



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KAROLINE LEITE

**TRIAGEM VIRTUAL E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
POTENCIAIS INIBIDORES DA TIMIDINA QUINASE E DA
DNA POLIMERASE DO VÍRUS DO HERPES SIMPLES**

Londrina
2023

KAROLINE LEITE

**TRIAGEM VIRTUAL E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
POTENCIAIS INIBIDORES DA TIMIDINA QUINASE E DA
DNA POLIMERASE DO VÍRUS DO HERPES SIMPLES**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Orsato

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Marcelle de Lima
Ferreira Bispo

Londrina
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L533t Leite, Karoline .
TRIAGEM VIRTUAL E AVALIAÇÃO IN VITRO DE POTENCIAIS INIBIDORES DA TIMIDINA QUINASE E DA DNA POLIMERASE DO VÍRUS DO HERPES SIMPLIS / Karoline Leite. - Londrina, 2023.
106 f. : il.

Orientador: Alexandre Orsato.
Coorientador: Marcelle de Lima Ferreira Bispo.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Tese. 2. Antiviral - Tese. 3. Triagem virtual - Tese. 4. Quimioteca - Tese. I. Orsato, Alexandre. II. Bispo, Marcelle de Lima Ferreira. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

KAROLINE LEITE

**TRIAGEM VIRTUAL E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
POTENCIAIS INIBIDORES DA TIMIDINA QUINASE E DA
DNA POLIMERASE DO VÍRUS DO HERPES SIMPLES**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Orsato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Carla Cristina Perez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Magaly Girão Albuquerque
Universidade Federal do Rio de Janeiro -
UFRJ

Londrina, 04 de agosto de 2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela dádiva da vida, e por me transmitir muita força, paciência e persistência para alcançar meus objetivos.

Aos meus familiares, em especial, meus pais Inez Cheuczuk Leite e Moacir Leite, pela educação e por todos os esforços realizados para que eu concluísse meus estudos. E ao e meus irmãos Karina Leite e Gabriel Leite pelo apoio.

As minhas amigas Daiane Lopes da Silva e Paloma Danguí Rodrigues, pelos conselhos, apoio e amizade.

A Universidade Estadual de Londrina (UEL) por proporcionar um ensino de qualidade, em especial ao Programa de Pós Graduação em Química, e a todos os professores vinculados ao departamento pela aprendizagem, mas acima disso, por serem inspirações como pessoas e como profissionais dedicados.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Orsato e minha co-orientadora profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo, pela oportunidade, paciência, orientação, e por todo o conhecimento transmitido.

A todos os colegas e professores do LaSMMed – Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais.

E a todos que contribuíram de alguma forma para minha formação.

RESUMO

LEITE, Karoline. **Triagem virtual e avaliação *in vitro* de potenciais inibidores da timidina quinase e da DNA polimerase do vírus do herpes simples**. 2023. 106f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

O herpes é uma infecção causada pelo vírus do herpes simples (HSV) e faz parte das doenças virais que mais afetam os seres humanos, representando, assim, um problema de saúde pública global e, por não existir antiviral que possa curar as pessoas infectadas, o herpes apresenta alta prevalência em todo o mundo. A incidência e a severidade das infecções causadas pelo HSV (1 e 2) têm aumentado nas últimas décadas. As opções de tratamento disponíveis contra o HSV-1 aliviam os sintomas e diminuem a proliferação viral. O antiviral de primeira linha utilizado no tratamento é o aciclovir, que é altamente seletivo para esse vírus. Porém, o uso constante desse fármaco tem aumentado significativamente o surgimento de cepas de vírus resistentes. No intuito de descobrir novos inibidores das enzimas virais, timidina quinase (TK) e DNA polimerase, este trabalho propõe uma triagem virtual baseada em docagem molecular de compostos da quimioteca do Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais (LaSMMed) frente a esses alvos moleculares. Os protocolos de docagem molecular foram validados por redocagem para ambas as enzimas do HSV-1 (TK e DNA polimerase). Selecionou-se 12 compostos da quimioteca do LaSMMed para cada proteína para a análise das interações. Os compostos que resultaram no melhor desempenho nas simulações computacionais foram selecionados para a etapa de avaliação de atividade antiviral contra a infecção do HSV *in vitro*. As concentrações citotóxicas a 50% (CC₅₀) e inibitórias a 50% (IC₅₀) de três compostos testados permitiram classificá-los como inibidores moderados e levaram ao cálculo do índice de seletividade (IS) ≥ 10 , o que pode ser considerado um resultado satisfatório. O melhor composto, a cromona **LaSMMed71**, serviu como referência para o desenho de novos análogos. A análise das interações selecionou cinco compostos para a etapa de síntese, que foram preparados e caracterizados. E posteriormente enviados para os testes *in vitro*, os quais não se mostraram solúveis no meio aquoso do experimento. A partir dos resultados, pode-se perceber o sucesso das triagens virtuais que resultaram em compostos com potencial atividade antiviral. As perspectivas do trabalho são estudar mais detalhadamente a solubilidade das cromonas, aumentar a série destas e aprofundar o conhecimento dos compostos que apresentaram inibição para o HSV.

Palavras-chave: Antiviral; Triagem virtual; Docagem molecular; Cromonas; Quimioteca.

ABSTRACT

LEITE, Karoline. **Virtual screening and *in vitro* evaluation of potential herpes simplex virus thymidine kinase and DNA polymerase inhibitors**. 2023. 106f. Dissertation (master's degree in chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

Herpes is an infection caused by the herpes simplex virus (HSV) and is one of the viral diseases that most affect humans, thus representing a global public health problem and, because there is no antiviral that can cure infected people, herpes has a high prevalence worldwide. The incidence and severity of infections caused by HSV (1 and 2) have increased in recent decades. The treatment options available against HSV-1 alleviate symptoms and decrease viral proliferation. The first-line antiviral used in the treatment is acyclovir, which is highly selective for this virus. However, the constant use of this drug has significantly increased the emergence of resistant virus strains. In order to discover new inhibitors of viral enzymes, thymidine kinase (TK) and DNA polymerase, this work proposes a virtual screening based on molecular docking of compounds from the Laboratory of Synthesis of Medicinal Molecules (LaSMMed – Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais) against these molecular targets. Molecular docking protocols were validated by redocking for both HSV-1 enzymes (TK and DNA polymerase). Twelve compounds from the LaSMMed chemical library were selected for each protein for the analysis of interactions. The compounds that resulted in the best performance in computer simulations were selected for the evaluation step of antiviral activity against HSV infection *in vitro*. Cytotoxic concentrations at 50% (CC₅₀) and inhibitory at 50% (IC₅₀) of three tested compounds allowed classifying them as moderate inhibitors and led to the calculation of the selectivity index (SI) ≥ 10 , which can be considered a satisfactory result. The best compound, the chromone **LaSMMed71**, served as a reference for the design of new analogues. Interaction analysis selected five compounds for the synthesis step, which were prepared and characterized. And later sent for *in vitro* tests, which were not soluble in the aqueous medium of the experiment. From the results, we observed the success of the virtual screenings that resulted in compounds with potential antiviral activity. The perspectives of the work are to study in more detail the solubility of the chromones, increase their series and deepen the knowledge of the compounds that showed inhibition for HSV.

Key-words: Antiviral; Virtual screening; Molecular docking; Chromones; Chemical library.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Lesões causadas na pele pelo vírus do herpes.	14
Figura 2- Estrutura do HSV.	17
Figura 3- Reações de fosforilação do pró-fármaco aciclovir para a forma ativa trifosfatada.....	20
Figura 4- Reação da primeira fosforilação da timidina catalisada pela TK.	21
Figura 5- Representação esquemática em diagrama de fitas da estrutura tridimensional da timidina quinase (TK, “thymidine kinase”) do HSV-1 (“herpes simplex virus type 1”) obtida por cristalografia e resolvida por difração de raios-X (PDB ID: 1E2P) e, em destaque, resíduos de aminoácidos do sítio ativo em modelo bastão (colorido por elemento).....	22
Figura 6- Estrutura geral da DNA polimerase do HSV-1 em fita.....	23
Figura 7- Alguns compostos da literatura com atividade frente ao vírus do herpes.	24
Figura 8- Classes de compostos pertencentes à quimioteca do LaSMMed.	27
Figura 9- Sobreposição de poses do ligante original (CCV), ligante da pose 2 de menor RMSD (0,33) e ligante da pose 4 de maior fitness (40,20) na função de pontuação ASP.	34
Figura 10- Representação bidimensional das interações realizadas pelo ligante após a redocagem com o sítio catalítico da enzima.....	35
Figura 11- Representação das interações dos ésteres do ácido vanílico (LaSMMed 61-64) com os resíduos de aminoácidos importantes do sítio catalítico da TK.	37
Figura 12- Representação das interações dos ligantes da classe das tiazolidinonas [LaSMMed 44 (R e S), 45 (R e S) e 47(R e S)] com os resíduos de aminoácidos importantes do sítio catalítico da TK.	39
Figura 13- Representação das interações das oxazolidinonas LaSMMed 38(S) e 39(S) com os resíduos de aminoácidos importantes do sítio catalítico da TK.....	41
Figura 14- Representação das interações dos indóis LaSMMed 32 e 72 com os resíduos de aminoácidos importantes do sítio catalítico da TK.....	41
Figura 15- Representação das interações do LaSMMed 51 (cumarilamida) com os resíduos de aminoácidos importantes do sítio catalítico da TK.....	42
Figura 16- Sobreposição entre as poses do ligante original (YE4), do de menor RMSD (0,55 Å, pose 8) e do de maior FS (1,17 Å, pose 2) na função Goldscore.....	44

Figura 17- Representação bidimensional das interações realizadas pelo ligante após a redocagem com o sítio ativo da enzima.	45
Figura 18- Representação das interações das tiazolidinonas LaSMMed 49(R) , 49(S) , 48(R) , 46(R) , 45(R) e 46(S) com os resíduos de aminoácidos importantes do sítio catalítico da DNA polimerase.....	46
Figura 19- Representação das interações das cumarilamidas (LaSMMed 17 , 21 e 23) com os resíduos importantes do sítio catalítico da DNA polimerase.....	48
Figura 20- Representação das interações das cromonas (LaSMMed 54 e 71) e do análogo α,β -insaturado de apocinina (LaSMMed 69) com os resíduos importantes do sítio catalítico da DNA polimerase.....	49
Figura 21- Sítio ativo da enzima com o ligante original, LaSMMed 54 e LaSMMed 48(R)	51
Figura 22- Planejamento estrutural a partir da hibridação molecular da tiazolidinona e éster do ácido vanílico.....	56
Figura 23- Representação bidimensional das interações dos cinco melhores compostos [TK10(R) , TK10(S) , TK11(R) , TK11(S) e TK03(R)] com os aminoácidos do sítio catalítico da enzima.	58
Figura 24- Estrutura química da classe das amidas com núcleo cromona e do composto LaSMMed 71	59
Figura 25- Planejamento estrutural a partir da cromona LaSMMed 71	60
Figura 26- Representação bidimensional das interações realizadas pelos compostos LaSMMed 71 , DNA02 , DNA09 , DNA10 , DNA11 e DNA15 com o sítio catalítico da enzima.....	62
Figura 27- Rota sintética para a obtenção dos compostos DNA02 , DNA09 , DNA10 , DNA11 e DNA15 (3a-e)	64
Figura 28- Mecanismo proposto para a reação de obtenção do cloreto de acila (2).	65
Figura 29- Mecanismo proposto para a reação de obtenção da amida (3).....	65
Figura 30- Espectro de RMN de ^1H do composto DNA09	66
Figura 31- Espectro de RMN de ^1H do composto DNA10	67
Figura 32- Espectro de RMN de ^1H do composto DNA11	67
Figura 33- Espectro de RMN de ^1H do composto DNA02	68
Figura 34- Espectro de RMN de ^1H do composto DNA15	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Herpes-vírus humanos, suas subfamílias e siglas.	15
Tabela 2- Valores de RMSD e Fitness Score para as 10 corridas, na ausência das moléculas de água.	30
Tabela 3- Valores de RMSD e Fitness Score para as 10 corridas, na presença das moléculas de água HOH2012 e HOH2052 flexíveis.	31
Tabela 4- Valores de RMSD e Fitness Score para as 10 corridas, na presença das moléculas de água HOH2012 e HOH2052 fixas.	32
Tabela 5- Valores de média e desvio padrão para as quatro funções, calculados a partir dos dados das 10 corridas da Tabela 3.	33
Tabela 6- Valores de RMSD e Fitness Score para as 10 corridas nas quatro funções de pontuação avaliadas (ChemScore, GoldScore, ChemPLP e ASP).	43
Tabela 7- Viabilidade celular (%) dos cinco compostos em célula VERO (ATCC, CCL-81), nas concentrações de 300 a 18 µg/mL, e a concentração citotóxica 50% (CC ₅₀ em µg/mL).	52
Tabela 8- Concentrações citotóxicas (CC ₅₀) e inibitórias (IC ₅₀) de 50% (µg/mL) após tratamento com os compostos listados, na infecção por HSV-1 (cepa KOS) em células Vero.	54
Tabela 9- Resultados da triagem virtual, da melhor pose para cada composto.	57
Tabela 10- Resultados da triagem virtual, da melhor pose para cada composto análogo da DNA Polimerase, e em vermelho o valor de corte.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato de adenosina
ASP	Potencial Estatístico Astex (<i>Astex Statistical Potential</i>)
ATP	Trifosfato de Adenosina
CADD	Métodos computacionais no desenho de fármacos (<i>Computer-Aided Drug Designer</i>)
CC ₅₀	Concentração citotóxica a 50%
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
ChemPLP	Potencial linear por partes (<i>Piecewise Linear Potential</i>)
DMF	Dimetilformamida
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
dTMP	Desoxitimidina monofosfatada
EDTA	Ácido etilodiamino tetra-acético
FS	<i>Fitness Score</i>
GOLD	<i>Genetic Optimization for Ligand Dockin</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immuno-Deficiency Virus</i>)
HSV	Vírus herpes simples
IC ₅₀	Concentração inibitória a 50%
IS	Índice de seletividade
LaSMMed	Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais
PDB	Banco de dados de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Resonância magnética nuclear
RMSD	Desvio quadrático médio (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
SBDD	Desenho de fármaco baseados na estrutura (<i>Struture Based Drug Design</i>)
TK	Timidina Quinase
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Herpes-vírus: classificação e doenças associadas.....	14
1.2 Epidemiologia e tratamentos	18
1.3 Importância dos alvos moleculares para o Herpes vírus	20
1.4 Descoberta de fármacos auxiliado por computadores	24
1.5 A Quimioteca do LaSMMed	26
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1 Triagem virtual por docagem molecular da quimioteca do LaSMMed	29
3.1.1 Timidina Quinase viral	29
3.1.2 DNA Polimerase	43
3.2 Citotoxicidade	52
3.3 Avaliação da Atividade antiviral <i>in vitro</i>	53
3.4 Propostas de compostos análogos.....	55
3.4.1 Potenciais inibidores da Timidina Quinase (TK).....	55
3.4.2 Potenciais inibidores da DNA Polimerase	59
3.5 Síntese e caracterização dos compostos propostos.....	63
3.6 Citotoxicidade e avaliação da atividade antiviral <i>in vitro</i>	69
4. METODOLOGIA	70
4.1 Triagem Virtual Baseada em docagem Molecular	70
4.1.1 Obtenção e preparação das estruturas tridimensionais dos alvos moleculares	70
4.1.2 Preparação dos ligantes	70
4.1.3 Docagem molecular.....	71
4.2 Ensaio <i>in vitro</i>	72
4.2.1 Cultura celular	72
4.2.2 Estoque viral.....	72
4.2.3 Titulação viral	73
4.2.4 Compostos	73
4.2.5 Citotoxicidade	74

4.2.6	Triagem de atividade antiviral.....	75
4.3	Síntese e caracterização dos compostos	76
4.3.1	Procedimento geral	76
4.3.2	Caracterização	76
4.3.3	Síntese	76
5.	CONCLUSÃO	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 HERPES-VÍRUS: CLASSIFICAÇÃO E DOENÇAS ASSOCIADAS

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, do inglês “International Committee on Taxonomy of Viruses”), os vírus do herpes pertencem à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*. Esta família abrange cerca de 200 vírus capazes de infectar diversas espécies, como mamíferos, aves, répteis, peixes e moluscos. Os primeiros herpes-vírus humanos descritos foram os herpes-vírus simples (HSV). Hipócrates, médico da Grécia antiga, documentou as lesões na pele, denominando-as herpes (do grego *herpein* = rastejar ou alastrar) em referência ao aparecimento das vesículas na pele próximas umas às outras (Figura 1) (KUKHANOVA et al., 2014).

Figura 1- Lesões causadas na pele pelo vírus do herpes.



Fonte: (ROCHA, 2023).

Os herpes-vírus simples são divididos em dois tipos: 1 e 2 (HSV-1, HSV-2). Além desses, seis outros herpes-vírus são conhecidos por causarem infecções em humanos, divididos em três subfamílias. Os herpes-vírus são classificados conforme as suas características biológicas, estrutura do genoma, tropismo, efeito citopático, sítio de infecção latente, patogênese e manifestação da doença.

A subfamília *Alphaherpesvirinae* é constituída pelos vírus que causam infecções latentes em células neurais, com ciclo de replicação curto, como os vírus HSV-1, HSV-2 e varicela-zóster (VZV, do inglês “varicella-zoster virus”). A subfamília *Betaherpesvirinae* causa infecções latentes nas glândulas secretórias

e rins, com ciclo de replicação longo, como os vírus citomegalovírus (CMV) e herpes-vírus humano 6 e 7 (HHV-6 e HHV-7). A subfamília *Gammaherpesvirinae* infecta células linfóides, é formada por Epstein-Barr (EBV) e herpes-vírus humano-8 associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV). A Tabela 1 mostra os nomes dos oito herpes-vírus humanos, suas subfamílias e siglas (KELLY et al., 2009).

Tabela 1- Herpes-vírus humanos, suas subfamílias e siglas.

Subfamília	Nome oficial	Nome comum	Siglas
Alfa	Herpes-vírus humano 1	Vírus herpes simples tipo 1	HHV-1 ou HSV-1
	Herpes-vírus humano 2	Vírus herpes simples tipo 2	HHV-2 ou HSV-2
	Herpes-vírus humano 3	Vírus varicela-zóster	HHV-3 ou VZV
Beta	Herpes-vírus humano 5	Citomegalovírus	HHV-5 ou CMV
	Herpes-vírus humano 6	Vírus herpes humano 6	HHV-6
	Herpes-vírus humano 7	Vírus herpes humano 7	HHV-7
Gama	Herpes-vírus humano 4	Vírus Epstein-Barr	HHV-4 ou EBV
	Herpes-vírus humano 8	Herpes-vírus associado ao sarcoma de Kaposi	HHV-8 ou KSHV

A infecção primária causada pelo VZV (HHV-3) é a varicela (catapora, em inglês “chickenpox”), uma doença muito comum na infância. A reativação da varicela em adultos causa o herpes-zóster (cobreiro), onde as erupções são semelhantes às da varicela, porém, mais localizadas (SANTOS et al., 2012). O Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza vacina contra a varicela para crianças (vacina varicela e tetra-viral: sarampo, caxumba, rubéola e varicela), entretanto, no caso do herpes-zóster, apesar de também haver vacina (Zostavax/Merck e Shingrix/GSK), ela é de alto custo e ainda não está disponível no SUS (OLIVEIRA; SILVA, 2023).

O CMV (HHV-5) é um agente infeccioso presente em diferentes locais no corpo humano, as formas mais graves ocorrem no período neonatal e resultam da infecção intrauterina (SANTOS et al., 2012).

O KSHV (HHV-8) está diretamente relacionado às lesões de sarcoma de Kaposi (um tipo de câncer de pele), no entanto, geralmente, para o desenvolvimento da doença, é preciso que o paciente esteja com o sistema imunológico deficiente (como em portadores do HIV) (SANTOS et al., 2012).

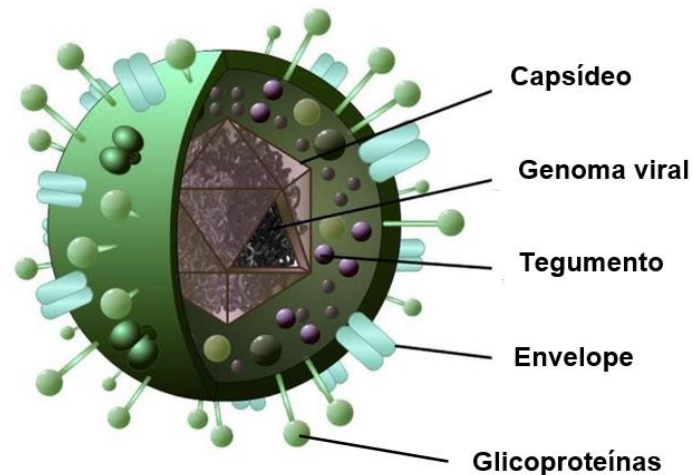
O gênero *Simplexvirus* é representado por dois vírus: vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1) e vírus herpes simples tipo 2 (HSV-2). O tipo 1 está normalmente associado a infecções orais e oculares, mas também pode causar infecções genitais, enquanto o segundo tipo está mais relacionado às infecções genitais e ao herpes neonatal, sendo considerada uma infecção sexualmente transmissível (IST). Estas infecções podem evoluir para infecções severas, principalmente, em pacientes imunodeficientes ou neonatos, como meningite, encefalite e lesões oculares (ZUCKERMAN, A.J.; BANATVALA, J.E.; PATTISON, J.R.; GRIFFITHSAND; SCHOUB, 2004; BEAUMAN, 2005).

Além disso, estes vírus causam infecções que desenvolvem um estado de latência, manifestando seus sintomas periodicamente. Após a replicação primária na mucosa oral ou genital, os vírus se deslocam dos axônios para os neurônios do gânglio sensorial. É no gânglio sensorial que ele permanece em um estado de latência, que persiste pelo resto da vida do infectado. As lesões desaparecem à medida que o sistema imune do indivíduo se recupera (SANTOS et al., 2008).

Os fatores que desencadeiam a reativação da infecção ainda não são bem conhecidos, porém, vários estímulos são descritos como capazes de induzir a infecção, entre eles estão: estresse físico e emocional, febre, exposição à luz ultravioleta, menstruação e desequilíbrio hormonal (MUYLEAERT et al., 2011; SANTOS, N. S. O. ; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, 2015).

O HSV apresenta-se como uma partícula esférica com diâmetro entre 120 e 200 nm (Figura 2). A partícula viral consiste em três elementos estruturais: um nucleocapsídeo contendo o genoma (constituído de DNA de fita dupla linear); o envelope, que consiste em uma bicamada lipídica com glicoproteínas inseridas, e uma região proteica, entre o capsídeo e o envelope, chamada de tegumento (ARDUINO; PORTER, 2008; SANTOS et al., 2008).

Figura 2- Estrutura do HSV.



Fonte: (BAEZ et al., 2018).

A replicação do HSV é composta de sete etapas principais: adsorção, penetração, desnudamento, replicação do DNA viral, montagem, empacotamento e liberação. O ciclo se inicia com a adsorção da partícula viral à célula hospedeira, o vírus se liga à superfície celular por meio das glicoproteínas do envelope (RESKE et al., 2007; AKHTAR; SHUKLA, 2009; WOUK et al., 2021). O vírus então se liga a um receptor específico (heparano sulfato) na superfície da célula (ITZHAKI; WOZNIAC, 2006).

Após a adsorção, as etapas de penetração e desnudamento acontecem de forma complementar. Durante a penetração, o vírus perde seu envelope viral e ocorre a fusão com a membrana celular, assim, apenas o tegumento e o nucleocapsídeo adentram no citoplasma da célula (WOUK et al., 2021).

Após entrar na célula, o nucleocapsídeo é transportado ao poro nuclear pelo citoesqueleto, onde o genoma viral é liberado e o capsídeo vazio é deixado no citoplasma. Nesta etapa, o DNA viral é alterado de sua forma linear de fita dupla para a forma circular (HELDWEIN; KRUMMENACHER, 2008; KELLY et al., 2009).

No núcleo, acontecerá a replicação do material genético do vírus, ou seja, seu DNA será transcrito e replicado para que novas partículas virais sejam formadas. A replicação conta com um arranjo de genes virais α , β e γ , estes devem atuar corretamente para que o material genético seja sintetizado e, assim, completando o ciclo replicativo viral (MELLO et al., 2016; RAMPERSA; TENNANT, 2018). Faz-se destaque para a transcrição dos genes virais β , que

gera uma série de proteínas, entre elas a timidina quinase e DNA polimerase, que estão envolvidas com a síntese do DNA viral (VENTURA, 2023).

Posteriormente, a etapa de montagem da partícula viral se inicia (WOUK et al., 2021). As proteínas de suporte (*scaffolding*) se organizam e envolvem o DNA viral sintetizado, formando, assim, o nucleocapsídeo (SANTOS et al., 2008).

A última etapa da replicação do vírus é complexa e não está bem estabelecida. No entanto, há dois processos sugeridos sobre a aquisição do envelope e a migração do nucleocapsídeo para fora da célula. A primeira hipótese descreve a teoria do duplo envelopamento, e a segunda sugere que o nucleocapsídeo adquire um único envelope. Apesar da forma de envelopamento do vírus HSV ser ainda incerta, sabe-se que este sai da célula já com o seu envoltório externo. A partícula viral completa e pronta para infectar as células adjacentes é chamada de vírion. Todo o processo de replicação demora em torno de 18 a 20 horas (SANTOS et al., 2008; WOUK et al., 2021).

1.2 EPIDEMIOLOGIA E TRATAMENTOS

No mundo, o herpes é classificado como uma infecção altamente contagiosa, comum e pandêmica, pois os vírus estão distribuídos em todos os países e etnias. O herpes faz parte das doenças virais que mais afetam os seres humanos, por não existir fármaco antiviral que possa curar permanentemente a doença (LOOKER et al., 2015). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 3,7 bilhões de pessoas com menos de 50 anos são infectadas com o HSV (67% da população mundial). No Brasil, não há dados oficiais, mas de acordo com dados do Ministério da Saúde (2019), estima-se uma prevalência de 80% da população (LOOKER et al., 2015, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

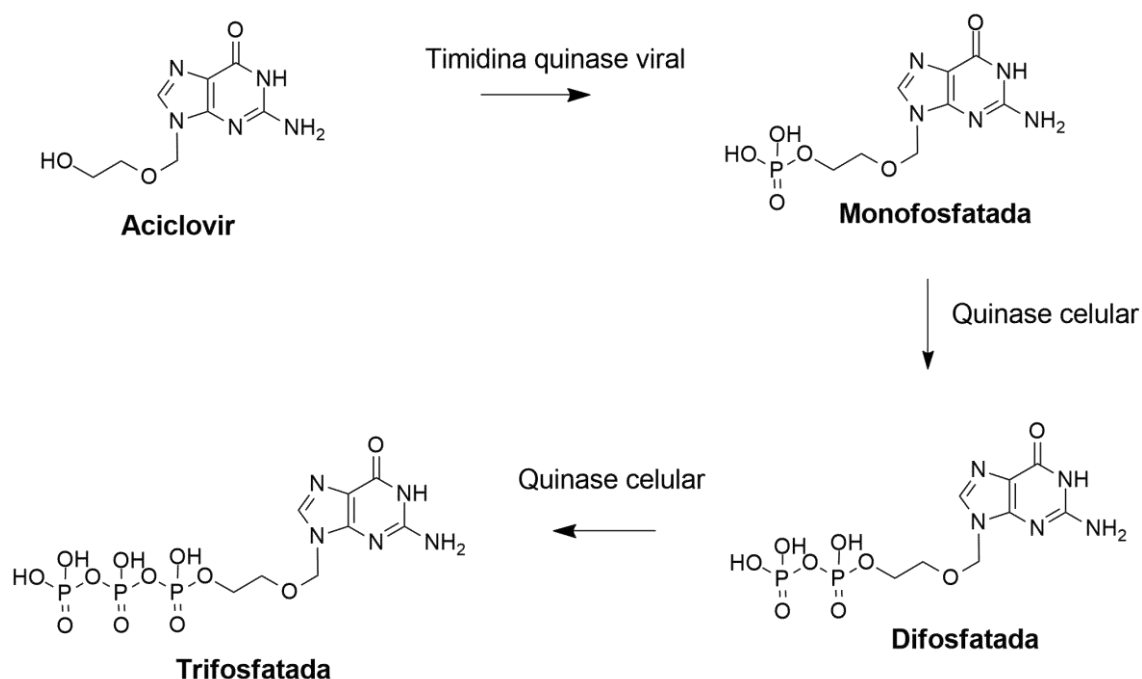
O número de fármacos utilizados nas várias infecções virais é limitado, uma das principais razões é a natureza dos vírus. Os vírus apresentam um sistema enzimático bastante restrito, sendo dependentes dos processos metabólicos celulares para sua multiplicação. Vários passos da sua replicação envolvem processos metabólicos da célula hospedeira, e isto tem dificultado o ataque direto ao vírus ou à sua replicação, sem causar efeitos adversos nas

células infectadas (JASSIM; NAJI, 2003; CLERCQ, DE, 2004, 2005; ORHAN et al., 2009).

O herpes é uma doença que não tem cura, visto que não existe um fármaco antiviral capaz de eliminar permanentemente o vírus do organismo. Durante as crises infecciosas, o objetivo principal dos tratamentos é acelerar a cicatrização das lesões e prevenir a transmissão. Assim, o sucesso parcial da quimioterapia antiviral contra o HSV se deve ao desenvolvimento do aciclovir, que interage com proteínas-chave da replicação viral (CLERCQ, DE, 2004; JENSSEN et al., 2004; TAGLIARI et al., 2012).

