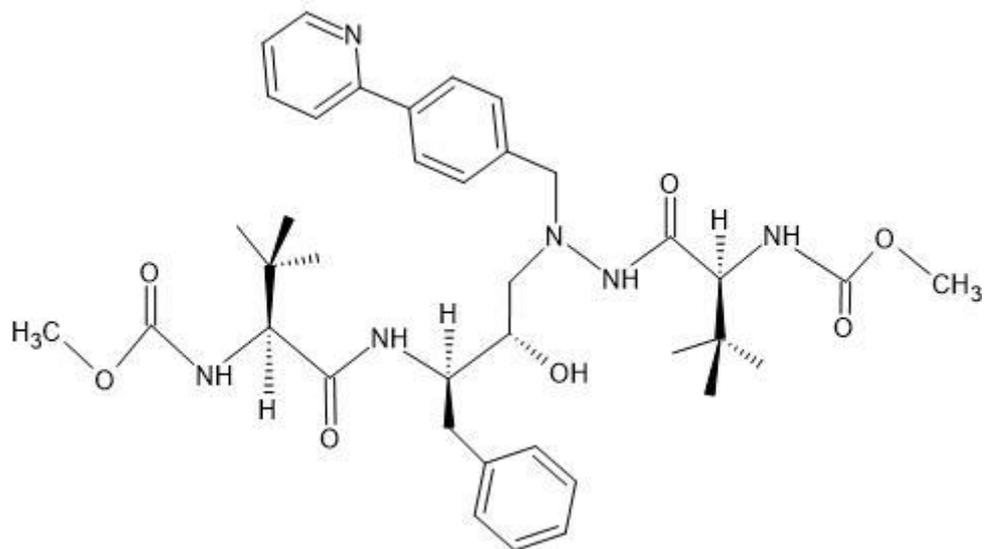


**Figura 18.** Estrutura do ledipasvir.

Ao fim da lista, dois antivirais (nelfinavir e atazanavir) (Figuras 19 e 20, respectivamente) empregados no tratamento da infecção pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) foram testados para reposicionamento, onde se acredita que possuam atividade inibitória sobre a proteína principal do SARS-CoV, a 3CL(pro). As testagens evidenciaram valores promissores de  $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$  e de  $2,9 \mu\text{molL}^{-1}$  para o atazanavir e nelfinavir, respectivamente, em células Vero E6.<sup>28</sup>



**Figura 19.** Estrutura do nelfinavir.



**Figura 20.** Estrutura do atazanavir.

Nesta seção foram apresentados apenas 6 fármacos antivirais representativos, porém há muitos trabalhos apresentando outros antivirais sob a mesma perspectiva de reposicionamento para a causa da COVID-19.

### **5.3. Metalofármacos em estudo e reposicionados para o combate à COVID-19**

Nesta penúltima parte do trabalho serão apresentados os principais avanços e estratégias utilizados no desenvolvimento de fármacos à base de metal para possíveis tratamentos contra a infecção de SARS-CoV 2. No Quadro 3, foram organizados os metalofármacos com informações a respeito de sua aplicação atual, classe de fármaco a que pertence, alvo farmacológico no vírus da COVID-19, IC<sub>50</sub>(ou EC<sub>50</sub>), valores de docking, centro metálico e referência das informações apresentadas.

**Quadro 3-** Metalofármacos em teste para reposicionamento contra a COVID-19.

Fármaco	atual aplicação	Class. Fármaco	Alvo Farm.	IC50 ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )	Docking (kcal/mol)	Metal	Ref.
auranofina	contra artrite reumatóide	agente anti-reumático	ACE2; PL(pro)	<u>1,5</u> EC <sub>Huh7</sub> ; <u>22,2</u> IC; <u>0,75</u> IC	ND*	Au(I) (III)	6,16, 29,30
ebselen	anti-inflamatório	anti-inflamatório	PL(pro); 3CL(pro)	4,0; 4,7 (EC <sub>50</sub> )	ND	Se <sup>@</sup>	16,32
citrato de ranitidina e bismuto(III) (RBC)	anti H.pylori	anti viral/ anti úlcera	Helicase	4,6	ND	Bi(III)	37
doxovir; (CTC-96)	antiviral	antiviral	Zn fingers; ACE; S	ND	ND	Co(III)	6

\*ND- não disponível pela referência ou não encontrado para esse trabalho.

#NP- candidato a fármaco em teste que **não** possui classe e/ou atuação farmacológica atualmente.

@ - Selênio não é considerado um metal, mas sim um metalóide.

nsp16 – do inglês non structural protein 16

**Quadro 4-** Novos candidatos à metalofármacos em estudo contra a COVID-19.

Fármaco	atual aplicação	Class. Fármaco	Alvo Farm.	IC50 ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )	Docking (kcal/mol)	Metal	Ref.
Derivados de Metizazona	contra varíola	antiviral	PL(pro),S 3CL(pro), RdRp	ND	-7,4;-7,3 -8,3	Fe, Mg, Mn	33
Tiosemicarbazonas de Fe(III)	anti-câncer	anticâncer	3CL(pro)	100 (máx)	ND	Fe(III)	34
Tricarbonil Re(I)	NP <sup>#</sup>	NP	3CL(pro)	9,0a 20,0	ND	Re(I)	36
Tiosemicarbazonas de Pd(II)	anti câncer	anticâncer	produção de EROS	ND	-9	Pd(II)	35
Complexos de Vanádio (I,IV,V)	antiviral	antiviral	3CL(pro)	ND	(-5)a(-9)	V, VO	38
Ciclopentadienila de Rd	anti tuberculose	antibiótico	Spike	~12,0	ND	Rd	39
M-ATCUN	liberação local de EROs	produtor de EROs	Spike	ND	ND	Cu, Ni e Co	40
Mn(II) e Mg(II) nsp16	NP	NP	Cap RNA viral (nsp16)	ND	ND	Mn(II) ) e Mg(II) )	41
Trat. Remd.;Cu(II);NAC; Colchicina; NO	NP	NP	PL(pro); S; N	ND	ND	Cu(II)	42

\*ND- não disponível pela referência ou não encontrado para esse trabalho.

#NP- candidato a fármaco em teste que **não** possui classe e/ou atuação farmacológica atualmente.

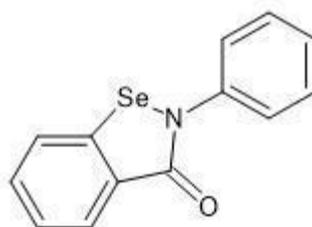
@ - Selênio não é considerado um metal, mas sim um metalóide.

nsp16 – do inglês non structural protein 16

O primeiro item do Quadro 3 parte 1 de fármacos se trata da auranofina (Figura 5), um composto baseado em seu centro metálico de ouro (Au) geralmente nos estados de oxidação Au(I) ou Au(III). Esse composto e todos os seus derivados pertencem à classe de anti reumáticos, sendo atualmente aprovado pela FDA para o tratamento de artrite reumatoide. Em testes durante infecções de SARS-CoV 2, a Auranofina apresentou aumento na regulação da produção de citocinas dos tipos IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e NF-kB. Trabalhos realizados por grupos de pesquisas sobre fármacos à base de ouro, apresentaram valores de EC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> de 1,5  $\mu\text{molL}^{-1}$  e 5,7  $\mu\text{molL}^{-1}$  em culturas de células Huh7. Outro estudo apresentou a CC<sub>50</sub> de 14,2  $\mu\text{molL}^{-1}$  na linhagem Vero E6, porém sem valor de EC<sub>50</sub>. Valores de IC<sub>50</sub> foram encontrados no estudo em que se comprara a inibição das S-ACE2 e 3CL(pro) por complexos à base de ouro com ligantes de carbenos heterocíclicos ou ligantes alquílicos, onde a auranofina apresentou valores 22,2  $\mu\text{molL}^{-1}$  e 0,75  $\mu\text{molL}^{-1}$  contra S-ACE2 e 3CL(pro) respectivamente. Estes estudos defendem a teoria de que a auranofina age como um composto tiolfílico, onde os grupos tióis dos fragmentos de cisteínas das proteínas apresentaram forte tendência a se coordenarem ao íon de ouro, deslocando íons de zinco(II) de regiões de dobras das proteínas, conhecidas como dedos de zinco (do inglês: zinc-fingers)<sup>16,29</sup>. Ao deslocar o íon zinco da estrutura proteica, o íon de ouro desencadearia uma mudança estrutural nos sítios ativos dessas moléculas, inativando-as. Outro modo de inibição apresentado no caso da 3CL(pro), o fármaco de ouro se liga à cisteína 111 (CYS111) presente no sítio ativo de proteína, causando a inativação da mesma. Essa afinidade entre ouro e enxofre, é explicada pela teoria ácido base de Pearson, onde uma base macia como o enxofre do grupo tiol tende a interagir melhor com ácidos macios, como é o caso do ouro. Com o avanço de estudos foi observado, inclusive, efeitos inibitórios da auranofina sobre a tioredoxina redutase, o estresse oxidativo do retículo endoplasmático e a ativação de proteínas não funcionalizadas.<sup>6,16,29,30</sup>

