

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA**

**DOCKING MOLECULAR DE DERIVADOS DO TERPINEN-4-OL COM
POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

AMANDA MARTINS LINAZZI

PORTO ALEGRE, 2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA**

Amanda Martins Linazzi

**DOCKING MOLECULAR DE DERIVADOS DO TERPINEN-4-OL COM
POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul como requisito à obtenção do título
de grau de Farmacêutica.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Coorientador: Farmacêutico Guilherme Saldanha Henkin

Porto Alegre, 2023

Dedico este trabalho aos meus pais.

Os maiores incentivadores das realizações
dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rosane Martins Linazzi e Luiz Carlos Vincensi Linazzi, por acreditarem nas minhas escolhas, sempre me motivando e me apoiando, além de me darem todo o amor do mundo.

À minha família, por todo amor, carinho, apoio, e paciência ao longo desta caminhada, compreendendo as horas dedicadas ao estudo e à pesquisa, mesmo quando isso significava menos tempo para estarmos juntos.

À minha prima, que mais considero irmã, Andressa Schneider, por todo cuidado, amor e carinho durante a graduação, além de todo suporte em momentos difíceis.

À minha amiga Luiza Garcia, pela sua amizade incondicional desde o primeiro semestre da graduação, e por todo apoio e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos, Alessandra Nunes, Matheus Gallas e Thailana Stahlhofer, por estarem presentes na minha vida, tornando os dias mais alegres e a graduação mais leve e feliz.

À professora Simone Gnoatto, que me inspirou durante suas aulas e que aceitou conduzir meu trabalho de pesquisa, além de me incentivar e confiar em mim durante a realização deste projeto.

Ao farmacêutico Guilherme Henkin, por todos os ensinamentos, orientações e apoio. Sem a sua contribuição, a realização deste trabalho não teria sido possível.

A todos os meus colegas com quem convivi durante todos esses anos de curso, que me incentivaram e que sem dúvida tiveram impacto na minha formação acadêmica.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a todos os professores do meu curso, pela alta qualidade de ensino que proporcionaram e pela contribuição na minha formação como profissional.

A todos que participaram e me deram apoio e orientação ao longo de toda esta jornada.

*“The art and science of asking questions is the
source of all knowledge”*

Thomas Berger

RESUMO

A resistência aos antibióticos é um problema de saúde pública urgente, estando associado a custos médicos elevados, aumento de internações hospitalares e aumento da mortalidade. Além da necessidade do uso racional de medicamentos e práticas de higiene, à medida que os mecanismos de resistência surgem, é essencial o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos. Uma solução para este problema pode ser através da busca de metabólitos de plantas com propriedades terapêuticas que possam servir de protótipos para modificações moleculares. A *Melaleuca alternifolia* é uma planta medicinal cujo óleo essencial possui atividade antimicrobiana, relacionada principalmente ao composto majoritário do óleo, o terpinen-4-ol. Terpinen-4-ol é um monoterpeneo que apresenta relatos de interação com a proteína de ligação à penicilina (PBP2a) *in silico*. Assim, o objetivo do trabalho foi planejar moléculas derivadas de terpinen-4-ol que apresentem maior interação com PBP2a, a fim de potencializar sua atividade antimicrobiana. Portanto, adotou-se a estratégia do *design* racional de fármacos inserindo substituintes em diferentes posições na molécula em estudo, onde não há interações conhecidas com a PBP2a, avaliando suas novas interações com o sítio ativo por meio da técnica de *docking* molecular. Os dados encontrados mostram que 5 moléculas derivadas do terpinen-4-ol apresentam importantes e novas interações com a proteína, demonstrando potencial para atividade antimicrobiana. Os resultados abrem caminho para a otimização das moléculas obtidas e aplicação de novas técnicas simulando seu comportamento em meio biológico. Ao mesmo tempo, possibilitam a síntese destas moléculas com intuito de testar sua atividade farmacológica. Ademais, os resultados servem como informações de suporte para futuros estudos farmacológicos do terpinen-4-ol, com foco em sua aplicação terapêutica.

Palavras-chaves: *Melaleuca alternifolia*; Terpinen-4-ol; Docking Molecular; Antibióticos; Desenvolvimento de Fármacos

ABSTRACT

Antibiotic resistance is an urgent public health matter, being associated with high medical costs, increased hospital admissions and increased mortality. In addition to the need for rational drug use and good hygiene practices, as resistance mechanisms emerge, the development of new antimicrobial drugs becomes essential. A solution for this problem could be through the search for medicinal plant metabolites with therapeutic properties that can serve as prototypes for molecular modifications. *Melaleuca alternifolia* is a medicinal plant whose essential oil has antimicrobial activity, which is mainly related to its major compound, terpinen-4-ol. Terpinen-4-ol is a monoterpene that has been reported to interact with penicillin-binding protein (PBP2a) *in silico*. Thus, the main purpose of this work was to design molecules derived from terpinen-4-ol that present a greater interaction with PBP2a, in order to potentially improve its antimicrobial activity. Therefore, the rational drug design strategy was adopted, inserting groups in different positions in the molecule under study, where there are no known interactions with PBP2a, evaluating their new interactions with the active site through molecular docking technique. The data shows that 5 molecules derived from terpinen-4-ol present important and new interactions with the protein, demonstrating potential for antimicrobial activity. The results pave the way for optimization of the new molecules and application of new techniques simulating their behavior in a biological environment. At the same time, it enables the synthesis of these molecules in order to test their pharmacological activity. Furthermore, the results serve as support information for future pharmacological studies of terpinen-4-ol, focusing on its therapeutic application.

Keywords: *Melaleuca alternifolia*; Terpinen-4-ol; Molecular Docking; Antibiotics; Drug Development

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da Penicilina G.....	12
Figura 2: As quatro classes principais de antibióticos betalactâmicos.....	13
Figura 3: Semelhança estrutural entre a Penicilina G e o dipeptídeo D-Ala-D-Ala terminal.....	14
Figura 4: Mecanismo de ação da Penicilina G.....	14
Figura 5: Ramos terminais e flores de <i>Melaleuca alternifolia</i>	18
Figura 6: Estrutura do terpinen-4-ol.....	20
Figura 7: Representação das interações entre o terpinen-4-ol e a PBP2a.....	20
Figura 8: Estrutura do Terpinen-4-ol com as diferentes posições para substituição destacadas.....	22
Figura 9: Diagrama de Craig 2.0	23
Figura 10: Alteração e estruturas dos substituintes avaliados.....	24
Figura 11: Molécula derivada do terpinen-4-ol com o grupo benzil fixado na posição 1 previamente determinada.....	35
Figura 12: Estrutura da molécula 5.....	37
Figura 13: Interações entre a molécula 5 e PBP2a.....	38
Figura 14: Estrutura da Molécula 4.....	39
Figura 15: Interações entre a molécula 4 e PBP2a.....	41
Figura 16: Estrutura da molécula 3.....	41
Figura 17: Interações entre a molécula 3 e PBP2a.....	43
Figura 18: Estrutura da molécula 2.....	44
Figura 19: Interações entre a molécula 2 e PBP2a.....	46
Figura 20: Estrutura da molécula 1.....	46
Figura 21: Interações entre a molécula 1 e a PBP2a.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	18
Tabela 2: Valores de RMSD obtidos no Redocking.....	26
Tabela 3: <i>Goldscore.fitness</i> obtidos para o Terpinen-4-ol.....	27
Tabela 4: <i>Goldscore.fitness</i> obtidos para a Penicilina G.....	27
Tabela 5: <i>Goldscore.fitness</i> obtidos para a Cefalexina.....	28
Tabela 6: <i>Goldscore.fitness</i> obtidos para a Oxacilina.....	28
Tabela 7: Médias e maiores <i>goldscore.fitness</i> para os grupos com substituintes na posição 1.....	29
Tabela 8: Médias e maiores <i>goldscore.fitness</i> para os grupos com substituintes na posição 2.....	30
Tabela 9: Médias e maiores <i>goldscore.fitness</i> para os grupos com substituintes na posição 3.....	32
Tabela 10: Médias e maiores <i>goldscore.fitness</i> para os compostos dissustituídos.....	33
Tabela 11: Médias do <i>goldscore.fitness</i> para os compostos com substituintes na posição 1 da segunda etapa	34
Tabela 12: Médias do <i>goldscore.fitness</i> para os compostos dissustituídos... ..	35
Tabela 13: Médias e maiores <i>goldscore.fitness</i> para os compostos trissustituídos.....	36
Tabela 14: Escores obtidos para a molécula 5.....	37
Tabela 15: Escores obtidos para a molécula 4.....	39
Tabela 16: Escores obtidos para a molécula 3.....	41
Tabela 17: Escores obtidos para a molécula 2.....	44
Tabela 18: Escores obtidos para a molécula 1.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA: Alanina

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATB: *Automated Topology Builder*

CBM: Concentração Bactericida Mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

DM: *Docking* Molecular

GLN: Glutamina

GLU: Ácido Glutâmico

HIS: Histidina

LYS: Lisina

MET: Metionina

MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBP: Proteína de Ligação à Penicilina

PBP2a: Proteína de Ligação Acil-penicilina 2a

RMSD: *Root Mean Square Deviation*

SER: Serina

THR: Treonina

TYR: Tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. DESENVOLVIMENTO.....	22
3.1.1. Substituintes.....	22
3.1.2. Ligantes.....	24
3.1.3. Receptor.....	25
3.1.4. Docking Molecular.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Redocking.....	26
4.2 Docking Molecular.....	27
5. CONCLUSÃO.....	49
6. REFERÊNCIAS.....	51
APÊNDICE A - Docking Molecular com substituintes na posição 1.....	61
APÊNDICE B - Docking Molecular com substituintes na posição 2.....	69
APÊNDICE C - Docking Molecular com substituintes na posição 3.....	77
APÊNDICE D - Docking Molecular com compostos dissubstituídos.....	85
APÊNDICE E - Docking Molecular com compostos trissubstituídos.....	91

1. INTRODUÇÃO

As evidências mais antigas de vida no planeta terra são bacterianas, sugerindo que as bactérias existem há mais de 3 bilhões de anos, dominando a biosfera e modulando continuamente o ambiente terrestre conforme as espécies evoluem (Alegado; King, 2014; Coates *et al.*, 2002). Esses seres unicelulares dispuseram de tempo suficiente para desenvolver-se e adaptar-se aos mais distintos ecossistemas através da combinação entre mutações - mudanças nas sequências de nucleotídeos do DNA - e da seleção natural. Uma vez que uma mutação ocorre e está presente em um indivíduo de uma espécie, ela pode se tornar uma parte estável de sua herança. Logo, a variabilidade genética se torna essencial no ciclo de vida dos organismos e um pré-requisito para a evolução (Babakhani; Oloomi, 2018; Denamur; Matic, 2006; Hershberg, 2015). Além disso, as bactérias comumente possuem elementos genéticos extracromossomais, chamados de plasmídeos, que codificam características adaptativas como a resistência aos antibióticos, e que são facilmente transmissíveis de uma bactéria para a outra. Os plasmídeos também podem estar associados a elementos móveis menores, como os transposons, que reorganizam a ordem e a presença dos genes nos cromossomos. Assim, as bactérias podem se adaptar a cada ambiente específico no qual estão presentes, apresentando um grande sucesso evolutivo (Carattoli, 2013; Orlek *et al.*, 2017).

Estar presente em todos os ambientes significa que estes microrganismos também estão presentes em praticamente todo o corpo, habitando principalmente a pele, o nariz e o intestino, vivendo em harmonia com os humanos hospedeiros e contribuindo para que o organismo funcione corretamente. Contudo, o corpo humano também carrega e pode ser infectado por bactérias patogênicas, que têm o potencial de causar doenças, dependendo do estado de saúde do indivíduo. Um exemplo é a *Escherichia coli*, bactéria comensal encontrada no intestino, que possui cepas capazes de causar graves infecções. Neste caso, a diferença entre a bactéria inofensiva e a bactéria nociva pode estar associada a genes codificados em elementos móveis, como os plasmídeos e os transposons, citados anteriormente (Manos, 2022; Stephens; Murray, 2001). Para conter as infecções causadas por estes microrganismos, o principal tratamento é realizado com fármacos antibióticos, substâncias químicas com propriedades bactericidas ou bacteriostáticas, que por um mecanismo de ação específico, interferem na sobrevivência bacteriana,

apresentando mínima toxicidade para o organismo (Ribeiro da Cunha; Fonseca; Calado, 2019; Uddin *et al.*, 2021).

Previamente à descoberta dos antibióticos, o entendimento, o tratamento e a prevenção de infecções causadas por bactérias eram inapropriados, resultando na alta mortalidade entre as pessoas infectadas. Além disso, os microrganismos foram identificados como os agentes responsáveis por essas infecções apenas na segunda metade do século XIX (Saga; Yamaguchi, 2009). Este cenário começou a mudar em 1929, quando Alexander Fleming, um bacteriologista, descreveu pela primeira vez no *British Journal of Experimental Pathology* a habilidade da penicilina, (figura 1) produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, de inibir o crescimento bacteriano *in vitro*. Ele notou que o mofo produzido pelo fungo em placas petri inoculadas com colônias de *Staphylococcus* sp., esquecidas em seu laboratório, inibiu o crescimento da colônia. Fleming, portanto, sugeriu utilização deste novo metabólito como antisséptico para feridas (Chain *et al.*, 2005; Fleming, 1929).

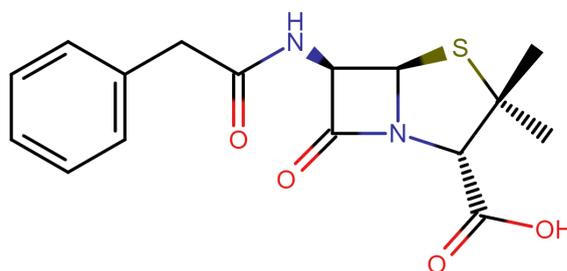


Figura 1: Estrutura da Penicilina G.

Todavia, o bacteriologista possuía problemas em caracterizar a atividade da molécula, já que não conseguia elucidar sua estrutura devido a problemas na purificação do composto. Felizmente, após 10 anos, os cientistas Howard Florey e Ernst Chain decidiram usar o estudo de Fleming para analisar as funções antimicrobianas da penicilina e, com o auxílio do químico Norman Heatley, obtiveram sucesso ao extrair e purificar a substância, obtendo quantidades suficientes para a realização de experimentos que atestaram sua eficácia em camundongos (Aminov, 2010; Lobanocska; Pilla, 2017). A partir dos testes, foi possível confirmar o efeito da penicilina *in vivo*, tornando-a uma excelente alternativa como medicamento, capaz de salvar vidas. Assim, o uso do antibiótico se tornou popular, principalmente devido à Segunda Guerra Mundial, resultando em sua produção e distribuição em massa,

instituindo uma nova era na medicina, a era dos antibióticos, uma das principais descobertas do século XX (Ribeiro da Cunha; Fonseca; Calado, 2019).