O aciclovir [9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina], um análogo acíclico e sintético dos nucleosídeos purínicos, tornou-se o padrão da terapia para infecções pelo HSV. O aciclovir é um pró-fármaco, ou seja, para ter ação antiviral, necessita ser ativado para a forma trifosfatada. A primeira fosforilação é catalisada por uma enzima específica, uma quinase viral. As enzimas da célula hospedeira fosforilam sequencialmente a forma monofosfatada em difosfatada e trifosfatada (Figura 3) (BRIK, 1993; PENELLO et al., 2010). O mecanismo de ação do aciclovir baseia-se na maior afinidade da enzima DNA polimerase viral pela forma trifosfatada do aciclovir, assim, interrompendo o alongamento da cadeia de DNA viral (BRIK, 1993; FONSECA, 1998). Análogos do aciclovir foram autorizados para o tratamento das infecções herpéticas, mas estes também precisam passar por etapas de fosforilação para serem ativados (FONSECA, 1998).

Figura 3- Reações de fosforilação do pró-fármaco aciclovir para a forma ativa trifosfatada.



Fonte: A autora (2023).

Nas últimas décadas, o aciclovir tem sido extensivamente usado no tratamento das infecções por herpes simples e, como consequência, a resistência a esse antiviral tem emergido pela seleção de cepas resistentes, principalmente em pacientes imunocomprometidos (XU et al., 1999; ZHANG et al., 2007; SANTOS et al., 2008; SU et al., 2008; GOULD et al., 2013). Em pacientes imunocompetentes, o isolamento de HSV-1 resistente ao aciclovir e a outros análogos de nucleosídeos é raro, mas em 2008, Cheng e colaboradores relataram que de 0,28% a 0,33% dos isolados clínicos apresentam algum grau de resistência (CHENG et al., 2008).

Dessa forma, tendo em vista o número elevado de casos de herpes e o surgimento de cepas resistentes aos fármacos existentes, há necessidade de estudos de novas estratégias de inibição viral (PENELLO et al., 2010).

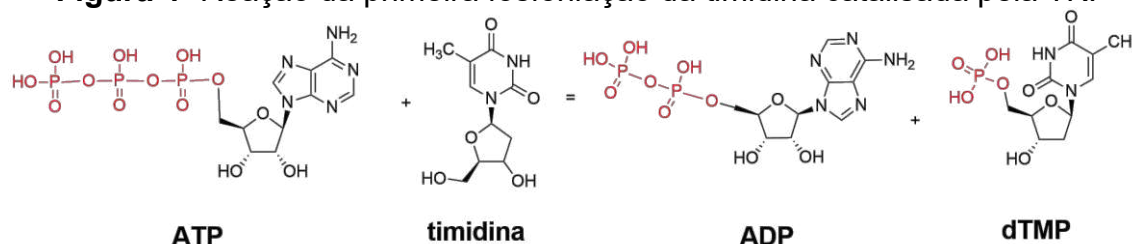
1.3 IMPORTÂNCIA DOS ALVOS MOLECULARES PARA O HERPES VÍRUS

Como alternativa para a resistência ao tratamento convencional, as enzimas virais que são peças-chave para a patogênese viral são alvos

moleculares estudados como estratégia antiviral. A inibição enzimática pode acarretar na interrupção da replicação viral, e o processo proteolítico essencial para a maturação dos vírus pode ser interrompido (CLERCQ, DE, 2004).

A timidina quinase (TK, “thymidine kinase”) catalisa a transferência do grupo gama-fosfato do ATP para a timidina, formando desoxitimidina monofosfatada (dTMP) que é substrato para a polimerase de DNA durante a replicação viral do DNA (Figura 4). Posteriormente, a dTMP é fosforilada mais duas vezes e, finalmente, a forma trifosfatada é incorporada em uma molécula de DNA (CADORE, 2013). Nos vírus da subfamília *Alphaherpesvirinae*, a função da TK também é a fosforilação, fornecendo desoxirribonucleotídeos para a síntese de DNA viral (ENQUIST et al., 1998; CADORE, 2013).

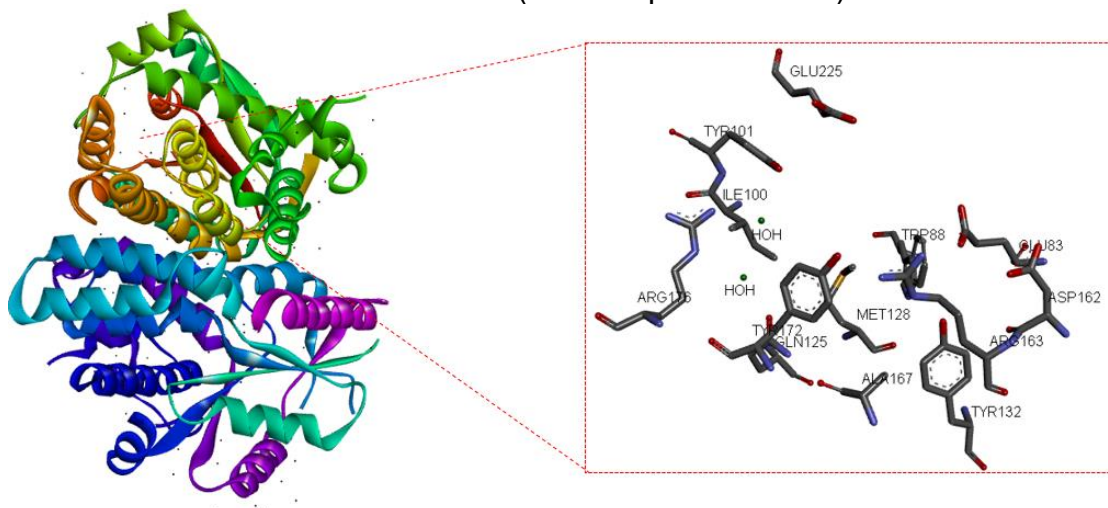
Figura 4- Reação da primeira fosforilação da timidina catalisada pela TK.



Fonte: Adaptado de BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase, www.brenda-enzymes.org)

A TK (EC 2.7.1.21) viral é uma enzima da classe das transferases, subclasse das fosfotransferases e sub-subclasse das fosfotransferases que apresentam um grupo álcool como aceptor (CHANG et al., 2021). A TK é uma macromolécula constituída por duas cadeias (A e B) com aproximadamente 40 kDa por monômero, organizada em dímero (homodímero) (WURTH et al., 2001). A Figura 5 mostra a estrutura cristalográfica da TK do HSV-1 e seu sítio ativo.

Figura 5- Representação esquemática em diagrama de fitas da estrutura tridimensional da timidina quinase (TK, “thymidine kinase”) do HSV-1 (“herpes simplex virus type 1”) obtida por cristalografia e resolvida por difração de raios-X (PDB ID: 1E2P) e, em destaque, resíduos de aminoácidos do sítio ativo em modelo bastão (colorido por elemento).



Fonte: A autora (2023), com base na estrutura do PDB 1E2P, produzida no programa Discovery Studio Visualizer.

Como é possível observar na Figura 5, os aminoácidos do sítio ativo são Glu83, Trp88, Ile100, Tyr101, Gln125, Met128, Tyr132, Asp162, Arg163, Ala167, Tyr172, Arg176 e Glu225.

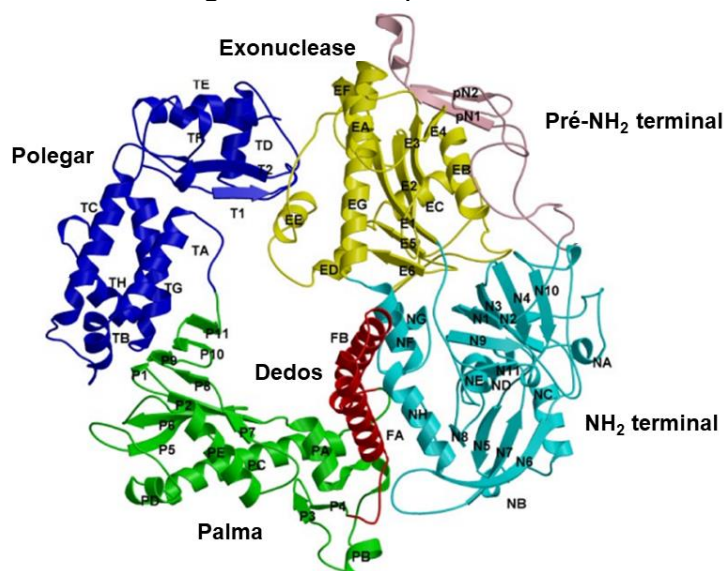
Estudos mostraram que a TK viral é necessária para a expressão completa da virulência, e a sua ausência está relacionada com a redução desta (ENQUIST et al., 1998; FERRARI et al., 2000; CADORE, 2013). Assim, a TK é uma enzima muito importante para o vírus, tornando-se um alvo promissor e sua inibição poderia interromper a replicação viral e diminuir a virulência.

Outro alvo molecular na busca de antivirais é a DNA polimerase viral, uma enzima envolvida na replicação do DNA do vírus. Ela é a mediadora, ou seja, dá início a síntese do DNA viral. (GROVER et al., 2011; KARAMPURI et al., 2012; ZARROUK et al., 2017).

A DNA polimerase do HSV-1 pertence à família de polimerases dos herpesvírus, possui 1235 resíduos de aminoácidos. A estrutura cristalina desta DNA polimerase apresenta seis domínios estruturais, que são: domínio pré-NH₂ terminal, NH₂ terminal, exonuclease, polegar, dedos e palma (Figura 6). Uma fração da estrutura é comparada com uma mão direita com domínios

denominados de palma, polegar e dedos, o sítio ativo é formado pelos domínios da palma e dos dedos da polimerase de HSV (LIU et al., 2006).

Figura 6- Estrutura geral da DNA polimerase do HSV-1 em fita.

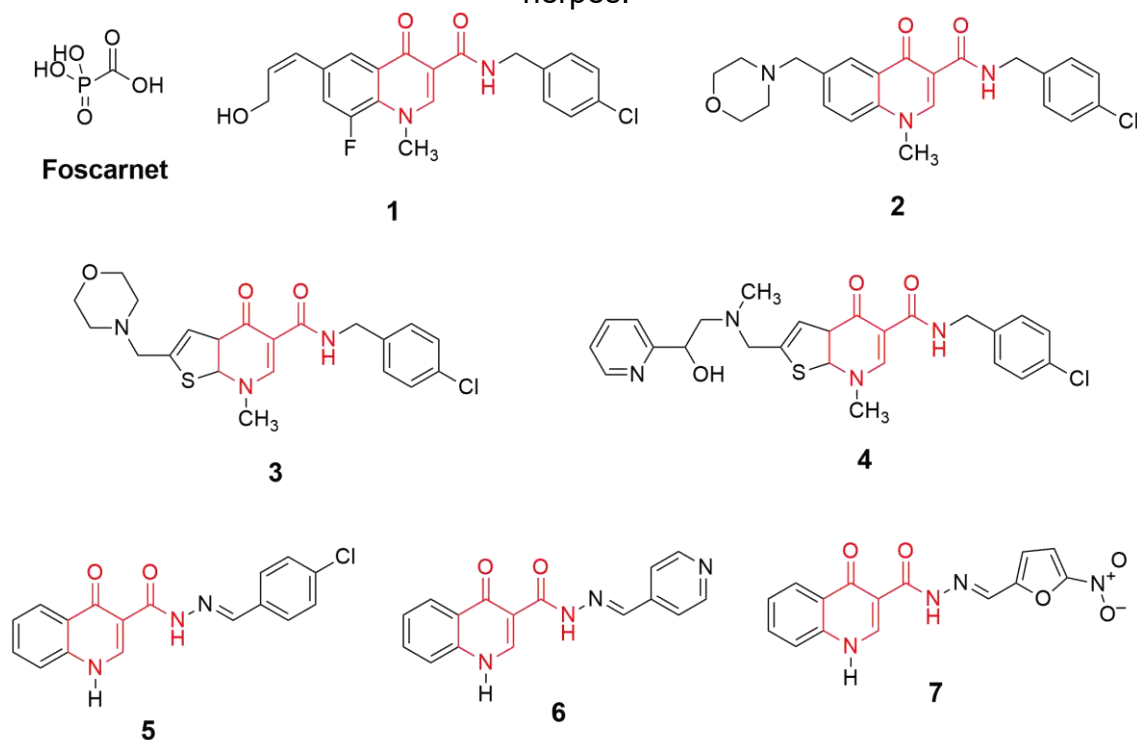


Fonte: Adaptado de LIU et al., 2006. Domínio pré-NH₂ terminal na coloração rosa, domínio NH₂ terminal em ciano, exonuclease em amarelo, palma em verde, dedos em vermelho e polegar em azul.

O aciclovir e seus análogos são inibidores nucleosídicos da DNA polimerase, entretanto, existem também inibidores não nucleosídicos da DNA polimerase, que inibem diretamente a DNA polimerase viral, como o foscarnet (ácido fosfonofórmico, Figura 7), que liga-se ao local da ligação do pirofosfato da DNA polimerase viral (WATHEN, 2002).

Dados da literatura mostram alguns compostos que são excelentes candidatos a agentes anti-herpéticos (Figura 7). Os compostos **1** e **2** são derivados 4-dihidro-oxoquinolinos, levam a sigla PNU (WATHEN, 2002). Os compostos **3** e **4** possuem grande potencial de inibição, sendo propostas modificações neles (SCHNUTE et al., 2005, 2008). A série de derivados acil-hidrazonas **5**, **6** e **7** foram sintetizados e mostraram atividade frente ao HIV-1. Porém, estudos de modelagem molecular mostraram que estes compostos devem ser ativos também frente ao HSV-1 (YONEDA et al., 2014).

Figura 7- Alguns compostos da literatura com atividade frente ao vírus do herpes.



Fonte: Adaptados de (WATHEN, 2002; SCHNUTE et al., 2005, 2008; YONEDA et al., 2014).

Legenda: a semelhança estrutural entre os compostos destacada em vermelho.

Devido à resistência dos vírus aos fármacos existentes, há a importante necessidade de estudos de novos inibidores contra a DNA polimerase, como também de inibidores contra novos alvos moleculares.

1.4 DESCOBERTA DE FÁRMACOS AUXILIADO POR COMPUTADORES

Nas últimas décadas, ampliou-se significativamente o desenvolvimento de tecnologias computacionais, assim proporcionando o uso de abordagens *in silico* com maior frequência e qualidade. O uso de técnicas computacionais para a descoberta de novos fármacos é conhecida pela sigla CADD (do inglês: *Computer-Aided Drug Design*), ou seja, planejamento de fármacos auxiliado por computador. O CADD pode ser dividido em duas abordagens principais: (a) planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD, “ligand based drug design”) e (b) planejamento de fármacos baseado na estrutura da macromolécula-alvo (SBDD, “structure based drug design”).

A triagem virtual pode ser realizada considerando as duas abordagens, LBDD e SBDD. No caso da triagem virtual empregando a abordagem SBDD usando a técnica do docagem molecular, por exemplo é possível selecionar as estruturas dos compostos de melhor interação com a macromolécula-alvo a partir de um amplo espaço químico, que pode conter dezenas ou milhões de substâncias diferentes. Isso permite a triagem virtual de uma grande quantidade de compostos em um tempo acessível, reduzindo os custos iniciais de identificação e melhorando as chances de encontrar candidatos a fármacos, visto que a pesquisa *in vitro* e *in vivo* são muito mais demoradas e dependem de mais recursos financeiros (PINZI; RASTELLI, 2019; LINHARES et al., 2021).

A docagem molecular é uma abordagem utilizada para prever possíveis modos de ligação entre um ligante e uma macromolécula, de modo a avaliar a interação de substâncias com um alvo molecular de interesse. Os algoritmos de busca realizam uma pesquisa no espaço conformacional disponível para o ligante, procurando diferentes conformações e orientações desse ligante em sítios de ligação da macromolécula para formar complexos ligante-macromolécula, ou seja, diferentes poses ou soluções. Em seguida, uma função de pontuação é aplicada para calcular a energia do complexo, com base na afinidade entre eles (FABRIS, 2023).

Os algoritmos de busca modificam parâmetros estruturais dos ligantes, como graus de liberdade de torção, translacional e rotacional, com o objetivo de determinar a pose (i.e., conformação e orientação) mais favorável. Os programas GOLD e AutoDock utilizam métodos de buscas estocásticos, estes fazem alterações aleatórias no ligante usando uma função de probabilidade predefinida, de modo que as mudanças favoráveis são aceitas, gerando um conjunto de conformações, com amplo espectro energético (SLIWOSKI et al., 2014; LEELANANDA; LINDERT, 2016; FABRIS, 2023).

As funções de pontuação são geralmente de quatro tipos. As funções de pontuação baseadas em campo de força, como GoldScore, são desenvolvidas com base nos cálculos da mecânica clássica, que levam em consideração as interações de van der Waals e forças eletrostáticas. As funções de pontuação empíricas, como ChemScore, utilizam dados de estruturas determinadas experimentalmente e parametrizam essas informações, de modo a obter uma energia livre de ligação como a soma ponderada de termos de energia não

correlacionados (i.e., van der Waals, hidrofobicidade e eletrostática, ligação de hidrogênio, e de dessolvatação). As funções baseadas em conhecimento, ASP (do inglês: *Astex Statistical Potential*), derivam de informações estruturais de complexos ligante-proteína, retirados de bancos de dados experimentais, para gerar potenciais estatísticos. E por último, as funções baseadas em consenso que combinam várias funções de pontuação, para gerar um resultado com menos erros e com mais precisão (SLIWOSKI et al., 2014; LEELANANDA; LINDERT, 2016; FABRIS, 2023).

1.5 A QUIMIOTECA DO LASMMED

O Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais (LaSMMed) do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina (UEL) tem trabalhado nos últimos anos na construção de uma quimioteca (coleção de substâncias), contendo dezenas de substâncias sintéticas, que pertencem a diferentes classes químicas. Esta quimioteca (Figura 8) é composta por derivados de ésteres de carvacrol (12 compostos), cumarilamidas (13 compostos), cumariltioureia (1 compostos), indóis (15 compostos), cromonas (3 compostos), oxazolidinonas (12 compostos), tiazolidinonas (6 compostos), ésteres de ácido vanílico (4 compostos) e derivados de apocinina (6 compostos). A adição de substituintes com diferentes características estéreo-eletrônicas permite a avaliação da influência destes sobre a ação desejada. Todas as estruturas e seus respectivos substituintes estão dispostos no Apêndice A.

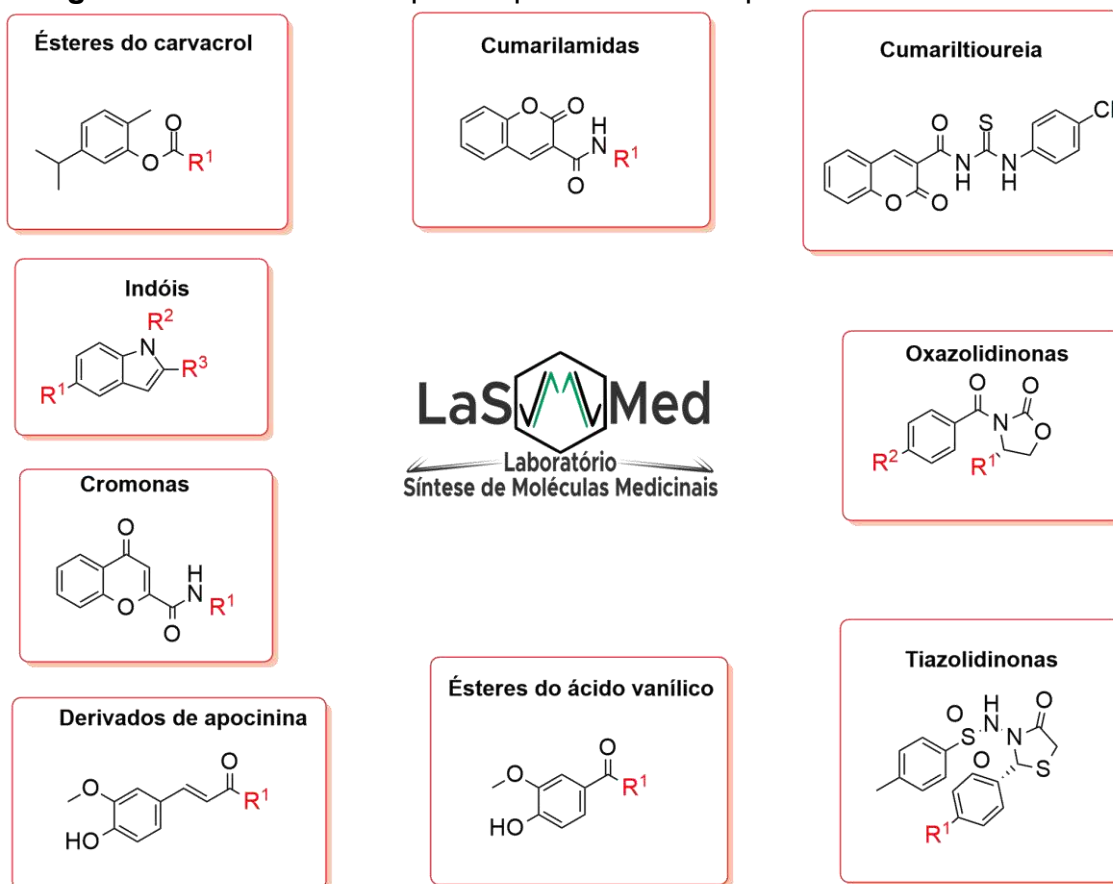
Destacamos a classe das cromonas, que são compostos heretocíclicos do tipo benzo- γ -pirona, de origem natural ou sintética. Devido às suas características estruturais e propriedades farmacológicas, o núcleo químico da cromona tem um lugar importante no âmbito dos produtos naturais, na química orgânica sintética e na química medicinal (GASPAR et al., 2011, 2013).

É válido ressaltar que o interesse em se avaliar as substâncias da nossa quimioteca pode ser embasado em relatos da literatura que indicam o potencial antiviral frente a diferentes vírus (e.g., dengue, HIV, Chikungunya) dos núcleos heterocíclicos ou funções orgânicas presentes em seus arcaouços estruturais. Além disso, algumas dessas classes foram identificadas como inibidores de enzimas virais (PILAU et al., 2011; LIN et al., 2013; QUINTANA et al., 2016;

TIJSMA et al., 2016; HISHIKI et al., 2017; WU et al., 2017; GHOSH et al., 2018; HWU et al., 2019; XU et al., 2020).

Portanto, neste trabalho realizou-se inicialmente uma triagem virtual, por docagem molecular, a fim de identificar dentre os compostos da nossa quimioteca, os que apresentam atividade antiviral frente ao HSV-1, como potenciais inibidores da timidina quinase ou da DNA polimerase virais.

Figura 8- Classes de compostos pertencentes à quimioteca do LaSMMed.



Fonte: A autora (2023).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar compostos com atividade antiviral frente ao HSV-1 como potenciais inibidores das seguintes enzimas do HSV-1: timidina quinase (TK) ou DNA polimerase.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma triagem virtual baseada em docagem molecular dos compostos pertencentes à quimioteca do LaSMMed frente à timidina quinase (TK) e à DNA polimerase do HSV-1.
- Avaliar experimentalmente a citotoxicidade e a atividade antiviral dos compostos selecionados na triagem virtual.
- Propor novos análogos do composto com o melhor desempenho nos testes anti-HSV-1.
- Realizar uma segunda rodada de triagem virtual baseada em docagem molecular com os compostos análogos propostos.
- Sintetizar os compostos com os melhores resultados *in silico*, e avaliar as suas citotoxicidades e atividades antivirais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TRIAGEM VIRTUAL POR DOCAGEM MOLECULAR DA QUIMIOTECA DO LASMMED

3.1.1 Timidina Quinase viral

Para a triagem virtual, escolheu-se a enzima TK viral com o ligante co-cristalizado 6-(dihidroxi-isobutil)-timina (CCV), devido à ausência de mutações (PDB ID = 1E2P, resolução 2,50 Å). Para a validação do protocolo foi utilizado o procedimento de redocagem. Este consiste na retirada do ligante co-cristalizado no seu sítio de ligação no alvo-molecular que, em seguida, é encaixado novamente. No primeiro momento, realizou-se o processo de redocagem não considerando a presença das moléculas de água HOH2012 e HOH2052. Estas moléculas de água são mediadoras de ligações de hidrogênio entre o ligante e a enzima, assim são relevantes para o reconhecimento molecular. Estas foram encontradas realizando a medida das distâncias interatômicas no complexo, conforme relatado pelos autores (WURTH et al., 2001). Por último, realizou-se o procedimento considerando ou não a flexibilidade dessas moléculas. Cada pose obtida para cada função de pontuação (ChemScore, GoldScore, ChemPLP e ASP) exibiu um valor de desvio quadrático médio (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*) individual e um valor de pontuação (*Fitness Score*, FS) que podem ser observadas nas Tabelas 2-4.

Tabela 2- Valores de RMSD e *Fitness Score* para as 10 corridas, na ausência das moléculas de água.

ChemScore			GoldScore		
Poses	RMSD (Å)	Fitness	Poses	RMSD (Å)	Fitness
1	1,44	22,58	1	1,54	62,58
2	1,68	22,70	2	1,55	66,19
3	1,02	22,71	3	2,96	62,06
4	0,91	22,12	4	1,62	65,49
5	1,44	22,75	5	1,19	63,61
6	0,76	23,11	6	1,16	63,62
7	0,94	22,69	7	0,90	59,10
8	0,82	21,84	8	1,08	64,39
9	1,51	26,97	9	1,00	64,66
10	1,00	22,54	10	1,05	60,83

ChemPLP			ASP		
Poses	RMSD (Å)	Fitness	Poses	RMSD (Å)	Fitness
1	0,57	66,24	1	0,66	36,92
2	0,68	65,98	2	0,51	36,32
3	0,89	62,16	3	0,78	36,95
4	0,93	61,74	4	0,55	37,04
5	0,85	61,45	5	2,57	35,49
6	0,56	66,02	6	0,56	37,00
7	0,54	66,50	7	0,46	36,97
8	0,68	66,04	8	0,52	35,64
9	0,51	65,74	9	0,45	35,70
10	0,33	60,67	10	0,62	35,53

Fonte: A autora (2023).

Tabela 3- Valores de RMSD e *Fitness Score* para as 10 corridas, na presença das moléculas de água HOH2012 e HOH2052 flexíveis.

ChemScore			GoldScore		
Poses	RMSD (Å)	Fitness	Poses	RMSD (Å)	Fitness
1	0,67	33,54	1	0,98	76,33
2	0,85	33,80	2	1,52	74,72
3	0,77	35,49	3	0,90	76,03
4	0,94	33,94	4	0,71	74,28
5	0,80	34,98	5	0,93	71,79
6	0,71	34,90	6	0,85	73,72
7	0,94	34,03	7	0,92	71,31
8	0,88	34,97	8	0,92	75,10
9	1,49	37,01	9	0,92	74,03
10	0,91	34,41	10	0,90	71,99

ChemPLP			ASP		
Poses	RMSD (Å)	Fitness	Poses	RMSD (Å)	Fitness
1	0,75	85,84	1	0,69	39,39
2	0,52	86,47	2	0,34	39,98
3	0,56	79,64	3	0,79	39,89
4	0,74	86,18	4	0,73	40,20
5	0,64	85,04	5	0,54	38,97
6	0,66	85,53	6	0,75	39,38
7	0,44	81,20	7	0,53	39,49
8	0,51	86,09	8	0,68	39,68
9	0,43	79,65	9	0,75	39,61
10	0,49	84,88	10	0,73	39,70

Fonte: A autora (2023).

Tabela 4- Valores de RMSD e *Fitness Score* para as 10 corridas, na presença das moléculas de água HOH2012 e HOH2052 fixas.

ChemScore			GoldScore		
Poses	RMSD (Å)	Fitness	Poses	RMSD (Å)	Fitness
1	0,91	21,64	1	1,21	62,42
2	1,44	23,24	2	1,19	63,76
3	1,52	27,05	3	1,09	64,12
4	0,75	22,85	4	1,44	62,78
5	0,71	22,58	5	1,01	64,45
6	0,69	22,35	6	1,56	62,50
7	2,95	25,95	7	1,48	61,98
8	1,37	22,32	8	1,05	63,82
9	0,69	23,42	9	1,55	62,28
10	1,07	22,11	10	1,59	65,55

ChemPLP			ASP		
Poses	RMSD (Å)	Fitness	Poses	RMSD (Å)	Fitness
1	0,68	65,99	1	0,99	36,04
2	0,53	65,69	2	0,45	35,98
3	0,92	61,62	3	0,48	35,61
4	0,62	59,85	4	0,76	36,88
5	0,92	61,15	5	0,54	36,43
6	0,67	65,70	6	2,71	35,59
7	0,54	66,18	7	0,71	36,91
8	0,67	65,98	8	0,77	36,32
9	0,67	65,02	9	0,70	36,70
10	0,69	66,24	10	0,65	36,15

Fonte: A autora (2023).

Os valores de RMSD podem ser usados como medida de discrepância do encaixe do ligante de referência e das poses geradas pelo programa. Os baixos valores de RMSD obtidos após a redocagem na ausência de moléculas de água (Tabela 2) indicam que o protocolo de docagem poderia ser validado. Entretanto, a validação também foi possível em protocolos que levaram em consideração a presença de HOH2012 e HOH2052 (Tabelas 3 e 4), o que representaria um modelo mais adequado para a simulação computacional devido à sua proximidade com as condições biológicas (LADBURY, 1996). Comparando-se os resultados que consideraram ou não a flexibilidade de HOH2012 e HOH2052, pode-se observar uma tendência de diminuição dos valores de RMSD e em suas

variações entre as poses para a redocagem com flexibilidade das moléculas de água em questão, o que corresponderia a um cenário mais factível encontrado no meio biológico, uma vez que o processo de dessolvatação dos sítios de ligação é fundamental para o reconhecimento molecular (LADBURY, 1996; MAHMOUD et al., 2020).