O fármaco ebselen (Figura 21) se trata de um organosselenóide por conter um selênio em sua estrutura. O selênio não é considerado um metal, mas sim um metalóide. Este composto foi aplicado em estudos contra o câncer devido à sua atividade anti-inflamatória e antioxidante, sendo atualmente utilizado no tratamento de transtorno bipolar e problemas de perda de audição<sup>16,31</sup>. Devido às suas propriedades clínicas, incluindo a baixa toxicidade<sup>31</sup> e evidências

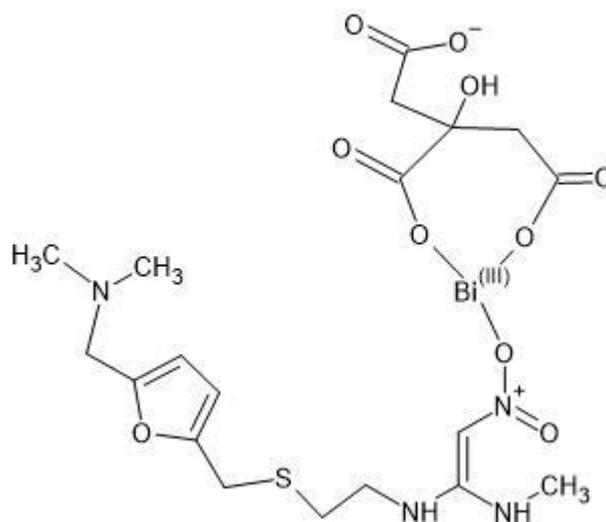
que apontam a inibição de proteínas por interação com cisteínas proteicas, esse fármaco foi estudado para a possível aplicação no tratamento da COVID-19. O grupo de Tomczak et. al (2020) fez um estudo abrangente sobre esse composto, testando sua atividade sobre as proteínas PL(pro) e 3CL(pro), obtendo-se valores de IC<sub>50</sub> de ~2,3 μmolL<sup>-1</sup> e 0,67 μmolL<sup>-1</sup>, respectivamente. Ensaios de EC<sub>50</sub> realizados em células da linhagem Vero E6 apresentaram o valor de 4,67 μmolL<sup>-1</sup>.<sup>32</sup> O grupo argumenta que esses baixos valores são explicados pela descoberta que o ebselen se liga covalentemente ao grupo cisteína dos sítios ativos das duas proteínas alvos, CYS111 da PL(pro) e CYS145 da 3CL(pro), com evidências de que se trata de inibições não reversíveis<sup>32</sup>. Foram realizados estudos com derivados do ebselen, porém estes apresentaram valores de inibição parecidas ou ligeiramente superiores. No momento, o que impede em maior proporção o avanço da aprovação desse fármaco é a sua baixa seletividade, apresentando interações com proteínas humanas como chaperonas, β-tubulinas, enolase 1, vimentina e receptor de laminina 1.<sup>16</sup>



**Figura 21.** Estrutura do ebselen.

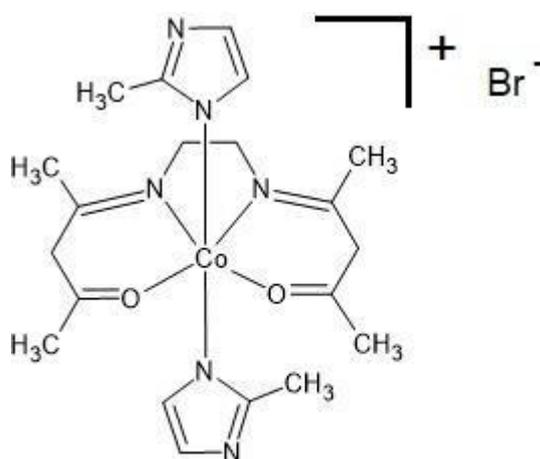
O Bi é conhecido por sua baixa toxicidade frente ao organismo humano, conferindo-o um grande atrativo para o desenvolvimento de novos fármacos. O grupo de Yuan et. al, 2020 realizou um amplo estudo sobre fármacos de bismuto em comparação com dois fármacos de ouro (sendo um deles a Auranofina) e o remdesivir. O trabalho do grupo realizou testes de efetividade de inibição do vírus, inibição das funções de ATPase e desenovelamento de DNA da helicase do SARS-CoV 2 e concentração citotóxica de todos os fármacos do estudo. O principal fármaco com propriedades promissoras deste texto foi o citrato de ranitidina e Bi(III) (do inglês: **Ranitidine Bismuth Citrate - RBC**, Figura 26), que apresentou valores de CC<sub>50</sub> de 2243 μmolL<sup>-1</sup> para a linhagem Vero E6 e de 2486 μmolL<sup>-1</sup> para a linhagem de Caco-2. A RBC apresentou valores de IC<sub>50</sub> contra as atividades de ATPase e desenovelamento de DNA de ~0,7 μmolL<sup>-1</sup> para ambos. Para analisar o tipo de inibição foi adicionada uma quantidade de 50 vezes

a quantidade de bismuto após os testes de inibição para tentar restaurar a atividade da enzima, porém foram restaurados apenas valores de 6% e 13% para as atividades de ATPase e desenovelamento de DNA, respectivamente, o que evidenciou uma inibição competitiva (aumento apenas no valor da constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_m$ )) e irreversível do sítio ativo da helicase pelo Bi(III). O trabalho apontou um estudo que revelou a existência de 3 regiões de dedo de zinco (do inglês: Zn-fingers) na estrutura de helicase. Com essa informação, o grupo realizou um estudo da tiofilicidade do Bi(III) pelas cisteínas dos dedos de zinco, onde os resultados analisados por UV-Vis apresentaram uma banda do tipo transferência de carga do ligante para o metal (LMCT) na região de 340 nm característica da ligação Bi-S. Com os valores de intensidade de absorvância e o do platô formado da razão entre a concentração de Bi(III) pela de helicase de SARS-CoV 2, foi encontrado um valor de 3, o que corrobora com o resultado do estudo, onde as cisteínas dos 3 dedos de zinco na estrutura da helicase viral se ligam ao Bi(III). Para a confirmação desse resultado, o grupo acompanhou a ejeção de zinco com análises de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês: **I**nductively **C**oupled **P**lasma **M**ass **S**pectrometry - ICP-MS). Segundo os autores, no caso do RBC, a função da molécula de ranitidina no fármaco é a de estabilização do mesmo no meio aquoso, pois o mesmo atua no citoplasma celular, que é altamente hidratado e pelo fato de que esse fármaco é ministrado por via oral. Devido a essa posologia, é explicado o fato dos testes terem sido realizados com a linhagem Caco-2 de células intestinais. Por fim, os autores apresentam alguns aspectos a serem aprimorados sobre esse fármaco, como: a baixa concentração no soro sanguíneo que é abaixo da  $EC_{50}$  para Vero E6 e, apesar dos resultados apresentados, a confirmação da seletividade desse fármaco à helicase é necessária.<sup>37</sup>



**Figura 22.** Estrutura do citrato de ranitidina e Bi(III)

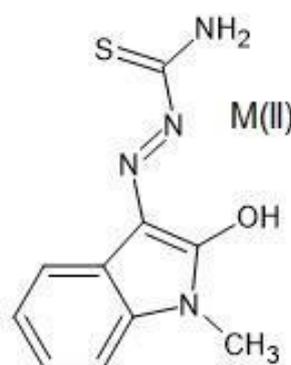
O doxovir (Figura 29), da série de fármacos identificados pelo termo CTC (do inglês: cobalt chelates compounds), é o de número 96, CTC-96 e se trata de um centro de cobalto(III) quelado por 1 ligante acacen (formado pela reação entre 2 acetilacetatos e 1 etilenodiamina) e 2 ligantes 2-metilimidazol. Este composto é sugerido devido à propriedade dessa série de compostos de atuar como compostos ejetores de zinco, sendo que resultados apontam que o Doxovir foi capaz de inibir a entrada do vírus de herpes simplex em células e no nucleocapsídeo do HIV-1.<sup>6</sup>



**Figura 23.** Estrutura do doxovir.

Para compostos derivados de metisazona (Figura 22), o grupo de Alkhatip et. al (2021) selecionou esse composto para desenvolver complexos de Ca, Fe, Mg, Mn e Zn, pois anteriormente foi observado que a metisazona apresentava interação com proteínas do vírus da COVID-19. Um estudo foi então realizado para avaliar a alteração na interação desse composto com alvos farmacológicos do SARS-CoV 2 quando coordenado a diferentes metais. Não foram realizados testes bioquímicos, a metisazona e seus derivados foram apenas avaliados através de Docking molecular com a comparação de seus valores de energia livre. As energias foram avaliadas frente às proteínas alvo Spike, RdRp, PL(pro) e 3CL(pro), onde para a proteína S foram encontrados valores para os complexos de Mn(II) -8,3 kcal/mol, Zn(II) e Ca(II) -8,3 kcal/mol e por fim Fe(II) e Mg(II) -7,9 kcal/mol. As interações dos derivados com os outros alvos farmacológicos estudados foram inferiores relativamente à Spike, porém foi observado que de maneira geral a coordenação com metais aumentou a interação da metisazona com a PL(pro) e a 3CL(pro). Com a observação das interações dentro dos sítios ativos, o grupo concluiu adicionalmente que as moléculas não possuem uma conformação específica de interação.<sup>33</sup>