As penicilinas, assim como outras classes que foram descobertas durante este período, como as cefalosporinas, os carbapenêmicos e os monobactâmicos (figura 2) apresentam em comum em sua estrutura um anel betalactâmico, ou seja, uma amida cíclica de 4 membros, sendo a principal parte da estrutura molecular responsável pela sua classificação e sua atividade biológica (Fisher; Mobashery, 2020).

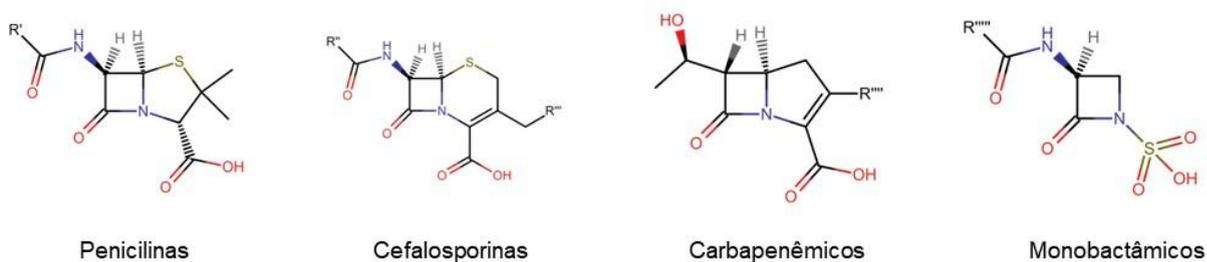


Figura 2: As quatro classes principais de antibióticos betalactâmicos.

Estes antibióticos agem na inibição da síntese de peptidoglicanos das bactérias, macromolécula composta por ácido diaminopimérico, ácido teicóico, ácido murâmico, aminoácidos, lipídios e carboidratos, sendo essenciais para o desenvolvimento e crescimento bacteriano, conferindo rigidez e estabilidade à parede celular dos microrganismos. Logo, os betalactâmicos interrompem a síntese da parede celular através da formação de uma ligação covalente entre transpeptidases - enzimas que catalisam a reação de substituição nucleofílica da carbonila necessária para a reticulação do peptidoglicanos da parede celular bacteriana - com os antibióticos. Isso ocorre devido à semelhança estrutural entre os antimicrobianos e o dipeptídeo D-Ala-D-Ala terminal (figura 3). Logo, a transpeptidase reconhece erroneamente a penicilina e permite a formação de um composto intermediário altamente estável, inibindo a transpeptidação (figura 4). Em virtude à interação entre penicilina e transpeptidase, a enzima é conhecida como proteína de ligação à penicilina (PBPs), onde cada espécie bacteriana possui conjuntos distintos de PBPs que podem variar em até oito enzimas por espécie

(Bush; Bradford, 2016; Lima *et al.*, 2020; Martínez *et al.*, 2020; Tipper; Strominger, 1965).

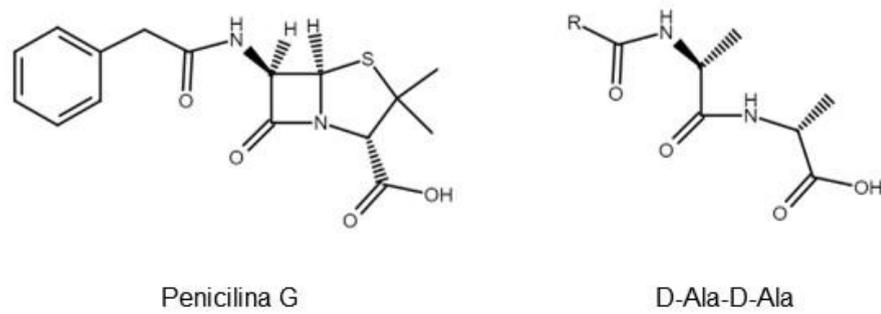


Figura 3: Semelhança estrutural entre a Penicilina G e o dipeptídeo D-Ala-D-Ala terminal.

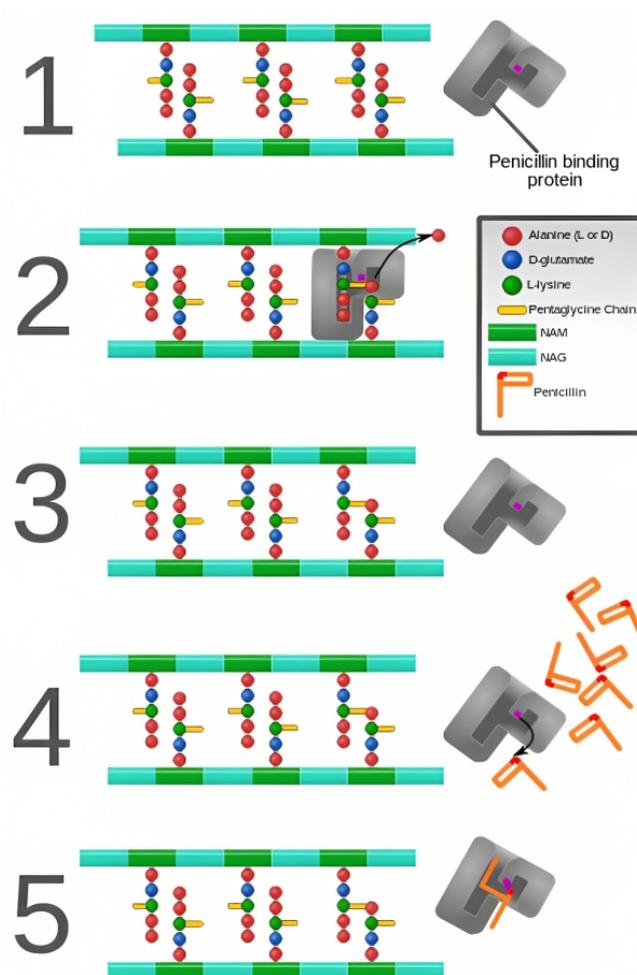


Figura 4: Mecanismo de ação da Penicilina G (Fonte: Varela *et al.*, 2021).

Com isso, no período entre 1940 a 1960, à medida que os antibióticos foram sendo descobertos, os mecanismos de ação elucidados e os processos de produção se tornando mais rápidos e eficientes, os medicamentos obtiveram um *status* de “milagrosos”, e doenças bacterianas tiveram seu fim proclamado, com a visão de que se tornaram um problema de saúde totalmente controlado. Ademais, o acesso aos antibióticos, antes caro e restrito, agora barato e acessível, culminou para o seu uso desenfreado, até mesmo para infecções triviais e não bacterianas (Ribeiro da Cunha; Fonseca; Calado, 2019; Uddin *et al.*, 2021). É indispensável ressaltar que a utilização de medicamentos fora das indicações apropriadas, ou em doses que não atendam a necessidade de cada indivíduo, ou ainda durante um período inadequado, caracteriza o uso de medicamentos como irracional e desnecessário (WHO, 2011). Alexander Fleming alertou para o uso inapropriado dos antibióticos, que, quando utilizados em quantidades insuficientes ou por um período muito curto, poderiam levar a mutações resistentes de bactérias, resultando em infecções mais graves para o hospedeiro ou para outras pessoas que o mesmo estivesse em contato ((Thakare *et al.*, 2020). O bacteriologista estava certo, conforme os antimicrobianos foram sendo utilizados indiscriminadamente, as bactérias se desenvolveram, aumentando seus níveis de complexidade, manifestando diferentes formas de resistência, fazendo com que a euforia ao redor dos antibióticos durasse pouco tempo (Machowska; Stålsby Lundborg, 2019; Tenover, 2006).

É importante lembrar que os antibióticos em si não são mutagênicos e nem responsáveis diretamente pela resistência que os microrganismos possuem. O mal uso do medicamento faz com que as bactérias mais suscetíveis sejam eliminadas, promovendo o estabelecimento de bactérias resistentes, abrindo caminho novamente, através de suas ferramentas genéticas, para a disseminação de sua resistência (Babakhani; Oloomi, 2018; Magalhães *et al.*, 2021). Um dos mecanismos de resistência mais estudados e conhecidos é o do *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina - antibiótico betalactâmico pertencente ao grupo das penicilinas. *S. aureus* é uma bactéria comensal gram-positiva, que coloniza aproximadamente 30% da pele e das membranas mucosas da população adulta saudável. Entretanto, está altamente associado a casos de infecções pulmonares, infecções de pele, endocardites e bacteremias (Jenul; Horswill, 2019; Siegel; Liu; Ton-That, 2016; Turner *et al.*, 2019). A bactéria ainda deu origem às cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), sendo um dos principais patógenos cuja

resistência traz grande preocupação global. A bactéria utiliza dois mecanismos principais de resistência: através de baixa afinidade pela proteína 2a de ligação acil-penicilina (PBP2a) e pela ação das betalactamases. A baixa afinidade pela PBP2a é atribuída a aquisição de um gene cassette *mecA*, que permite que a biossíntese de peptidoglicanos aconteça mesmo na presença de concentrações inibitórias de antibióticos. Além disso, a bactéria possui capacidade de desenvolver enzimas chamadas betalactamases, que hidrolisam o anel betalactâmico e desativam os fármacos da classe (Cook; Wright, 2022; Monaco *et al.*, 2017; Tooke *et al.*, 2019).

Assim, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), até mesmo casos de infecções bacterianas comuns como infecções no trato urinário e infecções respiratórias têm se tornado mais perigosas e letais devido às altas taxas de resistência aos antibióticos que são frequentemente utilizados nestas situações (WHO, 2021). Até o momento, nenhum método para reverter a resistência aos antibióticos é conhecido e mais de 70% das bactérias patogênicas desenvolveram resistência a pelo menos um antibiótico disponível no mercado. Logo, é um problema público de saúde global, que chama cada vez mais a atenção de pesquisadores e profissionais da saúde. Apesar disso, a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos tem diminuído nas últimas décadas devido à irresponsabilidade humana, a falhas científicas e a problemas regulatórios-econômicos, enquanto a disseminação da resistência bacteriana tem aumentado desenfreadamente. É imprescindível estimular a pesquisa tanto por parte da academia quanto por parte das indústrias farmacêuticas em relação ao desenvolvimento de novos medicamentos e de novas abordagens para enfrentar esta situação (Rao *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Desta forma, é primordial desenvolver novos fármacos de novas classes químicas e que possuam mecanismos de ação precisos contra as superbactérias, contando com um esforço a longo prazo e cooperação entre governos, indústrias e academia.

Uma alternativa na busca de novos compostos é através de plantas medicinais. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), plantas medicinais são plantas que possuem a capacidade de aliviar ou curar doenças, e possuem tradição de uso por uma população, que conheça, colha e prepare corretamente a planta (ANVISA, 2020). Há uma extensa diversidade de plantas medicinais que são utilizadas há muito tempo, principalmente em forma de tinturas,

chás, pós e outros tipos de formulações por diferentes comunidades. Ainda sim, existem diversos recursos naturais ao redor do mundo inexplorados capazes de nos fornecer opções para combater as bactérias. Os produtos naturais podem nos proporcionar compostos com alta complexidade estrutural, com baixa viabilidade sintética, com as mais distintas atividades terapêuticas e mecanismos de ação. Ademais, o avanço científico em áreas como química medicinal, biologia molecular e biotecnologia permite que moléculas com atividades farmacológicas provindas de plantas sirvam de inspiração ou possam ser isoladas e até mesmo modificadas, para o desenvolvimento racional e síntese de novos fármacos (Balunas; Kinghorn, 2005; Bérdy, 2012; Sen; Samanta, 2015). O desenvolvimento de fármacos a partir de plantas aconteceu pela primeira vez no início do século XIX por um farmacêutico alemão, Friedrich Sertürner, que isolou a morfina, potente agente analgésico, do ópio (Krishnamurti; Rao, 2016). Essa descoberta incentivou a busca por outros metabólitos com potencial terapêutico em outras plantas, principalmente os alcaloides, desencadeando o isolamento de inúmeras substâncias, que são conhecidas e utilizadas até hoje, como o ácido salicílico, a quinina, a capsaicina, entre outros (Atanasov *et al.*, 2015).

Melaleuca alternifolia Cheel (figura 5) é uma das principais espécies da família Myrtaceae, sendo popularmente conhecida como árvore do chá, do inglês *tea tree*, nome atribuído devido ao aroma de suas folhas ao preparar chás. É uma árvore com cerca de 7 metros de altura, nativa da Austrália, caracterizada por sua casca estratificada e escamosa, folhas oblongas e pontiagudas e flores em forma de espigas brancas, que conferem à árvore uma aparência “fofa”. É uma planta que cresce principalmente em regiões pantanosas ou próximas a rios. O principal produto desta planta medicinal é o seu óleo essencial, uma mistura complexa de metabólitos secundários voláteis, que está ligada à sua propriedade terapêutica, e que é obtido através de arraste a vapor ou hidrodestilação de folhas e ramos terminais (Carson; Hammer; Riley, 2006; Lam *et al.*, 2018).



Figura 5: Ramos terminais e flores de *Melaleuca alternifolia* (Domínio público).

Por muito tempo os aborígenes, nativos australianos, utilizavam o óleo de *M. alternifolia* para tratar feridas infectadas, picadas de inseto ou outros tipos de lesões na pele. Preparavam a planta a partir da maceração de folhas e ramos e a aplicavam utilizando uma compressa de lama quente (Budhiraja *et al.*, 1999). Atualmente, o óleo continua sendo utilizado em produtos voltados para o tratamento da acne em diferentes formas farmacêuticas como sabonetes, géis, tônicos, entre outros, visto que possui atividade antimicrobiana de amplo espectro (Hammer, 2015). Além disso, outros estudos presentes na literatura demonstram que o óleo, rico em monoterpenos, apresenta propriedades antifúngicas, antivirais e anti-inflamatórias (Hammer; Carson; Riley, 1998; Pazyar *et al.*, 2013; Salvatori *et al.*, 2017; Schnitzler; Schön; Reichling, 2001). O óleo essencial da *M. alternifolia*, não diferente dos outros óleos essenciais, é constituído por mais de 100 componentes, sendo a maioria monoterpenos, sesquiterpenos e compostos fenólicos. Sua composição é documentada pela ISO 4730, (tabela 1), onde observamos que 35% a 48% da composição pode ser pela presença do composto terpinen-4-ol (ISO, 2017; Carson; Hammer; Riley, 2006; Da Silva *et al.*, 2020; Wińska *et al.*, 2019).