Portanto, a docagem molecular com as águas flexíveis foi validada nas quatro funções de pontuação, assim foram calculadas as médias e desvios padrão para as quatro funções (Tabela 5).

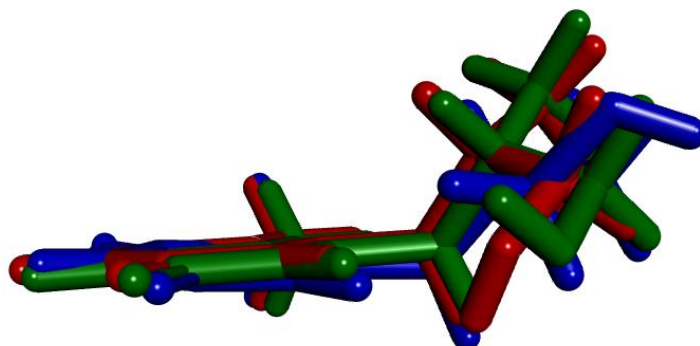
Tabela 5- Valores de média e desvio padrão para as quatro funções, calculados a partir dos dados das 10 corridas da Tabela 3.

	ChemScore	GoldScore	CHEMPLP	ASP
Média	0,90	0,96	0,58	0,65
Desvio Padrão	0,23	0,21	0,12	0,14

Fonte: A autora (2023).

As funções CHEMPLP e ASP apresentaram os menores valores de média e de desvio padrão, entretanto, analisando os dados de RMSD de cada função separadamente (Tabela 5) e correlacionando os valores de RMSD com os valores de *fitness* (medida relacionada ao ajuste do ligante no alvo), a função ASP foi a escolhida para a docagem dos compostos da quimioteca. Visto que a pose 2 de menor RMSD (0,34, Tabela 3) apresentou o segundo maior *fitness* (39,98), valor muito próximo do obtido para a pose 4 de maior *fitness* (40,20), que por sua vez, apresentou o quinto menor valor de RMSD (0,73, Tabela 3). Na Figura 9, pode-se observar a sobreposição dessas três poses, a partir da qual pode-se inferir que a função ASP deve ser capaz de pesquisar e classificar as poses mais adequadas para os compostos de interesse durante a triagem virtual.

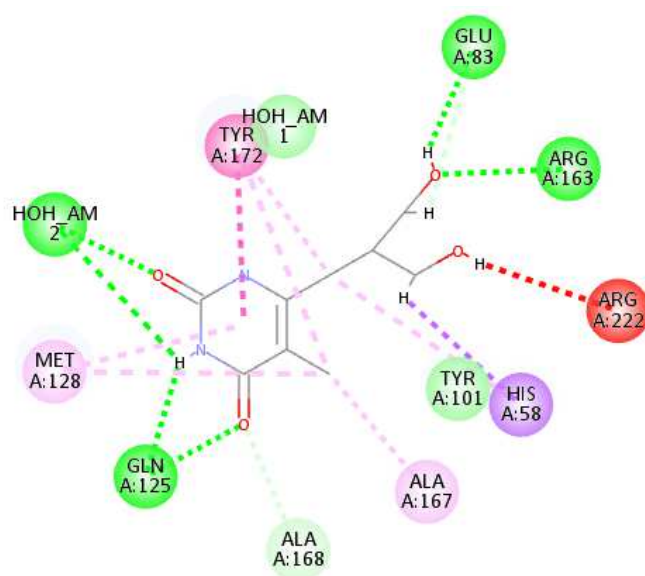
Figura 9- Sobreposição de poses do ligante original (CCV), ligante da pose 2 de menor RMSD (0,33) e ligante da pose 4 de maior *fitness* (40,20) na função de pontuação ASP.



Fonte: A autora (2023). Legenda: O ligante 6-(dihidroxi-isobutil)-timina apresenta-se em vermelho, e a pose de menor RMSD em azul e de maior *fitness* em verde (Função de pontuação: ASP).

As interações do ligante resultantes do processo de redocagem são mostradas na Figura 10 em 2D e no Apêndice B, destacando as ligações de hidrogênio com os aminoácidos Gln125, Arg163, Glu83 e com uma molécula de água. Segundo Champness et al. (1998), as interações importantes para o processo de reconhecimento molecular são as ligações de hidrogênio com os aminoácidos Arg176, Tyr101 e Gln125, e os contatos de Van der Waals com Met128 e Tyr172 (CHAMPNESS et al., 1998). Além da cadeia lateral de Lys62, que foi relatada como essencial para a transferência de um grupo fosforila durante a catálise (WURTH et al., 2001).

Figura 10- Representação bidimensional das interações realizadas pelo ligante após a redocagem com o sítio catalítico da enzima TK.



Fonte: A autora (2023). Legenda:

Tipo das interações:	■ Ligação de hidrogênio	■ Empilhamento Pi-Pi
	■ Ligação de hidrogênio não-convencional	■ Alquila/Pi-Alquila
	■ Desfavorável	■ Pi-Sigma
	■ Van der Waals	

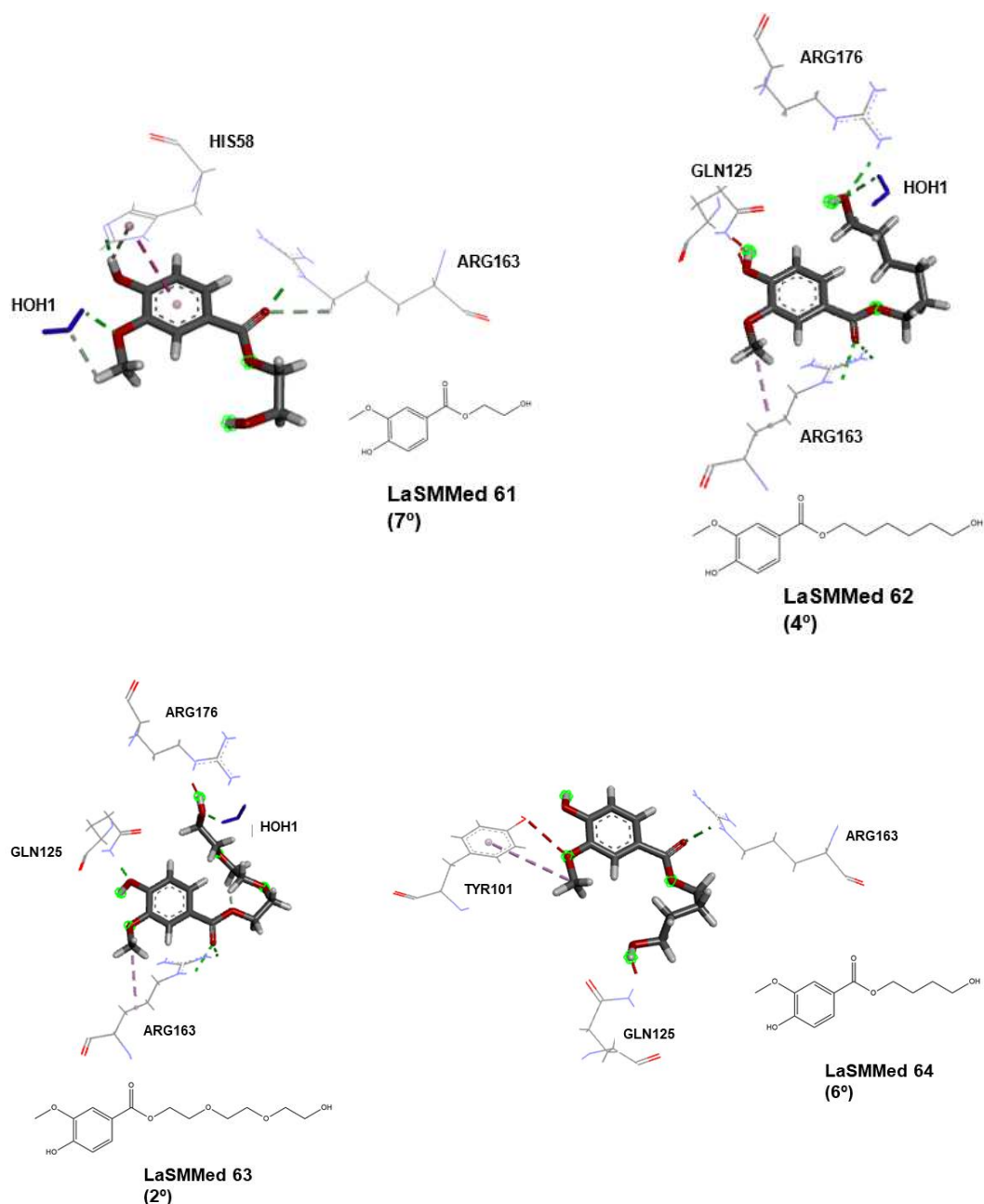
Após a validação do protocolo de docagem molecular por redocagem, este foi aplicado a 72 compostos pertencentes à quimioteca do LaSMMed (Apêndice A). Os estereoisomêros foram considerados, a classe das tiazolidinonas apresenta um centro quiral, assim, totalizando 78 estruturas, as quais pertencem às classes químicas: ésteres de carvacrol, cumariltioureas, cumarilamidas, indóis, oxazolidinonas, tiazolidinonas, cromonas, ésteres do ácido vanílico e derivados α,β -insaturados de apocinina (Figura 8).

No Apêndice C estão dispostos os valores de *FS* da melhor pose obtida para cada composto, bem como aquela obtida para o ligante original CCV após a redocagem e a classificação pelo valor de *FS* dos compostos.

Em comparação com o valor de *FS* obtido para o ligante original (CCV) que foi de 40,20, obtiveram-se 12 resultados superiores (45,27 a 40,77) e 66 inferiores (39,64 a -11,81). De um modo geral, os compostos que tiveram melhor desempenho pertencem a diferentes classes químicas, como a cumarilamida (**LaSMMed 51**), os indóis (**LaSMMed 32** e **LaSMMed 72**), as oxazolidinonas

(**LaSMMed 38(S)** e **LaSMMed 39(S)**), as tiazolidinonas (**LaSMMed 44(R)**, **LaSMMed 45(R)** e **LaSMMed 47(R)**), e ésteres do ácido vanílico (**LaSMMed 61-64**). Por outro lado, os compostos que tiveram pior desempenho, em geral pertencem à classe das cumarilamidas (**LaSMMed 14-23**), visto que os substituintes dessas são aromáticos e da **LaSMMed 51** é alifático. Assim sendo, os 12 compostos que apresentaram valores de *FS* acima do ligante original (CCV) foram selecionados para a avaliação das interações com a TK, destacando-se aquelas com resíduos importantes para o processo catalítico e as ligações de hidrogênio com resíduos que compõem o sítio catalítico (Figuras 11-15), enquanto as demais interações estão listadas no Apêndice B.

Figura 11- Representação das interações dos ésteres do ácido vanílico (**LaSMMed 61-64**) com os resíduos de aminoácidos importantes do sítio catalítico da TK.



Fonte: A autora (2023). **Legenda:** O composto é representado em bastões na cor dos elementos, os resíduos de aminoácidos em linha na cor dos elementos e a água como linhas azuis. As linhas tracejadas representam as interações realizadas e são coloridas conforme o tipo. Estrutura em 2D do composto e classificação por *FS*.

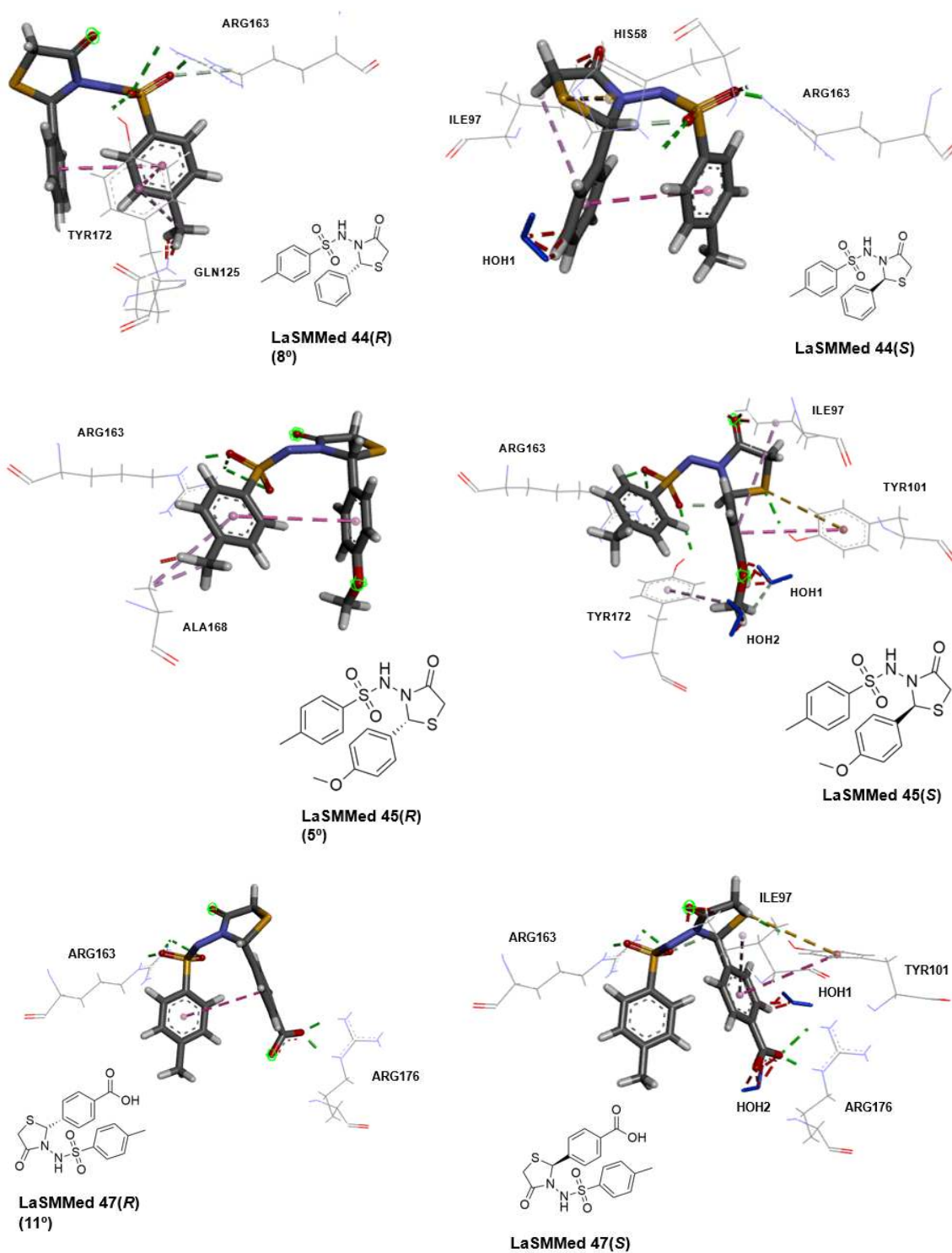
Tipo das interações:	 Ligação de hidrogênio	 Desfavorável
	 Ligação de hidrogênio não-convencional	 Alquila/Pi-Alquila

Dentre os doze compostos melhores classificados, quatro deles são ésteres do ácido vanílico (**LaSMMed 61-64**), ou seja, todos os ésteres do ácido vanílico ficaram entre os que apresentaram melhores *FS*.

Analisando-se as suas interações (Figura 11 e Apêndice B), pode-se observar que **LaSMMed 62** e **63** apresentaram ligações de hidrogênio com um resíduo importante, sendo com Arg176 e com Gln125, respectivamente. Entretanto, também apresentaram interações desfavoráveis, sendo **LaSMMed 62** com Gln125 e **LaSMMed 63** com Arg176. Ademais, realizaram mais duas ligações de hidrogênio com Arg163 e com a HOH1. Tais interações também foram observadas para o **LaSMMed 61**, que também apresentou uma ligação de hidrogênio com His58 e uma interação de Van der Waals com o resíduo Met128. Dentre esses derivados, o **LaSMMed 64** foi o único que não exibiu nenhuma interação forte com os resíduos importantes, realizando apenas uma ligação de hidrogênio com Arg163, além de ter apresentado interações desfavoráveis com dois resíduos importantes (Gln125 e Tyr101). Assim pode-se perceber que os ésteres do ácido vanílico que apresentam substituintes mais volumosos (**LaSMMed 62** e **63**) se acomodam melhor no sítio da TK.






Dentre a classe das tiazolidinonas, tem-se 3 representantes (**LaSMMed 44, 45** e **47**) dentre as doze selecionadas. É válido ressaltar que nenhum enantiômero *S* das tiazolidinonas apresentou *FS* maior que o ligante original CCV, indicando uma certa preferência no reconhecimento pela configuração *R* (Figura 12).

Figura 12- Representação das interações dos ligantes da classe das tiazolidinonas [LaSMMed 44 (*R* e *S*), 45 (*R* e *S*) e 47 (*R* e *S*)] com os resíduos de aminoácidos importantes do sítio catalítico da TK.



Fonte: A autora (2023). **Legenda:** O composto é representado em bastões na cor dos elementos, os resíduos de aminoácidos em linha na cor dos elementos e as águas como

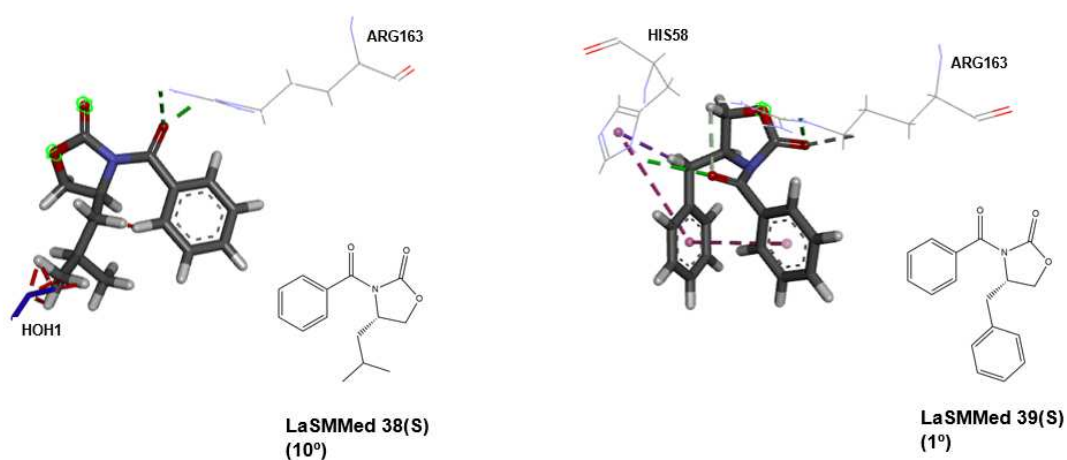
bastões azuis. As linhas tracejadas representam as interações realizadas e são coloridas conforme o tipo. Estrutura em 2D do composto e classificação por *FS*.

Tipo das interações:		Ligação de hidrogênio		Empilhamento Pi-Pi
		Desfavorável		Alquila/Pi-Alquila
		Ligação de hidrogênio não-convencional		

Mais especificamente, com relação às interações, observa-se na Figura 12 que o **LaSMMed 45(R)** apresentou três ligações de hidrogênio com a Arg163, mas nenhuma com resíduos importantes da enzima. O **LaSMMed 44(R)** realizou uma ligação de hidrogênio com a Tyr172, que com o substrato da enzima era interação de Van der Waals, duas ligações de hidrogênio com o resíduo Arg163, mas apresentou cinco interações desfavoráveis com um resíduo importante, Gln125. Por sua vez, o **LaSMMed 47(R)** exibiu 2 ligações de hidrogênio com o resíduo Arg176, além de 3 ligações de hidrogênio com a Arg163. Comparando os enantiômeros entre si, o **LaSMMed 44(S)** perdeu a interação com o resíduo importante Tyr172, além de apresentar mais interações desfavoráveis, no total seis, quatro com a HOH1 e duas com a Ile97. O **LaSMMed 45(S)** ganhou interações com resíduos importantes Tyr101 e Tyr172, mas apresentou dez interações desfavoráveis, três com a Ile97, quatro com a HOH1 e três com a HOH2, enquanto o seu enantiômero apresentou apenas uma. E o **LaSMMed 47(S)** ganhou interações com resíduos importantes Tyr101 e Arg176, mas também apresentou um número elevado de interações desfavoráveis, sendo treze, quatro com a Ile97, três com a HOH1 e seis com a HOH2, enquanto o seu enantiômero não apresentou nenhuma. O número elevado de interações desfavoráveis dos enantiômeros S, justifica o baixo valor de *FS*.

A classe das oxazolidinonas conta com dois representantes **LaSMMed 38(S)** e **39(S)** dentre os selecionados, sendo este último o primeiro colocado da triagem virtual. A Figura 13 mostra que **LaSMMed 38(S)** não apresentou nenhuma interação com resíduos importantes, realizando apenas duas ligações de hidrogênio com a Arg163, além de interações desfavoráveis com a água HOH1. Enquanto o **LaSMMed 39(S)** apresentou duas ligações de hidrogênio, com a Arg163 e His58, porém esses não são considerados resíduos-chave, apesar de seu elevado valor de *FS*.

Figura 13- Representação das interações das oxazolidinonas **LaSMMed 38(S)** e **39(S)** com os resíduos de aminoácidos importantes do sítio catalítico da TK.



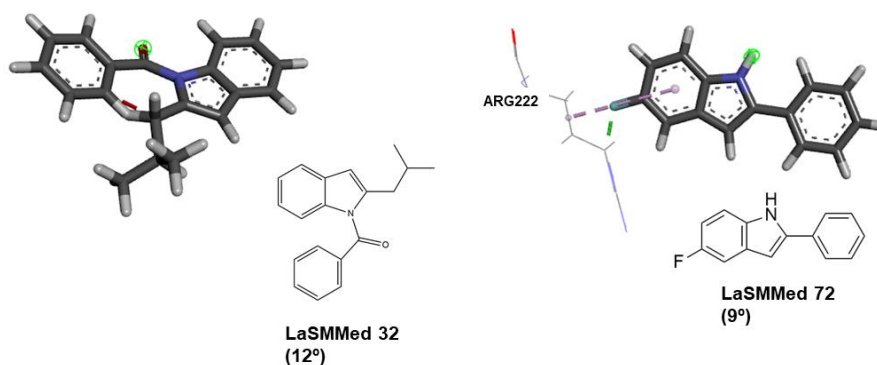
Fonte: A autora (2023). **Legenda:** O composto é representado em bastões na cor dos elementos, os resíduos de aminoácidos em linha na cor dos elementos e as águas como bastões azuis. As linhas tracejadas representam as interações realizadas e são coloridas conforme o tipo. Estrutura em 2D do composto e classificação por *FS*.

Tipo das interações:

█ Ligação de hidrogênio	█ Empilhamento Pi-Pi em T
█ Desfavorável	█ Pi-Sigma

A classe dos indóis apresenta dois representantes (**LaSMMed 32** e **72**) dentre os seleccionados, as suas interações estão mostradas na Figura 14.

Figura 14- Representação das interações dos indóis **LaSMMed 32** e **72** com os resíduos de aminoácidos importantes do sítio catalítico da TK.



Fonte: A autora (2023). **Legenda:** O composto é representado em bastões na cor dos elementos, os resíduos de aminoácidos em linha na cor dos elementos. As linhas tracejadas representam as interações realizadas e são coloridas conforme o tipo. Estrutura em 2D do composto e classificação por *FS*.

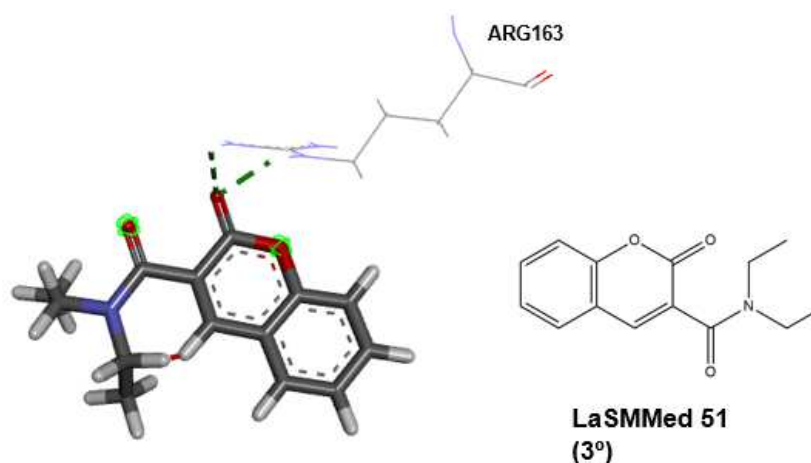
Tipo das interações:

█ Ligação de hidrogênio	█ Alquila/Pi-Alquila
--	---

O indol **LaSMMed 32** não demonstrou interações importantes e também não apresentou nenhuma ligação de hidrogênio. Já o **LaSMMed 72** tampouco apresentou interações com os resíduos importantes, mas realizando apenas uma ligação de hidrogênio com a Arg222.

A última estrutura selecionada pertence à classe das cumarilamidas (**LaSMMed 51**). As suas interações estão mostradas na Figura 15.

Figura 15- Representação das interações do **LaSMMed 51** (cumarilamida) com os resíduos de aminoácidos importantes do sítio catalítico da TK.



Fonte: A autora (2023). Legenda: O composto é representado em bastões na cor dos elementos, os resíduos de aminoácidos em linha na cor dos elementos. As linhas tracejadas representam as interações realizadas e são coloridas conforme o tipo. Estrutura em 2D do composto e classificação por *FS*.

Tipo das interações: Ligação de hidrogênio

De acordo com a Figura 15, percebe-se que a cumarilamida **LaSMMed 51** não apresentou nenhuma interação com resíduos importantes, apenas ligações de hidrogênio com a Arg163.

Assim, os compostos **LaSMMed 62**, **63**, **44(R)**, **47(R)**, **38(S)** e **39(S)** apresentaram interações mais relevantes com a enzima e foram selecionados para a próxima etapa que consiste na avaliação *in vitro* da atividade antiviral.

3.1.2 DNA Polimerase

Para a triagem virtual, escolheu-se um complexo específico (PDB ID = 7LUF, resolução 3,50 Å) devido à ausência de mutações na sequência primária, e por este ser o único complexo ternário disponível, constituído pela porção proteica, por uma fita dupla de DNA (em construção) e por um inibidor, tornando-a um modelo mais próximo da conformação ativa da enzima. Após a redocagem nas quatro funções de pontuação, cada pose obtida exibiu um valor de RMSD e um valor *FS* que podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6- Valores de RMSD e *Fitness Score* para as 10 corridas nas quatro funções de pontuação avaliadas (ChemScore, GoldScore, ChemPLP e ASP).

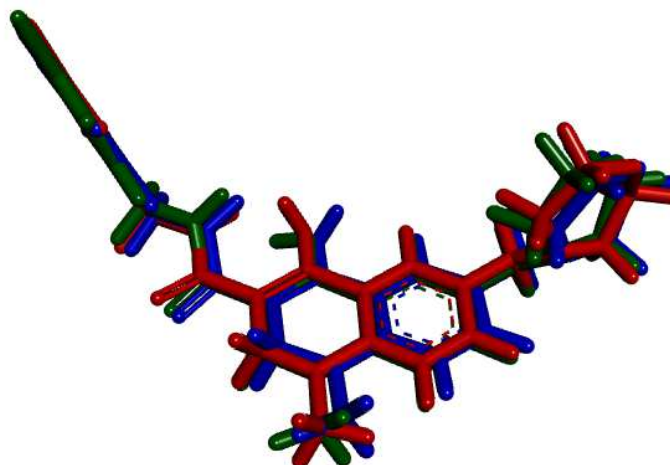
ChemScore			GoldScore		
Poses	RMSD (Å)	Fitness	Poses	RMSD (Å)	Fitness
1	6,59	24,93	1	9,62	75,07
2	9,23	26,67	2	1,17	86,82
3	9,29	27,21	3	1,15	84,03
4	6,66	23,97	4	9,71	70,17
5	9,29	25,97	5	1,22	79,99
6	6,29	27,96	6	7,37	63,54
7	6,94	28,00	7	9,56	74,35
8	6,40	24,96	8	0,55	79,32
9	10,73	22,96	9	1,11	78,20
10	6,51	27,87	10	9,70	74,36

ChemPLP			ASP		
Poses	RMSD (Å)	Fitness	Poses	RMSD (Å)	Fitness
1	9,99	66,39	1	7,00	39,59
2	6,23	79,44	2	7,39	39,06
3	6,61	72,09	3	4,47	40,28
4	10,43	70,37	4	7,66	38,72
5	10,41	65,37	5	7,14	40,62
6	6,58	71,84	6	7,23	39,68
7	6,41	81,25	7	4,89	37,95
8	10,76	66,22	8	4,83	38,79
9	10,39	65,91	9	7,41	10,51
10	6,78	69,97	10	7,65	39,52

Fonte: A autora (2023).

Analisando-se os valores de RMSD, pôde-se observar que a docagem molecular foi validada na função de pontuação GoldScore, pois apresentou 5 poses com valores de RMSD abaixo de 2,0 Å. Além disso, a pose 8 de menor RMSD (0,55 Å) apresentou o quarto *FS* mais alto (79,32), enquanto a pose 2 que apresentou o maior valor de *FS* (86,82) foi a terceira de menor RMSD (1,17 Å). Na Figura 16 é apresentada a sobreposição da pose obtida de menor RMSD (pose 8), maior *FS* (pose 2) com a função GoldScore e a pose do ligante original YE4.