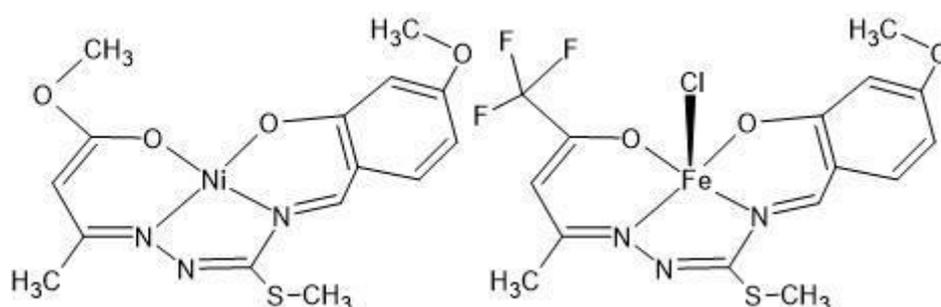
M(II): Ca, Zn, Mg ou Mn



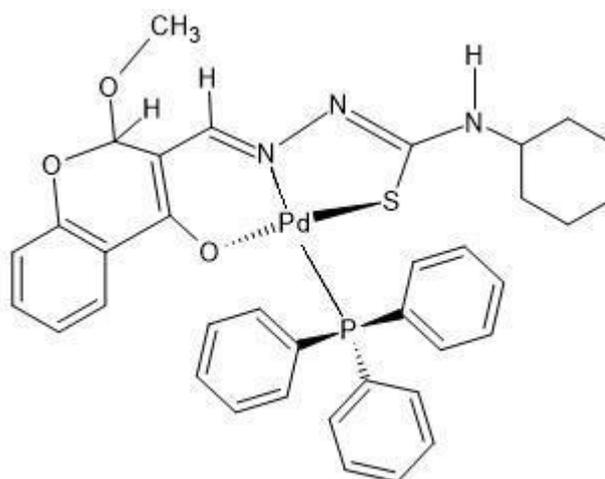
**Figura 24.** Estrutura dos compostos de metisazona.

As tiossemicarbazonas, assim como as metisazonas, são um grupo de fármacos que apresentaram alguns indícios de atividade antiviral, apesar de serem mais estudados para a área oncológica. Os estudos encontrados sobre esses compostos apenas avaliaram de maneira efetiva as interações moleculares com a proteína 3CL(pro) por simulações de Docking molecular. O

trabalho que avaliou tiossemicarbazonas de Fe(III) e Ni(II) (Figura 23) determinou valores de energia livre de -7,4 kcal/mol e 7,0 kcal/mol. Os autores consideraram o resultado do complexo de ferro como mais efetivo e realizaram um experimento de inibição apenas com este, onde o maior valor de inibição atingido foi de ~33%, com um valor de concentração do complexo de 100  $\mu\text{molL}^{-1}$ . O trabalho que avaliou as tiossemicarbazonas de Pd(II) (Figura 24) não apresentou uma discussão voltada diretamente à aplicação do candidato a fármaco para o combate ao vírus da COVID-19, apenas apresentando valores de energia livre obtidas por uma avaliação por Docking de 3 complexos com valores em torno de 9,0 kcal/mol em simulação de interação com a proteína 3CL(pro).<sup>34,35</sup>

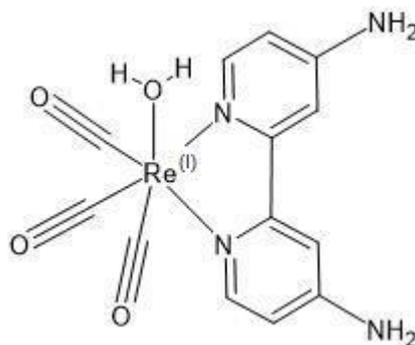


**Figura 25.** Estruturas: tiossemicarbazonas de Ni(II) (esquerda) e Fe(III) (direita).



**Figura 26.** Estrutura tiossemicarbazonas de Pd(II).

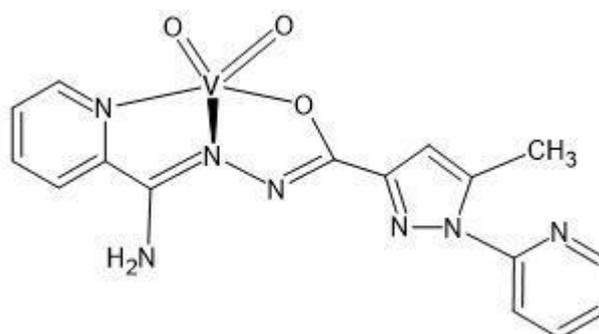
Karges et. al, 2021 utilizando das informações do trabalho de Fricker et. al, 2010, de que complexos de Au(III), Pd(II) e Re(V) podem inibir a atividade de proteases de cisteína B e K, através da formação de adutos por coordenação monodentada e de que complexos de Re(I) tricarbonila (um exemplo pode ser visto na Figura 25) já eram utilizados no tratamento de câncer, ou como sondas luminescentes e contraste em exames de rádio-imagem, decidiram sintetizar e avaliar uma série de complexos de Re(I) coordenados com 1 grupo bidentado 2,2 bipyridina di-substituída, 3 grupos carbonila e 1 ligante lábil ( $\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{Cl}^-$ ). Todas as moléculas foram avaliadas quanto ao seu potencial de inibição da enzima 3CL(pro), apresentando valores de  $\text{IC}_{50}$  na faixa 7,5 a 24,1  $\mu\text{molL}^{-1}$ , onde o menor valor foi obtido do composto de número 34 no trabalho, que se trata de um complexo com uma 2,2-bipiridina-4,4-substituída com  $\text{NH}_2$ , 3 CO e  $\text{H}_2\text{O}$  como ligante lábil. O grupo de pesquisa estudou o efeito do ligante lábil, concluindo que o  $\text{Cl}^-$  confere uma cinética lenta de coordenação com a cisteína da proteína 3CL(pro) e a água confere uma cinética rápida. Foi estudada inclusive a atuação do composto 34 sobre proteases presentes em células respiratórias, como a catepsina B (uma protease de cisteína), a aspartato protease beta-secretase 1 e serina protease humana dipeptidil peptidase-4, obtendo o resultado que frente a essas proteínas, o complexo é considerado seletivo para a proteína 3CL(pro).<sup>36</sup>



**Figura 27.** Estrutura do composto 34, p-diamino-2,2'bipiridinatricarbonil de rênio(I).

O artigo publicado por Scior, et. al, 2021, apresenta um trabalho de avaliação por Docking de 20 diferentes compostos de vanádio (I), (IV) e (V). O vanádio é um metal versátil

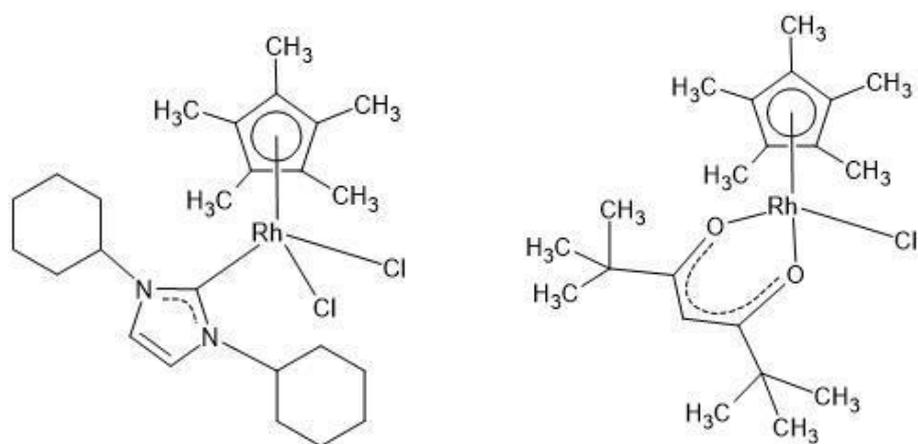
que pode estar presente em candidatos a fármacos contra diabetes e câncer. Esse metal é capaz de se apresentar na forma oxigenada (vanadila) e em diferentes geometrias, o que no meio biológico, o permite mimetizar ânions fosfatos em vias de sinalização. Além dessas propriedades, este centro metálico possui grande afinidade por proteínas de ambas superfícies (externa e interna) da membrana celular, inclusive. O grupo identificou que no sítio catalítico da proteína 3CL(pro) há uma díade cisteína-asparagina (CYS-ASP) semelhante à uma outra presente em uma hidrolase humana. Então foi utilizada a proteína-tirosina fosfatase 1B (hPTP1B) para mimetizar o sítio da 3CL(pro). Com a realização das simulações de uma série de complexos de vanádio nesse modelo mimético, apresentando valores de energia livre de -9,0 a 10,0 kcal/mol (onde valores menores que -6,5 kcal/mol são considerados como sinais de interações efetivas entre átomos). O complexo denominado de AREAY apresentou um dos valores mais promissores de energia -9 kcal/mol, sendo utilizado para ilustrar os compostos estudados (Figura 27).<sup>38</sup>