Tabela 1: Composição do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

Componentes do óleo essencial de <i>Melaleuca</i>	Composição (%)
Terpinen-4-ol	35,0 - 48,0
γ -terpineno	14,0 - 28,0

α -terpineno	6,0 - 12,0
1,8-cineol	Traços - 10,0
Terpinoleno	1,5 - 5,0
ρ -cimeno	0,5 - 8,0
α -pineno	1,0 - 4,0
α -terpineol	2,0 - 5,0
Aromadendreno	0,2 - 3,0
δ -cadineno	0,2 - 3,0
Limoneno	0,5 - 1,5
Sabineno	Traços - 3,5
Viridifloreno	0,1 - 3,0

Fonte: International Organization for Standardization, 2017

A atividade do óleo essencial da *M. alternifolia* está altamente associada ao seu composto majoritário terpinen-4-ol (figura 6). Além disso, estudos mostram que o terpinen-4-ol está amplamente correlacionado com a atividade antimicrobiana, apresentando efeitos farmacológicos similares tanto no óleo quanto de forma isolada (Lee *et al.*, 2013). Para testar estas propriedades, pesquisadores frequentemente utilizam ensaios *in vitro* contra diferentes espécies bacterianas, como o *S. aureus*, que apresenta cepas resistentes a antibióticos - e observam que a molécula aparenta ter uma atividade eficaz, sugerindo que o terpinen-4-ol pode vir a ser utilizado para aplicações terapêuticas (Ferrini *et al.*, 2006; Oliva *et al.*, 2018; Sharifi-Rad *et al.*, 2017). Cordeiro e colaboradores apresentaram dados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,25% e uma Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 0,5% para diferentes cepas de *S. aureus*, demonstrando uma atividade antibactericida (Cordeiro *et al.*, 2020).

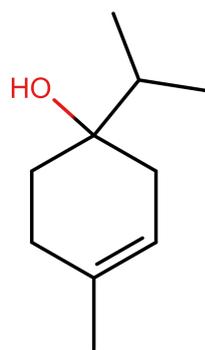


Figura 6: Estrutura do terpinen-4-ol.

Um estudo demonstrou através do *docking* molecular (DM) - técnica *in silico* para avaliar as interações entre um alvo biológico e um ligante - que o terpinen-4-ol apresenta uma importante interação com a PBP2a de *S. aureus* (Cordeiro *et al.*, 2020; Morris; Lim-Wilby, 2008). A pesquisa apontou que terpinen-4-ol realiza duas ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Ser403 e Ser462; uma interação alquil com Met641; e 12 interações do tipo *Van der Waals*, onde as interações mais importantes ocorrem com a Lys406 e a Thr600, que ancoram a molécula no sítio ativo da proteína e correspondem a duas das três principais interações realizadas entre a proteína e a penicilina G, que correspondem a Lys406, Thr600 e Ser403 (figura 7) (Cordeiro *et al.*, 2020).

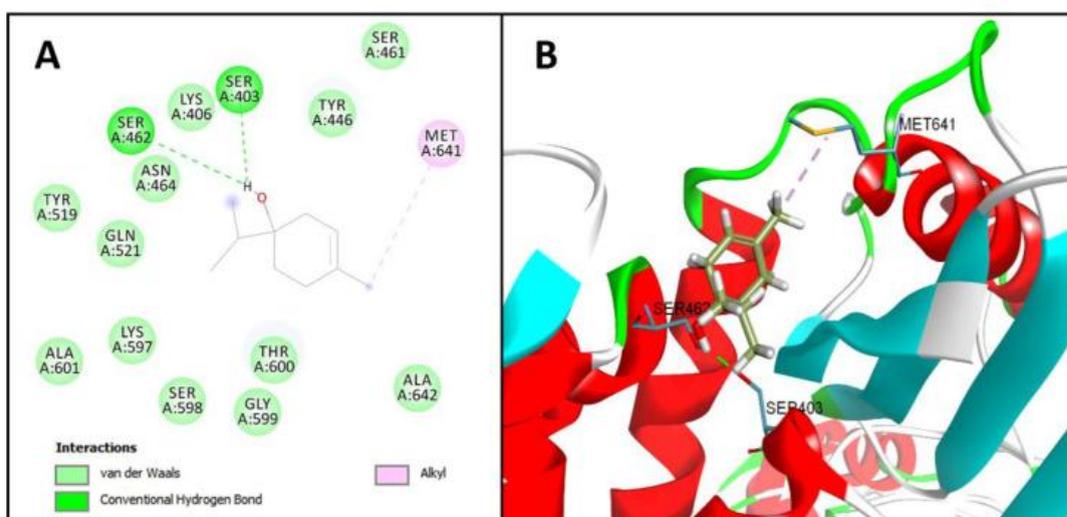


Figura 7: Representação das interações entre o terpinen-4-ol e a PBP2a (Fonte: Cordeiro *et al.*, 2020).

Essas informações reforçam que produtos naturais como *M. alternifolia* nos fornecem excelentes alternativas para tratar infecções bacterianas ou ainda mesmo utilizar os seus metabólitos como protótipos para modificações estruturais, que podem aumentar consideravelmente sua atividade terapêutica. As alterações estruturais de compostos já existentes podem proporcionar não só uma melhora em parâmetros farmacocinéticos, mas também em uma melhora em parâmetros farmacodinâmicos de um composto. Logo, podem trazer avanços em condições de solubilidade, absorção e estabilidade, e ainda permitir a ampliação do espectro de certas moléculas, dependendo do tipo de modificação realizada. As plantas medicinais possuem propriedades inerentes que podem ser aplicadas a favor da saúde, e seus produtos com alterações pertinentes podem se tornar um caminho para enfrentar os problemas de saúde atualmente. No caso do terpinen-4-ol, realizar modificações estruturais em uma molécula que possui atividade antimicrobiana conhecida e que apresenta um alvo identificado, torna a molécula extremamente atrativa para estudo, oferecendo uma importante oportunidade de potencializar a ação do composto e uma oportunidade de retomar a busca por novos antimicrobianos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Planejar, utilizando metodologia *in silico*, moléculas derivadas do terpinen-4-ol visando aprimorar suas interações com a PBP2a, a fim de potencializar sua atividade antimicrobiana.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver derivados do terpinen-4-ol por meio de estratégias de planejamento racional de fármacos.

Realizar o *Docking* Molecular dos derivados do terpinen-4-ol e identificar as interações dos compostos desenvolvidos com a PBP2a.

Mensurar as interações dos compostos desenvolvidos por meio do *goldscore*.

Correlacionar as interações entre os novos ligantes e a PBP2a com as interações entre antibióticos conhecidos e a PBP2a.

Selecionar os 5 melhores compostos para realizar análises detalhadas das interações com a PBP2a, a fim de definir um grupo de ligantes para estudos posteriores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DESENVOLVIMENTO

A metodologia empregada neste trabalho consistiu em realizar diferentes modificações estruturais em diferentes posições do terpinen-4-ol, que não possuíam interações com os resíduos de aminoácidos do receptor (Cordeiro *et al.*, 2020). Foram determinadas as posições 1, 2 e 3 (figura 8) de acordo com Cordeiro e colaboradores, visto que os dados já apresentam-se publicados na literatura, no terpinen-4-ol para inserção de diferentes grupos, avaliando as interações entre as moléculas derivadas do terpinen-4-ol e a PBP2a através da técnica de *docking* molecular. O processo foi executado em três etapas, onde na primeira etapa foi realizado o DM com todos os substituintes na posição 1, com todos os substituintes na posição 2 e com todos os substituintes na posição 3. Na segunda etapa em 2 posições diferentes com os substituintes idênticos em ambas posições, e na terceira etapa em 3 posições simultaneamente com substituintes diferentes. Para as etapas 2 e 3 foram selecionados os 4 melhores substituintes de acordo com seu *goldscore* na etapa 1. Quanto maior o *goldscore* obtido para a estrutura, mais forte a interação entre ligante e receptor.

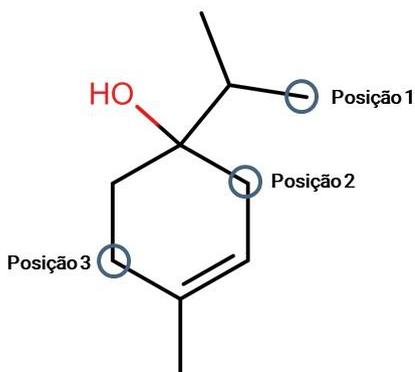


Figura 8: Estrutura do Terpinen-4-ol com as diferentes posições para substituição destacadas.

3.1.1. Substituintes

Para as moléculas derivadas do terpinen-4-ol, o diagrama de Craig (figura 9) foi adotado como estratégia para o planejamento racional das estruturas, sendo uma abordagem simples, contudo, eficiente. O diagrama de Craig é um sistema cartesiano que possibilita a seleção de substituintes de acordo com duas propriedades físico-químicas: sua constante de hidrofobicidade (π) e sua constante de distribuição eletrônica (σ) (Craig, 1971; Ertl, 2020). No eixo da abscissa apresentam-se os valores de π , enquanto no eixo da ordenada apresentam-se os valores de σ . O valor de π é uma medida de hidrofobicidade de um substituinte em relação ao hidrogênio, logo, um valor positivo de π indica que o substituinte é mais hidrofóbico em relação ao hidrogênio, enquanto um valor negativo de π indica que o substituinte é menos hidrofóbico em relação ao hidrogênio. Já o valor de σ é uma medida relacionada à capacidade de doação de elétrons dos substituintes. Valores positivos de σ indicam que o substituinte é retirador de elétrons, enquanto valores negativos de σ indicam que o substituinte é doador de elétrons. Os grupos são distribuídos nos diferentes quadrantes de acordo com as propriedades citadas (Hansch *et al.*, 1973; Hansch; Leo; Taft, 1991).

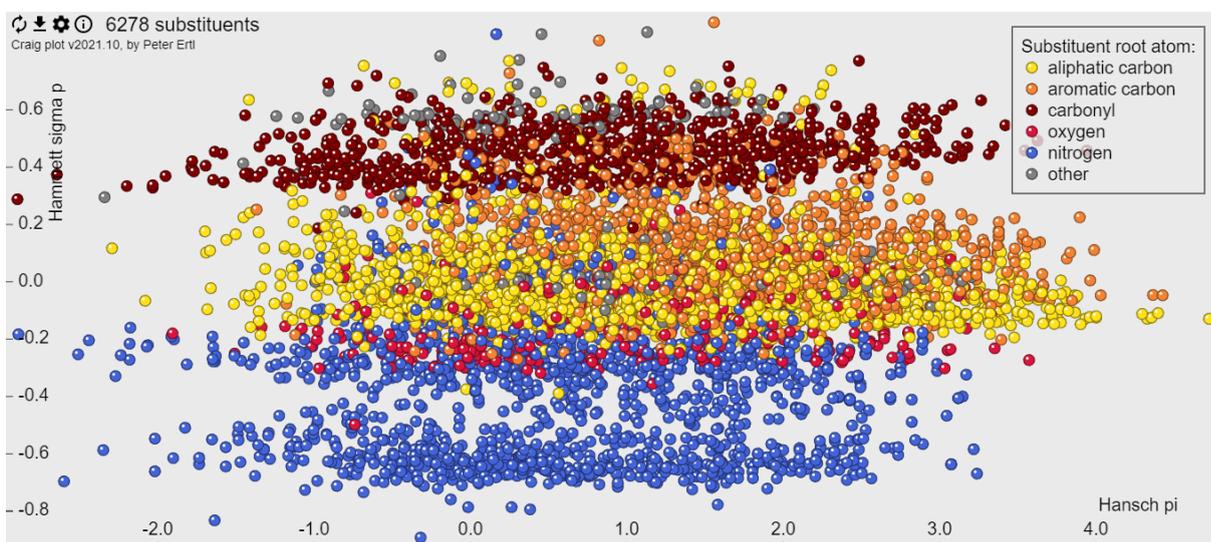


Figura 9: Diagrama de Craig 2.0 (Ertl, 2020).

A partir do diagrama, foram definidos a alteração na molécula, representado por (1) e a inserção de diferentes grupos para as substituições compreendidos entre os números (2) e (16) (figura 10) de maneira que todos os quadrantes fossem explorados.

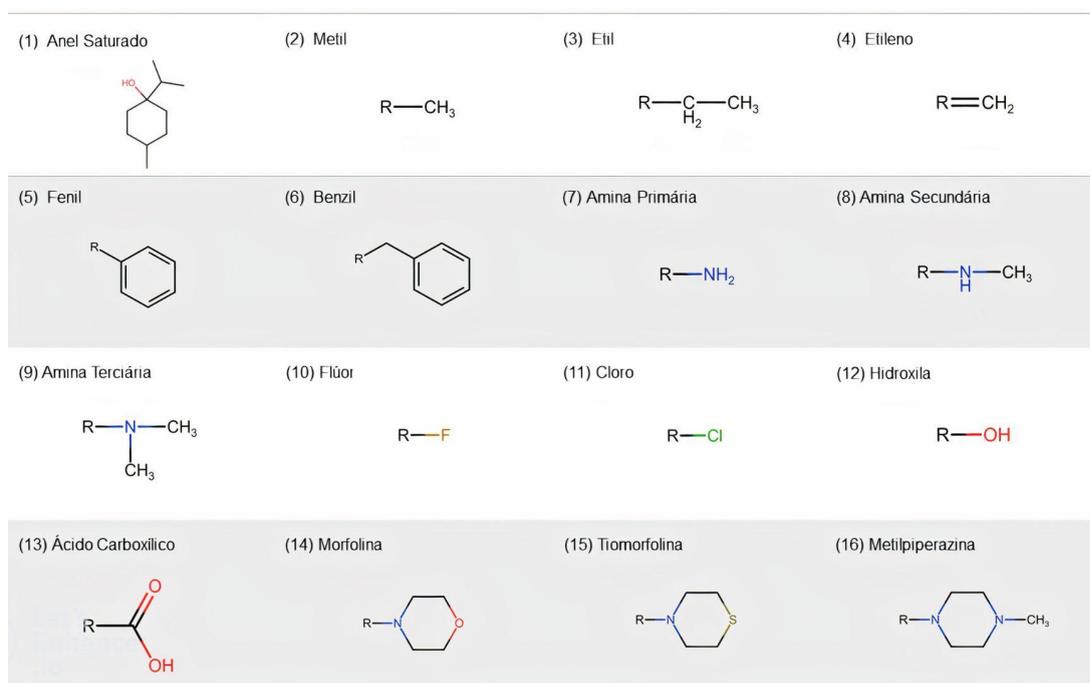


Figura 10: Alteração e estruturas dos substituintes avaliados.

Para realizar uma avaliação mais completa foram utilizados padrões de interação com a PBP2a, a fim de comparar as interações das moléculas propostas com o terpinen-4-ol, o ligante base utilizado, além de três antibióticos comerciais que atuam nesse mesmo alvo. Dessa forma, as moléculas padrão escolhidas foram o próprio terpinen-4-ol, molécula base de estudo; a penicilina G, antibiótico mais conhecido do grupo das penicilinas, estando cocristalizado à proteína obtida; a oxacilina, antibiótico do grupo das penicilinas, sendo a única representante do Brasil das penicilinas resistentes à ação das beta-lactamases, de acordo com a ANVISA (ANVISA, 2023) e a cefalexina, antibiótico do grupo das cefalosporinas, de primeira geração, que apresenta ocasionalmente resistência às betalactamases (Umolu; Okoli; Izomoh, 2002). Todos os compostos padrão escolhidos apresentam interações conhecidas com a PBP2a (Cordeiro *et al.*, 2020; Fergestad *et al.*, 2020; Pardo *et al.*, 2022).