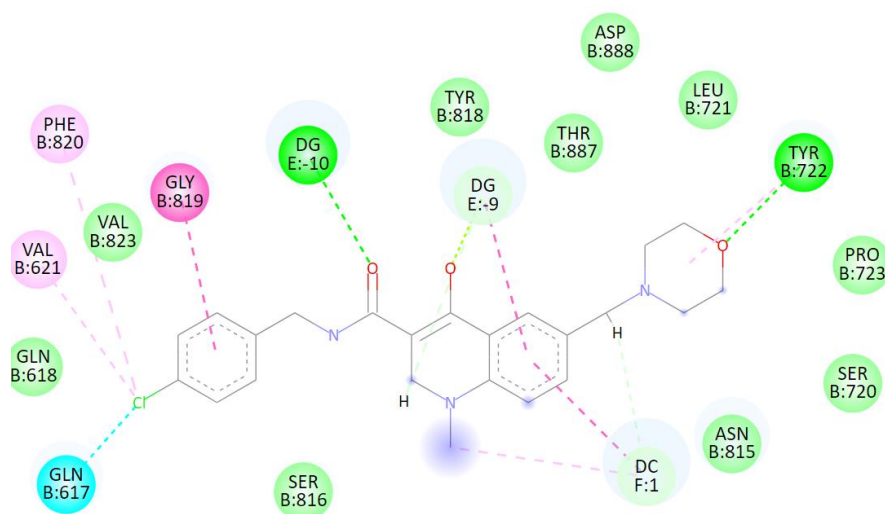
Figura 16- Sobreposição entre as poses do ligante original (YE4), do de menor RMSD (0,55 Å, pose 8) e do de maior *FS* (1,17 Å, pose 2) na função Goldscore.



Fonte: A autora (2023). Legenda: O ligante N-(4-clorobenzil)-1-metil-6-(morfolinometil)-4-oxo-1,4-di-hidroquinolina-3-carboxamida (YE4) apresenta-se em bastões vermelhos, e a pose de menor RMSD em bastões azuis e a de maior *fitness* em bastões verdes.

As interações do ligante resultantes do processo de redocagem são mostradas na Figura 17 em 2D, destacando-se a ligação de hidrogênio do aminoácido Tyr722 com o oxigênio da morfolina. A parte central do ligante realiza interações com as bases do DNA (DC1, DG-9 e DG-10). As demais interações são mostradas no Apêndice D.

Figura 17- Representação bidimensional das interações realizadas pelo ligante após a redocagem com o sítio ativo da enzima DNA polimerase.



Fonte: A autora (2023). Legenda:

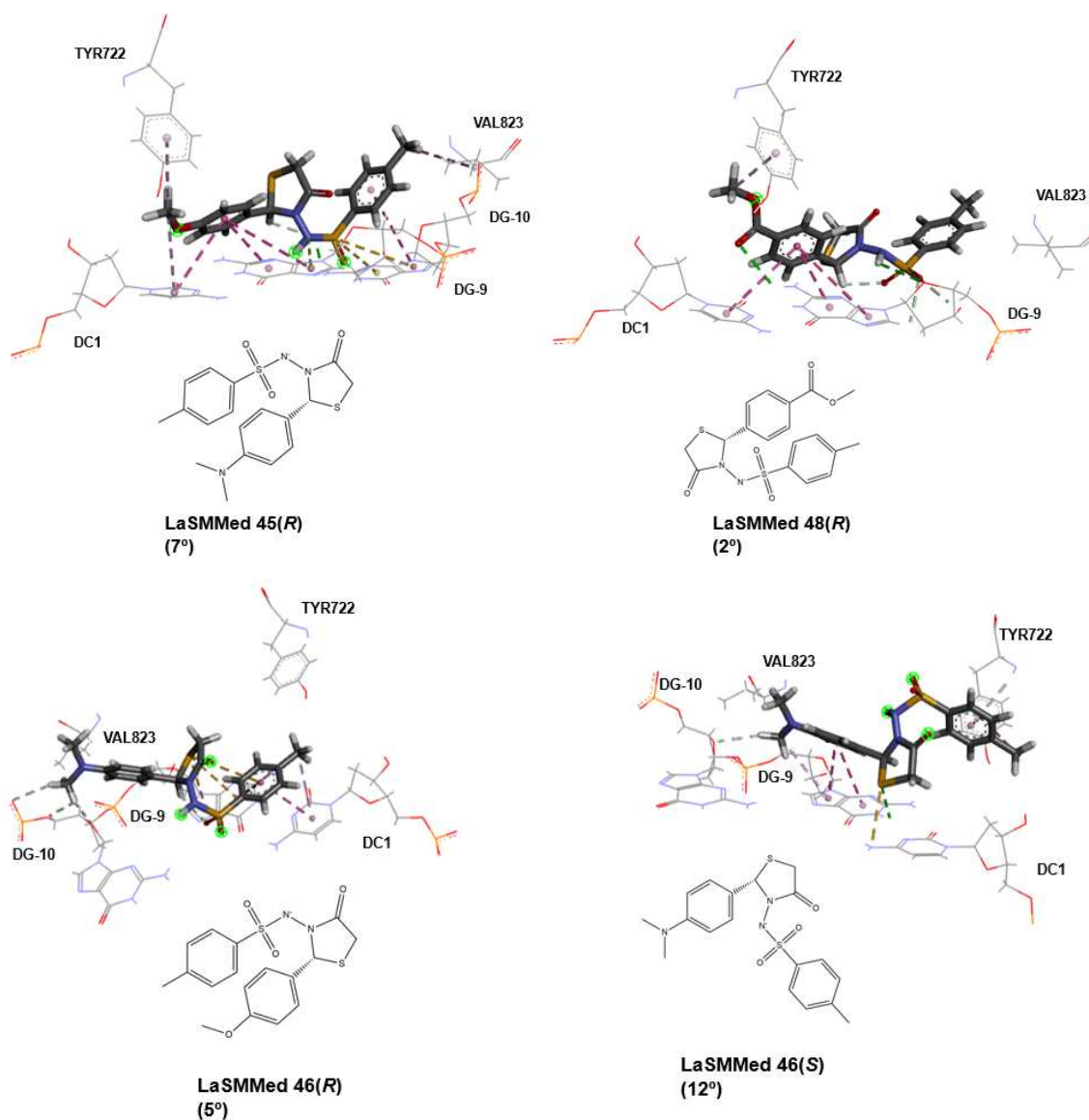
Tipo das interações:		Ligação de hidrogênio		Empilhamento Pi-Pi
		Ligação de hidrogênio não-convencional		Alquila/Pi-Alquila
		Van der Waals		Pi-Sigma
		Interação de halogênio		

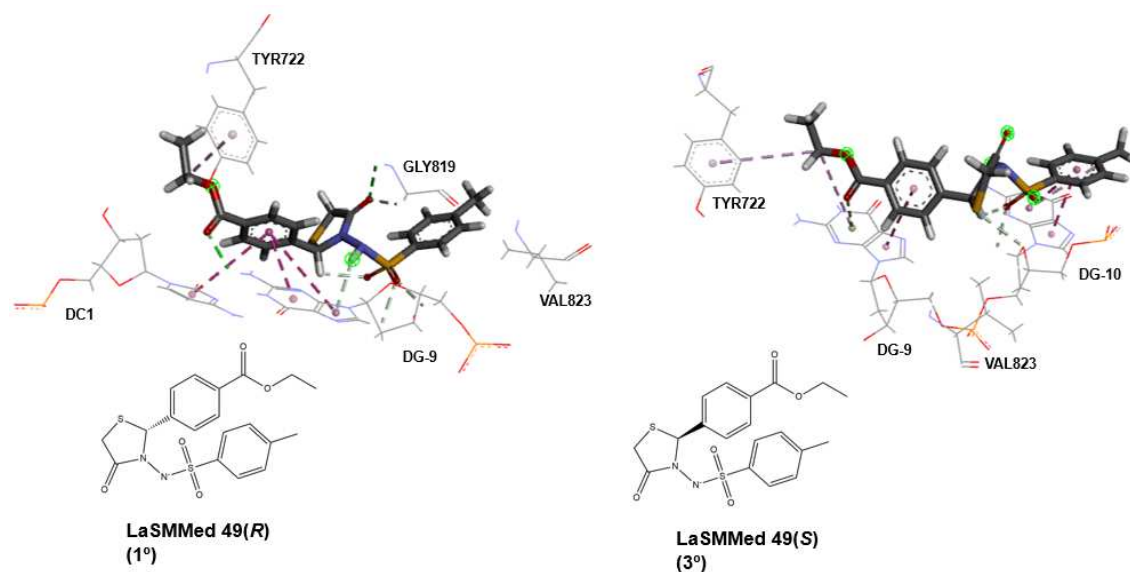
No apêndice E estão dispostos os valores de *FS* da melhor pose obtida dentre as 10 corridas executadas para cada composto. Em comparação com o valor de *FS* obtido para o ligante original (85,15), nenhum composto da quimioteca do LaSMMed apresentou valor igual ou superior a ele. Assim, foram selecionados os 12 compostos com maiores valores de *FS* (71,12 a 64,03) para a análise das interações. Pode-se perceber que os compostos que tiveram melhor desempenho pertencem à classe das tiazolidinonas, com seis representantes [LaSMMed 49(R), 49(S), 48(R), 46(R), 45(R) e 46(S)], seguido de 3 representantes das cumarilamidas (LaSMMed 17, 21 e 23), duas cromonas (LaSMMed 54 e 71) e um análogo α,β -insaturado de apocinina (LaSMMed 69). Além disso, nota-se que os compostos que tiveram pior desempenho, em geral, pertencem à classe das oxazolidinonas (LaSMMed 38-42 e 55-60), que com exceção de LaSMMed 41 e 43, todas as demais apresentaram um *FS* igual ou abaixo de 53,59.

Assim sendo, os 12 compostos selecionados para a avaliação das interações com a enzima, destacando-se aquelas com resíduos importantes para o processo catalítico e ligações de hidrogênio (Figuras 17-19), enquanto as

demais interações estão listadas no Apêndice D. A começar pela classe das tiazolidinonas, que conta com seis compostos, dentre os quais quatro apresentam configuração *R* e duas com configuração *S* (Figura 18).

Figura 18- Representação das interações das tiazolidinonas **LaSMMed 49(R)**, **49(S)**, **48(R)**, **46(R)**, **45(R)** e **46(S)** com os resíduos de aminoácidos importantes do sítio catalítico da DNA polimerase.





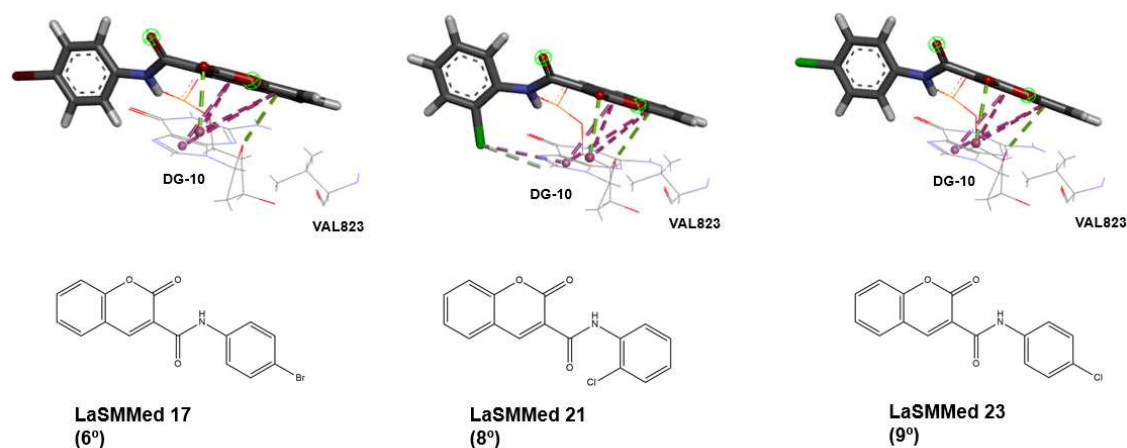
Fonte: A autora (2023). Legenda: O composto é representado em bastões na cor dos elementos, os resíduos de aminoácidos em linha na cor dos elementos. As linhas tracejadas as interações dos resíduos com a DNA polimerase. Estrutura em 2D do composto e classificação por FS.

Tipo das interações:	 Ligação de hidrogênio	 Desfavorável
	 Ligação de hidrogênio não-convencional	 Alquila/Pi-Alquila
	 Van der Waals	 Pi-Sigma
	 Interação Pi-hidrogênio	 Pi-enxofre/ enxofre X
	 Empilhamento Pi-Pi / em T	 Pi-Lone Pair

Pela Figura 18, pode-se observar que todos os compostos apresentaram interação com a Val823, este resíduo é considerado importante pois atua como um determinante da seletividade do ligante. Todas essas tiazolidinonas também apresentaram interação com a Tyr722, esta interação é importante pois ajuda a bloquear a associação do dNTP à polimerase. Todos os compostos também apresentaram interações de empilhamento com o resíduo do DNA DG-9, para o composto **LaSMMed 46(S)** foi a única interação. Entretanto, os demais (**LaSMMed 45(R)**, **46(R)**, **48(R)**, **49(R)** e **49(S)**) interagiram com outros resíduos (DC1, DG-10 ou ambos). Além disso, o ligante **LaSMMed 49(S)** apresentou uma interação desfavorável com o DG-10 e **LaSMMed 49(R)** uma ligação de hidrogênio com Gly819. As interações com as fitas de DNA são importantes para ocupar a fenda do sítio ativo, impedindo o pareamento das bases durante o processo de síntese do DNA.

Com relação aos representantes das cumarilamidas (**LaSMMed 17**, **21** e **23**), pode-se observar que essas seguem um mesmo padrão de interações, com interações com o resíduo de DNA DG-10 e com a Val823 (Figura 19).

Figura 19- Representação das interações das cumarilamidas (**LaSMMed 17**, **21** e **23**) com os resíduos importantes do sítio catalítico da DNA polimerase.

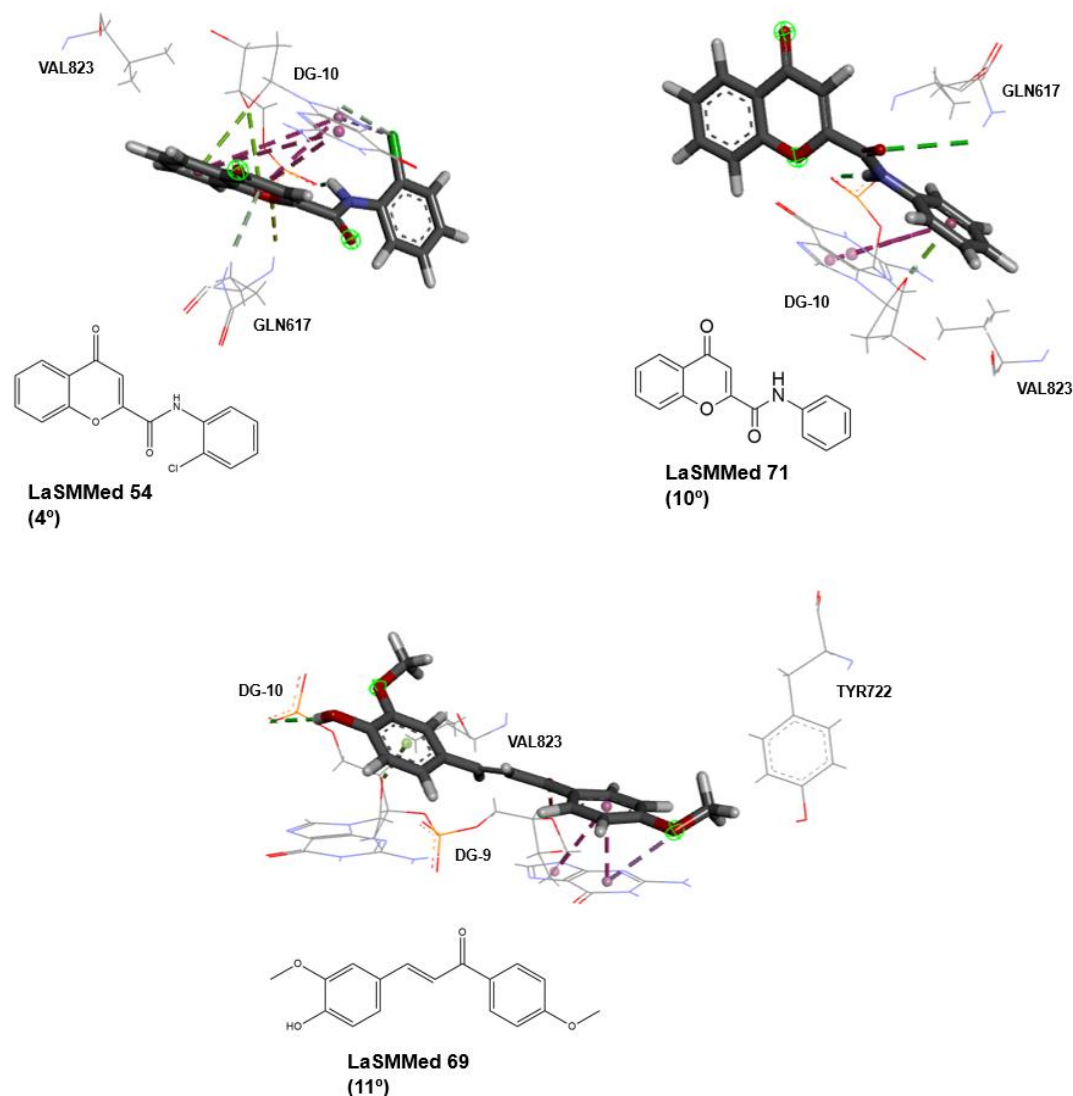


Fonte: A autora (2023). **Legenda:** O composto é representado em bastões na cor dos elementos, os resíduos de aminoácidos em linha na cor dos elementos. As linhas tracejadas as interações dos resíduos com a DNA polimerase. Estrutura em 2D do composto e classificação por FS.







Tipo das interações:	 Ligação de hidrogênio	 Empilhamento Pi-Pi
	 Ligação de hidrogênio não-convencional	 Alquila/Pi-Alquila
	 Pi-Lone Pair	

Por fim, analisou-se as interações das cromonas (**LaSMMed 54** e **71**) e do análogo α,β -insaturado de apocinina (**LaSMMed 69**), conforme ilustrado na Figura 20. Assim, observa-se que as interações de **LaSMMed 54** e **71** são com o DG-10, interação de Van der Waals com a Val823, e ligação de hidrogênio com a Gln617. Já o **LaSMMed 69** apresentou interações com DG-10 e DG-9, mas com este também apresentou uma interação desfavorável, e interação de Van der Waals com Tyr722 e Val823. Comparando as duas classes, o composto de tamanho maior, **LaSMMed 69**, conseguiu interagir com duas bases do DNA.

Figura 20- Representação das interações das cromonas (**LaSMMed 54** e **71**) e do análogo α,β -insaturado de apocinina (**LaSMMed 69**) com os resíduos importantes do sítio catalítico da DNA polimerase.



Fonte: A autora (2023). Legenda: O composto é representado em bastões na cor dos elementos, os resíduos de aminoácidos em linha na cor dos elementos. As linhas tracejadas as interações dos resíduos com a DNA polimerase. Estrutura em 2D do composto e classificação por FS.

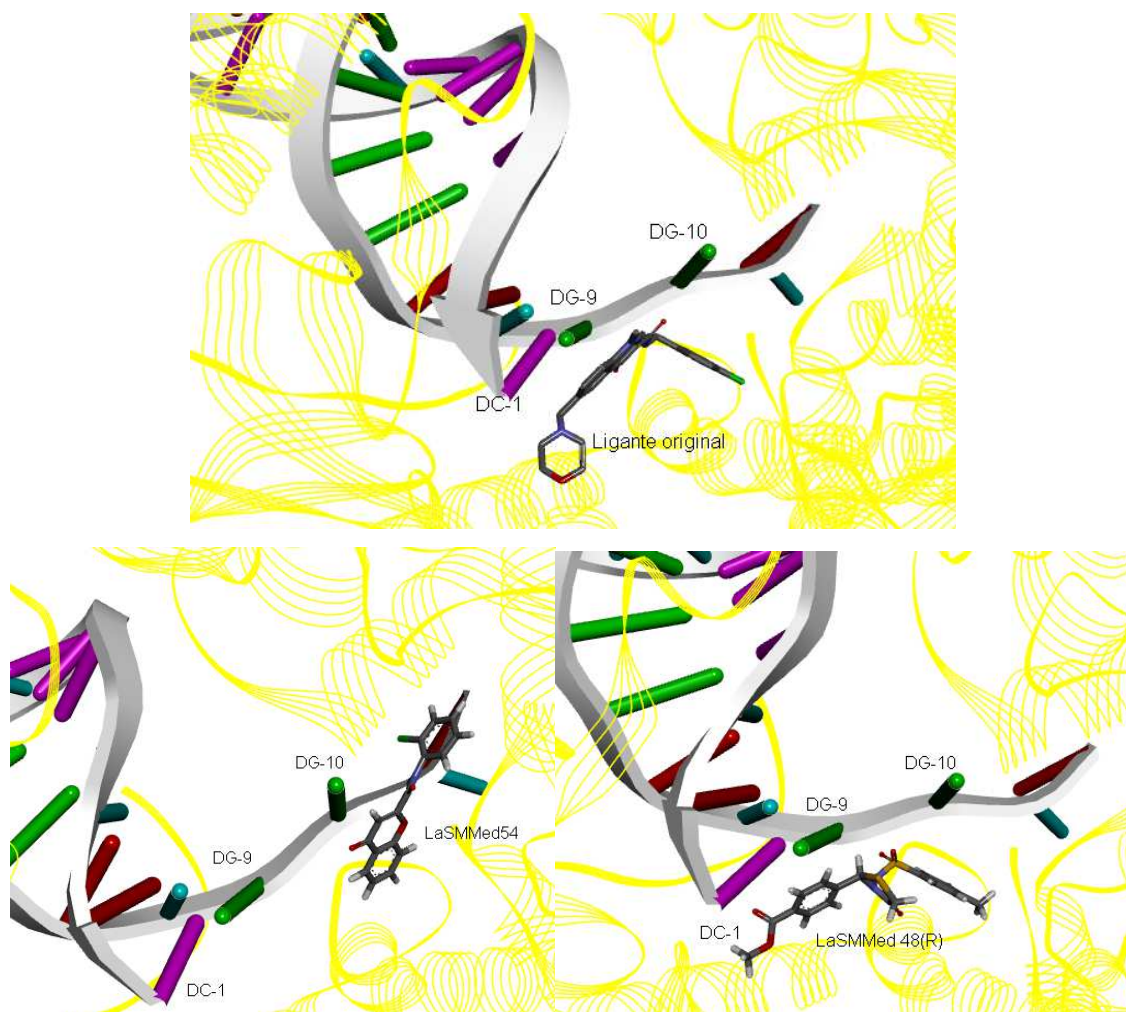
Tipo das interações:		Ligação de hidrogênio		Desfavorável
		Ligação de hidrogênio não-convencional		Empilhamento Pi-Pi
		Pi-Lone Pair		Alquila/Pi-Alquila

De um modo geral, um ponto positivo é que todos os compostos apresentaram interações, na sua grande maioria do tipo van der Waals, com frações hidrofóbicas dos resíduos Gln617, Gln618, Gly819, Phe820 e Val823.

Isto é vantajoso, visto que estes fazem parte de um bolso hidrofóbico que o alvo apresenta (HAYES et al., 2021).

Com base em todas as poses analisadas para os doze compostos selecionados, observou-se uma diferença nas interações com as bases de DNA. A título de exemplo para ilustrar tal comportamento, a Figura 21 mostra o sítio de interação do ligante original, o qual interage com três bases de DNA (DC-1, DG-9 e DG-10). Mas alguns compostos não apresentaram este padrão de interação, são eles **LaSMMed 17, 21, 23, 54, e 71**, os quais só interagiram com uma base de DNA (DG-10). A Figura 21 traz um destes compostos, **LaSMMed 54**, para mostrar a disposição deste no sítio. Os compostos **LaSMMed 46(R), 46(S) e 48(R)** interagiram com as três bases, um destes exemplos mostrados na Figura 21. Os demais compostos interagiram com pelo menos duas bases, **LaSMMed 45(R) e 49(R)** interagiram com DC-1 e DG-9, e **LaSMMed 49(S) e 69** interagiram com DG-9 e DG-10.

Figura 21- Sítio ativo da enzima com o ligante original, **LaSMMed 54** e **LaSMMed 48(R)**.



Fonte: A autora (2023). **Legenda:** Representação 3D do ligante original, LaSMMed 54 e LaSMMed 48(R), representação em fita da enzima na cor amarela com o composto no centro na forma de bastão na cor dos elementos.

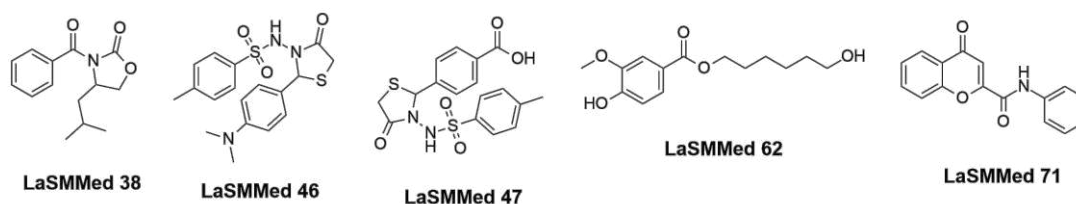
Pode-se observar que alguns dos compostos (**LaSMMed 46(R)**, **46(S)** e **48(R)**) interagiram no mesmo sítio de interação que o inibidor original, assim estes teriam uma maior chance de atuar como inibidores da enzima. Entretanto, outros compostos interagem bem com a enzima, mas se ligam em uma porção diferente da dupla fita de DNA em construção, o que pode não acarretar na inibição enzimática. Ainda assim, como estes apresentaram um *FS* elevado, seguiram para a próxima etapa. Portanto, todos os compostos foram selecionados para a próxima etapa, que consiste na avaliação *in vitro* da atividade antiviral e citotoxicidade.

3.2 CITOTOXICIDADE

Cabe recordar que todos os compostos triados *in vitro* foram previamente selecionados pela triagem virtual. Destes, oriundos da etapa de triagem *in silico* da TK são **LaSMMed 38, 39, 44, 47, 62 e 63**, enquanto que para a DNA Polimerase são os compostos **LaSMMed 17, 21, 23, 45, 46, 48, 49, 54, 69 e 71**. Como nosso grupo de pesquisa não dispõe de enantiômeros puros, as tiazolidinonas (**LaSMMed 44, 45, 46, 47, 48 e 49**) foram enviadas para análise na forma de uma mistura racêmica. Já as oxazolidinonas (**LaSMMed 38 e 39**) foram enviadas na configuração S.

Todos os compostos foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade, entretanto os compostos **LaSMMed 17, 21, 23, 39, 44, 45, 48, 49, 54, 63 e 69** apresentaram-se insolúveis no teste. Assim, as porcentagens de viabilidade celular dos cinco compostos solúveis (**LaSMMed 38, 46, 47, 62, 71**) são demonstradas na Tabela 7, nas respectivas concentrações analisadas. A partir destas porcentagens, utilizando regressão linear pela equação da reta, encontrou-se a concentração citotóxica 50% (CC₅₀).

Tabela 7- Viabilidade celular (%) de células VERO (ATCC, CCL-81) com os cinco compostos nas concentrações de 300 a 18 µg/mL, e a concentração citotóxica a 50% (CC₅₀ em µg/mL).



Viabilidade celular (%)					
Compostos	38	46	47	62	71
Concentrações					
300 µg/mL	71,1	30,1	100	34,4	100
150 µg/mL	63,6	59,0	100	60,7	100
75 µg/mL	84,8	59,4	100	62,6	100
37 µg/mL	87,7	53,5	100	80,6	100
18 µg/mL	77,1	74,5	100	90,4	100
CC ₅₀ (µg/mL)	>300	152,3	>300	177,0	>300

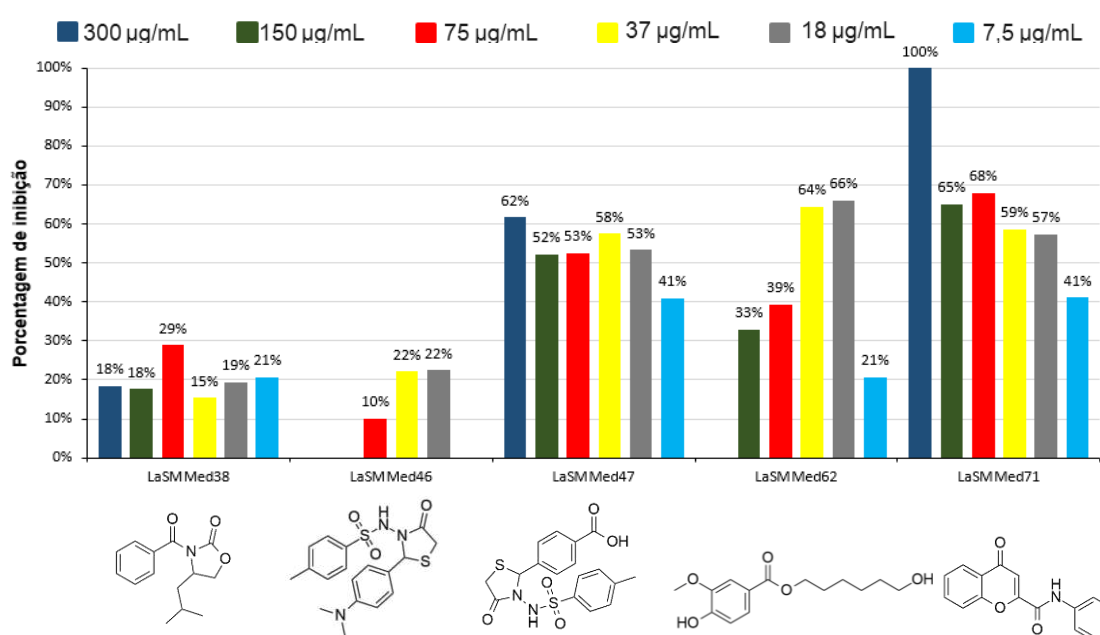
Fonte: A autora (2023). Legenda: Estruturas química dos cinco compostos.