**Figura 28.** Estrutura AREAY.

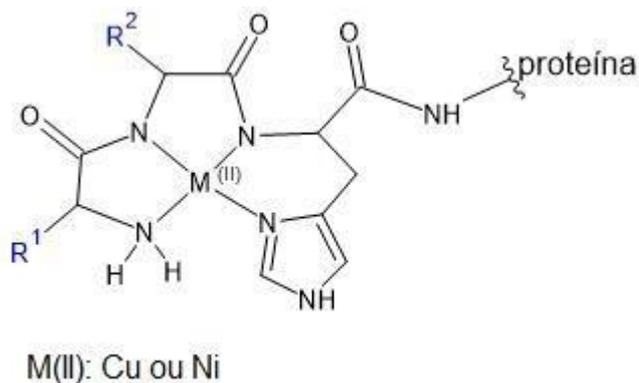
Complexos de ciclopentadienila de ródio, do tipo banco de piano, foram avaliados pelo grupo Chuong et. al (2021) quanto à citotoxicidade e efetividade de inibição do vírus SARS-CoV 2 em células da linhagem Vero E6 e Calu-3. No trabalho, o grupo utilizou de maneira equivocada o termo IC<sub>50</sub> para se referir à concentração efetiva onde o complexo inibe em 50% a atividade viral, no caso EC<sub>50</sub>. Testes de toxicidade e de estabilidade também foram realizados, onde a toxicidade de ambos complexos frente às células Vero E6 e Calu-3 apresentaram valores de CC<sub>50</sub> de 109,4 μmolL<sup>-1</sup> e 92,25 μmolL<sup>-1</sup> para os complexos 4 e 2, respectivamente. Os autores argumentaram que esses complexos possivelmente agem sobre a proteína Spike do vírus da COVID-19 baseados nas informações sobre os compostos derivados de ouro. Em estudos

realizados sobre a cinética dos complexos foi descoberto que o complexo 2 é mais instável, perdendo sua atividade ao longo do tempo quando comparado ao complexo 4 que a mantém. A seletividade desses compostos foi questionada frente a outras proteínas possivelmente presentes no meio celular devido às evidências de que esses tipos de complexos apresentam sensibilidade à presença de albumina do soro bovino. São apresentados abaixo dois dos complexos que apresentam melhores resultados (Figura 28).<sup>39</sup>



**Figura 29.** Estruturas: Cloreto de pentametilciclopentadienil 1,3-dicicloexilimidazol-2-ilideno de ródio (composto 2 - esquerda) e cloreto de pentametilciclopentadienil dipivaloimetanato de ródio (composto 4 - direita).

Assim como os CTC, os ATCUN são uma série de compostos de cobre ou de níquel (Figura 30) formados pela coordenação de um tipo específico de estrutura ao centro metálico, que nesse caso se tratam de grupos amino terminais, naturalmente presente em diversas proteínas (do inglês ATCUN: amino-terminal copper and nickel binding sites). Esses grupos amino-terminais são considerados como modificadores nas estruturas de interesse para modular atividades desejadas, como a produção de EROS, que é a principal estratégia desses tipos de compostos no combate a microrganismos. O trabalho propõe a síntese de um ATCUM conjugado com ACE2, onde esse composto com um centro de cobre ou níquel poderá se ligar e oxidar aminoácidos como a tirosina da estrutura da proteína Spike do SARS-CoV 2.<sup>40</sup>



**Figura 30.** Estrutura simplificada de M-ATCUN.

A linha do Quadro 3 (página 35), onde é apresentado Mg(II) e Mn(II) nsp16, não se trata exatamente de um medicamento encontrado para tratar a infecção viral da COVID-19. Esta, na realidade, é uma descoberta feita pelos autores do trabalho, onde foi evidenciada a necessidade de um cátion bivalente na região do "capped" do mRNA viral, durante o processo de metilação da primeira adenosina. Artigos anteriores identificaram esses íons como Mg(II) e Mn(II). Com o intuito de avaliar a influência desses metais sobre a metilação, testes com concentrações de MnCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub> foram realizadas, demonstrando uma maior contribuição de Mn(II) para o processo, que foi evidenciado pelo aumento de sua concentração. Para melhor compreensão do papel desses metais durante o processo, estudos cristalográficos dos produtos da metilação foram realizados, no qual as distâncias entre os grupos básicos e os centros metálicos foram analisadas para determinar as interações existentes. Estas imagens evidenciaram que os cátions desempenham o papel de alinhar a região "capped" do mRNA com o sítio ativo da 2'-O-MTase (complexo nsp16-nsp10), onde os cátions interagem majoritariamente com os grupos fosfatos da m<sup>7</sup>GpppAUU (que possui um trifosfato) e com um fosfato da primeira adenosina que será metilada. Íons adicionais promovem uma estabilização da conformação da fita de mRNA no interior da estrutura do complexo de metilação, por interações com grupos básicos da enzima e os grupos fosfatos das bases nitrogenadas.<sup>41</sup>

O artigo de Minasov et. al, 2021 apresentou a função específica das RdRp (nsp12) e helicase (nsp13). No momento pré-metilação, os mRNA recém produzidos possuem 3 fosfatos na sua extremidade 5' sendo, nesse ponto, que a função de trifosfatase da nsp13 a faz clivar um fosfato dessa tríade. Em seguida, o nsp12 realiza a união do grupo m<sup>7</sup>G que possui um fosfato, gerando o Cap-0-RNA (m<sup>7</sup>GpppAUU), que se trata da espécie ainda não metilada.<sup>41</sup>

## 5.4. Outras estratégias (“coquetéis medicinais”)

Além do uso individual de fármacos, alguns grupos de pesquisa têm adotado uma estratégia de combinação de substâncias que combatem a COVID-19 por diferentes frentes. O grupo de Andreou et. al (2020), após uma extensa pesquisa na literatura, propôs o uso de um esquema de tratamento que utiliza fármacos com diferentes nichos de atuação, como: antiviral, anti-inflamatório, vasodilatador, virucida, imunomodulador e precursor de EROs. O coquetel é composto por: remdesivir (antiviral), cobre (metal que possui atividade virucida por produção de EROs e imunomodulatória), *N*-acetilcisteína (um composto antioxidante, para conter a produção de EROs pelo cobre), colchicina (anti-inflamatório para combater a hiperinflamação por citocinas) e NO (administrado por inalação, que promove vasodilatação em regiões inflamadas para evitar hipóxia). Este esquema se propõe a tratar pacientes desde os que possuem sintomas leves até os que necessitam de respirador mecânico.<sup>42</sup>

Frente aos fármacos, observa-se uma menor quantidade de dados que descrevem os metalofármacos (geralmente apenas 1 evidência de sua atividade antiviral), o que reforça o argumento de pouco avanço de estudos relativamente aos de natureza puramente orgânica. Apesar disso, alguns autores e o número de alvos farmacológicos possivelmente afetados por metalofármacos, evidenciam a característica positiva de que esses candidatos metálicos possuem atuação de amplo espectro sobre o ciclo viral, o que aumenta a resistência desses fármacos metálicos frente às mutações. Dados obtidos de testes e parâmetros diferentes dificultam uma comparação efetiva entre os novos candidatos e inclusive, com fármacos já em aplicação clínica.

## 6. Conclusão

**Origens:** até o presente momento, as informações com relação às origens do vírus são resultantes de estudos de comparações filogenéticas, fazendo com que a maioria das estratégias de enfrentamento desse novo vírus fossem baseadas nas experiências obtidas por epidemias passadas como as de SARS-CoV e de MERS-CoV. Esta abordagem provém então, em consequência de estudos filogenéticos que apresentam semelhanças genótípicas entre as

linhagens SARS-CoV e SARS-CoV 2, o que revela indícios da possível origem da nova cepa. Não obstante, ainda há muito a ser descoberto sobre esse assunto, que ainda causa muita discussão dentro da comunidade científica.

**Cronologia:** desde os primeiros indícios notificados no final do ano de 2019 na província chinesa de Wuhan pela OMS, o vírus se disseminou rapidamente pelos países da Ásia e Europa em um intervalo de dois meses. Conseqüentemente no 3º mês após as primeiras notificações, a cepa altamente contagiosa chega ao Brasil. No início do ano de 2022, o novo coronavírus já infectou um total de 340 milhões e levou a óbito 5,5 milhões de pessoas, sendo deste total, 23 milhões infectados e 622 mil mortos brasileiros.

**Intervenção medicamentosa:** frente ao cenário desesperador em que se encontrava os sistemas de saúde da maioria dos países do mundo, medicamentos autorizados pelos respectivos órgãos regulatórios de cada país permitiram o uso emergencial de medicamentos de comportamento conhecido, que poderiam auxiliar na sobrevivência de pacientes em estado grave (de combate direto ao vírus ou em resposta aos efeitos de sua infecção).