3.1.2. Ligantes

Além do terpinen-4-ol, foram construídas 83 estruturas derivadas do mesmo, e os antibióticos Penicilina G, Oxacilina e Cefalexina no *software Gabedit* (Allouche,

2011), otimizadas com a ferramenta de otimização de mecânica molecular do próprio *software*, onde foi empregado o modelo Amber. As estruturas foram convertidas para o formato *.pdb* e submetidas ao *Automated Topology Builder (ATB) and Repository Version 3.0* (Malde *et al.*, 2011) para a minimização de energia, onde a molécula é inicialmente otimizada no nível teórico HF/STO-3G (ou AM1 ou PM3). Moléculas que possuem menos de 50 átomos em sua estrutura são reotimizadas no B3LYP/6-31G. Os arquivos foram obtidos em *.mol2*, sendo utilizados como os arquivos de entrada para o *software GOLD* versão 2022 1.0 (Jones *et al.*, 1997).

3.1.3. Receptor

A macromolécula utilizada foi a estrutura da proteína 2a de ligação acil-penicilina a penicilina G de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina cepa 27r com resolução de 2,45 Å, obtida por cristalografia de raio-x, a partir do banco de dados *Protein Data Bank*, código 1MWT (RCSB PDB, 2002).

3.1.4. Docking Molecular

O DM foi realizado utilizando o *software GOLD*, que emprega um algoritmo que estima a energia livre de ligação de um ligante a uma proteína (Eldridge *et al.*, 1997). O programa permite a determinação de uma *grid box*, ou seja, um espaço definido para que os ligantes interajam com uma parte específica da proteína. Neste caso, as coordenadas utilizadas no sítio ativo foram $x = 27,987783$, $y = 28,938739$, $z = 87,527565$, baseadas nas coordenadas já existentes entre o terpinen-4-ol e a PBP2a (Cordeiro *et al.*, 2020). Para o docking foi necessário a adição de hidrogênios pelo *software*, visto que não são representados em proteínas obtidas por cristalografia de raio-x, e a remoção de águas e outros cofatores como o íon Cádmio e o íon Cloreto, pois os mesmos não participam das interações do DM no sítio ativo da enzima, e poderiam influenciar no resultado do mesmo. Para a análise dos resultados foi determinada a utilização do *goldscore.fitness*, uma pontuação baseada no campo de força composta pelos seguintes componentes: energia externa de ligação de hidrogênio entre ligante-proteína; energia externa de *Van der Waals* entre ligante e proteína; energia interna de *Van der Waals* entre ligante e proteína; e energia de ligação de hidrogênio intramolecular do ligante. A pontuação da energia externa de *Van der Waals* é multiplicada por um fator de 1,375 quando o *goldscore.fitness* final é calculado. O termo *fitness* é utilizado pois otimiza a previsão

das posições de ligação do ligante no sítio ativo (Annamala; Inampudi; Guruprasad, 2007). Para cada composto, foram analisadas 10 diferentes poses das moléculas no sítio de ligação da proteína. Logo, o *software* indica uma pontuação para cada conformação, onde quanto maior o *goldscore.fitness*, maior a interação com o alvo (Verdonk *et al.*, 2003). Os arquivos entre os complexos ligante-proteína foram salvos e as interações foram analisadas pelo *software Discovery Studio* (BIOVIA, 2020).

3.1.5.Redocking

Para validar o método de *docking* molecular, ou seja, avaliar a capacidade do *software* de prever com exatidão a geometria de ancoragem da molécula, é imprescindível a realização do redocking. O redocking consiste em realizar o *docking* do ligante cristalografado - penicilina G - à proteína advinda do site PDB - PBP2a. Os resultados são comparados com a conformação original da penicilina G com a proteína PBP2a. São avaliados em relação ao *Root Mean Square Deviation* (RMSD, em português Desvio Médio Quadrático), onde o valor aceitável deve ser menor que 2 Angstroms ($\leq 2\text{\AA}$) para a conformação mais estável. Este procedimento é realizado apenas uma vez, com o ligante que foi cristalografado na proteína, antes do início dos *dockings* moleculares com as outras moléculas em estudo (Corbeil; Williams; Labute, 2012; Kufareva; Abagyan, 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Redocking

Os resultados para o redocking estão dispostos na tabela 2, onde foi encontrado um valor menor que 2\AA para a conformação mais estável (6).

Tabela 2: Valores de RMSD obtidos no Redocking

Conformação	Valores de RMSD
Conformação 6	1,8445
Conformação 1	1,9995
Conformação 7	2,3105
Conformação 3	2,3581
Conformação 8	2,3948
Conformação 4	2.4250

Conformação 5	2.4770
Conformação 9	4.3637
Conformação 10	4.4205
Conformação 2	4.4569

4.2 Docking Molecular

Inicialmente, são apresentados os resultados do *goldscore.fitness* para as moléculas padrão Terpinen-4-ol, Penicilina G, Cefalexina e Oxacilina nas tabelas 3, 4, 5 e 6, respectivamente. O terpinen-4-ol obteve a menor média (31,1599) e em sua conformação mais estável obteve um escore de 31,7284 (conformação 1). A Penicilina G exibiu um escore médio de 50,7690 com um maior escore de 53,3799 para a conformação de interação mais forte (conformação 7). A Cefalexina obteve um escore médio de 49,2567 e um maior escore de 55,7600 para conformação de maior escore (conformação 7). Por fim, a Oxacilina apresentou a maior média entre os padrões (59,2613) e um maior escore (59,7704) para a conformação 10.

Tabela 3: *Goldscore.fitness* obtidos para o Terpinen-4-ol

Conformação	Escore
Conformação 1	31,7284
Conformação 10	31,6553
Conformação 3	31,2581
Conformação 2	31,2352
Conformação 5	31,1219
Conformação 6	31,0514
Conformação 4	30,9914
Conformação 7	30,9192
Conformação 9	30,8288
Conformação 8	30,8101
Média ± Desvio Padrão	31,1599 ± 0,303

Tabela 4: *Goldscore.fitness* obtidos para a Penicilina G

Conformação	Escore
-------------	--------

Conformação 7	53,3799
Conformação 8	52,8318
Conformação 4	52,7264
Conformação 6	52,4261
Conformação 5	52,2671
Conformação 3	49,9970
Conformação 1	49,2934
Conformação 10	48,3017
Conformação 9	48,2863
Conformação 2	48,1807
Média ± Desvio Padrão	50,7690 ± 2,040

Tabela 5: *Goldscore.fitness* obtidos para a Cefalexina

Conformação	Escore
Conformação 7	55,7660
Conformação 8	54,1534
Conformação 10	51,2395
Conformação 2	51,1253
Conformação 9	50,6731
Conformação 5	49,5390
Conformação 1	45,7208
Conformação 6	45,3333
Conformação 4	45,1556
Conformação 3	43,8611
Média ± Desvio Padrão	49,2567 ± 3,869

Tabela 6: *Goldscore.fitness* obtidos para a Oxacilina

Conformação	Escore
Conformação 10	59,7704
Conformação 2	59,6001
Conformação 4	59,4512

Conformação 1	59,4374
Conformação 9	59,4305
Conformação 6	59,3104
Conformação 8	59,2002
Conformação 5	59,1244
Conformação 3	58,9955
Conformação 7	58,2929
Média ± Desvio Padrão	59,2613 ± 0,388

Como mencionado anteriormente, o *docking* molecular foi realizado em 3 etapas utilizando os substituintes descritos na figura 10 (Metodologia) ligados às posições 1, 2 e 3. Ao final, as melhores moléculas foram obtidas. Foram realizados no total 83 dockings com estes compostos. A seguir estão apresentados os resultados, onde para cada molécula derivada do terpinen-4-ol, o número entre parênteses refere-se ao substituinte ligado a posição em discussão.

Docking Molecular com substituintes na posição 1

Na tabela 7 estão expostos as médias dos *goldscore.fitness* para os grupos com substituintes na posição 1. É possível observar que a saturação do anel presente na molécula, representada pelo grupo 1(1), não trouxe grande diferença nos escores quando comparado ao terpinen-4-ol. Por esse motivo, para todas as outras moléculas a ligação dupla foi mantida. Além disso, os substituintes benzil, representado por 1(6), tiomorfolina, representado por 1(15), e metilpiperazina, representado por 1(16), apresentaram médias de escores de 43,3844, 41,3529 e 41,0547 respectivamente, ou seja, médias superiores à média apresentada pelo terpinen-4-ol. Todas as conformações e os *goldscore.fitness* das moléculas com substituintes na posição 1 estão contidas no Apêndice A.

Tabela 7: Médias e maiores *goldscore.fitness* para os grupos com substituintes na posição 1

Grupos	Média de Escores ± Desvio Padrão	Conformação de Maior Escore	Maior Escore
1(1) Anel Saturado	32,8198 ± 0,654	Conformação 6	33,8719
1(2) Metil	34,8533 ± 0,540	Conformação 6	35,5397

1(3) Etil	38,1691 ± 0,272	Conformação 1	38,5033
1(4) Etileno	32,7850 ± 0,570	Conformação 7	33,7737
1(5) Fenil	40,7685 ± 0,743	Conformação 3	42,0615
1(6) Benzil	43,3844 ± 0,857	Conformação 4	44,7020
1(7) Amina Primária	35,8015 ± 0,204	Conformação 5	36,2544
1(8) Amina Secundária	39,4113 ± 0,161	Conformação 1	39,7122
1(9) Amina Terciária	36,8690 ± 1,014	Conformação 1	38,9560
1(10) Flúor	33,5727 ± 0,294	Conformação 8	33,9457
1(11) Cloro	36,5779 ± 1,407	Conformação 8	37,7618
1(12) Hidroxila	34,6846 ± 0,501	Conformação 1	35,3528
1(13) Ácido Carboxílico	37,8178 ± 0,934	Conformação 8	38,8101
1(14) Morfolina	39,3239 ± 1,159	Conformação 4	40,1654
1(15) Tiomorfolina	41,3529 ± 0,960	Conformação 10	42,4884
1(16) Metilpiperazina	41,0547 ± 0,494	Conformação 1	41,7974
Terpinen-4-ol	31,1599 ± 0,303	Conformação 1	31,7284
Penicilina G	50,7690 ± 2,040	Conformação 7	53,3799
Cefalexina	49,2567 ± 3,869	Conformação 7	55,7660
Oxacilina	59,2613 ± 0,388	Conformação 10	59,7704

Docking Molecular com substituintes na posição 2

A partir da tabela 8 podemos observar as médias do *goldscore.fitness* para os grupos com substituintes na posição 2. Em relação aos resultados obtidos, o fenil, representado por 2(5), o benzil, representado por 2(6), e a tiomorfolina, representada por 2(15), obtiveram médias de *goldscore.fitness* de 40,6407, 41,0428 e 39,6042, respectivamente. Estas médias demonstram ser as mais altas para a posição 2, com valores próximos das médias dos substituintes na posição 1 e novamente superando a média obtida para o terpinen-4-ol. Todas as conformações e os *goldscore.fitness* das moléculas com substituintes na posição 2 estão contidas no Apêndice B.

Tabela 8: Médias e maiores *goldscore.fitness* para os grupos com substituintes na posição 2

Grupos	Média de Escores ± Desvio Padrão	Conformação de Maior Escore	Maior Escore
--------	-------------------------------------	--------------------------------	--------------

2(2) Metil	35,2191 ± 0,284	Conformação 8	35,6300
2(3) Etil	37,8505 ± 1,381	Conformação 5	38,9134
2(4) Etileno	35,4846 ± 0,579	Conformação 3	36,3538
2(5) Fenil	40,6407 ± 2,548	Conformação 10	42,8898
2(6) Benzil	41,0428 ± 2,922	Conformação 3	46,6627
2(7) Amina Primária	33,5286 ± 0,155	Conformação 4	33,7858
2(8) Amina Secundária	34,3747 ± 3,363	Conformação 6	36,1741
2(9) Amina Terciária	34,3063 ± 0,543	Conformação 1	35,1444
2(10) Flúor	31,5607 ± 0,676	Conformação 9	32,3826
2(11) Cloro	32,5788 ± 0,614	Conformação 10	33,0231
2(12) Hidroxila	32,3323 ± 0,173	Conformação 1	32,6416
2(13) Ácido Carboxílico	35,3170 ± 0,672	Conformação 10	35,7863
2(14) Morfolina	36,5811 ± 2,138	Conformação 9	40,3509
2(15) Tiomorfolina	39,6042 ± 2,441	Conformação 8	43,0523
2(16) Metilpiperazina	36,1812 ± 3,600	Conformação 6	40,7322
Terpinen-4-ol	31,1599 ± 0,303	Conformação 1	31,7284
Penicilina G	50,7690 ± 2,040	Conformação 7	53,3799
Cefalexina	49,2567 ± 3,869	Conformação 7	55,7660
Oxacilina	59,2613 ± 0,388	Conformação 10	59,7704

Docking Molecular com substituintes na posição 3

Em relação aos substituintes na posição 3, é possível visualizar as médias do *goldscore.fitness* apresentados na tabela 9. Os melhores substituintes para a posição 3 foram o fenil, representado por 3(5), o benzil, representado por 3(6), e a metilpiperazina, representada por 3(16). Os grupos apresentaram médias de *goldscore.fitness* de 40,8226, 45,5397, 40,3762, respectivamente. As médias para estes grupos foram mais altas que a média obtida para o terpinen-4-ol e próxima as médias dos substituintes da posição 1 e 2. Em todas as posições testadas, obtivemos os mesmos substituintes com os melhores resultados: fenil, benzil, tiomorfolina e metilpiperazina. Todas as conformações e os *goldscore.fitness* das moléculas com substituintes na posição 3 estão contidas no Apêndice C.

Tabela 9: Médias e maiores *goldscore.fitness* para os grupos com substituintes na posição 3

Grupos	Média de Escores \pm Desvio Padrão	Conformação de Maior Escore	Maior Escore
3(2) Metil	33,4451 \pm 0,276	Conformação 9	33,8536
3(3) Etil	35,1277 \pm 0,620	Conformação 8	35,8965
3(4) Etileno	34,5420 \pm 0,865	Conformação 6	36,2991
3(5) Fenil	40,8226 \pm 0,582	Conformação 3	41,4412
3(6) Benzil	45,5397 \pm 1,767	Conformação 5	47,9316
3(7) Amina Primária	33,8297 \pm 0,249	Conformação 8	34,1588
3(8) Amina Secundária	35,0102 \pm 1,345	Conformação 7	37,1537
3(9) Amina Terciária	34,2550 \pm 1,088	Conformação 5	36,2966
3(10) Flúor	33,4430 \pm 0,285	Conformação 10	33,8803
3(11) Cloro	33,2577 \pm 0,749	Conformação 9	34,0368
3(12) Hidroxila	33,9610 \pm 1,136	Conformação 10	35,3896
3(13) Ácido Carboxílico	34,0557 \pm 0,438	Conformação 1	35,0918
3(14) Morfolina	37,6334 \pm 0,954	Conformação 1	38,2962
3(15) Tiomorfolina	39,9882 \pm 0,729	Conformação 10	41,8925
3(16) Metilpiperazina	40,3762 \pm 0,246	Conformação 1	40,9853
Terpinen-4-ol	31,1599 \pm 0,303	Conformação 1	31,7284
Penicilina G	50,7690 \pm 2,040	Conformação 7	53,3799
Cefalexina	49,2567 \pm 3,869	Conformação 7	55,7660
Oxacilina	59,2613 \pm 0,388	Conformação 10	59,7704

Docking Molecular com compostos dissubstituídos

Para a etapa de DM em duas posições diferentes com os mesmos substituintes foram selecionados os 4 melhores grupos, ou seja, os 4 grupos com os melhores *goldscore.fitness* da primeira etapa. Estes substituintes, que incluem o fenil, o benzil, a tiomorfolina e a metilpiperazina, foram substituídos nas posições 1 e 2, 1 e 3, e 2 e 3, originando compostos dissubstituídos. Logo, cada grupo escolhido gerou 3 novas moléculas. Como exemplo podemos citar o grupo fenil, que originou moléculas derivadas do terpinen-4-ol com fenil substituído nas posições 1 e 2, 1 e 3, e 2 e 3. Assim ocorreu com os outros três grupos selecionados.