Os compostos **LaSMMed 46** e **62** apresentaram toxicidade acima de 50% apenas para a maior concentração testada (300 µg/mL), obtendo-se os valores de CC₅₀ de 152,3 µg/mL e 177,0 µg/mL, respectivamente (Tabela 7). Os compostos **LaSMMed 38**, **47** e **71** não apresentaram citotoxicidade relevante em células Vero até a maior concentração analisada (300 µg/mL), sendo considerado CC₅₀ >300 µg/mL. Segundo Indrayanto et al., (2021) os valores de CC₅₀ para **LaSMMed 46** e **62** entre 100-500 µg/mL os classificam com uma citotoxicidade moderada.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO*

Considerando as concentrações citotóxicas, a triagem anti-herpética com o vírus HSV-1, cepa KOS (sensível ao aciclovir), foi realizada nas concentrações de 300 a 7,5 µg/mL para os compostos **LaSMMed 38**, **47** e **71**; e a partir de 150 µg/mL para os compostos **LaSMMed 46** e **62**. Com base nos dados do apêndice F, as porcentagens de inibição viral são demonstradas no Gráfico 1.

Gráfico 1- Porcentagens de inibição dos compostos (**LaSMMed 38**, **46**, **47**, **62** e **71**, nas concentrações de 300 a 7,5 µg/mL) testados durante a infecção por HSV-1 (cepa KOS) em células VERO.



Fonte: A autora (2023).

O composto que apresentou melhor efeito inibitório foi o **LaSMMed 71**, com inibição de 100% na maior concentração testada (300 µg/mL). Este composto também apresentou inibição dose-dependente com pequena variação entre 150 e 75 µg/mL. O composto **LaSMMed 47** apresentou efeito inibitório, porém foi mais discretamente dependente de concentração, demonstrando em torno de 50% de inibição entre as concentrações de 150 a 18 µg/mL. A maior concentração avaliada (300 µg/mL) não inibiu 100% da infecção, porém exerceu sua maior inibição (61,6%). Nos testes de citotoxicidade, o composto **LaSMMed 62** apresentou menor toxicidade abaixo da concentração de 75 µg/mL. Isso pode explicar a maior porcentagem de inibição viral nas menores concentrações, com cerca de 60% para 37 e 18 µg/mL. Por outro lado, os compostos **LaSMMed 38** e **46** não exerceram atividade anti-herpética com inibição acima de 50%.

Com as porcentagens de viabilidade celular (Tabela 7) e as porcentagens de inibição (Gráfico 1), encontraram-se as concentrações citotóxicas a 50% (CC₅₀) e as concentrações inibitórias a 50% (IC₅₀), respectivamente, pela equação da reta. Estes dados foram utilizados para o cálculo do índice de seletividade (IS), mostrados na Tabela 8. O IS é calculado com o intuito de saber o quanto um composto inibe o vírus, mas sem causar danos a viabilidade celular. Este valor é utilizado para estipular a segurança de fármacos, uma previsão de sua margem terapêutica. Quanto maior o valor de IS (>1), maior é a diferença entre a dose de antiviral que reduz em 50% a replicação viral (IC₅₀) e a dose citotóxica (CC₅₀), portanto, maior segurança apresenta o composto testado.

Tabela 8- Concentrações citotóxicas (CC₅₀) e inibitórias (IC₅₀) de 50% (µg/mL) após tratamento com os compostos listados, na infecção por HSV-1 (cepa KOS) em células Vero.

Substâncias	38	46	47	62	71
CC₅₀	>300	152,3	>300	177	>300
IC₅₀	>300	>152,3	17,9	17,5	15,2
IS	-	<1	>16,7	10,1	>19,1

Fonte: A autora (2023).

Para os três compostos que demonstraram porcentagens de inibição acima de 50% foi possível determinar a IC₅₀ e conseqüentemente o IS. Os

valores de IC₅₀ e IS foram respectivamente de 17,9 µg/mL e >16,7 para o composto **LaSMMed 47**; 17,5 µg/mL e 10,1 para o composto **LaSMMed 62** e 15,2 µg/mL e >19,1 para o composto **LaSMMed 71** (Tabela 8). Quanto menor for o valor de IC₅₀, mais eficiente é o inibidor e quanto maior o valor de IS maior sua segurança. Logo, os três compostos apresentaram valores de IC₅₀ entre 10-50 µg/mL, considerado uma atividade inibitória moderada (INDRAYANTO et al., 2021). E também apresentaram IS ≥10; o que pode ser considerado bom, visto que geralmente a eficácia biológica não se deve à citotoxicidade quando IS ≥10 (VONTHRON-SÉNÉCHEAU et al., 2003; CAAMAL-FUENTES et al., 2011; AWOUAFACK et al., 2013; INDRAYANTO et al., 2021).

Dessa forma, sugere-se que dentre os compostos testados, o **LaSMMed 71** é o mais promissor na obtenção da atividade anti-herpética, seguida pelo **LaSMMed 47**, e por terceiro o **LaSMMed 62**, visto que este apresentou citotoxicidade relevante, oscilações nas porcentagens de inibição e um valor de IS menor que **LaSMMed 47**.

Com base nos resultados, foram selecionadas para a etapa de desenho de novos análogos os compostos **LaSMMed 71**, oriundo da etapa de triagem *in silico* da DNA polimerase, e **LaSMMed 47**, triado para a TK, sendo assim, temos um potencial inibidor de cada proteína.

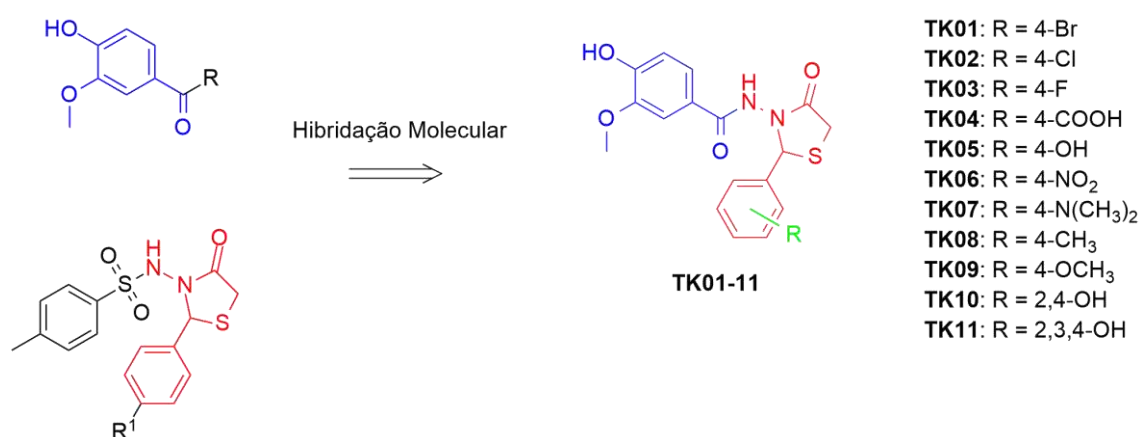
3.4 PROPOSTAS DE COMPOSTOS ANÁLOGOS

3.4.1 Potenciais inibidores da Timidina Quinase (TK)

Os compostos análogos foram propostos com base nos dados dos ensaios biológicos e na análise computacional, com o objetivo de melhorar as porcentagens de inibição. Dentre os compostos testados para a TK, a tiazolidinona **LaSMMed 47** apresentou o melhor desempenho nas análises *in vitro*, seguida do éster do ácido vanílico **LaSMMed 62**. Assim, as classes tiazolidinonas e ésteres do ácido vanílico foram hibridizadas para o desenho de novos compostos (Figura 22). Pode-se perceber a troca da porção toluenossulfonila pelo anel do ácido vanílico, que se espera gerar mais interações com o alvo. Os compostos propostos foram planejados com intuito de se avaliar a influência das características estereo-eletrônicas dos substituintes

no padrão de interação com o alvo molecular e, conseqüentemente, em suas atividades biológicas. A Figura 22 exibe os 11 compostos propostos (**TK01** a **TK11**). Ademais, tem-se disponibilidade imediata de todos os reagentes para uma futura síntese. Como os compostos apresentam um centro quiral, foram analisados os dois enantiômeros, *R* e *S*, assim resultando em um total de 22 novos compostos.

Figura 22- Planejamento estrutural a partir da hibridação molecular da tiazolidinona e éster do ácido vanílico.



Fonte: A autora (2023). Legenda: Em azul a estrutura do éster do ácido vanílico, em vermelho a estrutura base da tiazolidinona e em verde os substituintes.

Seguindo a metodologia descrita na seção 4.1 para os ensaios de triagem *in silico* da TK, foram preparados a proteína e os 22 compostos. Na Tabela 9 estão dispostos os valores de *FS* da melhor pose obtida dentre as 10 corridas executadas para cada composto.

Tabela 9- Resultados da triagem virtual, da melhor pose para cada composto.

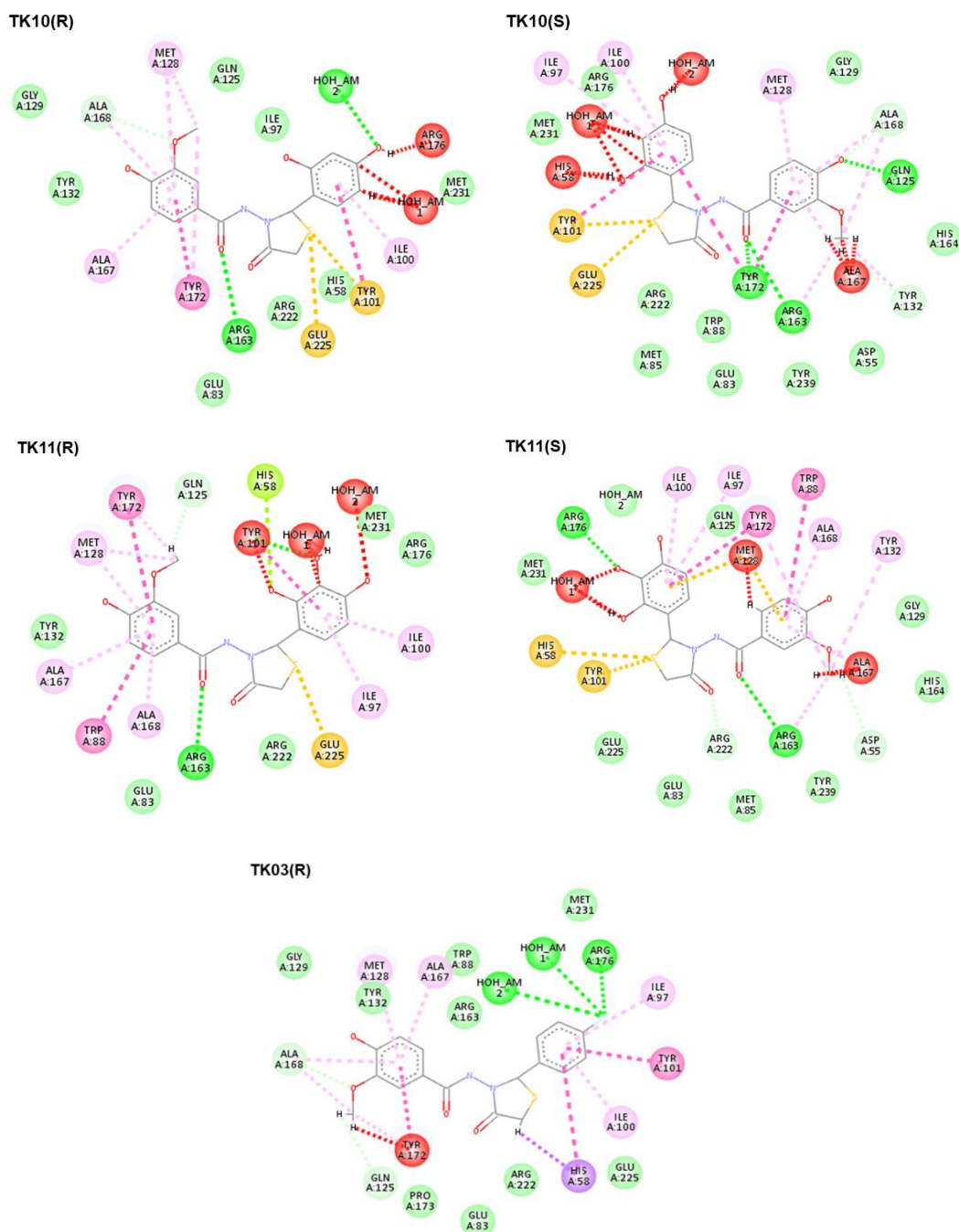
Ligantes	FS	Ligantes	FS
TK10 (R)	38,42	TK01 (R)	29,84
TK11 (R)	38,05	TK01 (S)	29,34
TK11 (S)	37,43	TK09 (S)	29,28
TK03 (R)	36,08	TK02 (S)	28,97
TK10 (S)	35,76	TK08 (S)	28,49
TK05 (R)	35,13	TK04 (S)	28,40
TK03 (S)	34,96	TK07 (R)	24,72
TK09 (R)	31,77	TK06 (S)	21,74
TK05 (S)	31,41	TK07 (S)	20,82
TK02 (R)	31,19	TK04 (R)	17,13
TK08 (R)	29,88	TK06 (R)	4,66

Fonte: A autora (2023).

O valor de *FS* utilizado como critério para a seleção dos melhores compostos na docagem molecular da quimioteca do LaSMMed foi o valor 40,20, que é o valor do ligante original 6-(dihidroxi-isobutil)-timina. Assim, os compostos selecionados no início deste trabalho mostraram um *FS* acima deste, que variaram de 45,27 a 40,24 (Apêndice C). Contudo, pode-se observar na Tabela 9 que o composto **TK10 (R)** apresentou o maior valor de *FS* (38,42), este não sendo um resultado satisfatório, visto que não conseguiu ultrapassar o *FS* do ligante original e demonstrou valores menores que o próprio composto de referência **LaSMMed 47(R)**, que foi de 41,25.

Para entender os valores de *FS* dos compostos propostos, a Figura 23 mostra as representações bidimensionais dos cinco compostos com os maiores valores de *FS* com todas as suas interações no sítio catalítico da enzima.

Figura 23- Representação bidimensional das interações dos cinco melhores compostos [TK10(R), TK10(S), TK11(R), TK11(S) e TK03(R)] com os aminoácidos do sítio catalítico da enzima TK.



Fonte: A autora (2023).

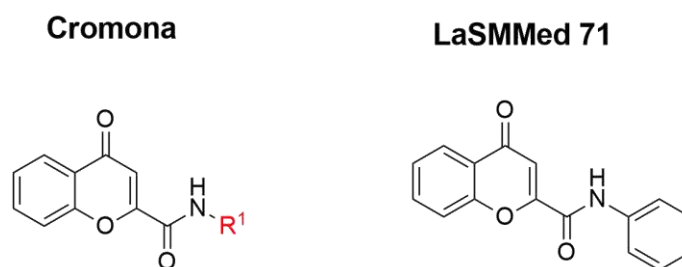
Tipo das interações:	 Ligação de hidrogênio	 Alquila/Pi-Alquila
	 Ligação de hidrogênio não-convencional	 Pi-Sigma
	 Van der Waals	 Pi-enxofre/ enxofre X
	 Desfavorável	 Pi-Lone Pair
	 Empilhamento Pi-Pi/ em T	

Observando as imagens 2D com as interações dos compostos, destaca-se o número de interações desfavoráveis que os compostos propostos realizaram, este sendo o provável motivo dos baixos valores de *FS*. Pode-se perceber que a troca da porção toluenossulfonila pela porção do ácido vanílico foi o motivo para esta piora nos valores de *FS*. Os compostos **TK10(S)**, **TK11(S)** e **TK03(R)** têm a porção do ácido vanílico realizando interações desfavoráveis. Além disso, para os outros compostos **TK10(R)**, **TK11(R)** a necessidade de acomodar a porção do ácido vanílico forçou o outro lado do composto a realizar interações desfavoráveis. Logo, estes compostos não foram selecionados para a próxima etapa, a etapa de síntese, neste primeiro momento.

3.4.2 Potenciais inibidores da DNA Polimerase

Os compostos análogos foram propostos com base nos dados dos ensaios biológicos, e na triagem virtual, nos quais o **LaSMMed 71** foi o melhor composto testado. Assim, o composto **LaSMMed 71**, uma cromona com o substituinte fenila na posição R¹, foi selecionado como referência para o desenho de novos compostos. A Figura 24 mostra as estruturas químicas da classe das amidas com núcleo cromona e da substância **LaSMMed 71**.

Figura 24- Estrutura química da classe das amidas com núcleo cromona e do composto **LaSMMed 71**.



Fonte: A autora (2023).

Os compostos propostos foram planejados com intuito de se avaliar a influência das características stereo-eletrônicas dos substituintes no padrão de interação com o alvo molecular e, conseqüentemente, em suas atividades biológicas. Portanto, foram propostas três séries de análogos que apresentam: substituição com grupos doadores ou retiradores de elétrons no anel benzênico

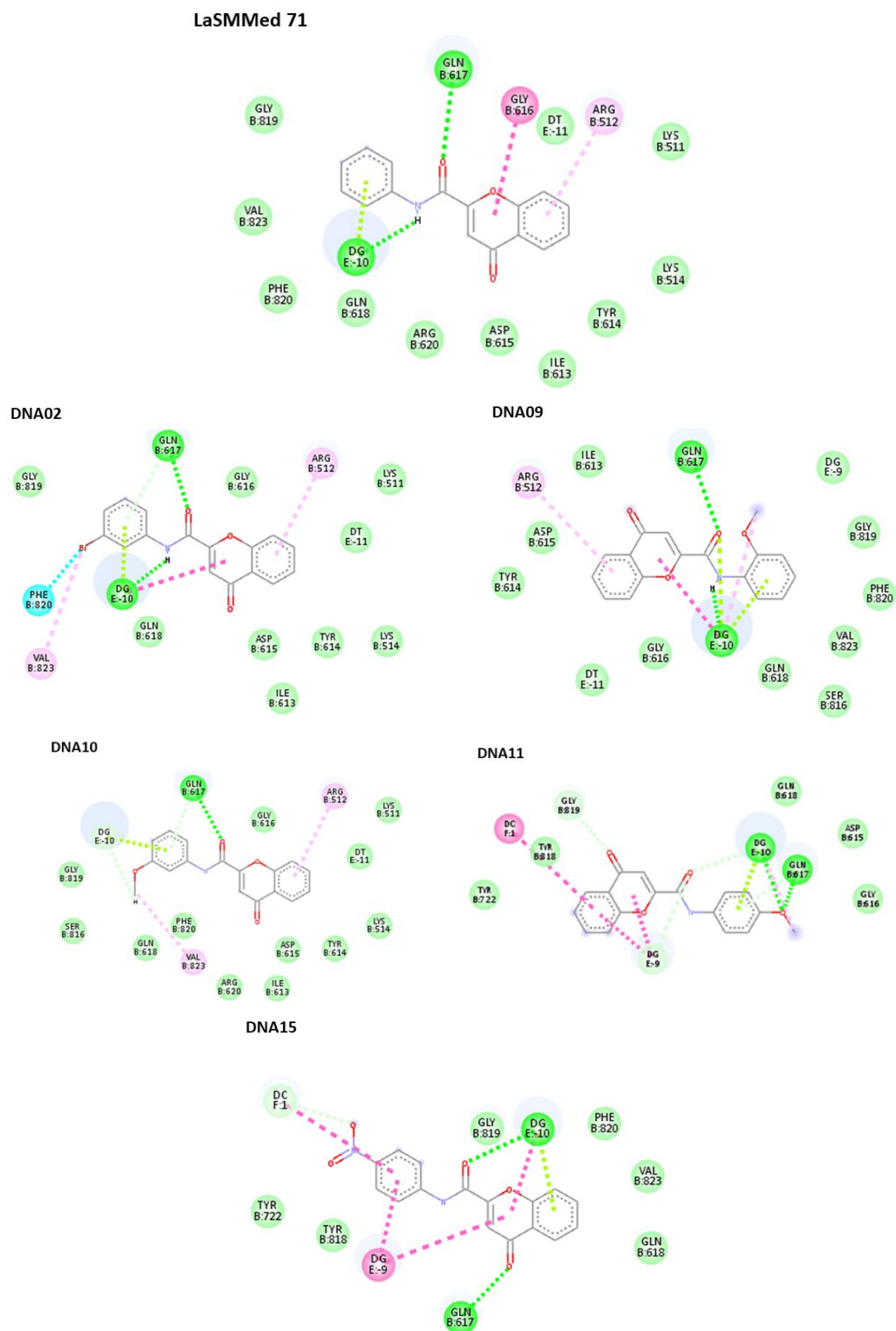
	64,03	DNA12	58,18
DNA10	63,94	DNA05	57,92
DNA11	63,93	DNA03	57,82
DNA02	63,79	DNA13	57,29
DNA23	63,03	DNA26	53,32
DNA06	61,94	DNA22	51,38
DNA28	61,78	DNA17	51,34
DNA21	61,15	DNA25	49,41
DNA08	61,03	DNA24	49,40
DNA19	60,36	DNA16	48,92
DNA09	60,16	DNA27	47,25
DNA15	60,02		

Fonte: A autora (2023).










Os valores de *FS* utilizados como critério para a seleção inicial dos melhores compostos na docagem molecular da quimioteca do LaSMMed, previamente descrita, foram dos 12 compostos que apresentaram os maiores valores de *FS* (71,12 – 64,03). Logo, pode-se observar na Tabela 10 que apenas os primeiros 3 compostos superaram o valor de corte utilizado (64,03). Mas pode-se verificar pela tabela que as modificações do tipo I (**DNA01** a **DNA15**) apresentaram na sua maioria os melhores valores de *FS*, assim todos os 15 compostos análogos oriundos desta estratégia foram selecionados para a análise das interações com a proteína.

Como as propostas de análogos foram realizadas a fim de melhorar as interações do **LaSMMed 71**, este foi utilizado como base para escolher os melhores compostos dentre os 15. Os 5 compostos que apresentaram a mesma base de interações que o composto **LaSMMed 71**, e que a adição do grupo ou átomo proposto fez com que estes apresentassem novas interações com a proteína, estão representados na Figura 26. Os demais compostos não são mostrados, devido à adição do grupo ou átomo forçar um posicionamento distinto no sítio de ligação e não manter o padrão de interações que o **LaSMMed 71** apresentou.

Figura 26- Representação bidimensional das interações realizadas pelos compostos **LaSMMed 71**, **DNA02**, **DNA09**, **DNA10**, **DNA11** e **DNA15** com o sítio catalítico da enzima DNA polimerase.



Fonte: A autora (2023).

Tipo das interações:		Ligação de hidrogênio		Alquil/Pi-Alquil
		Ligação de hidrogênio não-convencional		Empilhamento Pi-Pi e Pi-amida
		Interação Pi-hidrogênio		Interação de halogênio
		Van der Waals		Pi-Lone Pair
		Desfavorável		

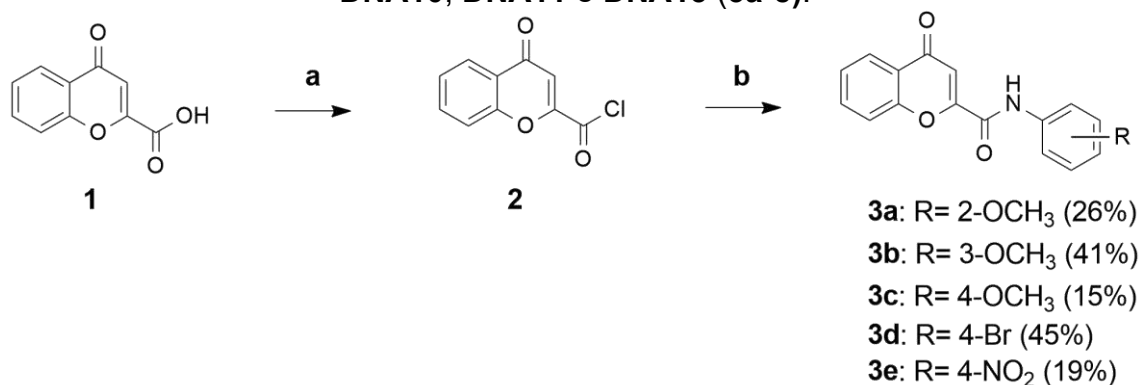
Dentre estes compostos, o grupo fenila está substituído com o grupo metoxila (OCH₃) nas posições *orto*, *meta* e *para*, ou com o grupo nitro (NO₂) na posição *para* e o átomo de bromo (Br) na posição *meta*. Observa-se que os compostos **DNA 02**, **DNA 09** e **DNA 10** conseguiram manter as interações que o **LaSMMed 71** apresentou, como por exemplo, o anel cromona com a Arg512, o grupo carbonila da amida com a Gln617, os anéis da cromona com a Gly616 (Van der Waals ou empilhamento Pi-Amida) e interações com os resíduos do DNA. Entretanto, os compostos **DNA 11** e **DNA 15** não mantiveram este padrão de interações, mas não foram descartados devido a apresentarem interações fortes com a enzima, como ligações de hidrogênio e interações com resíduos de DNA, sem uma distorção muito pronunciada. Deste modo, estes cinco compostos foram selecionados para a próxima etapa, a etapa de síntese.

3.5 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PROPOSTOS

A síntese foi realizada para os compostos **DNA 02**, **DNA 09**, **DNA 10**, **DNA 11** e **DNA 15**. As estratégias sintéticas comumente adotadas para a síntese desses tipos de amida geralmente envolvem a preparação do cloreto de acila, preparado através da reação de um ácido carboxílico com cloreto de tionila, seguido da reação com um agente nucleofílico, nesse caso anilinas, que produz as amidas correspondentes.

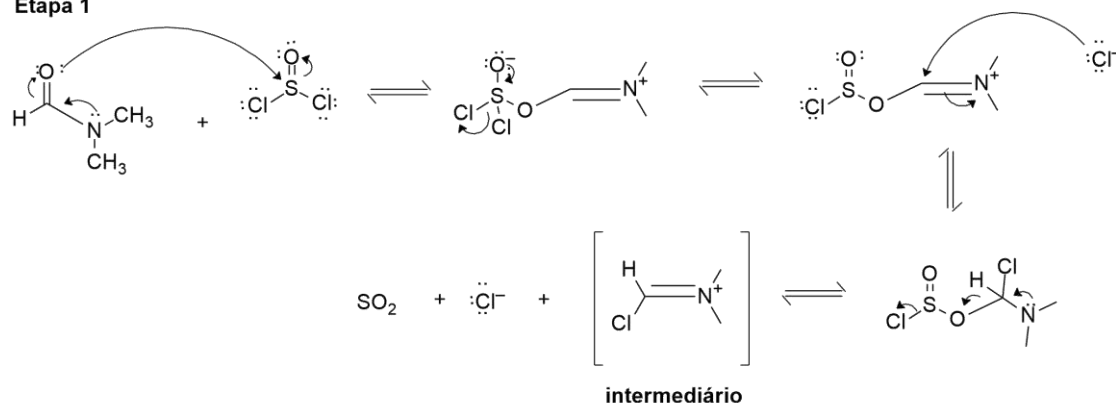
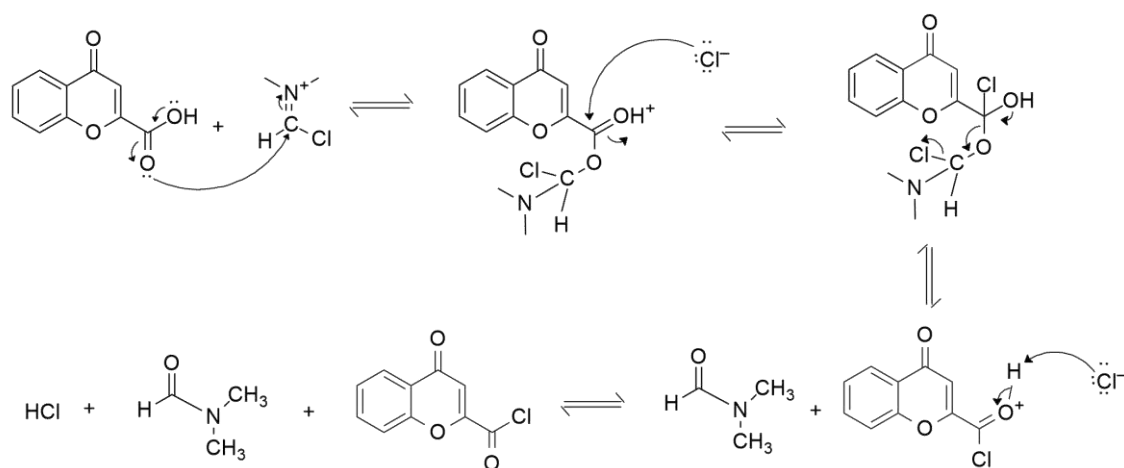
A síntese foi iniciada com a reação do ácido 4-oxocromeno-2-carboxílico (**1**) com excesso de cloreto de tionila (SOCl₂), onde utilizou-se diclorometano como solvente e N,N-dimetilformamida (DMF) como catalisador para formação do cloreto do ácido (**2**). Sequencialmente, as respectivas anilinas foram adicionadas ao **2**, utilizando-se acetona como solvente, para gerar os cinco compostos (cromonas) **DNA09 (3a)**, **DNA10 (3b)**, **DNA11 (3c)**, **DNA02 (3d)**, **DNA15 (3e)**, conforme a Figura 27.

Figura 27- Rota sintética para a obtenção dos compostos **DNA02**, **DNA09**, **DNA10**, **DNA11** e **DNA15 (3a-e)**.