**A pesquisa e os metalofármacos:** a discussão a respeito de reposicionamento de fármacos nos levou a uma das motivações deste trabalho que, apesar de ser já sinalizada por alguns trabalhos, ainda há pouco destaque de metalofármacos na medicina frente a medicamentos com princípios ativos puramente orgânicos. Este cenário, de certa forma, pode estar acarretando um atraso no campo farmacológico, dadas as possíveis propriedades conferidas pelo átomo metálico ao composto. Alguns fatores chaves podem ser os responsáveis por esse receio de grupos de pesquisa em explorar tal área:

1º: os metais livres geralmente apresentam alto grau de toxicidade em organismos vivos;

2º: pesquisas realizadas para o desenvolvimento de fármacos são extremamente caras, demandando além de laboratórios de síntese química, laboratórios de nível de biossegurança;

3º: dado o primeiro fator, foi criado um estigma sobre a possibilidade de propriedades curativas frente aos danos conhecidos, porém em culturas orientais, os metais já são utilizados em tratamentos da medicina tradicional.

**Conceitos:** a revisão da bibliografia a respeito de termos da medicina, como pandemia, epidemia, endemia e surto, assim como de termos farmacológicos a respeito de fármacos e suas variantes, serve de base introdutória para leitores de fora da área que não estão familiarizados com tal jargão.

**Ciclo viral:** com uma extensa pesquisa, foram descritos os principais mecanismos de entrada e de multiplicação viral no interior da célula. No âmbito de ingresso viral na célula, foi evidenciada a endocitose do SARS-CoV 2, além da conhecida fusão de membrana. Em vista do conhecimento a respeito da maquinaria viral e sua atuação sobre a célula hospedeira, se tornam mais tangíveis estratégias direcionadas a alvos farmacológicos do novo coronavírus.

**Efeitos da infecção:** assim como os eventos infecciosos, foi discutido um pouco sobre os efeitos consequentes da atuação viral sobre o sistema respiratório, principalmente, e outras células posteriormente infectadas. As tempestades de citocinas decorrentes da resposta desregulada do sistema imune, gera lesões sobre extensas regiões e o agravamento do quadro leva o paciente à sepse, que resulta em óbito na maioria dos casos.

**Bibliografia e seleção de fármacos:** A pesquisa na bibliografia do banco de artigos da Pubmed, principalmente, e em outros, durante os meses de junho a dezembro de 2021, forneceu informações a respeito de fármacos de diversas classes. Tendo em vista a abordagem deste trabalho, esses compostos foram categorizados em: não antivirais, antivirais e metalofármacos antivirais, onde foram selecionados 12, 5 e 11 fármacos de cada categoria respectivamente. Apesar da aparente abundância de metalofármacos antivirais frente aos antivirais puramente orgânicos, na realidade as quantidades de compostos se deve à tentativa de apresentar ao menos um de cada classe e explicitar os compostos mais conhecidos de seus nichos, porém com relação aos metalofármacos, objetivou-se abranger o máximo de entradas possíveis relacionadas ao SARS-CoV 2.

**Fármacos não antivirais:** estes foram empregados para tratar os efeitos colaterais da infecção pelo vírus e possíveis complicações, alguns desses medicamentos como a cloroquina, hidroxicloroquina, ivermectina e anidulafungina foram testados quanto ao seu poder de inibição da atuação viral e inibição de proteínas chaves (PL<sup>pro</sup>, S e helicase respectivamente). Os valores de inibição da atividade viral e específica de proteínas apresentados foram promissores, porém os resultados clínicos dos 3 primeiros fármacos dos 4 com valores no quadro, foram contraditórios, desacreditando a comunidade científica de sua efetividade.

**Observação:** à posteriori do trabalho, foi provado e admitido, pela comunidade científica a ineficiência do uso de ivermectina, cloroquina e hidroxicloroquina para o tratamento ou profilaxia à COVID-19, sendo atualmente contraindicado seus usos para este fim (2022).

**Fármacos antivirais de natureza puramente orgânica:** apresentaram bons valores de inibição da atividade viral em células de Vero E6, na qual remdesivir, nelfinavir e atazanavir apresentaram valores muito promissores; ledipasvir apresentou um valor regular de inibição da RdRp de  $34,6 \mu\text{molL}^{-1}$  e favipiravir que apresentou um valor muito alto, de  $61,6 \mu\text{molL}^{-1}$  de inibição da atividade viral em cultura de células. Um aspecto a ser notado dentro dessa categoria é a discordância entre os testes aplicados ao ledipasvir em relação aos outros, o que impossibilita uma comparação direta da efetividade desse fármaco em específico.

**Metalofármacos antivirais:** Enfim, encontrados em estudo para a inibição do SARS-CoV 2 apresentam uma grande variedade de ligantes e núcleos metálicos, o que reforça a rica variedade de fármacos que podem ser desenvolvidos. Esses compostos apresentam uma escassa base de dados clínicos, onde a maioria se encontra estagnada na fase pré-clínica. Apesar de ainda serem pouco estudados, apresentam características promissoras com relação à atuação de amplo espectro, conferindo maior resistência às mutações do vírus alvo, e baixos valores de concentração de inibição da atividade viral, inibição enzimática e Docking, apresentando-se tão interessantes quanto os fármacos já aprovados. Devido à uma boa parcela dos candidatos encontrados inibirem a atividade viral pela coordenação dos grupos tióis dos dedos de zinco, mais estudos relacionados a este tipo de interação metal-aminoácido devem ser realizados. Devido a esse modo de operação de metal-cisteína, os metalofármacos possuem uma maior probabilidade de serem resistentes à vírus altamente mutáveis como o SARS-CoV 2.

**Metas alcançadas e perspectivas da pandemia:** além dos objetivos propostos por este texto, este pode ser enquadrado como um guia para iniciação de pesquisadores pouco familiarizados com a área e que possuam dificuldades com a leitura extensiva de material em língua inglesa, pois quase todo o material já publicado e em publicação está em inglês. Em virtude dos aspectos abordados, trabalhos de revisão da bibliografia, como este, relacionado à catalogação de ligantes e/ou fármacos que podem atuar como tais, que possam aprimorar o funcionamento de metalofármacos aqui apresentados, poderão ser de extrema importância para a área da bioinorgânica medicinal. Outro aspecto a ser desenvolvido seria o de um trabalho direcionado à elaboração de um protocolo de avaliação de candidatos a fármacos para o tratamento e profilaxia do SARS-CoV 2.

Por fim, com o conhecimento desenvolvido até o momento, foi possível reduzir o número de vítimas em decorrência dessa crise de saúde com o uso de vacinas desenvolvidas em um curto intervalo de tempo. O conceito de epistasia novamente abordado, provavelmente

virá a alterar os rumos da pandemia, direcionando-a para novos desafios ou para um fim natural.<sup>52</sup>

## 7. Referências

1. WHO - **Convended Global Study of Origins of SARS-CoV-2: China Part.** *Infectious Diseases & Immunity*, v. 1, n. 3, p. 125–132, out. 2021. DOI: 10.1097/ID9.000000000000017.
2. WHO. **Timeline: WHO's COVID-19 response.** *World Health Organization*, 2022. Disponível em: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline?gclid=Cj0KCQjw4eaJBhDMARIsANhrQAAAbKdZ1inq\\_IXKL2Tg5JyABhrDaucL AykDdMpw3IfEx6g9Bes8JTWMaAm9kEALw\\_wcB#event-21](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline?gclid=Cj0KCQjw4eaJBhDMARIsANhrQAAAbKdZ1inq_IXKL2Tg5JyABhrDaucL AykDdMpw3IfEx6g9Bes8JTWMaAm9kEALw_wcB#event-21). Acesso em: 11/01/2022.
3. Governo do Brasil. **Brasil confirma o primeiro caso do novo coronavírus.** *gov.br*, 26/02/2020(19h:13). Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2020/02/brasil-confirma-primeiro-caso-do-novo-coronavirus> . Acesso em: 11/01/2022.
4. GHAFFARI, M., MOLLAZADEH-BAJESTANI, M., MOZTARZADEH, F., et al. **"An overview of the use of biomaterials, nanotechnology, and stem cells for detection and treatment of COVID-19: towards a framework to address future global pandemics"**, *Emergent Materials*, v. 4, n. 1, p. 19–34, fev. 2021. DOI: 10.1007/s42247-020-00143-9.
5. HABIB, K., SPRECHER, B., YOUNG, S. B. **"COVID-19 impacts on metal supply: How does 2020 differ from previous supply chain disruptions?"**, *Resources, Conservation and Recycling*, v. 165, p. 105229, fev. 2021. DOI: 10.1016/j.resconrec.2020.105229.