As médias de *golscore.fitness* para os compostos dissubstituídos estão apresentadas na tabela 10. É possível analisar que com duas substituições as médias das novas moléculas se aproximaram mais das médias obtidas para os antibióticos comerciais, definitivamente superando a média obtida para o terpinen-4-ol. É importante destacar nesta etapa que a molécula com fenil substituído na posição 1 e 3, representado por 1(fenil)3(fenil), obteve a primeira média de escore, 49,8580, maior que a média de um antibiótico, a Cefalexina, 49,2567. Todas as conformações e os *golscore.fitness* das moléculas dissubstituídas estão contidas no Apêndice D.

Tabela 10: Médias e maiores *golscore.fitness* para os compostos dissubstituídos

Compostos dissubstituídos	Média de Escores ± Desvio Padrão	Conformação de Maior Escore	Maior Escore
1(fenil)2(fenil)	43,3520 ± 4,904	Conformação 7	50,4497
1(fenil)3(fenil)	49,8580 ± 0,852	Conformação 5	50,6514
2(fenil)3(fenil)	46,7999 ± 2,710	Conformação 3	49,0150
1(benzil)2(benzil)	41,8382 ± 3,897	Conformação 6	48,6024
1(benzil)3(benzil)	47,5278 ± 2,293	Conformação 2	52,6336
2(benzil)3(benzil)	44,8644 ± 2,778	Conformação 9	48,5414
1(tiomorfolina) 2(tiomorfolina)	40,6547 ± 3,287	Conformação 10	47,3163
1(tiomorfolina) 3(tiomorfolina)	39,6298 ± 3,404	Conformação 5	47,6130
2(tiomorfolina) 3(tiomorfolina)	36,7345 ± 7,267	Conformação 2	45,1021
1(metilpiperazina) 2(metilpiperazina)	39,2085 ± 2,108	Conformação 2	42,4507
1(metilpiperazina) 3(metilpiperazina)	40,8701 ± 0,993	Conformação 10	42,5101
2(metilpiperazina) 3(metilpiperazina)	35,1115 ± 3,347	Conformação 1	37,0437
Terpinen-4-ol	31,1599 ± 0,303	Conformação 1	31,7284
Penicilina G	50,7690 ± 2,040	Conformação 7	53,3799
Cefalexina	49,2567 ± 3,869	Conformação 7	55,7660
Oxacilina	59,2613 ± 0,388	Conformação 10	59,7704

Docking Molecular com compostos trissubstituídos

Para a etapa de DM em 3 posições diferentes com substituintes diferentes, novamente foram utilizados os 4 melhores grupos da etapa anterior, correspondendo ao fenil, o benzil, a tiomorfolina e a metilpiperazina. Seguindo o planejamento racional de fármacos, decidiu-se fixar um grupo na posição 1 e alternar todos os grupos, incluindo o grupo fixado, nas posições 2 e 3. Para decidir qual grupo seria fixado, as médias dos substituintes na posição 1 durante a segunda etapa foram avaliadas, apresentadas na tabela 11.

Tabela 11: Médias do *goldscore.fitness* para os compostos com substituintes na posição 1 da segunda etapa

Compostos dissubstituídos na	Média de Escores
1(fenil)2(fenil) + 1(fenil)3(fenil)	46,6050 ± 4,600
1(benzil)2(benzil) + 1(benzil)3(benzil)	44,6830 ± 4,023
1(tiomorfolina)2(tiomorfolina) + 1(tiomorfolina)3(tiomorfolina)	40,1422 ± 0,725
1(metilpiperazina)2(metilpiperazina) + 1(metilpiperazina)3(metilpiperazina)	40,0393 ± 1,175

O grupo fenil apresentou o melhor resultado na posição 1, com uma média de 46,60504. Todavia, quando substituído na molécula, o fenil estaria extremamente próximo ao anel principal e devido ao seu tamanho, poderia gerar um impedimento espacial, dificultando uma eventual síntese desse composto. Logo, por possuir um espaçador de um carbono, e aparecer com a segunda melhor média na posição 1, o grupo benzil foi o escolhido para ser fixado (figura 11).

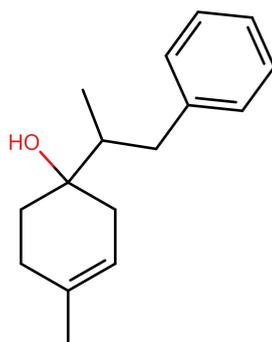


Figura 11: Molécula derivada do terpinen-4-ol com o grupo benzil fixado na posição 1 previamente determinada.

Além disso, novamente, visando executar um planejamento racional, decidiu-se eliminar um substituinte para os próximos dockings com moléculas trissubstituídas. Assim, a média geral dos compostos dissustituídos foi avaliada, e o grupo substituinte com a menor média, correspondente a metilpiperazina como mostra a tabela 12, foi excluído da etapa.

Tabela 12: Médias do *goldscore.fitness* para os compostos dissustituídos

Compostos dissustituídos	Média Geral de Escores
1(fenil)2(fenil) + 1(fenil)3(fenil) + 2(fenil)3(fenil)	46,6699 ± 3,255
1(benzil)2(benzil) + 1(benzil)3(benzil) + 2(benzil)3(benzil)	44,7434 ± 2,847
1(tiomorfolina)2(tiomorfolina) + 1(tiomorfolina)3(tiomorfolina) + 2(tiomorfolina)3(tiomorfolina)	39,0063 ± 2,033
1(metilpiperazina)2(metilpiperazina) + 1(metilpiperazina)3(metilpiperazina) + 2(metilpiperazina)3(metilpiperazina)	38,3976 ± 2,964

Logo, para a última sequência de dockings moleculares, o substituinte benzil foi fixado, e a alternância entre os grupos fenil, benzil e tiomorfolina nas posições 2 e 3 foi feita, de maneira que todas as combinações fossem abordadas. Outrossim, foi realizado o DM com o mesmo substituinte nas três posições, por exemplo, o fenil foi substituído nas posições 1, 2 e 3. O mesmo ocorreu para o benzil e para a tiomorfolina.

Para os compostos trissubstituídos, as médias do *goldscore.fitness* estão representadas na tabela 13. Foram selecionados os cinco melhores compostos para uma análise detalhada das interações, sendo eles a molécula **1**, 1(benzil)2(fenil)3(benzil) com escore médio 59,5516; a molécula **2**, 1(benzil)2(fenil)3(fenil) com escore médio 59,4580; a molécula **3**, 1(benzil)2(benzil)3(tiomorfolina) com escore médio 54,0290; a molécula **4**, 1(benzil)2(benzil)3(tiomorfolina) com escore médio 50,2267; e a molécula **5**, 1(fenil)2(fenil)3(fenil) com escore médio 49,4322. Estas moléculas serão posteriormente analisadas com mais detalhes. Todas as conformações e os *goldscore.fitness* das moléculas trissubstituídas estão contidas no Apêndice E.

Tabela 13: Médias e maiores *goldscore.fitness* para os 5 compostos trissubstituídos

Compostos Trissubstituídos	Média de Escores ± Desvio Padrão	Conformação de Maior Escore	Maior Escore
1(fenil)2(fenil)3(fenil)	49,4322 ± 5,584	Conformação 3	55,9528
1(benzil)2(fenil)3(fenil)	59,4580 ± 1,144	Conformação 3	61,2185
1(benzil)2(fenil)3(benzil)	59,5516 ± 1,359	Conformação 4	63,1257
1(benzil)2(fenil)3(tiomorfolina)	54,0290 ± 0,794	Conformação 10	55,1759
1(benzil)2(benzil)3(tiomorfolina)	50,2267 ± 5,035	Conformação 5	57,2214
Terpinen-4-ol	31,1599 ± 0,303	Conformação 1	31,7284
Penicilina G	50,7690 ± 2,040	Conformação 7	53,3799
Cefalexina	49,2567 ± 3,869	Conformação 7	55,7660
Oxacilina	59,2613 ± 0,388	Conformação 10	59,7704

As 5 moléculas com maiores médias de *goldscore.fitness* foram selecionadas para uma avaliação mais completa de suas interações. A análise está disposta da menor média de *goldscore.fitness* para a maior média de *goldscore.fitness* dentre as moléculas selecionadas.

Molécula 5 - 1(fenil)2(fenil)3(fenil)

A quinta melhor molécula, identificada como molécula 5 (figura 12), possui o fenil como substituinte nas posições 1, 2 e 3. Sua conformação mais estável

(conformação 3) obteve um escore de 55,9528 com um *goldscore.fitness* médio de 49,4322, como mostra a tabela 14.

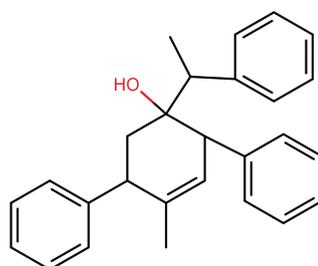


Figura 12: Estrutura da molécula 5.

Tabela 14: Escores obtidos para a molécula 5

Conformação	Escore
Conformação 3	55,9528
Conformação 10	54,3375
Conformação 2	53,8131
Conformação 9	52,4828
Conformação 8	52,4779
Conformação 7	50,2641
Conformação 1	46,9645
Conformação 5	46,7050
Conformação 4	45,1004
Conformação 6	36,2240
Média ± Desvio Padrão	49,4322 ± 5,584

Quando comparamos o escore médio da molécula com os escores médios das moléculas padrão, a molécula 5 apresenta um maior escore médio (49,4322) maior que o Terpinen-4-ol (31,1599) e a Cefalexina (31,7284). A conformação mais estável da molécula 5 apresenta escore maior (55,9528) que as do Terpinen-4-ol (31,7284), da Penicilina G (53,3799) e da Cefalexina (55,7600).

Em relação às interações com os resíduos de aminoácidos da PBP2a (figura 13), a molécula 5 apresenta 17 interações do tipo *Van der Waals*, com destaque

para as interações com a Lys406 e a Ser403, que correspondem a duas das três principais interações conhecidas entre a Penicilina G e a PBP2a. A molécula 5 também realiza 5 interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos Tyr446, His583, Met641 e Glu447. Apresenta também uma interação do tipo π -stack entre o fenil da posição 3 e o anel presente na estrutura da His583. Entre todas as interações observadas, a molécula 5 possui 13 interações em comum com o Terpinen-4-ol. O destaque das interações analisadas é a ligação π -stack, que em sistemas biológicos pode participar na determinação de propriedades de reconhecimento estrutural de proteínas (Cockroft *et al.*, 2007). A ligação π -stack é um tipo de interação planar entre sistemas de elétrons π , e que apesar de ser descrita como uma interação fraca, pode contribuir para que a molécula esteja melhor estabilizada no sítio ativo pela sobreposição dos sistemas π -conjugados (Arzhanik *et al.*, 2010). Também pode favorecer o reconhecimento da estrutura pela molécula alvo, conferindo uma seletividade e afinidade adicional à molécula pela proteína. É possível que a ligação π -stack possa ocasionar mudanças estruturais na PBP2a, afetando sua função biológica e influenciando a ação da molécula no sítio ativo (Arzhanik *et al.*, 2010; Stornaiuolo *et al.*, 2013).

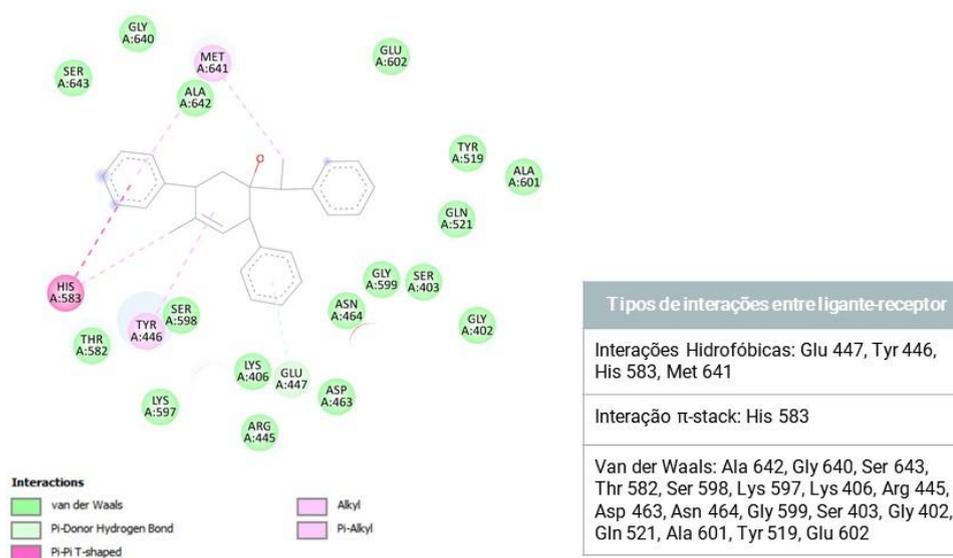


Figura 13: Interações entre a molécula 5 e PBP2a.

Molécula 4 - 1(benzil)2(benzil)3(tiomorfolina)

A quarta melhor molécula, identificada como molécula 4 (figura 14), possui o benzil como substituinte nas posições 1 e 2, e a tiomorfolina como substituinte na

posição 3. Sua conformação mais estável (conformação 5) possui um escore de 57,2214 com um *goldscore.fitness* médio de 50,2267, como a tabela 15 apresenta.

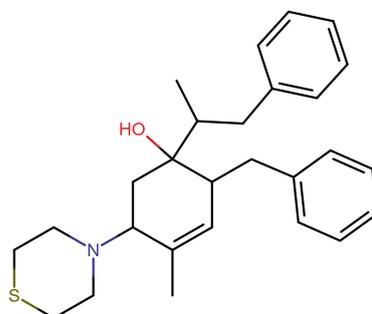


Figura 14: Estrutura da molécula 4.