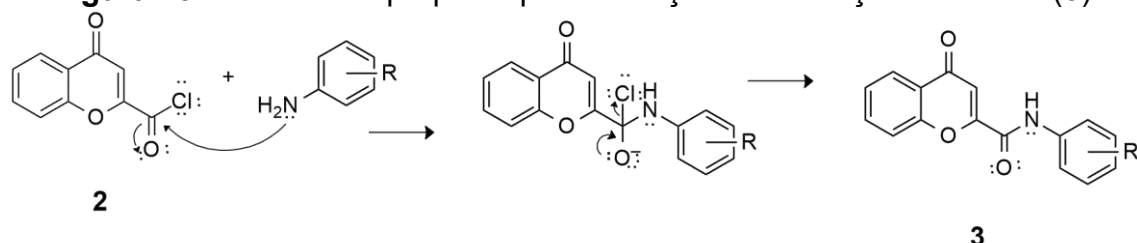


Reagentes e condições: a) SOCl₂, CH₂Cl₂, DMF, t.a. 24h. b) Anilina correspondente, acetona e refluxo, 2h, 15-45% (em duas etapas).

Os cloretos de acila são muito reativos, por este fato o uso do reagente cloreto de tionila para prepará-los. A metodologia empregada para a obtenção do cloreto de acila utiliza DMF como catalisador, que por meio da reação com cloreto de tionila forma um intermediário, altamente reativo (Figura 28, etapa 1). Na sequência, acontece o ataque nucleofílico do ácido carboxílico ao átomo de carbono extremamente eletrofílico do intermediário previamente formado. Logo após, o íon cloreto volta ao centro reacional, formando um intermediário tetraédrico, que sofre um colapso com a volta do par de elétrons da hidroxila, regenerando assim o catalisador. Na sequência, o íon cloreto captura um próton, formando assim o cloreto de acila correspondente, juntamente com ácido clorídrico (Figura 28).

Figura 28- Mecanismo proposto para a reação de obtenção do cloreto de acila (**2**).**Etapa 1****Etapa 2**

Na reação do cloreto de acila com uma amina, esta se comporta como nucleófilo, o ataque à carbonila ocorre diretamente, seguida da saída do íon cloreto para formar uma amida (Figura 29).

Figura 29- Mecanismo proposto para a reação de obtenção da amida (**3**).

Os análogos preparados foram obtidos com rendimentos entre 15 e 45% (Figura 27) e as suas estruturas foram confirmadas por RMN de ¹H (Figuras 30-34). Os espectros de RMN de ¹H apresentaram sinais característicos da

formação das amidas desejadas, tais como simpletos com deslocamento químico entre 8,56 e 11,20 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio das amidas (NH), bem como um simpleto com deslocamento entre 7,29 e 6,99 ppm, relativo ao hidrogênio do anel cromona (H3). Devido às características eletrônicas dos substituintes do anel aromático das amidas e a sua posição, observou-se a presença de variados sinais na região entre 8,34 e 6,77 ppm.

Nos espectros de RMN de ^1H (Figuras 30-32), para os compostos **DNA09** (N-(2-metoxifenil)-2-cromona-carboxamida, **3a**), **DNA10** (N-(3-metoxifenil)-2-cromona-carboxamida, **3b**) e **DNA11** (N-(4-metoxifenil)-2-cromona-carboxamida, **3c**), identificou-se a soma total de 13H, distribuídos em 11 sinais para **DNA09**, 9 sinais para **DNA10** e 8 sinais para **DNA11**.

Figura 30- Espectro de RMN de ^1H do composto **DNA09**.

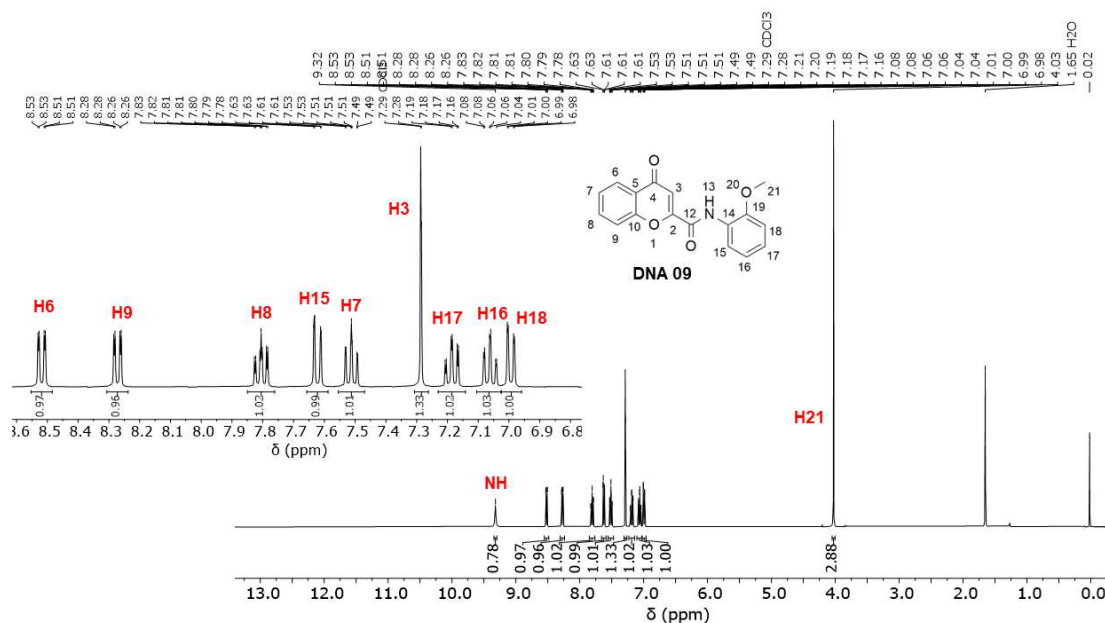


Figura 33- Espectro de RMN de ^1H do composto **DNA02**.

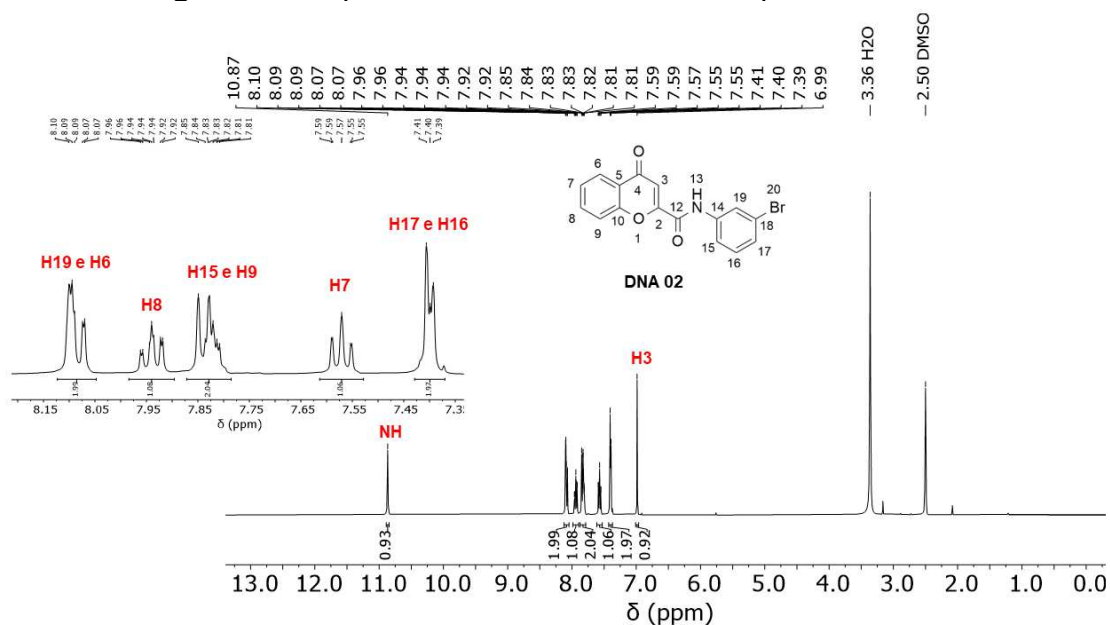
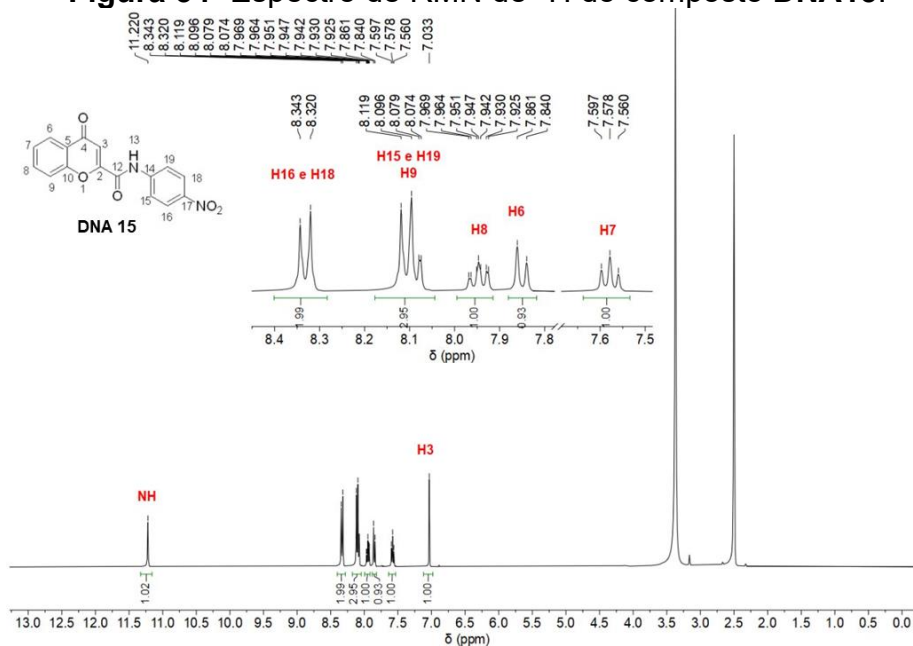


Figura 34- Espectro de RMN de ^1H do composto **DNA15**.



Gaspar e colaboradores realizaram a caracterização por RMN de ^1H do composto com o átomo de bromo (Br) na posição *meta*, este com os mesmos deslocamentos químicos encontrados nesse trabalho, para o composto **DNA 02** (GASPAR et al., 2011, 2013). Posteriormente, os cinco compostos foram enviados para os testes *in vitro*.

3.6 CITOTOXICIDADE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO*

Os cinco compostos sintetizados **DNA 02**, **DNA 09**, **DNA 10**, **DNA 11** e **DNA 15**, foram enviados para os testes *in vitro*, mas infelizmente na concentração testada de 300 µg/mL eles se mostraram insolúveis, assim impedindo que o teste fosse realizado.

No momento, estamos trabalhando para encontrar um meio de dissolver os compostos no meio de teste, com o objetivo de diminuir a concentração para que estes se mostrem solúveis, e assim, analisar a atividade anti-herpética dos compostos.

4. METODOLOGIA

4.1 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM DOCAGEM MOLECULAR

4.1.1 Obtenção e preparação das estruturas tridimensionais dos alvos moleculares

A estrutura cristalográfica da timidina quinase (TK) do Vírus Herpes Simples do tipo 1 (HSV-1) foi obtida no Banco de Dados de Proteínas (<http://www.rcsb.org>, PDB), disponibilizada pelo código 1E2P, escolheu-se a estrutura devido à ausência de mutações, seu valor de resolução (2,50 Å) e o organismo sem cepa. Então, a estrutura do alvo molecular foi preparada, utilizando-se apenas o monômero A e removendo-se todos os artefatos de cristalização e moléculas de água (HOH) do monômero em questão, com exceção das águas consideradas importantes para o reconhecimento molecular, conforme descrito por WURTH et al. (2001), pois são mediadoras de ligações de hidrogênio entre o ligante e a enzima. Estas moléculas de água (HOH2012 e HOH2052) foram encontradas por meio de inspeção visual e da realização de medidas das distâncias interatômicas realizadas no programa Discovery Studio Visualizer (v.21.1.0.20298).

Obteve-se a estrutura cristalográfica da DNA polimerase do Vírus Herpes Simples do tipo 1 (HSV-1) no Banco de Dados de Proteínas (<http://www.rcsb.org>, PDB), disponibilizada pelo código 7LUF (resolução de 3,50 Å), escolheu-se esta estrutura por ser a única disponível na forma de um complexo ternário. Assim, preparou-se a estrutura do alvo molecular, utilizando-se apenas o monômero B, removendo-se as moléculas de água e demais artefatos de cristalização, além das estruturas que fazem parte do monômero A.

4.1.2 Preparação dos ligantes

As estruturas das moléculas presentes na quimioteca do LaSMMed (Apêndice A) foram construídas bidimensionalmente (2D) no programa ChemDraw Pro 12.0. Em seguida, foi realizada uma busca por estereoisômeros, tautômeros e micro espécies em pH 8 para a TK e pH 7,4 para a DNA polimerase,

no programa MarvinSketch (v.21.15), mostradas no Apêndice A. Todas as estruturas dos isômeros, tautômeros e micro espécies presentes em maiores proporções (> 60 %) no pH em questão, foram salvas no formato .cdx. Logo após, cada uma das estruturas foi convertida tridimensionalmente (3D) pelo programa ChemBio3D Ultra (v.12.0.2) e salva no formato *.mol2. No programa Avogadro (v.1.1.1), otimizou-se a geometria de cada estrutura usando o campo de força *Merck Molecular Force Field 94* (MMFF94). Os arquivos das estruturas otimizadas foram salvos no formato *.mol2 para serem utilizados na docagem molecular.

4.1.3 Docagem molecular

As simulações de docagem molecular foram realizadas no programa GOLD (*Genetic Optimization for Ligand Docking*, versão 2020.3.0), licenciado no Brasil em parceria com a Coordenadoria de Aperfeiçoamento Profissional (CAPES). As estruturas cristalográficas dos alvos moleculares foram preparadas para o cálculo na interface do software pela remoção dos ligantes co-cristalizados e pela adição dos átomos de hidrogênio polares com base na ionização inferida pelo programa. A docagem molecular foi realizada no modo rígido para a proteína e flexível para os ligantes, utilizando-se as quatro funções de pontuação disponíveis no programa GOLD (GoldScore, ChemScore, CHEMPLP e ASP), sendo submetidos a 10 execuções interativas e as demais configurações do programa definidas por padrão.

Para o complexo da TK (1E2P), as duas águas conservadas (HOH2012 e HOH2052) foram definidas como flexíveis, sendo assim configuradas em relação a sua orientação e distância de interação por meio do ajuste das opções: *Toggle* como “On”; *Spin* como “*Trans spin*” e *Distance* igual 1 Å.

As regiões de interesse dos sítios de ligação foram definidas baseadas em um raio de 15 Å a partir das coordenadas dos ligantes co-cristalizados, sendo no complexo da TK (1E2P), a estrutura da 6-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)propil]-5-metil-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinediona (X=46,593533, Y=33,842933 e Z=0,364933), enquanto no complexo da DNA polimerase (7LUF), as coordenadas do ligante *N*-(4-clorobenzil)-1-metil-6-(morfolinometil)-4-oxo-1,4-di-hidroquinolina-3-carboxamida foram X=53,659733, Y=178,118733 e Z=-8,764300.

Esse protocolo foi devidamente validado através de procedimento conhecido como redocagem, realizado diretamente no programa GOLD, através do qual selecionou-se a função de pontuação adequada com base no cálculo de desvio quadrático médio ($RMSD < 2,0 \text{ \AA}$), sendo ASP para o complexo da TK e GoldScore para o complexo da DNA polimerase. Após a validação por redocagem, os mesmos parâmetros foram aplicados na triagem virtual da quimioteca do LaSMMed.

As análises das interações intermoleculares dos complexos ligante-enzima foram realizadas por meio dos diagramas 2D e 3D gerados no programa Discovery Studio Visualizer (v.21.1.0.20298).

4.2 ENSAIOS *IN VITRO*

4.2.1 Cultura celular

Células Vero (células epiteliais de rim de macaco verde africano, ATCC CCL81) foram cultivadas em frascos de cultivo celular de 75 cm^2 (1×10^6), acondicionados em estufa umedecida, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, contendo 5% de CO_2 atmosférico (Sanyo MCO-17AIC). As células foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM– Invitrogen-Gibco), com alta glicose (DMEM high glucose - Sigma-Aldrich), suplementado com 2 mM de glutamina (Sigma-Aldrich), 10% de Soro bovino fetal (Bio Nutrientes), $2,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$ de anfotericina B (Novafarma), $100 \text{ } \mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (SIGMA) e 100 IU/mL de penicilina (Novafarma). O subcultivo celular foi realizado com solução de tripsina/EDTA 0,25% (Inlab) regularmente quando o tapete celular ultrapassava 95% de confluência (8×10^6), aproximadamente a cada 48 horas.

4.2.2 Estoque viral

Células Vero foram semeadas em frascos de cultivo celular de 25 cm^2 e incubadas nas condições supracitadas, até alcançarem confluência adequada (85-90%), com aproximadamente 24 horas de incubação. Consecutivamente, o meio de cultivo foi retirado com posterior lavagem da monocamada celular com solução de tampão fosfato salino de Dulbecco (D-PBS). A monocamada celular

foi exposta a 0,5 mL de suspensão viral de HSV-1 (cepa KOS, sensível ao ACV), por um período de 1 hora, visando maximizar a adsorção viral. Seguidamente, 4,5 mL de meio DMEM, sem soro fetal bovino (DMEM-SF), foram incorporados aos frascos, que foram novamente incubados nas condições supracitadas, por tempo suficiente para observação de amplo efeito citopático (ECP), entre 48 e 72 horas, respectivamente. Uma vez observado ECP, o frasco de cultivo inoculado com HSV-1 teve seu conteúdo congelado a -20 °C. Os frascos foram descongelados a 4 °C, coletados e centrifugados a 4 °C e 292 g (SIGMA 2-16PK). O sobrenadante foi coletado, separado em alíquotas e estocado a -80 °C até o momento de uso (GUPTA et al., 1996; GROSZ et al., 2014).

4.2.3 Titulação viral

A diluição necessária da suspensão viral para observação de 50% de ECP foi definida através do método TCID₅₀ (*Median Tissue Culture Infectious Dose* - Dose infecciosa mediana em cultura de tecido), sendo calculada pelo método estipulado por *Reed-Muench* (REED; MUENCH, 1938). Células Vero (2,5x10⁴ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas, nas condições supracitadas. Posteriormente, uma alíquota do estoque viral puro foi diluída em meio DMEM-SF, de forma seriada, utilizando fator de diluição na base 10, sendo o ponto final 10⁻⁶ vezes diluído, em relação a suspensão viral original. As diluições virais (HSV-1) foram inoculadas nas monocamadas celulares em seis replicatas, obtendo em cada poço um volume final de 100 µL/poço. Um controle celular (CC), contendo apenas meio DMEM e células, foi concomitantemente mantido durante o experimento em 6 replicatas. As placas foram incubadas nas condições supracitadas, a cada 24 horas sucedeu-se a observação em microscópio óptico da monocamada celular para registro da presença de ECP, o período final de incubação foi de 72 horas.

4.2.4 Compostos

Os compostos liofilizados foram solubilizados com 10% DMSO e 90% meio DMEM-SF, a concentração foi mantida de acordo com a original e as alíquotas foram estocadas a -20°C.

4.2.5 Citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada através do Teste de Redução do Tetrazólio [(3,4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina, MTT] (Life Technologies/Invitrogen), em cristais insolúveis de formazana, realizada através da atividade mitocondrial de células metabolicamente viáveis (KUMAR et al., 2018). Células Vero ($2,5 \times 10^4$ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas nas condições supracitadas. As diluições seriadas, feitas na base 2 dos compostos, partindo de 300 $\mu\text{g/mL}$, em DMEM-SF, foram realizadas e adicionadas sobre as monocamadas, em quatro replicatas, para obter um volume final de 100 $\mu\text{L/poço}$. Poços contendo apenas DMEM-SF, também com volume final de 100 $\mu\text{L/poço}$, foram utilizados como controle celular (CC). Posterior a 72 horas de incubação nas condições supracitadas, o conteúdo dos poços foi removido e a monocamada foi lavada com 100 μL de D-PBS e 10 μL de solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados em cada poço (tratamentos e CC). As placas foram novamente incubadas nas condições supracitadas por 2 horas e, em seguida, foi adicionado 900 μL de solução solubilizante (isopropanol acidificado com HCl 0,01 M e 0,36 % de Triton-X). Os cristais de formazana foram solubilizados mediante agitação por 15 minutos e a absorbância avaliada por espectrofotômetro (Agilent BIOTEK) no comprimento de onda de 570nm. Uma leitura adicional a 690 nm foi realizada para remoção de ruídos oriundos da placa. Os dados de absorbância foram transformados em porcentagem de viabilidade celular, através da equação exemplificada abaixo. Os resultados em viabilidade celular foram utilizados para estipular a equação da reta para cada composto e para encontrar a concentração necessária para diminuir em 50% a viabilidade celular (CC_{50}).

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{(A_{t(570)} - A_{t(690)})}{(A_{cc(570)} - A_{cc(690)})} \times 100$$

Onde:

A_t = Absorbância do grupo de tratamento.

A_{cc} = Absorbância do grupo controle.

4.2.6 Triagem de atividade antiviral

A triagem de atividade antiviral foi realizada pelo teste de redução do MTT, conforme supracitado, todavia apresentando pequenas alterações. Células Vero ($2,5 \times 10^4$ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas nas condições supracitadas por 24 horas. As diluições seriadas, feitas na base 2 dos compostos, partindo de 100 µg/mL, em DMEM-SF, foram preparadas e adicionadas sobre a monocamada celular, também foram adicionados simultaneamente (tempo 0h) 10% de inóculo viral 10^{-2} de HSV (Vero), em quatro replicatas, para obter um volume final de 100 µL/poço. Poços contendo apenas DMEM-SF e DMEM-SF inoculado com 10% de inóculo viral 10^{-2} de HSV (Vero) foram utilizados como controles celular (CC) e viral (CV), respectivamente. O CC e o CV foram utilizados para mensurar os parâmetros de 100 e 0% de inibição do HSV. As placas foram incubadas nas condições supracitadas por 72 horas. Posteriormente ao período de incubação, a revelação do teste de redução do MTT e a obtenção do resultado em absorbância foi realizada como citado anteriormente. Os valores de absorbância foram transformados em porcentagem de inibição viral, utilizando a equação demonstrada abaixo (WATANABE et al., 1994).

$$\text{Inibição Viral (\%)} = \frac{(A_T - A_{CV})}{(A_{CC} - A_{CV})} \times 100$$

Onde:

A_T = Absorbância do grupo tratado.

A_{CV} = Absorbância do grupo controle viral.

A_{CC} = Absorbância do grupo controle celular.

A concentração responsável por inibir em 50% a infectividade viral (IC_{50}) para cada composto foi determinada através da equação da reta. Este dado foi utilizado para o cálculo do índice de seletividade (IS).

$$IS = \frac{CC_{50}}{IC_{50}}$$

Onde:

CC_{50} = Concentração citotóxica 50%.

IC_{50} = Concentração inibidora 50%.

4.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

4.3.1 Procedimento geral

O processo de monitoramento das reações foi realizado através da cromatografia em camada delgada (CCD), em cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F-254 com espessura de 0,25 mm com indicador para UV (254 nm), marca Merck. Os eluentes foram preparados volume a volume (v/v) e a revelação das substâncias em CCD foi realizada em lâmpada de UV (254-366 nm).

4.3.2 Caracterização

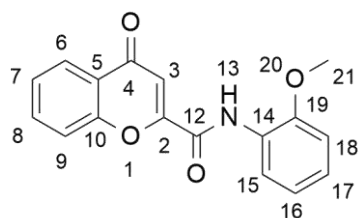
Os compostos **3a-e** foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H . Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker modelo Avance III, operando a 400 MHz para ^1H , equipado com sondas multinucleares de 5 mm. Estes espectros foram registrados utilizando CDCl_3 e DMSO-d_6 como solventes e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. O software utilizado para o processamento dos espectros de RMN foi o MestReNova (Versão 6.0). Para calibração do espectro de RMN de ^1H foram adotados os valores de 0,00 ppm para TMS, 7,26 ppm para CDCl_3 e 2,50 ppm para o DMSO-d_6 . As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica, e suas multiplicidades foram descritas da seguinte forma: simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), duplo duplete (dd), duplo duplo-duplete (ddd) e multiplete (m). As constantes de acoplamento (J) foram relatadas em Hz.

4.3.3 Síntese

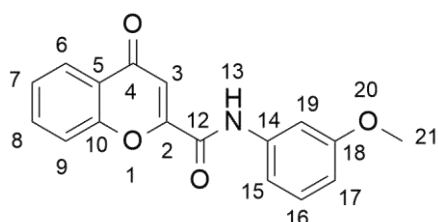
Em um balão de fundo redondo foram adicionados o ácido cromona (1,0 eq.) com o cloreto de tionila (SOCl_2 , 2,0 eq.), 5 mL do solvente diclorometano (CH_2Cl_2) e 30 gotas do catalisador *N,N*-dimetilformamida (DMF) sob agitação magnética por 24 horas. Na sequência, o excesso de SOCl_2 foi removido com o auxílio do rotaevaporador, obtendo-se o cloreto do ácido cromona. Então, foi adicionado à mistura reacional a anilina correspondente (1,0 eq.) e 10 mL de acetona, acoplado no balão um condensador de refluxo, o qual permaneceu sob

agitação magnética e refluxo por 2 horas, quando se evidenciou o término da reação por CCD. Em seguida, a solução foi vertida em um béquer contendo gelo triturado e submetido a agitação por 30 minutos. Posteriormente, o precipitado obtido foi filtrado à vácuo e transferido para um erlemmeyer com 10 mL de metanol, a solução foi aquecida até a solubilização total e resfriada a temperatura ambiente. Depois, os cristais formados foram filtrados à vácuo e lavados com éter etílico gelado (3 x 5 mL). Assim obteve-se os compostos **3a-e** com rendimentos variando entre 15 e 45%.

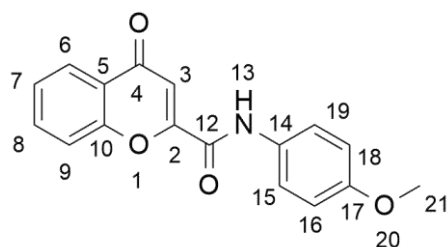
***N*-(2-metoxifenil)-2-cromona-carboxamida (DNA09, 3a).**



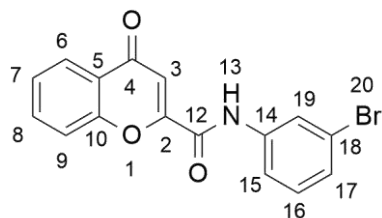
Nº Hidrogênio	δ H (m, <i>J</i> em Hz, nH)
NH	9,32 (s, 1H)
6	8,52 (dd, <i>J</i> = 8,0, 1,6 Hz, 1H)
9	8,27 (dd, <i>J</i> = 8,0, 1,7 Hz, 1H)
8	7,81 (ddd, <i>J</i> = 8,7, 7,1, 1,7 Hz, 1H)
15	7,66 – 7,59 (m, 1H)
7	7,51 (ddd, <i>J</i> = 8,2, 7,1, 1,1 Hz, 1H)
3	7,28 (s, 1H)
17	7,19 (td, <i>J</i> = 7,8, 1,6 Hz, 1H)
16	7,06 (td, <i>J</i> = 7,8, 1,4 Hz, 1H)
18	6,99 (dd, <i>J</i> = 8,2, 1,3 Hz, 1H)
21	4,03 (s, 3H)

***N*-(3-metoxifenil)-2-cromona-carboxamida (DNA10, 3b).**

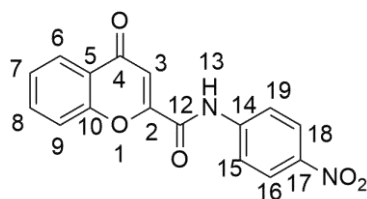
Nº Hidrogênio	δ H (m, <i>J</i> em Hz, nH)
NH	8,56 (s, 1H)
6	8,25 (dd, <i>J</i> = 7,9, 1,1 Hz, 1H)
8	7,82 – 7,75 (m, 1H)
9	7,62 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H)
7 e 19	7,54 – 7,45 (m, 2H)
16	7,31 (t, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H)
3	7,28 (d, <i>J</i> = 11,1 Hz, 1H)
15	7,19 (d, <i>J</i> = 7,3 Hz, 1H)
17	6,78 (dd, <i>J</i> = 8,3, 2,5 Hz, 1H)
21	3,85 (s, 3H)

***N*-(4-metoxifenil)-2-cromona-carboxamida (DNA10, 3c).**

Nº Hidrogênio	δ H (m, <i>J</i> em Hz, nH)
NH	8,53 (s, 1H)
6	8,27 (dd, <i>J</i> = 8,0, 1,7 Hz, 1H)
8	7,80 (ddd, <i>J</i> = 8,7, 7,1, 1,7 Hz, 1H)
9	7,66 (d, <i>J</i> = 2,3 Hz, 1H)
19 e 15	7,64 – 7,60 (m, 2H)
7	7,51 (ddd, <i>J</i> = 8,0, 7,1, 1,0 Hz, 1H)
3	7,29 (s, 1H)
18 e 16	6,99 – 6,94 (m, 2H)
21	3,85 (s, 3H)

***N*-(3-bromofenil)-2-cromona-carboxamida (DNA02, 3d).**

Nº Hidrogênio	δ H (m, J em Hz, nH)
NH	10,87 (s, 1H)
19 e 6	8,12 – 8,05 (m, 2H)
8	7,94 (ddd, J = 8,6, 7,0, 1,8 Hz, 1H)
15 e 9	7,87 – 7,79 (m, 2H)
7	7,61 – 7,53 (m, 1H)
17 e 16	7,43 – 7,37 (m, 2H)
3	6,99 (s, 1H)

***N*-(4-nitrofenil)-2-cromona-carboxamida (DNA15, 3e).**

Nº Hidrogênio	δ H (m, J em Hz, nH)
NH	11,22 (s, 1H)
16 e 18	8,34 – 8,32 (m, 2H)
15, 19 e 9	8,1 (t, J = 8,8, 3H)
8	7,95 (ddd, J = 8,7, 7,0, 1,7 Hz, 1H)
6	7,86 (d, J = 8,4, 1H)
7	7,59 (t, J = 7,5, 1H)
3	7,03 (s, 1H)

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados, pode-se perceber o sucesso das triagens virtuais dos compostos pertencentes à quimioteca do LaSMMed para as duas enzimas, visto que estas trouxeram resultados que permitiram a seleção de compostos com atividade antiviral.