6. DE PAIVA, R. E. F., MARÇAL NETO, A., SANTOS, I. A., et al. **"What is holding back the development of antiviral metallodrugs? A literature overview and implications for SARS-CoV-2 therapeutics and future viral outbreaks"**, Dalton Transactions, v. 49, n. 45, p. 16004–16033, 2020. DOI: 10.1039/D0DT02478C.
7. SARKAR, P. K., DAS MUKHOPADHYAY, C. **"Ayurvedic metal nanoparticles could be novel antiviral agents against SARS-CoV-2"**, International Nano Letters, 6 jan. 2021. DOI: 10.1007/s40089-020-00323-9.
8. Instituto Butantan. **Entenda o que é pandemia e as diferenças entre surto, epidemia e endemia.** [butantan.gov.br](http://butantan.gov.br), 2020. Disponível em: <https://butantan.gov.br/covid/butantan-tira-duvida/tira-duvida-noticias/entenda-o-que-e-uma-pandemia-e-as-diferencas-entre-surto-epidemia-e-endemia>. Acesso em: 11/01/2022.
9. Schueler P. **O que é uma pandemia.** [bio.fiocruz.br](http://bio.fiocruz.br), 28/07/2021. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/1763-o-que-e-uma-pandemia>. Acesso em: 11/01/2022.
10. WHO – **"Risk communication and community engagement readiness and response to coronavirus disease (COVID-19)"**, Interim Guidance, 19 March 2020.
11. WHO – **"Responding to community spread of COVID-19 WHO"**, Interim Guidance, 7 March 2020.
12. WHO. **Coronavirus disease (COVID-19) pandemic.** World Health Organization, 2022. Disponível em: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019?adgroupsurvey={adgroupsurvey}&gclid=CjwKCAjw55-HBhAHEiwARMCszsv9833wg1AGIuzMMC\\_KqgoSCHuwNLVTh5vr2ngOvSr6OVT-ODBUQBoCCSUQAvD\\_BwE](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019?adgroupsurvey={adgroupsurvey}&gclid=CjwKCAjw55-HBhAHEiwARMCszsv9833wg1AGIuzMMC_KqgoSCHuwNLVTh5vr2ngOvSr6OVT-ODBUQBoCCSUQAvD_BwE). Acesso em: 11/01/2022.
13. Governo do Brasil. **COVID19 Painel Coronavírus.** [covid.saude.gov.br](http://covid.saude.gov.br), 2022. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 11/01/2022.
14. WU, F., ZHAO, S., YU, B., et al. **"A new coronavirus associated with human respiratory disease in China"**, Nature, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 12 mar. 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.

15. V'KOVSKI, P., KRATZEL, A., STEINER, S., et al. "**Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2**", *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 3, p. 155–170, mar. 2021. DOI: 10.1038/s41579-020-00468-6.
16. KARGES, J., COHEN, S. M. "**Metal Complexes as Antiviral Agents for SARS-CoV-2**", *ChemBioChem*, v. 22, n. 16, p. 2600–2607, 2021. DOI: 10.1002/cbic.202100186.
17. KRUMM, Z. A., LLOYD, G. M., FRANCIS, C. P., et al. "**Precision therapeutic targets for COVID-19**", *Virology Journal*, v. 18, n. 1, p. 66, dez. 2021. DOI: 10.1186/s12985-021-01526-y.
18. OU, X., LIU, Y., LEI, X., et al. "**Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV**", *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 1620, dez. 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-15562-9.
19. HAFEZI, B., CHAN, L., KNAPP, J. P., et al. "**Cytokine Storm Syndrome in SARS-CoV-2 Infections: A Functional Role of Mast Cells**", *Cells*, v. 10, n. 7, p. 1761, 12 jul. 2021. DOI: 10.3390/cells10071761.
20. U.S. Food & Drug Administration. **Human Drugs**. [Fda.gov](https://www.fda.gov), 05/03/2021. Disponível em: [https://www.fda.gov/industry/regulated-products/human-drugs#:~:text=The%20FDA%20defines%20a%20drug,Drug%20and%20Cosmetic%20Act%20\(FD%26C](https://www.fda.gov/industry/regulated-products/human-drugs#:~:text=The%20FDA%20defines%20a%20drug,Drug%20and%20Cosmetic%20Act%20(FD%26C). Acesso em: 11/01/2022.
21. PAINTSIL, E., CHENG, Y. "**Antiviral Agents**", Elsevier, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA, 2009.
22. ALESSIO, E., "**Bioinorganic Medicinal Chemistry**", Somerset, Wiley, 2011.
23. Nature medicine. **15 drugs being tested to treat COVID-19 and how they would work**. [nature.com](https://www.nature.com), 15/05/2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/d41591-020-00019-9>. Acesso em: 11/01/2022.
24. RAKEDZON, S., NEUBERGER, A., DOMB, A. J., et al. "**From hydroxychloroquine to ivermectin: what are the anti-viral properties of anti-**

- parasitic drugs to combat SARS-CoV-2?",** Journal of Travel Medicine, v. 28, n. 2, p. taab005, 23 fev. 2021. DOI: 10.1093/jtm/taab005.
25. ANWAAR, M. U., ADNAN, F., ABRO, A., et al. "**Combined deep learning and molecular docking simulations approach identifies potentially effective FDA approved drugs for repurposing against SARS-CoV-2**", Computers in Biology and Medicine, p. 105049, nov. 2021. DOI: 10.1016/j.combiomed.2021.105049
26. AWADASSEID, A., WU, Y., TANAKA, Y., et al. "**Effective drugs used to combat SARS-CoV-2 infection and the current status of vaccines**", Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 137, p. 111330, maio 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111330.
27. PIRZADA, R. H., HASEEB, M., BATOOL, M., et al. "**Remdesivir and Ledipasvir among the FDA-Approved Antiviral Drugs Have Potential to Inhibit SARS-CoV-2 Replication**", Cells, v. 10, n. 5, p. 1052, 29 abr. 2021. DOI: 10.3390/cells10051052.
28. CHEN, J., ALI, F., KHAN, I., et al. "**Recent progress in the development of potential drugs against SARS-CoV-2**", Current Research in Pharmacology and Drug Discovery, v. 2, p. 100057, 2021. DOI: 10.1016/j.crphar.2021.100057.
29. GIL-MOLES, M., BASU, U., BÜSSING, R., et al. "**Gold Metallodrugs to Target Coronavirus Proteins: Inhibitory Effects on the Spike-ACE2 Interaction and on PLpro Protease Activity by Auranofin and Gold Organometallics\*\***", Chemistry – A European Journal, v. 26, n. 66, p. 15140–15144, 2020. DOI: 10.1002/chem.202004112.
30. ROTHAN, H. A., STONE, S., NATEKAR, J., et al. "**The FDA-approved gold drug auranofin inhibits novel coronavirus (SARS-COV-2) replication and attenuates inflammation in human cells**", Virology, v. 547, p. 7–11, ago. 2020. DOI: 10.1016/j.virol.2020.05.002.
31. JIN, Z., DU, X., XU, Y., et al. "**Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors**", Nature, v. 582, n. 7811, p. 289–293, 11 jun. 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2223-y.

32. WĘGLARZ-TOMCZAK, E., TOMCZAK, J. M., TALMA, M., et al. **“Ebselen as a highly active inhibitor of PL Pro CoV2”**, preprint. [S.l.], Biochemistry, 17 maio 2020.
33. ABDELAAL AHMED MAHMOUD M. ALKHATIP, A., GEORGAKIS, M., MONTERO VALENZUELA, L. R., et al. **"Metal-Bound Methisazone; Novel Drugs Targeting Prophylaxis and Treatment of SARS-CoV-2, a Molecular Docking Study"**, International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 6, p. 2977, 15 mar. 2021. DOI: 10.3390/ijms22062977.
34. ATASEVER ARSLAN, B., KAYA, B., ŞAHIN, O., et al. **"The iron(III) and nickel(II) complexes with tetradentate thiosemicarbazones. Synthesis, experimental, theoretical characterization, and antiviral effect against SARS-CoV-2"**, Journal of Molecular Structure, v. 1246, p. 131166, dez. 2021. DOI: 10.1016/j.molstruc.2021.131166.
35. HARIBABU, J., SRIVIDYA, S., MAHENDIRAN, D., et al. **"Synthesis of Palladium(II) Complexes via Michael Addition: Antiproliferative Effects through ROS-Mediated Mitochondrial Apoptosis and Docking with SARS-CoV-2"**, Inorganic Chemistry, v. 59, n. 23, p. 17109–17122, 7 dez. 2020. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.0c02373.
36. KARGES, J., KALAJ, M., GEMBICKY, M., et al. **"ReI Tricarbonyl Complexes as Coordinate Covalent Inhibitors for the SARS-CoV-2 Main Cysteine Protease"**, Angewandte Chemie International Edition, v. 60, n. 19, p. 10716–10723, 2021. DOI: 10.1002/anie.202016768.
37. YUAN, S., WANG, R., CHAN, J. F.-W., et al. **"Metallodrug ranitidine bismuth citrate suppresses SARS-CoV-2 replication and relieves virus-associated pneumonia in Syrian hamsters"**, Nature Microbiology, v. 5, n. 11, p. 1439–1448, nov. 2020. DOI: 10.1038/s41564-020-00802-x.
38. SCIOR, T., ABDALLAH, H. H., MUSTAFA, S. F. Z., et al. **"Are vanadium complexes druggable against the main protease Mpro of SARS-CoV-2? – A computational approach"**, Inorganica Chimica Acta, v. 519, p. 120287, maio 2021. DOI: 10.1016/j.ica.2021.120287.