Tabela 15: Escores obtidos para a molécula 4

Conformação	Escore
Conformação 5	57,2214
Conformação 8	56,5252
Conformação 9	55,0123
Conformação 4	54,8422
Conformação 2	49,0429
Conformação 6	47,8347
Conformação 7	47,7685
Conformação 3	46,3640
Conformação 1	46,1491
Conformação 10	41,5073
Média ± Desvio Padrão	50,2267 ± 5,035

Quando avaliados os escores médios das moléculas padrão e o escore médio da molécula 4, a última apresenta um maior escore médio (50,2267) que o Terpinen-4-ol (31,1599) e a Cefalexina (49,2567). Em relação à conformação mais estável, a molécula 4 apresenta um escore maior (57,2214) que as conformações mais estáveis do Terpinen-4-ol (31,7284), Penicilina G (53,3799) e Cefalexina (55,7600), assim como a molécula 5.

No que diz respeito às interações entre a molécula 4 e os resíduos de aminoácidos da PBP2a (figura 15), a molécula 4 realiza 18 interações do tipo *Van der Waals*, novamente interagindo com Lys406 e Ser403 e apenas 2 interações hidrofóbicas com Tyr446 e Met641. Além disso, realiza uma interação π -stack entre o benzil na posição 1 e Tyr446. Uma “nova” interação do tipo X-enxofre é realizada entre o enxofre presente na tiomorfolina na posição 3 e Gln613. No total, possui 12 interações em comum com o Terpinen-4-ol. Em relação à molécula 5, a molécula 4 apresenta diferenças em todos os seus substituintes, o que traz mudanças nas interações que ocorrem entre o composto e a proteína. A interação que chama atenção é a interação do tipo X-enxofre, onde o X pode representar diferentes elementos como oxigênio, nitrogênio, metais e halogênios (Ford; Saxton; Ho, 2017). Neste caso, de acordo com o *software Discovery Studio* o X está representando o oxigênio da carbonila presente em Gln613. Os anéis heteroaromáticos que contém enxofre podem ser componentes-chave na química medicinal já que o átomo é altamente versátil, interagindo com grupos funcionais pobres e ricos em elétrons, podendo realizar diferentes interações com o sítio ativo. A tiomorfolina é um grupamento heterocíclico que contém os elementos nitrogênio e enxofre em sua estrutura, sendo derivado da morfolina. Dados da literatura apontam que o grupamento pode estar relacionado a atividades farmacológicas de alguns fármacos, como o nifurtimox, utilizado no tratamento da doença de Chagas (Choudhury *et al.*, 2011; Nadar; Thakor, 2021). Conforme relatado por Nwuche e colaboradores, há um crescente interesse na atividade antimicrobiana de grupamentos como a tiomorfolina, além de um interesse relacionado a bons parâmetros farmacocinéticos que o grupo pode estar relacionado, como boa solubilidade (Nwuche *et al.*, 2017). Neste caso, a interação entre enxofre e oxigênio está amplamente associada à conformação molecular, impactando em como o ligante pode interagir com o receptor (Bissantz; Kuhn; Stahl, 2010; Zhang *et al.*, 2015). Zhang e colaboradores concluíram em seus estudos que as interações entre enxofre e oxigênio apresentam-se favoráveis quando relacionado ao desenvolvimento de fármacos. A força entre a interação demonstra ser comparável a força de uma ligação de hidrogênio, o que favorece a afinidade de ligação e pode contribuir para uma maior seletividade do composto pelo receptor (Zhang *et al.*, 2015).

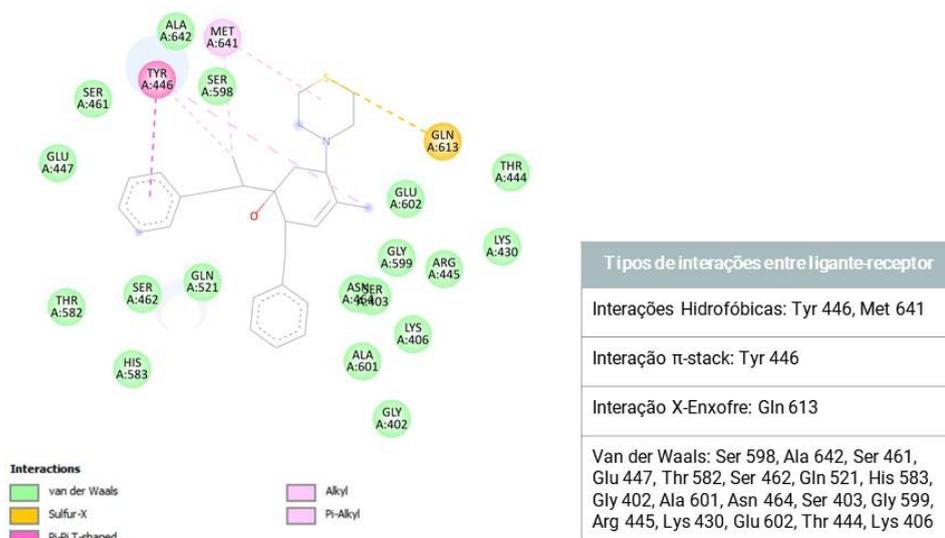


Figura 15: Interações entre a molécula 4 e PBP2a.

Molécula 3 - 1(benzil)-2(fenil)-3(tiomorfolina)

A terceira melhor molécula, identificada como molécula 3 (figura 16), possui o benzil como substituinte na posição 1, o fenil como substituinte na posição 2 e a tiomorfolina como substituinte na posição 3. A partir da tabela 16 é possível observar que sua melhor conformação (conformação 10) apresentou um escore de 55,1759 com um *goldscore.fitness* médio de 54,0290.

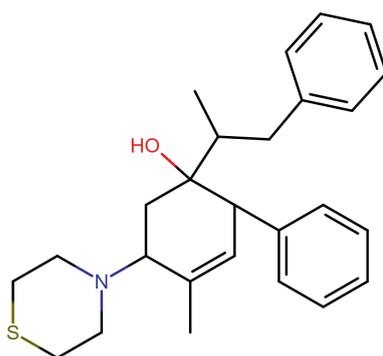


Figura 16: Estrutura da Molécula 3.

Tabela 16: Escores obtidos para a molécula 3

Conformação	Escore
Conformação 10	55,1759

Conformação 6	55,0233
Conformação 9	54,5647
Conformação 8	54,3909
Conformação 5	54,1080
Conformação 3	53,9916
Conformação 1	53,7235
Conformação 4	53,5491
Conformação 7	53,4406
Conformação 2	52,3228
Média ± Desvio Padrão	54,0290 ± 0,794

Quando analisado o escore médio da molécula 3 e os escores médios das moléculas padrão, a molécula 3 apresenta um escore médio de 54,0290, sendo maior que os escores médios do Terpinen-4-ol (31,1599), da Penicilina G (53,3799) e da Cefalexina (49,2567). Acerca de sua melhor conformação (55,1759), apresenta-se com interações mais fortes que o Terpinen-4-ol (31,7284) e que a Penicilina G (53,3799).

A partir da avaliação das interações realizadas entre a molécula 3 e os resíduos de aminoácidos da PBP2a (figura 17), a molécula 3 realiza: 19 interações do tipo *Van der Waals*, interagindo novamente com Lys406 e Ser403; 3 interações hidrofóbicas com Tyr446, Met641 e Ala601; 1 interação π -stack com Tyr446; 1 interação X-enxofre com Gln613; e 1 ligação de hidrogênio com Thr600, da mesma forma que a Penicilina G. A molécula 3 realiza 13 interações em comum com o Terpinen-4-ol. Em relação à molécula 4, a molécula 3 mantém o benzil na posição 1 e a tiomorfolina na posição 3, e traz a troca do benzil pela fenila na posição 2. A interação π -stack que ocorre entre o benzil na posição 1 e Tyr446, e a interação X-enxofre que ocorre entre o oxigênio da carbonila em Gln613 e o enxofre presente na tiomorfolina na posição 3 permanecem. A presença de ambas estas ligações podem estar aumentando a afinidade de ligação entre a molécula e o alvo, assim como pode estar conferindo uma especificidade maior em relação às outras moléculas avaliadas até então no sítio ativo do receptor (Arzhanik *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015). Além disso, é a primeira molécula onde observamos a presença de uma ligação de hidrogênio, ligações moderadamente fortes (Patrick, 2013). A

ligação de hidrogênio é uma das interações mais importantes entre as moléculas (Panigrahi, 2008). A ligação de hidrogênio ocorre entre o hidrogênio da hidroxila presente na molécula 3, deficiente em elétrons, e o oxigênio da carbonila presente no resíduo de aminoácido Thr600, um heteroátomo rico em elétrons. Esta interação pode ser extremamente importante para o reconhecimento molecular e pode auxiliar na afinidade entre o ligante e o alvo, contribuindo para uma determinada especificidade, estabilizando a molécula no sítio ativo, assim como pode estar relacionada a eficácia da molécula, caso haja atividade farmacológica (Liu *et al.*, 2008; Patil *et al.*, 2010). A presença de uma ligação de hidrogênio pode ser interessante para um potencial fármaco antimicrobiano. A vancomicina, um antibiótico da classe dos glicopeptídeos, se liga seletivamente a peptídeos que possuem a porção terminal D-Ala-D-Ala através de cinco ligações de hidrogênio, impedindo a síntese da parede celular bacteriana (Schaeffer, 2008).

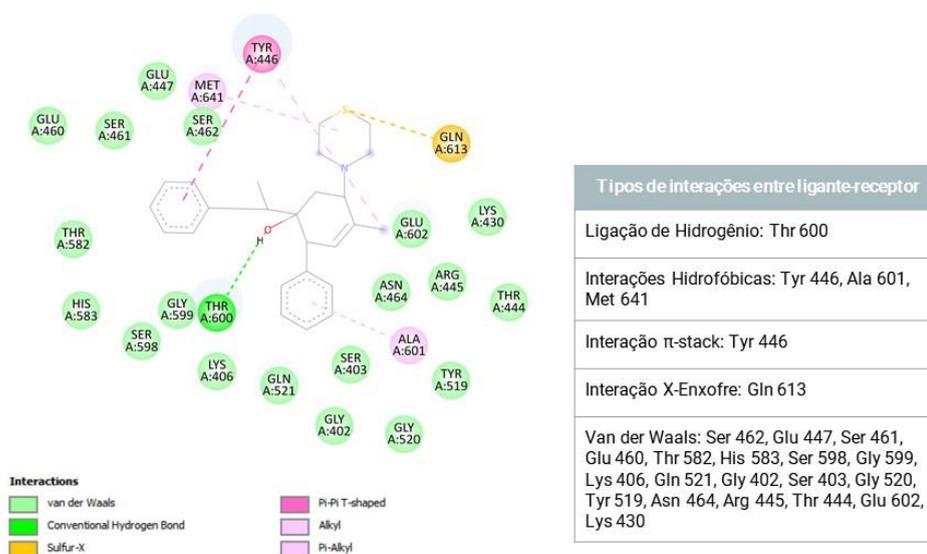


Figura 17: Interações entre a molécula 3 e PBP2a.

Molécula 2 - 1(benzil)2(fenil)3(fenil)

A segunda melhor molécula, identificada como molécula 2 (figura 18), possui o benzil como substituinte na posição 1 e o fenil como substituinte nas posições 2 e 3. Sua conformação de maior interação (conformação 3) obteve um escore de 61,2185 com um *goldscore.fitness* médio de 59,4580, conforme a tabela 17.

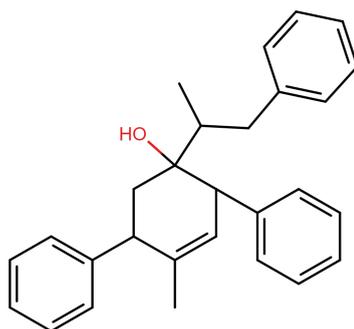


Figura 18: Estrutura da molécula 2.

Tabela 17: Escores obtidos para a molécula 2

Conformação	Escore
Conformação 3	61,2185
Conformação 6	60,7127
Conformação 2	60,5396
Conformação 8	60,0517
Conformação 4	59,6927
Conformação 1	59,0554
Conformação 7	58,9143
Conformação 9	58,7084
Conformação 5	58,3913
Conformação 10	57,2955
Média ± Desvio Padrão	59,4580 ± 1,144

Ao examinarmos os escores médios das moléculas padrão e o escore médio da molécula 2, esta apresenta um escore médio (59,4580) maior que o Terpinen-4-ol (31,1599), a Penicilina G (50,7690), a Cefalexina (49,2567) e a Oxacilina (59,2613), ou seja, todos os padrões avaliados. Além disso, sua conformação de maior interação apresenta um escore maior (61,2185) que todas as conformações de maior interação das moléculas padrão, ou seja, o Terpinen-4-ol (31,7284), a Penicilina G (53,3799), a Cefalexina (55,7660) e a Oxacilina (59,7704).

Referente às interações realizadas entre a molécula 2 e os resíduos de aminoácidos da PBP2a (figura 19), a molécula realiza 18 interações de *van der*

Waals, incluindo 2 das 3 ligações realizadas pela Penicilina G, com os resíduos de aminoácidos Lys406 e Ser403; 2 interações hidrofóbicas; 1 interação π -stack com Tyr519; e 1 ligação de hidrogênio com Thr600 também correspondendo a uma das ligações feitas pela Penicilina G. A molécula 2 apresenta 12 interações em comum com o Terpinen-4-ol. Em relação à molécula 3, a molécula 2 mantém o benzil na posição 1 e o fenil na posição 2, e troca a tiomorfolina na posição 3 por uma fenila. A molécula 2 compartilha com a molécula 3 as mesmas interações, com exceção da interação X-enxofre, devido a ausência do grupamento tiomorfolina em sua estrutura, e apesar de não possuir esta interação, obteve um *goldscore.fitness* maior para sua conformação mais estável. Comparando as moléculas que realizam interações X-enxofre (moléculas 3 e 4) com a molécula 2, as interações, ainda que possam estar relacionadas a uma maior seletividade dos ligantes pelo sítio ativo, não demonstram, nesta situação, favorecer a interação entre a molécula derivada do terpinen-4-ol e PBP2a. A molécula 2, contudo, ainda apresenta uma interação do tipo π -stack entre o fenil da posição 2 e o anel aromático presente na estrutura da Tyr519. Estudos demonstram que a presença de anéis aromáticos em grande parte dos fármacos torna as interações π -stack como um diferencial no seu reconhecimento pelas proteínas (Mcgaughey; Gagné; Rappé, 1998). Entretanto, o que aparenta estar tendo um impacto importante no *goldscore.fitness* é a ligação de hidrogênio, interação forte com geometria bem definida, que está ocorrendo entre o hidrogênio da hidroxila e o oxigênio da carbonila presente em THR 600. As ligações de hidrogênio são extremamente importantes entre fármacos e proteínas. Além disso, quando consideramos o que as ligações de hidrogênio podem trazer em termos de farmacocinética, estas podem afetar a absorção da molécula assim como o seu transporte e distribuição dentro do sistema biológico (Kubinyi, 2001).