As porcentagens de viabilidade celular geradas causaram consequências na atividade antiviral de alguns dos compostos ativos. O melhor candidato, **LaSMMed 71**, exerceu notável inibição dose-dependente, com um valor de IS satisfatório para uma triagem preliminar.

Foram selecionados para síntese cinco compostos desenhados como análogos de **LaSMMed 71**. Estes apresentaram interações com a enzima viral DNA Polimerase, além das interações realizadas pelo **LaSMMed 71**. Realizada a síntese destes cinco compostos, e suas caracterizações, estes foram encaminhados para avaliação da citotoxicidade e atividade anti-herpética, se mostrando insolúveis no meio de teste.

Todos os dados obtidos foram registrados na quimioteca do LaSMMed, estes podendo ser utilizados como referência para futuros trabalhos no grupo de pesquisa e para a comunidade em geral.

Por fim, as perspectivas deste trabalho são estudar mais detalhadamente a solubilidade das cromonas, aumentar a série destas bem como a sua potência e aprofundar o conhecimento dos compostos que apresentaram inibição para o HSV.

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, J.; SHUKLA, D. Viral entry mechanisms: Cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. **FEBS Journal**, v. 276, n. 24, p. 7228–7236, 2009.
- ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: Overview on relevant clinico-pathological features. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 37, n. 2, p. 107–121, 2008.
- AWOUAFACK, M. D.; MCGAW, L. J.; GOTTFRIED, S.; et al. Antimicrobial activity and cytotoxicity of the ethanol extract, fractions and eight compounds isolated from *Eriosema robustum* (Fabaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, 2013.
- BAEZ, M. V.; AGUIRRE, A. I.; EPSTEIN, A. L.; JERUSALINSKY, D. A. Using herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors for neuroscience research and gene therapy of neurologic diseases. **Molecular-Genetic and Statistical Techniques for Behavioral and Neural Research**, p. 445–477, 2018.
- BEAUMAN, J. G. Genital herpes: a review. **American family physician**, v. 72, n. 8, p. 1527–34, 2005.
- BRIK, D. Antivirais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 56, n. 6, p. 1–6, 1993.
- CAAMAL-FUENTES, E.; TORRES-TAPIA, L. W.; SIMÁ-POLANCO, P.; PERAZA-SÁNCHEZ, S. R.; MOO-PUC, R. Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 719–724, 2011.
- CADORE, G. C. **PATOGENIA DA INFECÇÃO AGUDA E LATENTE PELO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 E POR RECOMBINANTE COM DELEÇÃO NO GENE DA TIMIDINA QUINASE EM OVINOS**, 2013. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Maria. Disponível em: <<http://repositorio.ufsm.br/handle/1/4086>>. .
- CHAMPNESS, J. N.; BENNETT, M. S.; WIEN, F.; et al. Exploring the active site of herpes simplex virus type-1 thymidine kinase by X-ray crystallography of complexes with aciclovir and other ligands. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 32, n. 3, p. 350–361, 1998.
- CHANG, A.; JESKE, L.; ULBRICH, S.; et al. BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: New developments and updates. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D498–D508, 2021. Oxford University Press.
- CHENG, H. Y.; HUANG, H. H.; YANG, C. M.; LIN, L. T.; LIN, C. C. The in vitro anti-herpes simplex virus type-1 and type-2 activity of long dan xie gan tan, a prescription of traditional Chinese medicine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 77–83, 2008.
- CLERCQ, E. DE. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, n. 2, p. 115–133, 2004.
- CLERCQ, E. DE. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 552–560, 2005.
- ENQUIST, L. W.; HUSAK, P. J.; BANFIELD, B. W.; SMITH, G. A. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. **Advances in virus research**, v. 51, n. 609, p. 237–347, 1998.
- FABRIS, L. I. **TRIAGEM VIRTUAL DA QUIMIOTECA DO LASMMED E AVALIAÇÃO IN VITRO DE POTENCIAIS INIBIDORES DE UREASES**, 2023. Universidade Estadual de Londrina - UEL.
- FERRARI, M.; METTENLEITER, T. C.; ROMANELLI, M. G.; et al. A

- Comparative Study of Pseudorabies Virus (PRV) Strains with Defects in Thymidine Kinase and Glycoprotein Genes. , v. 123, p. 152–163, 2000.
- FONSECA, B. A. L. DA. CLÍNICA E TRATAMENTO DAS INFECÇÕES PELOS VÍRUS Herpes Símplex TIPO 1 E 2. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 32, n. 2, p. 147, 1998.
- GASPAR, A.; CAGIDE, F.; QUEZADA, E.; et al. Synthesis and NMR studies of novel chromone-2-carboxamide derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 251–254, 2013.
- GASPAR, A.; SILVA, T.; YÁÑEZ, M.; et al. Chromone, a privileged scaffold for the development of monoamine oxidase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 14, p. 5165–5173, 2011.
- GHOSH, A. K.; WILLIAMS, J. N.; HO, R. Y.; et al. Design and Synthesis of Potent HIV-1 Protease Inhibitors Containing Bicyclic Oxazolidinone Scaffold as the P2 Ligands: Structure-Activity Studies and Biological and X-ray Structural Studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 21, p. 9722–9737, 2018.
- GOULD, S.; COOPER, V. L.; REICHARDT, N.; O'CONNOR, A. M. An evaluation of the prevalence of Bovine herpesvirus 1 abortions based on diagnostic submissions to five U.S.-based veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 2, p. 243–247, 2013.
- GROSZ, D. D.; GEELLEN, A. VAN; GALLUP, J. M.; et al. Sucrose stabilization of Respiratory Syncytial Virus (RSV) during nebulization and experimental infection. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2014.
- GROVER, A.; AGRAWAL, V.; SHANDILYA, A.; BISARIA, V. S.; SUNDAR, D. Non-nucleosidic inhibition of Herpes simplex virus DNA polymerase : mechanistic insights into the anti-herpetic mode of action of herbal drug withaferin A. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. Suppl 13, p. 9, 2011.
- GUPTA, C. K.; LESZCZYNSKI, J.; GUPTA, R. K.; SIBER, G. R. Stabilization of respiratory syncytial virus (SV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV vaccines and immune globulin. **Vaccine**, v. 14, n. 15, p. 1417–1420, 1996.
- HAYES, R. P.; HEO, M. R.; MASON, M.; et al. Structural understanding of non-nucleoside inhibition in an elongating herpesvirus polymerase. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2021.
- HELDWEIN, E. E.; KRUMMENACHER, C. Entry of herpesviruses into mammalian cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 11, p. 1653–1668, 2008.
- HISHIKI, T.; KATO, F.; TAJIMA, S.; et al. Hirsutine, an indole alkaloid of *Uncaria rhynchophylla*, inhibits late step in dengue virus lifecycle. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1–7, 2017.
- HWU, J. R.; HUANG, W. C.; LIN, S. Y.; et al. Chikungunya virus inhibition by synthetic coumarin–guanosine conjugates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 166, p. 136–143, 2019.
- INDRAYANTO, G.; PUTRA, G. S.; SUHUD, F. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 46, p. 273–307, 2021.
- ITZHAKI, R. F.; WOZNIAK, M. A. Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E, and cholesterol: A dangerous liaison in Alzheimer's disease and other disorders. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 1, p. 73–90, 2006.
- JASSIM, S. A. A.; NAJI, M. A. Novel antiviral agents: A medicinal plant perspective. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 412–427, 2003.

- JENSSEN, H.; ANDERSEN, J. H.; MANTZILAS, D.; GUTTEBERG, T. J. A wide range of medium-sized, highly cationic, α -helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 64, n. 2, p. 119–126, 2004.
- KARAMPURI, S.; BAG, P.; YASMIN, S.; et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Structure based molecular design , synthesis and biological evaluation of a -pyrone analogs as anti-HSV agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 19, p. 6261–6266, 2012.
- KELLY, B. J.; FRAEFEL, C.; CUNNINGHAM, A. L.; DIEFENBACH, R. J. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. **Virus Research**, v. 145, n. 2, p. 173–186, 2009.
- KUKHANOVA, M. K.; KOROVINA, A. N.; KOCHETKOV, S. N. Human herpes simplex virus: Life cycle and development of inhibitors. **Biochemistry (Moscow)**, v. 79, n. 13, p. 1635–1652, 2014.
- KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. 469–471, 2018.
- LADBURY, J. E. Just add water! The effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design. **Chemistry and Biology**, v. 3, n. 12, p. 973–980, 1996.
- LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, p. 2694–2718, 2016.
- LIN, C. H.; CHANG, T. C.; DAS, A.; et al. Synthesis of acylguanidine zanamivir derivatives as neuraminidase inhibitors and the evaluation of their bio-activities. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 24, p. 3943–3948, 2013.
- LINHARES, J.; MIRANDA, I.; SILVA, W.; et al. Introdução a Triagem Virtual. **BIOINFO - Revista Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional**, 2021.
- LIU, S.; KNAFELS, J. D.; CHANG, J. S.; et al. Crystal structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 26, p. 18193–18200, 2006.
- LOOKER, K. J.; ELMES, J. A. R.; GOTTLIEB, S. L.; et al. Effect of HSV-2 infection on subsequent HIV acquisition: an updated systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. 1303–1316, 2017.
- LOOKER, K. J.; MAGARET, A. S.; MAY, M. T.; et al. Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–17, 2015.
- MAHMOUD, A. H.; MASTERS, M. R.; YANG, Y.; LILL, M. A. Elucidating the multiple roles of hydration for accurate protein-ligand binding prediction via deep learning. **Communications Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 1–13, 2020.
- MELLO, C. P. P. DE; BLOOM, D. C.; PAIXÃO, I. C. N. P. Review Herpes simplex virus type-1 : replication , latency , reactivation and its antiviral targets. **Antiviral Therapy**, v. 286, p. 277–286, 2016.
- MUYLAERT, I.; TANG, K. W.; ELIAS, P. Replication and recombination of herpes simplex virus DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 18, p. 15619–15624, 2011.
- OLIVEIRA, G. E. A. DE; SILVA, I. M. C. E. Herpes Zoster em idosos: uma visão acerca da prevenção. **ID on line. Revista de psicologia**, v. 17, n. 66, p. 318–330, 2023.
- ORHAN, I.; DELIORMAN-ORHAN, D.; ÖZÇELİK, B. Antiviral activity and

cytotoxicity of the lipophilic extracts of various edible plants and their fatty acids. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 701–705, 2009.

PENELLO, A. M.; CAMPOS, B. C.; SIMÃO, M. S.; et al. Herpes genital. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 2, p. 64–72, 2010.

PILAU, M. R.; ALVES, S. H.; WEIBLEN, R.; et al. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1616–1624, 2011.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 2019.

QUINTANA, V. M.; PICCINI, L. E.; PANOZZO ZÉNERE, J. D.; et al. Antiviral activity of natural and synthetic β -carboline against dengue virus. **Antiviral Research**, v. 134, p. 26–33, 2016.

RAMPERSA, S.; TENNANT, P. Replication and Expression Strategies of Viruses. **Viruses**, p. 55–82, 2018.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.

RESKE, A.; POLLARA, G.; KRUMMENACHER, C.; CHAIN, B. M.; KATZ, D. R. Understanding HSV-I entry glycoproteins. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, n. 3, p. 205–215, 2007.

ROCHA. Herpes. Veja como Prevenir Essa Doença com Alimentação Estratégica. Disponível em: <<https://drrocha.com.br/herpes/>>. Acesso em: 16/3/2023.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia humana 3. ed.** Rio de Janeiro, 2015.

SANTOS, M.; MORAIS, M.; FONSECA, D.; et al. Herpesvírus humano: tipos, manifestações orais e tratamento. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**, v. 11, n. 3, p. 191–196, 2012.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. 2ª edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SCHNUTE, M. E.; BRIDEAU, R. J.; COLLIER, S. A.; et al. Synthesis of 4-oxo-4,7-dihydrofuro[2,3-b]pyridine-5-carboxamides with broad-spectrum human herpesvirus polymerase inhibition. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 14, p. 3856–3859, 2008.

SCHNUTE, M. E.; CUDAHY, M. M.; BRIDEAU, R. J.; et al. 4-Oxo-4,7-dihydrothieno[2,3-b]pyridines as non-nucleoside inhibitors of human cytomegalovirus and related herpesvirus polymerases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 18, p. 5794–5804, 2005.

SLIWOSKI, G.; KOTHIWALE, S.; MEILER, J.; LOWE, E. W. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 334–395, 2014.

SU, C. T.; HSU, J. T. A.; HSIEH, H. P.; et al. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Research**, v. 79, n. 1, p. 62–70, 2008.

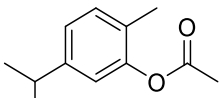
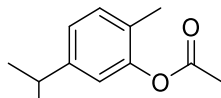
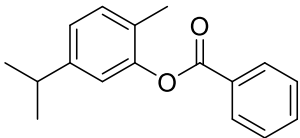
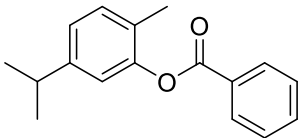
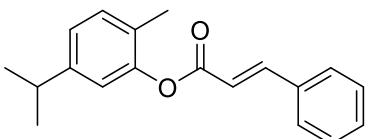
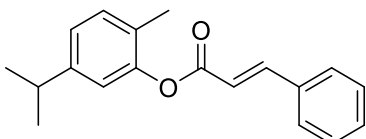
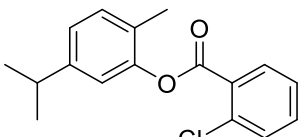
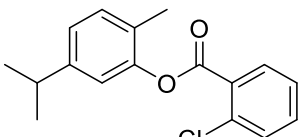
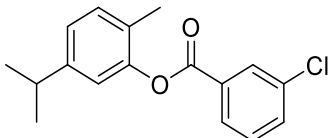
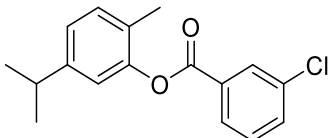
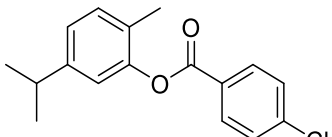
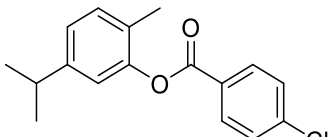
TAGLIARI, N. A. B.; KELMANN, R. G.; DIFENTHALER, H. Aspectos Terapêuticos Das Infecções Causadas Pelo Vírus Herpes Simples Tipo 1. **Perspectiva**, v. 36, n. 133, p. 191–201, 2012.

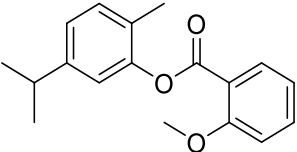
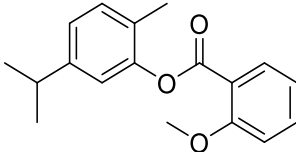
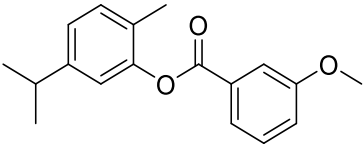
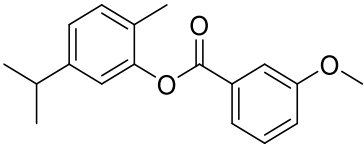
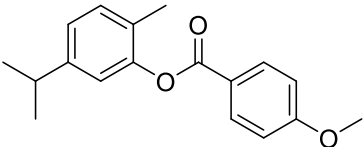
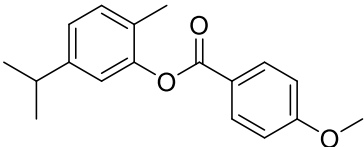
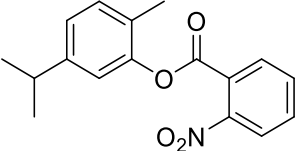
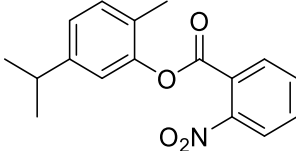
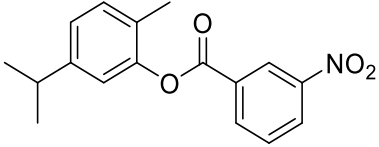
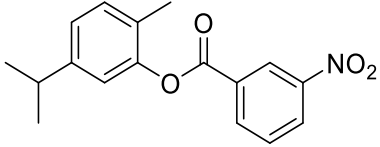
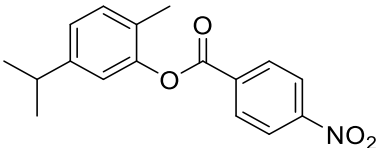
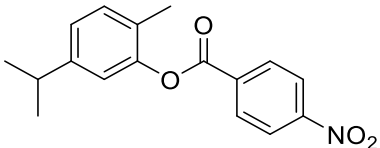
TIJSMA, A.; THIBAUT, H. J.; FRANCO, D.; DALLMEIER, K.; NEYTS, J. Hydantoin: The mechanism of its in vitro anti-enterovirus activity revisited. **Antiviral Research**, v. 133, p. 106–109, 2016.

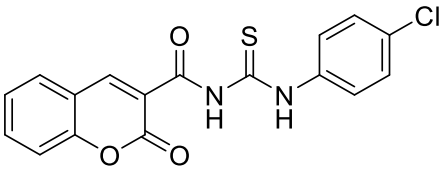
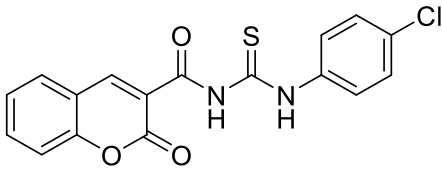
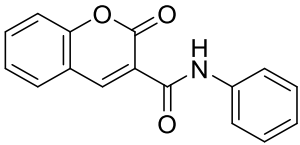
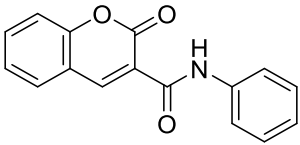
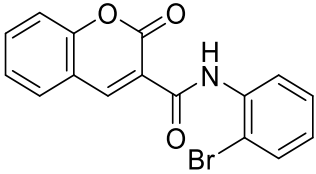
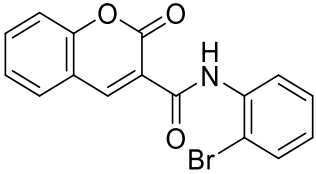
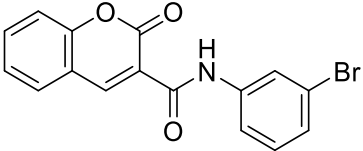
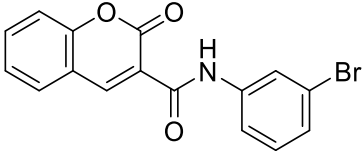
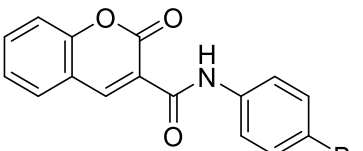
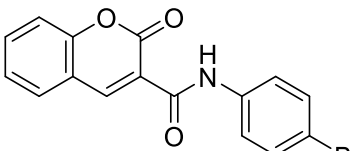
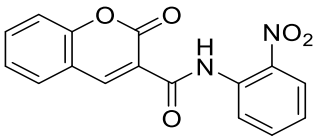
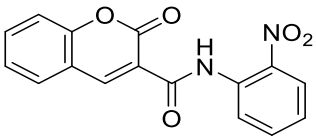
- VENTURA, A. **Apostila de Virologia: Herpesvírus**. São Paulo, 2023.
- VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; WENIGER, B.; OUATTARA, M.; et al. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected Ivorian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 2–3, p. 221–225, 2003.
- WATANABE, W.; KONNO, K.; IJICHI, K.; et al. MTT colorimetric assay system for the screening of anti-orthomyxo- and anti-paramyxoviral agents. **Journal of Virological Methods**, v. 48, n. 2–3, p. 257–265, 1994.
- WATHEN, M. W. Non-nucleoside inhibitors of herpesviruses. **Reviews in Medical Virology**, v. 12, n. 3, p. 167–178, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Billions worldwide living with herpes. .
- WOUK, J.; MALFATTI, C. R. M.; FACCIN-GALHARDI, L. C. Herpes Simplex: Uma Epidemia Viral Persistente. , n. January, p. 98–117, 2021.
- WU, Y.-H.; ZHANG, B.-Y.; QIU, L.-P.; et al. Structure Properties and Mechanisms of Action of Naturally Originated Phenolic Acids and Their Derivatives against Human Viral Infections. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 38, 2017.
- WURTH C, KESSLER U, VOGT J, SCHULZ GE, FOLKERS G, S. L. The effect of substrate binding on the conformation and structural stability of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. **Protein Science**, v. 10, n. 1, p. 63–73, 2001.
- XU, C.; XIN, Y.; CHEN, M.; et al. Discovery, synthesis, and optimization of an N-alkoxy indolylacetamide against HIV-1 carrying NNRTI-resistant mutations from the *Isatis indigotica* root. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 189, p. 112071, 2020. Elsevier Masson SAS.
- XU, H. X.; LEE, S. H. S.; LEE, S. F.; WHITE, R. L.; BLAY, J. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. **Antiviral Research**, v. 44, n. 1, p. 43–54, 1999.
- YONEDA, J. D.; ALBUQUERQUE, M. G.; LEAL, K. Z.; et al. Docking of anti-HIV-1 oxoquinoline-acylhydrazone derivatives as potential HSV-1 DNA polymerase inhibitors. **Journal of Molecular Structure**, v. 1074, p. 263–270, 2014.
- ZARROUK, K.; PIRET, J.; BOIVIN, G. Herpesvirus DNA polymerases : Structures , functions and inhibitors. **Virus Research**, v. 234, p. 177–192, 2017.
- UT, P. P. H.; OOI, V. E. C.; et al. Chemical properties, mode of action, and in vivo anti-herpes activities of a lignin-carbohydrate complex from *Prunella vulgaris*. **Antiviral Research**, v. 75, n. 3, p. 242–249, 2007.
- ZUCKERMAN, A.J.; BANATVALA, J.E.; PATTISON, J.R.; GRIFFITHSAND, P. D. .; SCHOUB, B. **Principles and practice of clinical virology**. 5^a ed. 2004.

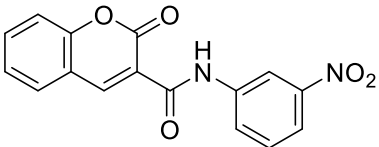
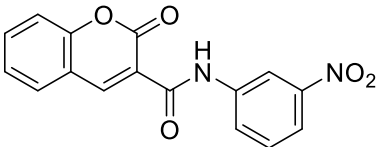
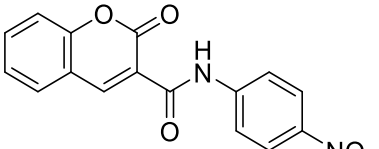
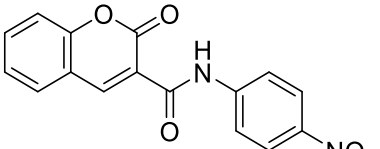
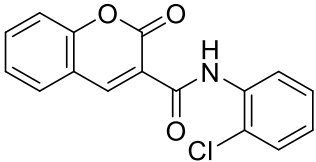
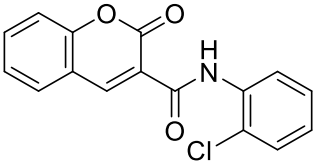
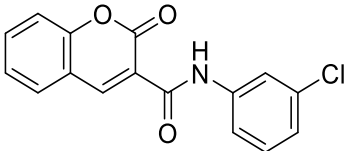
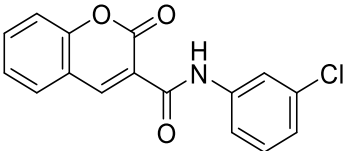
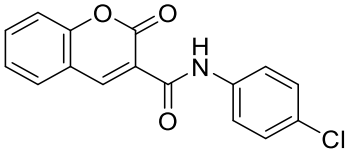
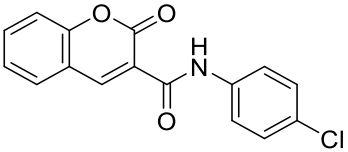
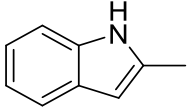
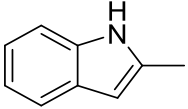
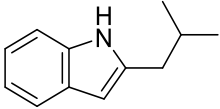
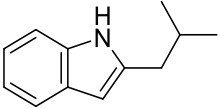
APÊNDICE A

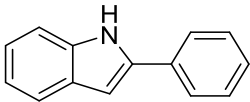
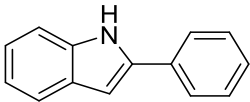
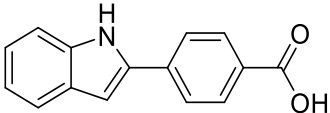
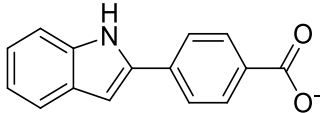
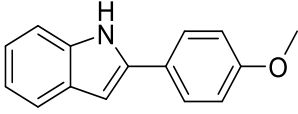
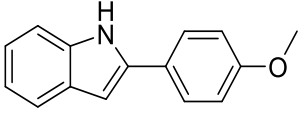
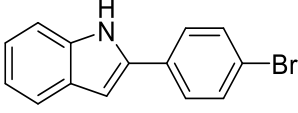
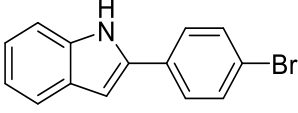
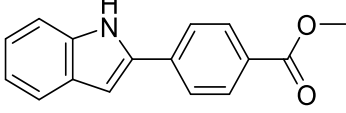
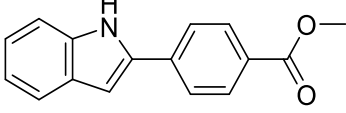
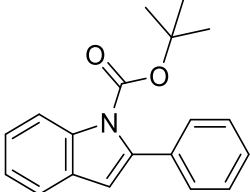
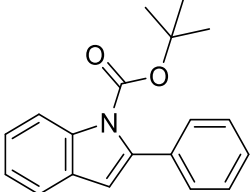
Estruturas químicas das substâncias da quimioteca do LaSMMed triadas
virtualmente neste trabalho.