39. CHUONG, C., DUCHANE, C. M., WEBB, E. M., et al. "**Noble Metal Organometallic Complexes Display Antiviral Activity against SARS-CoV-2**", *Viruses*, v. 13, n. 6, p. 980, 25 maio 2021. DOI: 10.3390/v13060980.
40. MAITI, B. K., GOVIL, N., KUNDU, T., et al. "**Designed Metal-ATCUN Derivatives: Redox- and Non-redox-Based Applications Relevant for Chemistry, Biology, and Medicine**", *iScience*, v. 23, n. 12, p. 101792, dez. 2020. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101792.
41. MINASOV, G., ROSAS-LEMUS, M., SHUVALOVA, L., et al. "**Mn 2+ coordinates Cap-0-RNA to align substrates for efficient 2'- O -methyl transfer by SARS-CoV-2 nsp16**", *Science Signaling*, v. 14, n. 689, p. eabh2071, 29 jun. 2021. DOI: 10.1126/scisignal.abh2071.
42. ANDREOU, A., TRANTZA, S., FILIPPOU, D., et al. "**COVID-19: The Potential Role of Copper and N-acetylcysteine (NAC) in a Combination of Candidate Antiviral Treatments Against SARS-CoV-2**", *In Vivo*, v. 34, n. 3 suppl, p. 1567–1588, 2020. DOI: 10.21873/invivo.11946.
43. UBI – "**UBI® SARS-CoV-2 ELISA INSTRUCTIONS FOR USE**", United Biomedical, Inc. 25 Davids Drive Hauppauge, NY 11788 U.S.A. v: 7.0.
44. Quest Diagnostics - "**SARS-CoV-2 RNA, Qualitative Real-Time RT-PCR (Test Code 39433)**", Quest Diagnostics Infectious Disease, Inc. 33608 Ortega Highway, Bldg. B-West Wing San Juan Capistrano, CA 92675 U.S.A, 2021.
45. International Atomic Energy Agency. **How is COVID-19 Virus detected using Real Time RT-PCR?**. [iaea.org](https://www.iaea.org), 27/03/2020. Disponível em: <https://www.iaea.org/newscenter/news/how-is-the-covid-19-virus-detected-using-real-time-rt-pcr> Acesso em: 11/01/2022.
46. Henrik's Lab. **qPCR(real-time PCR) protocol explained**. *Youtube*, 04/01/2021. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=iu4s3Hbc\\_bw](https://www.youtube.com/watch?v=iu4s3Hbc_bw) . Acesso: 11/01/2022.

47. Barros, M. E. S. B.,” **Estudos de Docking Molecular, Síntese e Atividade Biológica de Análogos da (-)-Massoialactona e da Combretastatina A-4**”, Tese de Doutorado, DQF-UFPE, Recife, 2015.
48. Meng, X.Y., Zhang, H. X., Mezei, M., Cui, M.,” **Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery**”, National Institutes of Health, Curr Comput Aided Drug Des., 7(2), 2011 June 1, 146–157.
49. Centers for Disease Control and Prevention. **Public Health Image Library (ID#: 23311)**. [phil.cdc.gov](http://phil.cdc.gov), 2020. Disponível em: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=23311> Acesso em: 11/01/2022.
50. Faculdades fio ourinhos. **Normalização de trabalhos acadêmicos**. [fio.edu.br](http://fio.edu.br). Disponível em: [https://fio.edu.br/manualtcc/co/5\\_Introducao.html](https://fio.edu.br/manualtcc/co/5_Introducao.html). Acesso em: 11/01/2022.
51. Centro de ensino superior de Foz do Iguaçu. **Manual de Orientação para confecção de Trabalhos Acadêmicos**. [cesufoz.edu.br](http://cesufoz.edu.br), 2018. Disponível em: [https://www.cesufoz.edu.br/aluno/orientacao\\_academica.asp](https://www.cesufoz.edu.br/aluno/orientacao_academica.asp) . Acesso em: 11/01/2022.
52. BBC News Brasil. **Covid: como a epistasia é a chave para entender gravidade de ômicron**. [Youtube](https://www.youtube.com/watch?v=CHzSb2ZTeug), 11/12/2021. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=CHzSb2ZTeug> . Acesso em: 11/01/2022.
53. Silvestre Labs. **Quem somos**. [silvestrelabs.com.br](http://silvestrelabs.com.br), 19/02/2022. Disponível em: <https://silvestrelabs.com.br/sobre-nos/> . Acesso em: 19/02/2022.
54. Silvestre Labs. **Dermazine**. Bula Paciente, Silvestre Labs Química & Farmacêutica Ltda. Av. Carlos Chagas Filho, 791 – Polo de Biotecnologia do Rio de Janeiro – Bio Rio – Cidade Universitária – Ilha do Fundão – CEP: 21.941-904 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, 09/04/2019.

## 8. Apêndice

### 8.1. Análises utilizadas no diagnóstico de pacientes

Para o estudo desses candidatos a fármacos, alguns parâmetros são comumente avaliados como CC50 e IC50, além de algumas análises que foram amplamente utilizadas para o monitoramento de pessoas infectadas pelo vírus com o RT-PCR ou ELISA. Esses dois testes foram muito utilizados no monitoramento do avanço da pandemia COVID-19, pois o podem diagnosticar ou indicar a possibilidade de infecção do paciente pelo vírus.

#### 8.1.1. ELISA

O teste **ELISA** (**E**nzyme-**L**inked Immuno**S**orbent **A**ssay) se trata de um exame para a detecção de anticorpos do tipo IgG (que representam os anticorpos que perduram no plasma sanguíneo após a infecção). Com esse teste, pacientes recém e pós infectados puderam ser melhor instruídos dos cuidados a serem tomados ou da necessidade de um novo teste para a confirmação do diagnóstico.

O teste ELISA consiste na reação dos anticorpos presentes no soro ou plasma humano, resultantes da infecção, com peptídeos das mesmas proteínas dos antígenos, como a S, M e N. Esses peptídeos são ancorados em uma placa com poços onde amostras e controles são adicionados para reagirem com seus alvos e posteriormente serem reagidos com peroxidases animais, seguidos de lavagens dos poços, os sistemas anticorpo-peptídeo reagem em meio de peróxido com 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), formando uma solução azulada de acordo com a quantidade de peptídeos ligados aos IgG. A placa com soluções azuladas em seus poços é levada a um espectrofotômetro específico para esse tipo de análise. O equipamento analisa as amostras por 15 minutos no comprimento de onda de ~450 nm. O valor é convertido em um sinal de corte que é comparado com um valor de referência (<1 negativo e ≥1 positivo).<sup>A</sup>

### 8.1.2. RT-PCR

O teste de RT-PCR (**R**everse **T**ranscription **P**olymerase **C**hain **R**eaction) se trata de um exame para a detecção de ácido nucleico viral do tipo RNA, principalmente em amostras do trato respiratório superior (naso e orofaringe com coleta por Swabs) e inferior (aspiração traqueal e lavagem bronquioalveolar).

O teste é dividido em duas fases, onde a primeira consiste na extração do RNA viral da amostra (garantindo a eliminação de material genético do hospedeiro inclusive), em seguida o RNA viral é transcrito em cDNA (DNA codificante) em uma etapa de transcrição reversa (com a enzima transcriptase reversa) e na segunda fase, onde os novos cDNA passam por uma etapa de amplificação PCR com os primers específicos para SARS-CoV 2. A detecção em tempo real é realizada com sondas específicas para 2019-nCoV. Essa análise visa as regiões N1 e N3 do RNA viral. O resultado da reação é obtido pela análise colorimétrica da solução com um corante específico do equipamento<sup>B</sup>. Os primers utilizados podem ser inclusive compostos fluorescentes que emitem radiação na região do visível quando são excitados após integração em uma fita de DNA, sendo então detectados por espectrofotometria específica para essa análise<sup>C</sup>. Caso haja sinal de fluorescência considerável, o resultado é avaliado como positivo (em se tratando de uma análise qualitativa, no caso).

Após a análise de RT-PCR, pode-se realizar uma análise quantitativa da amostra para determinar com mais precisão a severidade da infecção. Nesse caso, a amostra é analisada por 35 ciclos de replicação de DNA para o monitoramento da fluorescência. Sabe-se que pela natureza da replicação do DNA ocorre a duplicação do número de DNA a cada ciclo, segundo a equação 1, fazendo com que o número de fitas de DNA cresça exponencialmente, assim como a fluorescência da amostra ( $2^{35}$ ). O valor padrão de ciclos utilizados é de 35 ciclos, o gera em torno de 35 bilhões de cópias do DNA viral.<sup>C,D</sup>

$$N_n = 2^n \quad (\text{equação 1})$$

n: número de ciclos de duplicação de DNA;

N: número de fitas de DNA no ciclo n.