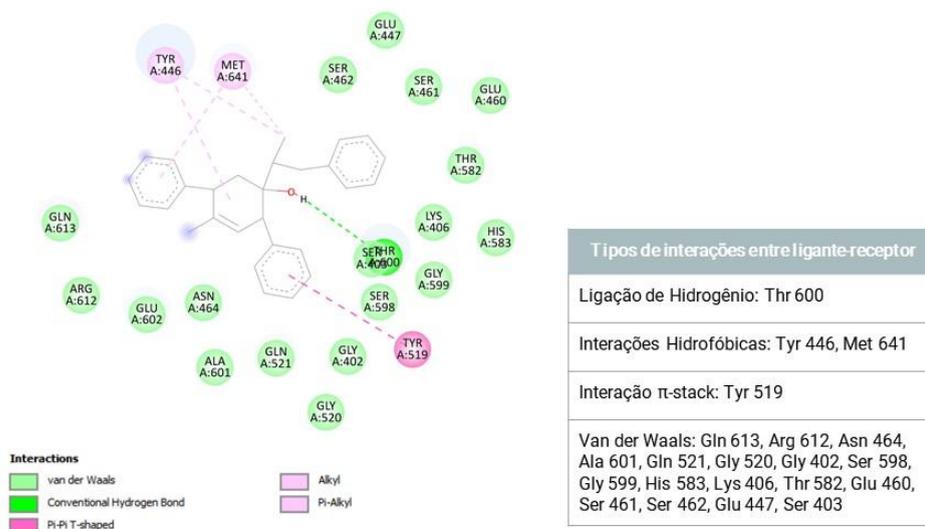


Figura 19: Interações entre a molécula 2 e PBP2a.

Molécula 1 - 1(benzil)-2(fenil)-3(benzil)

Em primeiro lugar, a molécula identificada como molécula 1 (figura 20), possui o benzil como substituinte nas posições 1 e 3 e o fenil como substituinte na posição 2. Como apresentado na tabela 18, sua conformação mais estável (conformação 4) alcançou um escore de 63,1257 com um *goldscore.fitness* de 59,5516.

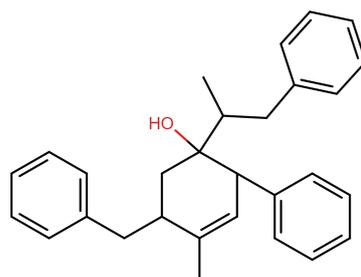


Figura 20: Estrutura da molécula 1.

Tabela 18: Escores obtidos para a molécula 1

Conformação	Escore
Conformação 4	63,1257
Conformação 5	60,3107
Conformação 9	59,7463

Conformação 2	59,6450
Conformação 3	59,4754
Conformação 8	58,9574
Conformação 7	58,8698
Conformação 10	58,8221
Conformação 6	58,7836
Conformação 1	57,7800
Média ± Desvio Padrão	59,5516 ± 1,359

Em relação aos escores médios entre a molécula 1 e as moléculas padrão, a molécula 1 apresentou um escore médio (59,5516) maior que todos os escores médios das moléculas padrão (Terpinen-4-ol, 31,1599; Penicilina G, 50,7690; Cefalexina, 49,2567; Oxacilina, 59,2613). Também apresentou para sua conformação mais estável um escore maior (63,1257) que todos os melhores escores das moléculas padrão (Terpinen-4-ol, 31,7284; Penicilina G, 53,3799; Cefalexina, 55,7660; Oxacilina, 59,7704).

Quando analisadas as interações realizadas entre a molécula 1 e os resíduos de aminoácido da PBP2a (figura 21), observamos que a molécula 1 realiza 14 interações de *van der Waals*, dentre as quais apresenta 2 das 3 ligações realizadas pela Penicilina G, com Lys406 e Ser403; 3 interações hidrofóbicas; e 1 ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido Thr600, da mesma forma que a Penicilina G. A molécula 1 apresenta 8 ligações em comum com o Terpinen-4-ol. Quando comparamos a molécula 1 com todas as outras moléculas derivadas, observamos que é o composto que menos apresenta interações em comum com a molécula original, além de possuir menos interações “distintas” como interação π -stack e X-enxofre.

A presença da ligação de hidrogênio é a interação que parece estar relacionada a um maior *goldscore.fitness* obtido no DM. Novamente, é importante destacar que ligações de hidrogênio contribuem consideravelmente para a estabilidade entre ligante e proteína, visto que são interações ubíquas e flexíveis. Uma condição que pode ser favorável é a força desta ligação de hidrogênio, mais fraca que uma ligação covalente e mais forte que uma interação de *van der Waals*. Estudos sugerem que os ligantes preferem utilizar sua capacidade de ligação de

hidrogênios mais forte para interagir com os resíduos de aminoácidos, deixando as interações mais fracas para serem realizadas com a água (Panigrahi, 2008). Estas ligações podem favorecer a seletividade do ligante ao alvo devido à sua distância e restrição de ângulo (Kawasaki; Freire, 2011). Ao mesmo tempo, as ligações de hidrogênio podem determinar as propriedades farmacológicas dos ligantes quando interagindo com os receptores (Fu; Zhao; Chen, 2018; Hubbard; Kamran Haider, 2010; Panigrahi, 2008).

Ademais, a molécula 1 apresenta um espaçador de carbono no substituinte da posição 3 em relação ao substituinte na mesma posição da molécula 2, o que também pode estar influenciando no valor obtido para a conformação mais estável. A presença deste carbono “extra” na molécula pode estar relacionado às interações de *van der Waals* - interações fracas que ocorrem em regiões hidrofóbicas de moléculas diferentes como substituintes acíclicos (Patrick, 2013). A contribuição das interações de *van der Waals*, no geral, costuma ser crucial para as interações entre fármacos e alvos. Auxiliam no reconhecimento molecular do fármaco pelo receptor, além de que resultam em contribuições energéticas consideráveis (Barreiro; Fraga, 2015; Patrick, 2013). É considerada uma interação fraca (0,1 a 0,2 kcal/mol) - especialmente em relação às ligações de hidrogênio (2 a 5 kcal/mol) - porém, estudos mostram que podem contribuir substancialmente para estabilizar a proteína. Além disso, permitem que a molécula se ligue reversivelmente a proteína, o que acontece com muitos fármacos, que se ligam transitoriamente e reversivelmente ao receptor apenas para desencadear uma resposta farmacológica. Da mesma forma, a molécula pode ser um inibidor irreversível da enzima inibindo sua atividade (Li *et al.*, 2018; Lemke; Williams, 2012).

Outro fator importante para a interação entre, não somente a molécula 1, mas também as outras moléculas derivadas do terpinen-4-ol, é a presença de anéis aromáticos. São estruturas hidrofóbicas planares, que também apresentam um papel significativo nas interações com a proteína, visto que podem realizar interações de *van der Waals* com as regiões hidrofóbicas planas do sítio de ligação. Também podem ser fatores-chave em termos de lipofilicidade e polaridade do composto, além de serem capazes de estar amplamente relacionados ao reconhecimento, a estabilidade metabólica, a reatividade molecular e a toxicidade do composto em seu alvo (Taylor; Maccoss; Lawson, 2014; Patrick, 2013). Por fim, as interações hidrofóbicas - que ocorrem quando regiões apolares das moléculas estão

próximas - podem, assim como os outros tipos de interação, aumentar a afinidade de ligação. São constantemente relacionadas às alterações conformacionais em receptores, o que pode estar associado a um aumento da atividade biológica de um composto (Davis; Teague, 1999; Patil *et al.*, 2010). Ao mesmo tempo, podem contribuir com propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção.

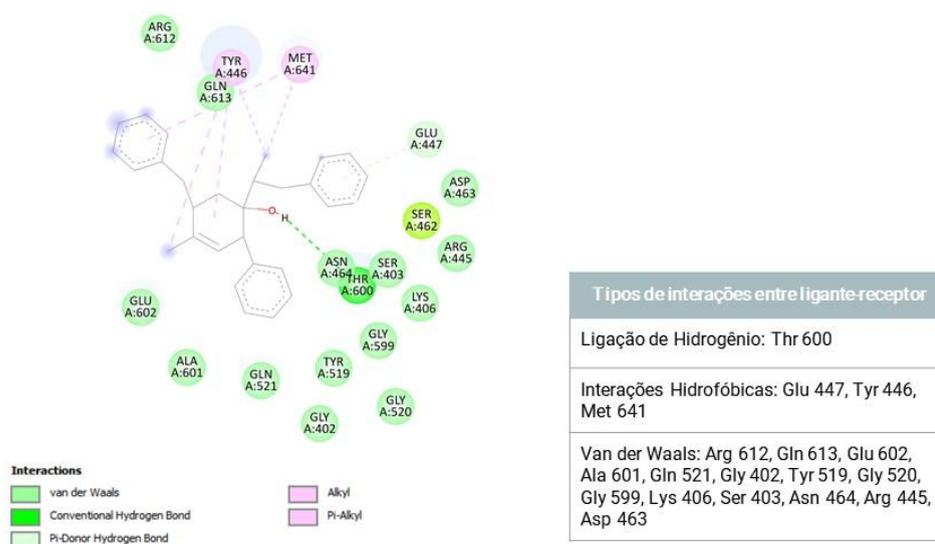


Figura 21: Interações entre a molécula 1 e a PBP2a.

5. CONCLUSÃO

Levando em consideração a crescente resistência à medicamentos apresentada pelas bactérias, a necessidade de novas opções terapêuticas eficazes e a melhora da saúde global, é visível a importância da pesquisa, planejamento e desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos. Além disso, produtos naturais, como a *Melaleuca alternifolia*, de fato fornecem metabólitos que possuem características especiais em relação a moléculas sintéticas, como alta diversidade estrutural e atividade farmacológica, que podem ser utilizados como ponto de partida para o planejamento de novos fármacos. O uso da modelagem molecular nos permite mimetizar o comportamento de moléculas, trazendo informações pertinentes sobre um composto, possibilitando a compreensão das interações entre ligantes e receptores, e direcionando o planejamento para novos e potenciais fármacos, além de viabilizar a descoberta e otimização de compostos eficientes, seletivos e seguros.

Sendo assim, neste estudo foi possível desenvolver 83 estruturas derivadas do terpinen-4-ol e realizar 87 dockings moleculares, considerando as moléculas padrão, identificando as interações realizadas de todos os compostos com a PBP2a. A estratégia empregada para o *design* racional de fármacos, o diagrama de Craig, possibilitou a inserção de substituintes diferentes adequados, através da avaliação da constante de hidrofobicidade e da constante de grupo. Além disso, o posicionamento dos substituintes em diferentes posições da molécula em estudo, que não aparentavam ter interações com a proteína, foi essencial para a obtenção de compostos que obtiveram uma interação mais forte com a mesma. Através de um planejamento racional de fármacos, 5 compostos obtiveram resultados melhores que os fármacos padrões antibióticos utilizados e que o composto original, o que evidencia que estas moléculas apresentam um potencial para serem estudadas detalhadamente. O nível de interação dos compostos com a proteína pôde ser avaliado através do *goldscore.fitness*, que permitiu a correlação entre as interações realizadas pelos antibióticos com as interações realizadas pelas novas moléculas, fornecendo uma ampla visão em como uma estrutura pode se comportar em seu alvo.

A molécula 1 apresentou o melhor *goldscore.fitness* entre todas as moléculas, sendo o composto com menos interações distintas em relação às outras moléculas, além de apresentar menos interações em comum com o terpinen-4-ol. Neste caso, a presença da ligação de hidrogênio é a interação que demonstra estar relacionada a o maior valor obtido contribuindo para uma maior estabilidade entre ligante e proteína. Além disso, a presença do benzil na posição 3 da molécula também aparenta estar tendo um impacto importante no valor obtido para a conformação mais estável.

Apesar de que todas estas previsões sejam baseadas apenas na técnica *in silico Docking* Molecular, nos fornecem informações que possibilitam o seguimento do estudo através de outras abordagens como a dinâmica molecular, simulando o comportamento e as interações das moléculas derivadas ao longo do tempo, lançando mão de solventes e íons, podendo-se realizar uma simulação mimetizando o meio fisiológico. Concomitantemente, é possível a elaboração de rotas sintéticas para as moléculas a fim de testar sua atividade *in vitro* e *in vivo*, e verificar se as interações previstas com PBP2a possuem e potencializam efetivamente a ação antimicrobiana.

Por fim, os resultados obtidos abrem o caminho para a otimização das cinco melhores moléculas obtidas, permitindo a aplicação de novas técnicas que simulem o comportamento dessas moléculas em meio biológico, bem como possibilitem a síntese das mesmas com o intuito de avaliar sua atividade farmacológica. A avaliação *in silico* das interações das 5 melhores moléculas derivadas do terpinen-4-ol demonstra um potencial importante para atividade antimicrobiana. Esses achados incentivam pesquisas futuras e fornecem subsídios para estudos farmacológicos mais aprofundados do Terpinen-4-ol, com ênfase em sua possível aplicação terapêutica.

6. REFERÊNCIAS

ALEGADO, R. A.; KING, N. Bacterial Influences on Animal Origins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 6, n. 11, p. a016162, nov. 2014.

ALLOUCHE, A.-R. Gabedit—A graphical user interface for computational chemistry softwares. *Journal of Computational Chemistry*, v. 32, n. 1, p. 174–182, jan. 2011.

AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, v. 1, n. 134, p.1–7, dez. 2010.

ANNAMALA, M. K.; INAMPUDI, K. K.; GURUPRASAD, L. Docking of phosphonate and trehalose analog inhibitors into *M. tuberculosis* mycolyltransferase Ag85C: Comparison of the two scoring fitness functions GoldScore and ChemScore, in the GOLD software. *Bioinformatics*, v. 1, n. 9, p. 339–350, jan. 2007.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Consultas - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2023. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/?substancia=7158>. Acesso em: 24 jul. 2023.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/fitoterapicos/fitoterapicos>. Acesso em: 23 jul. 2023.

ARZHANIK, V. *et al.* Interaction of antibodies with aromatic ligands: the role of pi-stacking. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, v. 8, n. 3, p. 471–483, jun. 2010.

ATANASOV, A. G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, dez. 2015.

BABAKHANI, S.; OLOOMI, M. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, v. 58, n. 11, p. 905–917, nov. 2018.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v. 78, n. 5, p. 431–441, dez. 2005.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química medicinal: bases moleculares da ação dos fármacos*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. 608 p.

BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, v. 65, n. 8, p. 385–395, ago. 2012.

BIOVIA, Dassault Systèmes, BIOVIA Discovery Studio, Discovery v.21.1.0.20298, San Diego: Dassault Systèmes, 2020.

BISSANTZ, C.; KUHN, B.; STAHL, M. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 14, p. 5061–5084, jul. 2010.

BUDHIRAJA, S. S. *et al.* Biological activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil component, terpinen-4-ol, in human myelocytic cell line HL-60. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, v. 22, n. 7, p. 447–453, set. 1999.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 6, n. 8, p. a025247, ago. 2016.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. *International journal of medical microbiology: IJMM*, v. 303, n. 6–7, p. 298–304, ago. 2013.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 1, p. 50–62, jan. 2006.