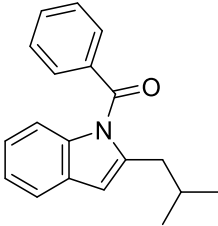
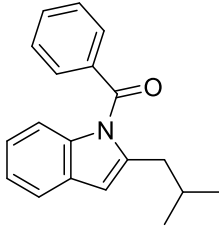
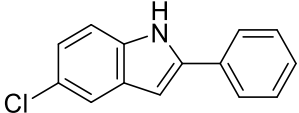
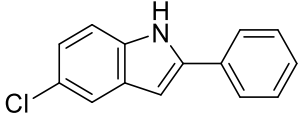
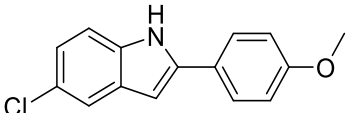
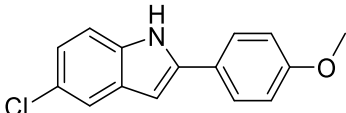
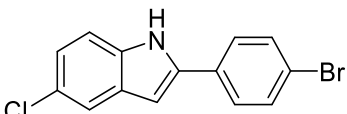
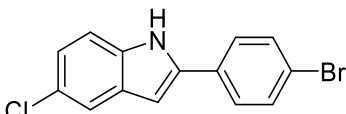
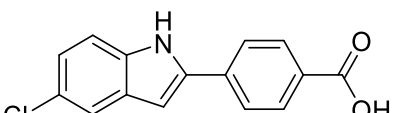
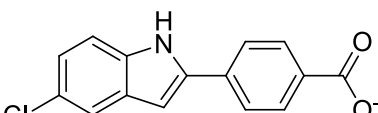
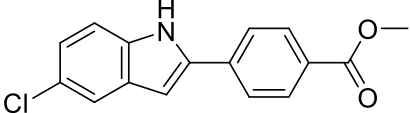
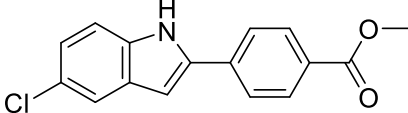
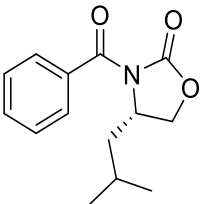
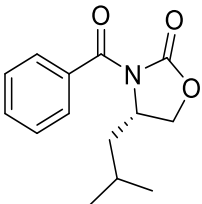
Substância (estrutura 2D/ nome)	Classe química	Micro espécies em pH 8 e pH 7,4 (estrutura 2D/ nome)
 <p style="text-align: center;">LaSMMed01</p>	Éster de carvacrol	 <p style="text-align: center;">LaSMMed01</p>
 <p style="text-align: center;">LaSMMed02</p>	Éster de carvacrol	 <p style="text-align: center;">LaSMMed02</p>
 <p style="text-align: center;">LaSMMed03</p>	Éster de carvacrol	 <p style="text-align: center;">LaSMMed03</p>
 <p style="text-align: center;">LaSMMed04</p>	Éster de carvacrol	 <p style="text-align: center;">LaSMMed04</p>
 <p style="text-align: center;">LaSMMed05</p>	Éster de carvacrol	 <p style="text-align: center;">LaSMMed05</p>
 <p style="text-align: center;">LaSMMed06</p>	Éster de carvacrol	 <p style="text-align: center;">LaSMMed06</p>

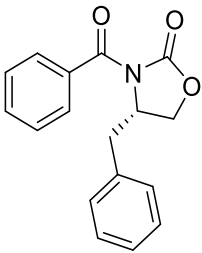
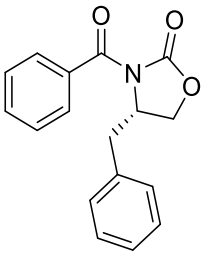
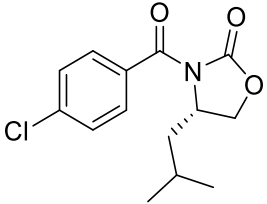
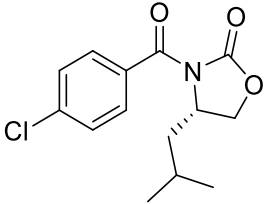
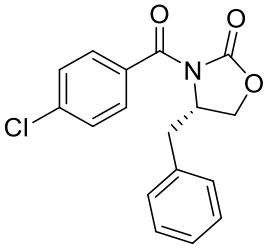
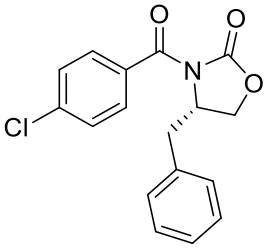
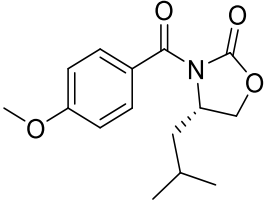
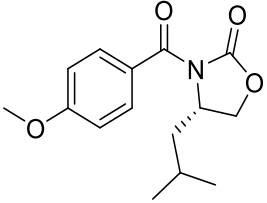
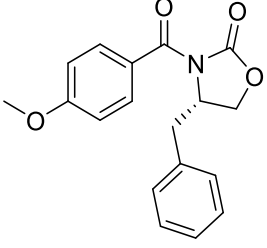
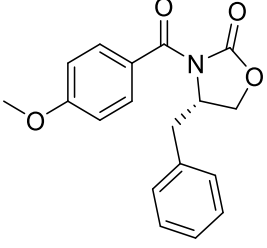
 <p>LaSMMed07</p>	Éster de carvacrol	 <p>LaSMMed07</p>
 <p>LaSMMed08</p>	Éster de carvacrol	 <p>LaSMMed08</p>
 <p>LaSMMed09</p>	Éster de carvacrol	 <p>LaSMMed09</p>
 <p>LaSMMed10</p>	Éster de carvacrol	 <p>LaSMMed10</p>
 <p>LaSMMed11</p>	Éster de carvacrol	 <p>LaSMMed11</p>
 <p>LaSMMed12</p>	Éster de carvacrol	 <p>LaSMMed12</p>

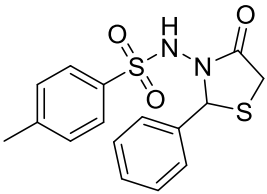
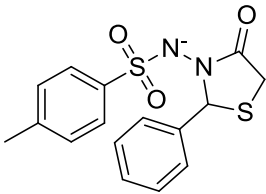
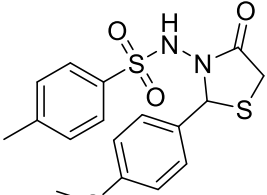
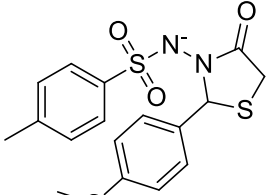
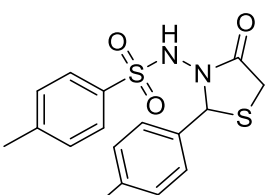
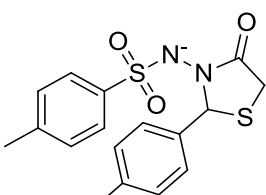
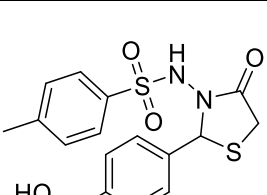
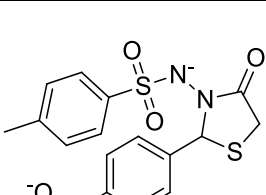
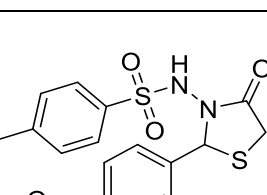
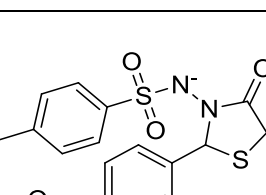
 <p>LaSMMed13</p>	Cumariltiourea	 <p>LaSMMed13</p>
 <p>LaSMMed14</p>	Cumarilamida	 <p>LaSMMed14</p>
 <p>LaSMMed15</p>	Cumarilamida	 <p>LaSMMed15</p>
 <p>LaSMMed16</p>	Cumarilamida	 <p>LaSMMed16</p>
 <p>LaSMMed17</p>	Cumarilamida	 <p>LaSMMed17</p>
 <p>LaSMMed18</p>	Cumarilamida	 <p>LaSMMed18</p>

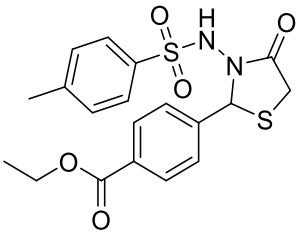
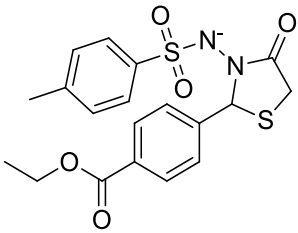
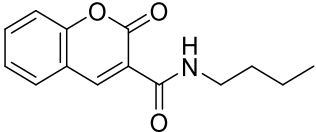
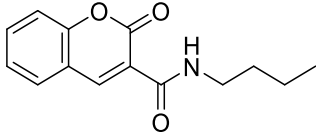
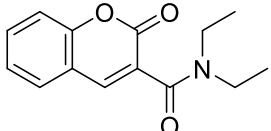
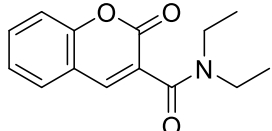
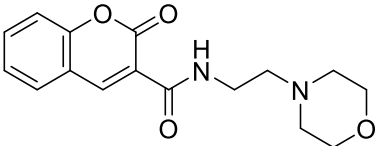
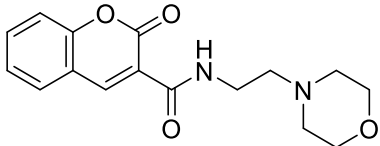
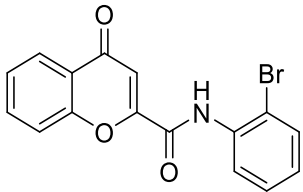
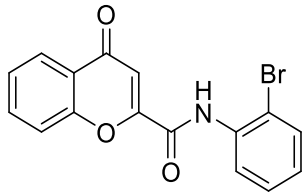
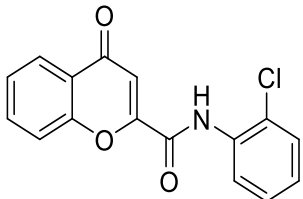
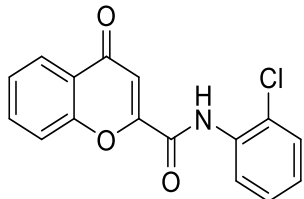
 <p>LaSMMed19</p>	Cumarilamida	 <p>LaSMMed19</p>
 <p>LaSMMed20</p>	Cumarilamida	 <p>LaSMMed20</p>
 <p>LaSMMed21</p>	Cumarilamida	 <p>LaSMMed21</p>
 <p>LaSMMed22</p>	Cumarilamida	 <p>LaSMMed22</p>
 <p>LaSMMed23</p>	Cumarilamida	 <p>LaSMMed23</p>
 <p>LaSMMed24</p>	Indol	 <p>LaSMMed24</p>
 <p>LaSMMed25</p>	Indol	 <p>LaSMMed25</p>

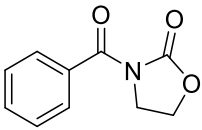
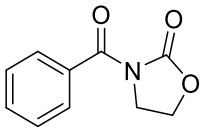
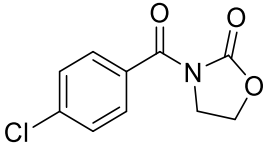
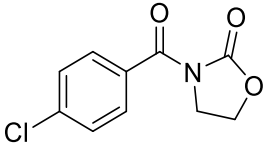
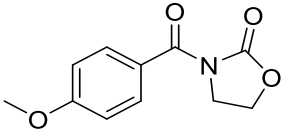
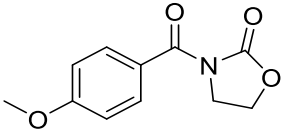
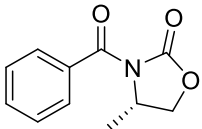
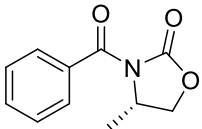
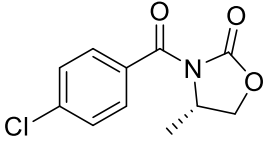
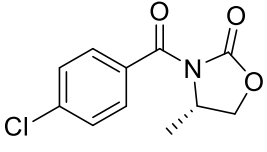
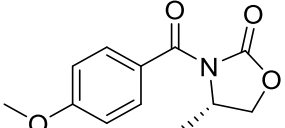
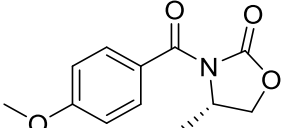
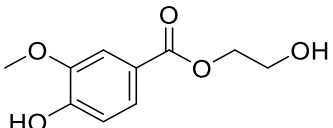
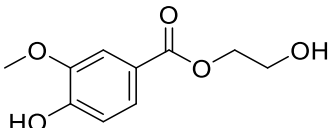
 <p>LaSMMed26</p>	Indol	 <p>LaSMMed26</p>
 <p>LaSMMed27</p>	Indol	 <p>LaSMMed27</p>
 <p>LaSMMed28</p>	Indol	 <p>LaSMMed28</p>
 <p>LaSMMed29</p>	Indol	 <p>LaSMMed29</p>
 <p>LaSMMed30</p>	Indol	 <p>LaSMMed30</p>
 <p>LaSMMed31</p>	Indol	 <p>LaSMMed31</p>

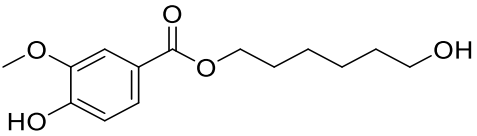
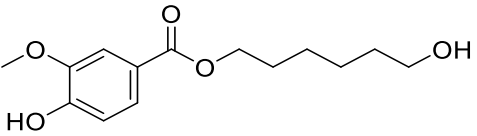
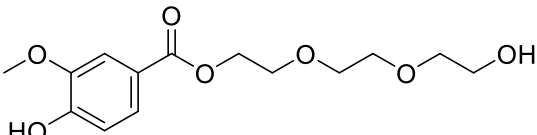
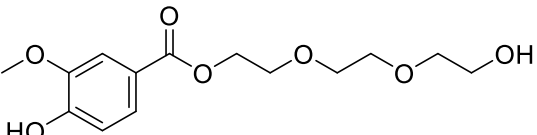
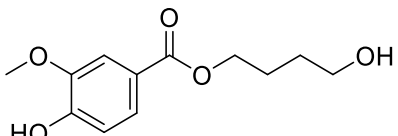
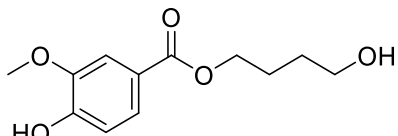
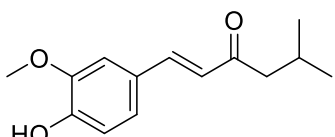
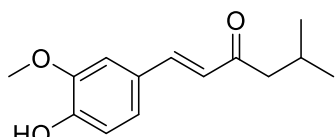
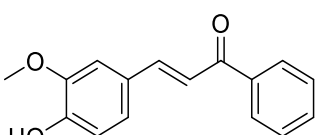
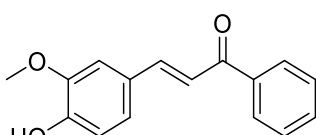
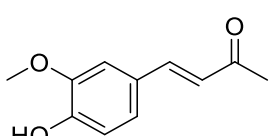
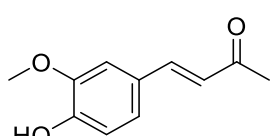
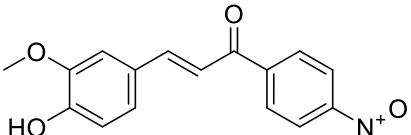
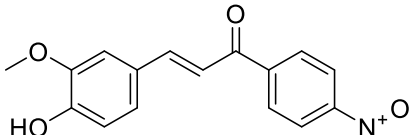
 <p>LaSMMed32</p>	Indol	 <p>LaSMMed32</p>
 <p>LaSMMed33</p>	Indol	 <p>LaSMMed33</p>
 <p>LaSMMed34</p>	Indol	 <p>LaSMMed34</p>
 <p>LaSMMed35</p>	Indol	 <p>LaSMMed35</p>
 <p>LaSMMed36</p>	Indol	 <p>LaSMMed36</p>
 <p>LaSMMed37</p>	Indol	 <p>LaSMMed37</p>
 <p>LaSMMed38</p>	Oxazolidinona	 <p>LaSMMed38</p>

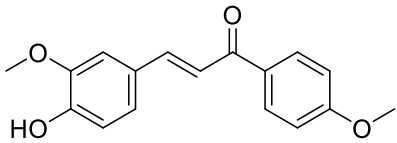
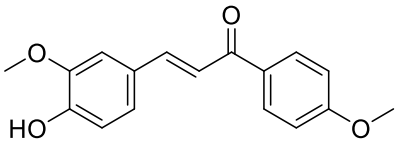
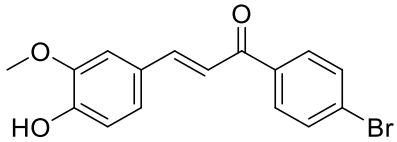
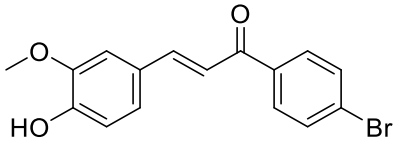
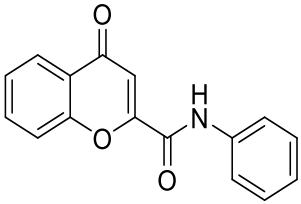
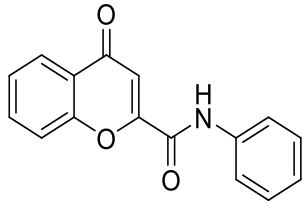
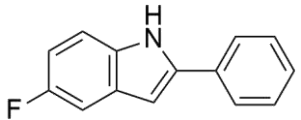
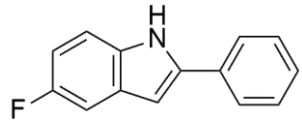
 <p>Chemical structure of LaSMMed39: A 5-membered oxazolidinone ring with a carbonyl group at the 2-position. The nitrogen atom is substituted with a benzoyl group. The 4-position of the ring is substituted with a phenyl ring.</p>	Oxazolidinona	 <p>Chemical structure of LaSMMed39: A 5-membered oxazolidinone ring with a carbonyl group at the 2-position. The nitrogen atom is substituted with a benzoyl group. The 4-position of the ring is substituted with a phenyl ring.</p>
 <p>Chemical structure of LaSMMed40: A 5-membered oxazolidinone ring with a carbonyl group at the 2-position. The nitrogen atom is substituted with a 4-chlorobenzoyl group. The 4-position of the ring is substituted with an isopropyl group.</p>	Oxazolidinona	 <p>Chemical structure of LaSMMed40: A 5-membered oxazolidinone ring with a carbonyl group at the 2-position. The nitrogen atom is substituted with a 4-chlorobenzoyl group. The 4-position of the ring is substituted with an isopropyl group.</p>
 <p>Chemical structure of LaSMMed41: A 5-membered oxazolidinone ring with a carbonyl group at the 2-position. The nitrogen atom is substituted with a 4-chlorobenzoyl group. The 4-position of the ring is substituted with a phenyl ring.</p>	Oxazolidinona	 <p>Chemical structure of LaSMMed41: A 5-membered oxazolidinone ring with a carbonyl group at the 2-position. The nitrogen atom is substituted with a 4-chlorobenzoyl group. The 4-position of the ring is substituted with a phenyl ring.</p>
 <p>Chemical structure of LaSMMed42: A 5-membered oxazolidinone ring with a carbonyl group at the 2-position. The nitrogen atom is substituted with a 4-methoxybenzoyl group. The 4-position of the ring is substituted with an isopropyl group.</p>	Oxazolidinona	 <p>Chemical structure of LaSMMed42: A 5-membered oxazolidinone ring with a carbonyl group at the 2-position. The nitrogen atom is substituted with a 4-methoxybenzoyl group. The 4-position of the ring is substituted with an isopropyl group.</p>
 <p>Chemical structure of LaSMMed43: A 5-membered oxazolidinone ring with a carbonyl group at the 2-position. The nitrogen atom is substituted with a 4-methoxybenzoyl group. The 4-position of the ring is substituted with a phenyl ring.</p>	Oxazolidinona	 <p>Chemical structure of LaSMMed43: A 5-membered oxazolidinone ring with a carbonyl group at the 2-position. The nitrogen atom is substituted with a 4-methoxybenzoyl group. The 4-position of the ring is substituted with a phenyl ring.</p>

 <p>LaSMMed44</p>	Tiazolidinona	 <p>LaSMMed44</p>
 <p>LaSMMed45</p>	Tiazolidinona	 <p>LaSMMed45</p>
 <p>LaSMMed46</p>	Tiazolidinona	 <p>LaSMMed46</p>
 <p>LaSMMed47</p>	Tiazolidinona	 <p>LaSMMed47</p>
 <p>LaSMMed48</p>	Tiazolidinona	 <p>LaSMMed48</p>

 <p>LaSMMed49</p>	Tiazolidinona	 <p>LaSMMed49</p>
 <p>LaSMMed50</p>	Cumarilamida	 <p>LaSMMed50</p>
 <p>LaSMMed51</p>	Cumarilamida	 <p>LaSMMed51</p>
 <p>LaSMMed52</p>	Cumarilamida	 <p>LaSMMed52</p>
 <p>LaSMMed53</p>	Cromona	 <p>LaSMMed53</p>
 <p>LaSMMed54</p>	Cromona	 <p>LaSMMed54</p>

 <p>LaSMMed55</p>	Oxazolidinona	 <p>LaSMMed55</p>
 <p>LaSMMed56</p>	Oxazolidinona	 <p>LaSMMed56</p>
 <p>LasMMed57</p>	Oxazolidinona	 <p>LasMMed57</p>
 <p>LaSMMed58</p>	Oxazolidinona	 <p>LaSMMed58</p>
 <p>LaSMMed59</p>	Oxazolidinona	 <p>LaSMMed59</p>
 <p>LasMMed60</p>	Oxazolidinona	 <p>LasMMed60</p>
 <p>LaSMMed61</p>	Éster do ácido vanílico	 <p>LaSMMed61</p>

 <p>LaSMMed62</p>	<p>Éster do ácido vanílico</p>	 <p>LaSMMed62</p>
 <p>LaSMMed63</p>	<p>Éster do ácido vanílico</p>	 <p>LaSMMed63</p>
 <p>LaSMMed64</p>	<p>Éster do ácido vanílico</p>	 <p>LaSMMed64</p>
 <p>LaSMMed65</p>	<p>Derivado α,β-insaturado de apocinina</p>	 <p>LaSMMed65</p>
 <p>LaSMMed66</p>	<p>Derivado α,β-insaturado de apocinina</p>	 <p>LaSMMed66</p>
 <p>LaSMMed67</p>	<p>Derivado α,β-insaturado de apocinina</p>	 <p>LaSMMed67</p>
 <p>LaSMMed68</p>	<p>Derivado α,β-insaturado de apocinina</p>	 <p>LaSMMed68</p>

 <p>LaSMMed69</p>	Derivado α,β -insaturado de apocinina	 <p>LaSMMed69</p>
 <p>LaSMMed70</p>	Derivado α,β -insaturado de apocinina	 <p>LaSMMed70</p>
 <p>LaSMMed71</p>	Cromona	 <p>LaSMMed71</p>
 <p>LaSMMed72</p>	Indol	 <p>LaSMMed72</p>

Fonte: A autora (2023).












APÊNDICE B

Todas as interações observadas entre os ligantes e a TK.

Quadro B1 (página 99) - Todas as interações do ligante original (CCV), menor RMSD (Pose 2), maior *FS* (Pose 4), **LaSMMed 32, 38(S), 39(S), 44(R) e 45(R)** com a TK.

Quadro B2 (página 100) - Todas as interações dos ligantes **LaSMMed 47(R), 51, 61, 62, 63, 64 e 71** com a TK.

Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:

	Ligação de hidrogênio		Empilhamento Pi-Pi/ em T
	Ligação de hidrogênio não-convencional		Alquil/Pi-Alquil
	Van der Waals		Pi-Sigma
	Interação Pi-hidrogênio		Interação de halogênio
	Ligação de hidrogênio água		Desfavorável
	Pi-enxofre/ enxofre X		

Quadro B1

	CCV	Pose 2	Pose 4	32	38(S)	39(S)	44(R)	45(R)
Gln125								
Tyr172								
Tyr101								
Met128								
HOH1								
HOH2								
His58								
Ala167								
Arg163								
Glu83								
Arg222								
Ile97								
Ile100								
Ala168								
Arg176								
Tyr132								
Glu225								
Lys62								
Trp88								
Met85								
Pro173								
Met231								
Gly129								
His164								

Fonte: A autora (2023).

Quadro B2

	47(R)	51	61	62	63	64	72
Gln125							
Tyr172							
Tyr101							
Met128							
HOH1							
HOH2							
His58							
Ala167							
Arg163							
Glu83							
Arg222							
Ile97							
Ile100							
Ala168							
Arg176							
Tyr132							
Glu225							
Lys62							
Trp88							
Met85							
Pro173							
Met231							
Gly129							
His164							

Fonte: A autora (2023).

APÊNDICE C

Resultados da triagem virtual, da melhor pose para cada ligante, com o valor de FS e sua classificação (TK).

Classif.	Ligantes	FS	Classif.	Ligantes	FS	Classif.	Ligantes	FS
1º	39(S)	45,27	27º	25	36,37	53º	70	21,90
2º	63	44,80	28º	13	35,76	54º	27	21,64
3º	51	44,11	29º	1	35,58	55º	69	19,50
4º	62	42,67	30º	31	35,00	56º	34	18,44
5º	45(R)	42,64	31º	59(S)	34,70	57º	6	16,81
6º	64	42,42	32º	44(S)	34,51	58º	54	16,57
7º	61	41,98	33º	45(S)	33,97	59º	9	16,07
8º	44(R)	41,88	34º	33	33,38	60º	71	16,06
9º	72	41,80	35º	66	32,82	61º	30	15,18
10º	38(S)	41,38	36º	29	32,31	62º	53	13,66
11º	47(R)	41,25	37º	10	32,29	63º	36	12,28
12º	32	40,77	38º	46(R)	32,18	64º	14	12,22
	CCV	40,20	39º	49(R)	31,93	65º	11	11,98
13º	57	39,64	40º	47(S)	31,09	66º	15	11,19
14º	26	39,50	41º	2	30,43	67º	21	10,74
15º	42(S)	38,98	42º	24	29,02	68º	12	9,31
16º	41(S)	38,74	43º	28	28,51	69º	37	8,97
17º	67	38,68	44º	7	28,23	70º	18	7,74
18º	43(S)	38,65	45º	52	28,08	71º	22	5,36
19º	50	38,65	46º	46(S)	27,97	72º	16	5,15
20º	48(R)	38,32	47º	8	25,00	73º	68	5,03
21º	60(S)	38,11	48º	5	24,25	74º	3	3,26
22º	65	38,00	49º	4	23,13	75º	23	1,51
23º	55	37,89	50º	48(S)	23,04	76º	17	-0,34
24º	58(S)	37,34	51º	35	22,69	77º	19	-0,81
25º	40(S)	36,77	52º	49(S)	22,44	78º	20	-11,81
26º	56	36,43						

Fonte: A autora (2023).









APÊNDICE D

Todas as interações observadas entre os ligantes e a DNA polimerase

Quadro D1 (página 103) - Todas as interações do ligante original (YE4), menor RMSD (Pose 8), maior *FS* (Pose 2), **LaSMMed 17, 21, 23, 45(R) e 46(R)** com a DNA polimerase.

Quadro D2 (página 104) - Todas as interações dos ligantes **LaSMMed 46(S), 48(R), 49(R), 49(S), 54, 69 e 71** com a DNA polimerase.

Legenda das cores de acordo com os tipos de interações:

 Ligação de hidrogênio	 Empilhamento Pi-Pi/ em T
 Ligação de hidrogênio não-convencional	 Alquila/Pi-Alquila
 Van der Waals	 Pi-Sigma
 Interação Pi-hidrogênio	 Interação de halogênio
 Pi-enxofre/ enxofre X	 Desfavorável
 Pi-Lone Pair	

Quadro D1

	YE4	Pose 8	Pose 2	17	21	23	45(R)	46(R)
Tyr722								
DG-10								
DG-10								
DG-09								
DC-01								
DT-11								
Ser816								
Gln617								
Gly819								
Val621								
Phe820								
Gln618								
Leu721								
Val823								
Tyr818								
Thr887								
Asp888								
Ser720								
Pro723								
Asn815								
Gly616								
Asp615								
Ile613								
Tyr614								
Arg512								
Lys514								
Lys511								

Fonte: A autora (2023).

Quadro D2

	46(S)	48(R)	49(R)	49(S)	54	69	71
Tyr722	█	█	█	█		█	
DG-10	█	█	█	█	█	█	█
DG-10				█	█		
DG-09	█	█	█	█	█	█	█
DG-09		█	█				
DC-01	█	█	█			█	
DT-11					█		█
Ser816	█	█	█	█	█	█	
Gln617	█	█	█	█	█	█	█
Gly819	█	█	█	█	█	█	█
Val621		█	█				
Phe820	█	█	█	█	█	█	█
Gln618		█	█	█	█	█	█
Leu721	█	█	█				
Val823	█	█	█	█	█	█	█
Tyr818	█	█	█	█		█	
Thr887	█	█	█	█			
Asp888	█	█	█	█			
Ser720	█						
Pro723	█			█			
Asn815	█	█	█	█			
Gly616				█	█	█	█
Asp615				█	█		█
Ile613					█		█
Tyr614					█		█
Arg512				█	█		█
Lys514					█		█
Lys511					█		█
Arg620							█

Fonte: A autora (2023).

APÊNDICE E

Resultados da triagem virtual, da melhor pose para cada ligante (DNA Polimerase).

Classif.	Ligantes	FS	Classif.	Ligantes	FS	Classif.	Ligantes	FS
	Original	85,15	27º	3	61,45	53º	72	56,78
1º	49(R)	71,12	28º	13	61,33	54º	31	56,71
2º	48(R)	69,85	29º	18	61,32	55º	50	56,65
3º	49(S)	68,22	30º	14	61,16	56º	26	56,59
4º	54	67,45	31º	20	60,88	57º	34	56,45
5º	46(R)	66,00	32º	4	60,69	58º	30	55,33
6º	17	65,83	33º	29	60,52	59º	65	55,18
7º	45(R)	65,66	34º	48(S)	60,11	60º	62	55,03
8º	21	65,27	35º	28	59,95	61º	39	53,59
9º	23	64,40	36º	44(S)	59,81	62º	64	52,15
10º	71	64,22	37º	47(R)	59,52	63º	42	51,42
11º	69	64,07	38º	43	59,30	64º	25	50,85
12º	46(S)	64,03	39º	15	59,27	65º	32	50,65
13º	7	63,93	40º	66	59,24	66º	60	48,79
14º	16	63,91	41º	63	58,94	67º	67	48,79
15º	70	63,85	42º	6	58,49	68º	40	48,24
16º	22	63,79	43º	52	58,27	69º	61	47,43
17º	47(S)	63,72	44º	44(R)	58,10	70º	51	47,31
18º	8	63,17	45º	2	58,09	71º	1	46,22
19º	68	62,99	46º	33	57,99	72º	57	45,08
20º	45(S)	62,75	47º	10	57,74	73º	38	43,31
21º	53	62,61	48º	36	57,71	74º	59	41,93
22º	5	62,10	49º	37	57,43	75º	24	41,61
23º	11	61,89	50º	27	57,16	76º	55	41,55
24º	19	61,82	51º	41	57,03	77º	56	41,35
25º	9	61,77	52º	12	57,00	78º	58	39,47
26º	35	61,70						

Fonte: A autora (2023).

APÊNDICE F

Porcentagens de inibição dos compostos (**LaSMMed 38, 46, 47, 62 e 71**) testados durante a infecção por HSV-1 (cepa KOS), em células VERO e tratamento simultâneo (tempo 0h), nas respectivas concentrações (300 a 7,5 µg/mL).

Inibição do HSV-1 (%)					
Substâncias	38	46	47	62	71
Concentrações					
300 µg/mL	18,5	NT	61,7	NT	100
150 µg/mL	17,7	0	52,1	33,0	65,1
75 µg/mL	28,9	10,1	52,6	39,3	67,9
37 µg/mL	15,4	22,1	57,5	64,3	58,7
18 µg/mL	19,4	22,5	53,4	66,0	57,4
7,5 µg/mL	20,7	0	41,0	20,7	41,1

Fonte: A autora (2023). Legenda: *NT*- Não testado.