## 8.2. Análise e parâmetros para a avaliação de potencial farmacológico

### 8.2.1. Docking molecular

Ensaio de Docking molecular se trata de análises computacionais de interação entre moléculas para o estudo de suas suscetibilidades à interação. Essa técnica utiliza programas de computador que através de informações químicas, estruturais e espaciais, calculam as energias livres de Gibbs das interações entre um candidato a fármaco e o sítio ativo do alvo molecular em estudo<sup>E</sup>. O fármaco em questão, quando já conhecido, pode ser encontrado em alguns bancos de dados por códigos, que facilitarão a entrada de valores das propriedades do composto.<sup>E,F</sup>

Com os valores de energia pode-se selecionar as moléculas de menores valores (maior valor em módulo, pois esses valores são normalmente negativos) de energia (em kcal/mol) como as de melhor interação com o sítio ativo, possibilitando então a realização de um screening com milhares de moléculas e reduzindo o universo inicial de moléculas. A faixa de energia entre -6,0 a -6,5 kcal/mol é considerada a divisão entre as classificações de moléculas que “interagem” e “não interagem”<sup>K,L</sup>. Essas moléculas então poderão ser sintetizadas e testadas quanto às suas propriedades antivirais.<sup>E</sup>

### 8.2.2. Parâmetros de CC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> SI e biodisponibilidade

A biodisponibilidade se trata da capacidade do composto químico de permear até a região alvo de atuação em concentrações terapêuticas suficientes para exercer seu papel.

O CC<sub>50</sub> (do inglês, Cytotoxic Concentration **50**) se trata da concentração necessária da substância em questão para inviabilizar 50% das células da cultura em estudo, atingindo células saudáveis ou não.<sup>M</sup>

Para esse parâmetro são realizados testes em culturas com células da espécie que serão realizados testes de inibição. As células são marcadas com um indicador que perde a coloração na morte da célula, então sendo contabilizado o número de células restantes.

O **IC<sub>50</sub>** (do inglês, **Inhibition Concentration 50**) diz respeito à concentração em que 50% da atividade do alvo farmacológico é inibida pelo fármaco. Nesse critério, um composto produzido durante um ciclo viral é analisado em relação a um controle.<sup>M</sup>

A mistura da proteína alvo e o fármaco é acompanhada por espectroscopia no visível em presença de um indicador para a detecção do complexo enzima-fármaco, ou por titulação de um desses componentes.<sup>N</sup>

O **EC<sub>50</sub>** (**Effective Concentration 50**), de maneira similar ao IC50, representa a concentração em que 50% da atividade viral sobre as células é inibida. O vírus é inoculado em um meio de cultura celular teste permitindo a infecção de células. O meio celular pode ser pré-tratado com o candidato a fármaco ou pós tratado com relação à inoculação viral para a avaliação da atividade antiviral dentro das etapas do ciclo viral.<sup>M</sup>

Após a inoculação viral, a cultura é lavada e realiza-se a ruptura celular para a liberação do RNA viral. Após a remoção do excesso de material celular, o RNA viral pode ser quantificado por RT-PCR quantitativo. Uma outra maneira de quantificação da atividade viral é pelo ensaio de redução de placa, onde a viabilidade celular é obtida pela comparação entre um ensaio controle sem a introdução do fármaco e outro com o fármaco.<sup>O</sup>

Desses dois fatores, se calcula o **SI** (do inglês, **Selectivity Index**), que é obtido pela razão  $SI = CC50/IC50$ , concluindo a adequação do produto à estratégia terapêutica proposta.<sup>P,M</sup>

Esses 4 fatores determinam se um candidato é promissor para as etapas seguintes de estudo, pois é importante que o medicamento consiga inibir de maneira eficiente o antígeno (baixos valores de IC50) e que não cause a morte de um grande número de células saudáveis (CC50 alto). Com esses parâmetros, espera-se então obter um alto índice de seletividade, SI.

### **8.3 Referências dos anexos:**

- A. UBI – “**UBI® SARS-CoV-2 ELISA INSTRUCTIONS FOR USE**”, United Biomedical, Inc. 25 Davids Drive Hauppauge, NY 11788 U.S.A. v: 7.0.

- B. Quest Diagnostics - “**SARS-CoV-2 RNA, Qualitative Real-Time RT-PCR (Test Code 39433)**”, Quest Diagnostics Infectious Disease, Inc. 33608 Ortega Highway, Bldg. B-West Wing San Juan Capistrano, CA 92675 U.S.A, 2021.
- C. International Atomic Energy Agency. **How is COVID-19 Virus detected using Real Time RT-PCR?**. [iaea.org](https://www.iaea.org/newscenter/news/how-is-the-covid-19-virus-detected-using-real-time-rt-pcr), 27/03/2020. Disponível em: <https://www.iaea.org/newscenter/news/how-is-the-covid-19-virus-detected-using-real-time-rt-pcr> Acesso em: 11/01/2022.
- D. Henrik’s Lab. **qPCR(real-time PCR) protocol explained**. [Youtube](https://www.youtube.com/watch?v=iu4s3Hbc_bw), 04/01/2021. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=iu4s3Hbc\\_bw](https://www.youtube.com/watch?v=iu4s3Hbc_bw) . Acesso: 11/01/2022.
- E. Barros, M. E. S. B.,” **Estudos de Docking Molecular, Síntese e Atividade Biológica de Análogos da (-)-Massoialactona e da Combretastatina A-4**”, Tese de Doutorado, DQF-UFPE, Recife, 2015.
- F. Meng, X.Y., Zhang, H. X., Mezei, M., Cui, M.,” **Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery**”, National Institutes of Health, *Curr Comput Aided Drug Des.*, 7(2), 2011 June 1, 146–157.
- G. Centers for Disease Control and Prevention. **Public Health Image Library (ID#: 23311)**. [phil.cdc.gov](https://phil.cdc.gov), 2020. Disponível em: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=23311> Acesso em: 11/01/2022.
- H. Faculdades fio ourinhos. **Normalização de trabalhos acadêmicos**. [fio.edu.br](https://fio.edu.br). Disponível em: [https://fio.edu.br/manualtcc/co/5\\_Introducao.html](https://fio.edu.br/manualtcc/co/5_Introducao.html). Acesso em: 11/01/2022.
- I. Centro de ensino superior de Foz do Iguaçu. **Manual de Orientação para confecção de Trabalhos Acadêmicos**. [cesufoz.edu.br](https://www.cesufoz.edu.br), 2018. Disponível em: [https://www.cesufoz.edu.br/aluno/orientacao\\_academica.asp](https://www.cesufoz.edu.br/aluno/orientacao_academica.asp) . Acesso em: 11/01/2022.
- J. BBC News Brasil. Covid: como a epistasia é a chave para entender gravidade de ômicron. 11/12/2021. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=CHzSb2ZTeug> . Acesso em: 11/01/2022.
- K. ABDELAAL AHMED MAHMOUD M. ALKHATIP, A., GEORGAKIS, M., MONTERO VALENZUELA, L. R., et al. **"Metal-Bound Methisazone; Novel Drugs Targeting Prophylaxis and Treatment of SARS-CoV-2, a Molecular**

- Docking Study**", International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 6, p. 2977, 15 mar. 2021. DOI: 10.3390/ijms22062977.
- L. SCIOR, T., ABDALLAH, H. H., MUSTAFA, S. F. Z., et al. "**Are vanadium complexes druggable against the main protease Mpro of SARS-CoV-2? – A computational approach**", Inorganica Chimica Acta, v. 519, p. 120287, maio 2021. DOI: 10.1016/j.ica.2021.120287.
- M. PIRZADA, R. H., HASEEB, M., BATOOL, M., et al. "**Remdesivir and Ledipasvir among the FDA-Approved Antiviral Drugs Have Potential to Inhibit SARS-CoV-2 Replication**", Cells, v. 10, n. 5, p. 1052, 29 abr. 2021. DOI: 10.3390/cells10051052.
- N. ANWAAR, M. U., ADNAN, F., ABRO, A., et al. "**Combined deep learning and molecular docking simulations approach identifies potentially effective FDA approved drugs for repurposing against SARS-CoV-2**", Computers in Biology and Medicine, p. 105049, nov. 2021. DOI: 10.1016/j.combiomed.2021.105049.
- O. YUAN, S., WANG, R., CHAN, J. F.-W., et al. "**Metallo drug ranitidine bismuth citrate suppresses SARS-CoV-2 replication and relieves virus-associated pneumonia in Syrian hamsters**", Nature Microbiology, v. 5, n. 11, p. 1439–1448, nov. 2020. DOI: 10.1038/s41564-020-00802-x.
- P. DE PAIVA, R. E. F., MARÇAL NETO, A., SANTOS, I. A., et al. "**What is holding back the development of antiviral metallodrugs? A literature overview and implications for SARS-CoV-2 therapeutics and future viral outbreaks**", Dalton Transactions, v. 49, n. 45, p. 16004–16033, 2020. DOI: 10.1039/D0DT02478C.