CHAIN, E. *et al.* THE CLASSIC: penicillin as a chemotherapeutic agent. 1940. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 439, p. 23–26, out. 2005.

CHOUDHURY, S. R. *et al.* Surface-modified sulfur nanoparticles: an effective antifungal agent against *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, n. 2, p. 733–743, abr. 2011.

COATES, A. *et al.* The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 1, n. 11, p. 895–910, nov. 2002.

COCKROFT, S. L. *et al.* Substituent effects on aromatic stacking interactions. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 5, n. 7, p. 1062–1080, mar. 2007.

COOK, M. A.; WRIGHT, G. D. The past, present, and future of antibiotics. *Science Translational Medicine*, v. 14, n. 657, p. eabo7793, ago. 2022.

CORBEIL, C. R.; WILLIAMS, C. I.; LABUTE, P. Variability in docking success rates due to dataset preparation. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 26, n. 6, p. 775–786, jun. 2012.

CORDEIRO, L. *et al.* Terpinen-4-ol as an Antibacterial and Antibiofilm Agent against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 12, p. 4531, jun. 2020.

CRAIG, P. N. Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 8, p. 680–684, ago. 1971.

DA SILVA, N. P. *et al.* Improved anti-*Cutibacterium acnes* activity of tea tree oil-loaded chitosan-poly(ϵ -caprolactone) core-shell nanocapsules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 196, p. 111371, dez. 2020.

DAVIS, A. M.; TEAGUE, S. J. Hydrogen Bonding, Hydrophobic Interactions, and Failure of the Rigid Receptor Hypothesis. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 38, n. 6, p. 736–749, mar. 1999.

DENAMUR, E.; MATIC, I. Evolution of mutation rates in bacteria. *Molecular Microbiology*, v. 60, n. 4, p. 820–827, maio 2006.

ELDRIDGE, M. D. *et al.* Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 11, n. 5, p. 425–445, set. 1997.

ERTL, P. Craig plot 2.0: an interactive navigation in the substituent bioisosteric space. *Journal of Cheminformatics*, v. 12, n. 8, jan. 2020.

FERGESTAD, M. E. *et al.* Penicillin-binding protein PBP2a provides variable levels of protection toward different β -lactams in *Staphylococcus aureus* RN4220. *MicrobiologyOpen*, v. 9, n. 8, p. e1057, ago. 2020.

FERRINI, A. M. *et al.* *Melaleuca alternifolia* essential oil possesses potent anti-staphylococcal activity extended to strains resistant to antibiotics. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, v. 19, n. 3, p. 539–544, jul. 2006.

FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, v. 29, n. 3, p. 629–646, mar. 2020.

FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*, v. 10, n. 3, p. 226–236, jun. 1929.

FORD, M. C.; SAXTON, M.; HO, P. S. Sulfur as an Acceptor to Bromine in Biomolecular Halogen Bonds. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, v. 8, n. 17, p. 4246–4252, set. 2017.

FU, Y.; ZHAO, J.; CHEN, Z. Insights into the Molecular Mechanisms of Protein-Ligand Interactions by Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation: A Case of Oligopeptide Binding Protein. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, v. 2018, p. e3502514, dez. 2018.

HAMMER, K. A. Treatment of acne with tea tree oil (*Melaleuca*) products: A review of efficacy, tolerability and potential modes of action. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 45, n. 2, p. 106–110, fev. 2015.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 42, n. 5, p. 591–595, nov. 1998.

HANSCH, C. *et al.* Aromatic substituent constants for structure-activity correlations. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 11, p. 1207–1216, nov. 1973.

HANSCH, CORWIN.; LEO, A.; TAFT, R. W. A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters. *Chemical Reviews*, v. 91, n. 2, p. 165–195, mar. 1991.

HERSHBERG, R. Mutation--The Engine of Evolution: Studying Mutation and Its Role in the Evolution of Bacteria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 7, n. 9, p. a018077, set. 2015.

HUBBARD, R. E.; KAMRAN HAIDER, M. Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength. Em: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. 1 ed. Chichester, UK:John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

International Organization for Standardization (ISO). 4730:2004. Essential oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (Tea Tree oil). Disponível em: <https://www.iso.org/standard/37033.html>. Acesso em: 25 jul. 2023.

JENUL, C.; HORSWILL, A. R. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiology Spectrum*, v. 7, n. 2, abr. 2019.

JONES, G. *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.

KAWASAKI, Y.; FREIRE, E. Finding a better path to drug selectivity. *Drug discovery today*, v. 16, n. 21–22, p. 985–990, nov. 2011.

KRISHNAMURTI, C.; RAO, S. C. The isolation of morphine by Serturmer. *Indian Journal of Anaesthesia*, v. 60, n. 11, p. 861–862, nov. 2016.

KUBINYI, H. Hydrogen Bonding: The Last Mystery in Drug Design? Em: TESTA, B.; WATERBEEMD, H.; FOLKERS, G.; GUY, R. *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies*. 1 ed. Wiley VCH:Weinheim, 2001. p. 513–524.

KUFAREVA, I.; ABAGYAN, R. Methods of protein structure comparison. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 857, p. 231–257, fev. 2012.

LAM, N. S. K. *et al.* Can the tea tree oil (Australian native plant: *Melaleuca alternifolia* Cheel) be an alternative treatment for human demodicosis on skin? *Parasitology*, v.

145, n. 12, p. 1510–1520, out. 2018.

LEE, C.-J. *et al.* Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 21, n. 2, p. 169–176, jun. 2013.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS D. A. *Foye's Principles of medicinal chemistry*. 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2011. 1520 p.

LI, J. *et al.* Direct Observation of CH/CH van der Waals Interactions in Proteins by NMR. *Journal of the American Chemical Society*, v. 140, n. 9, p. 3194–3197, mar. 2018.

LIMA, L. M. *et al.* β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 208, p. 112829, 15 dez. 2020.

LIU, F. *et al.* Effect of Flap Mutations on Structure of HIV-1 Protease and Inhibition by Saquinavir and Darunavir. *Journal of molecular biology*, v. 381, n. 1, p. 102–115, ago. 2008.

LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *The Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 90, n. 1, p. 135–145, mar. 2017.

MACHOWSKA, A.; STÅLSBY LUNDBORG, C. Drivers of Irrational Use of Antibiotics in Europe. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 16, n. 1, p. 27–40, jan. 2019.

MAGALHÃES, C. *et al.* To give or not to give antibiotics is not the only question. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 21, n. 7, p. e191–e201, jul. 2021.

MALDE, A. K. *et al.* An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 7, n. 12, p. 4026–4037, dez. 2011.

MANOS, J. The human microbiome in disease and pathology. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, v. 130, n. 12, p. 690–705, dez. 2022.

MARTÍNEZ, B. *et al.* Cell wall homeostasis in lactic acid bacteria: threats and defences. *FEMS microbiology reviews*, v. 44, n. 5, p. 538–564, set. 2020.

MCGAUGHEY, G. B.; GAGNÉ, M.; RAPPÉ, A. K. π -Stacking Interactions: ALIVE AND WELL IN PROTEINS *. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 25, p. 15458–15463, jun. 1998.

MONACO, M. *et al.* Worldwide Epidemiology and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 409, p. 21–56, 2017.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular Docking. Em: KUKOL, A. Molecular Modeling of Proteins. *Methods Molecular Biology*TM. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. p. 365–382.

NADAR, S.; THAKOR, E. Morpholine and Thiomorpholine: A Privileged scaffold possessing diverse bioactivity profile. *Journal of Chemical Review*. v. 3, n. 3, p. 247-270, jun. 2021.

NWUCHE, C. O. *et al.* Experimental and In-Silico Investigation of Anti-Microbial Activity of 1-Chloro-2-Isocyanatoethane Derivatives of Thiomorpholine, Piperazine and Morpholine. *PloS One*, v. 12, n. 1, p. e0170150, jan. 2017.

OLIVA, A. *et al.* High Potency of Melaleuca alternifolia Essential Oil against Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 23, n. 10, p. 2584, out. 2018.

ORLEK, A. *et al.* Plasmid Classification in an Era of Whole-Genome Sequencing: Application in Studies of Antibiotic Resistance Epidemiology. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. 182, fev. 2017.

PANIGRAHI, S. K. Strong and weak hydrogen bonds in protein-ligand complexes of kinases: a comparative study. *Amino Acids*, v. 34, n. 4, p. 617–633, maio 2008.

PARDO, L. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of oxacillin-susceptible and *mecA* positive *Staphylococcus aureus* strains isolated in Uruguay. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 54, n. 4, p. 293–298, out. 2022.

PATIL, R. *et al.* Optimized Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bonding at the

Target-Ligand Interface Leads the Pathways of Drug-Designing. PLoS One, v. 5, n. 8, p. e12029, ago. 2010.

PATRICK, G. L. An introduction to medicinal chemistry. 2. ed. New York, USA : Oxford University Press, 2001. 622 p.

PAZYAR, N. *et al.* A review of applications of tea tree oil in dermatology. International Journal of Dermatology, v. 52, n. 7, p. 784–790, jul. 2013.

RAO, C.V.S. *et al.* Antibiotic targeting of the bacterial secretory pathway. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Protein trafficking and secretion in bacteria. v. 1843, n. 8, p. 1762–1783, ago. 2014.

RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB). 1MWT: Structure of penicillin G acyl-Penicillin binding protein 2a from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strain 27r at 2.45 Å resolution, 2002. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1MWT>. Acesso em: 17 jul. 2023.

RIBEIRO DA CUNHA, B.; FONSECA, L. P.; CALADO, C. R. C. Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go? Antibiotics, v. 8, n. 2, p. 45–66, jun. 2019.

SAGA, T.; YAMAGUCHI, K. History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria. Japan Medical Association Journal. v. 52, n. 2, p.103–108, mar. 2009.

SALVATORI, C. *et al.* A comparative study of antibacterial and anti-inflammatory effects of mouthrinse containing tea tree oil. ORAL & implantology, v. 10, n. 1, p. 59–70, abril 2017.

SCHAEFFER, L. Chapter 14 - The Role of Functional Groups in Drug–Receptor Interactions. Em: WERMUTH, C. G. *et al.* The Practice of Medicinal Chemistry 4 ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 359–378.

SCHNITZLER, P.; SCHÖN, K.; REICHLING, J. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. Die Pharmazie, v. 56, n. 4, p. 343–347, abr. 2001.

SEN, T.; SAMANTA, S. K. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, v. 147, p. 59–110, jan. 2014.

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Plants of the Melaleuca Genus as Antimicrobial Agents: From Farm to Pharmacy. *Phytotherapy research: PTR*, v. 31, n. 10, p. 1475–1494, out. 2017.

SIEGEL, S. D.; LIU, J.; TON-THAT, H. Biogenesis of the Gram-positive bacterial cell envelope. *Current Opinion in Microbiology*, v. 34, p. 31–37, dez. 2016.

STEPHENS, C.; MURRAY, W. Pathogen evolution: How good bacteria go bad. *Current biology: CB*, v. 11, n. 2, p. R53-56, jan. 2001.

STORNAIUOLO, M. *et al.* Assembly of a π - π stack of ligands in the binding site of an acetylcholine-binding protein. *Nature Communications*, v. 4, n. 1, p. 1875, maio 2013.

TAYLOR, R. D.; MACCOSS, M.; LAWSON, A. D. G. Rings in Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 57, n. 14, p. 5845–5859, jul. 2014.

TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, v. 119, n. 6, p. S3–S10, jun. 2006.

THAKARE, R. *et al.* Chapter 1 - Antibiotics: past, present, and future. Em: KESHARWANI, O.; CHOPRA, S.; DASGUPTA, A. *Drug Discovery Targeting Drug-Resistant Bacteria*. 1 ed. Massachusetts, EUA: Academic Press, 2020. p.1-8.

TIPPER, D. J.; STROMINGER, J. L. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 54, n. 4, p. 1133–1141, out. 1965.

TOOKE, C. L. *et al.* β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, v. 431, n. 18, p. 3472–3500, ago. 2019.

TURNER, N. A. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews. Microbiology*, v. 17, n. 4, p. 203–218, abr. 2019.

UDDIN, T. M. *et al.* Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*,

Special Issue on Antimicrobial Resistance. v. 14, n. 12, p. 1750–1766, dez. 2021.

UMOLU, P. I.; OKOLI, E. N.; IZOMOH, I. M. Antibiogram and beta-lactamase production of *Staphylococcus aureus* isolates from different human clinical specimens in Edo State, Nigeria. *West African Journal of Medicine*, v. 21, n. 2, p. 124–127, abril 2002.

VARELA M. F. et al. Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Antibiotics*. v. 10, n. 5, p. 593-615, maio 2021.

VERDONK, M. L. *et al.* Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*, v. 52, n. 4, p. 609–623, set. 2003.

World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 24 jul. 2023.

World Health Organization (WHO). The World Medicines Situation 2011 - Access to controlled medicines, 3rd edition, 2011. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-EMP-MIE-2011-2.4>. Acesso em: 20 jul. 2023.

WILLIAMS, D. H.; BARDSLEY, B. The Vancomycin Group of Antibiotics and the Fight against Resistant Bacteria. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 38, n. 9, p. 1172–1193, maio 1999.

WIŃSKA, K. *et al.* Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules*, v. 24, n. 11, p. 2130, jan. 2019.

ZHANG, X. *et al.* Intermolecular Sulfur···Oxygen Interactions: Theoretical and Statistical Investigations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 55, n. 10, p. 2138–2153, out. 2015.

ZHANG, M. *et al.* Research and development of antibiotics: insights from patents and citation network. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 26, n. 5, p. 617–627, maio 2016.

APÊNDICE A - *Docking Molecular* com substituintes na posição 1

Tabela 1a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(1) Anel Saturado

Conformação	Escore
Conformação 6	33,8719
Conformação 1	33,5774
Conformação 4	33,2633
Conformação 8	33,1025
Conformação 2	33,0626
Conformação 9	32,7251
Conformação 10	32,6134
Conformação 7	32,1662
Conformação 3	32,1491
Conformação 5	31,6669
Média ± Desvio Padrão	32,8198 ± 0,654

Tabela 2a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(2) Metil

Conformação	Escore
Conformação 6	35,5397
Conformação 1	35,4526
Conformação 7	35,2778
Conformação 4	35,2610
Conformação 5	34,9440
Conformação 9	34,9035
Conformação 2	34,8165
Conformação 3	34,2340
Conformação 8	34,2253

Conformação 10	33,8788
Média ± Desvio Padrão	34,8533 ± 0,540

Tabela 3a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(3) Etil

Conformação	Escore
Conformação 1	38,5033
Conformação 2	38,5007
Conformação 3	38,3919
Conformação 8	38,2657
Conformação 5	38,2437
Conformação 9	38,2057
Conformação 10	38,1141
Conformação 4	37,9761
Conformação 7	37,9102
Conformação 6	37,5805
Média ± Desvio Padrão	38,1691 ± 0,272

Tabela 4a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(4) Etileno

Conformação	Escore
Conformação 7	33,7737
Conformação 10	33,1817
Conformação 2	33,1583
Conformação 1	33,0522
Conformação 4	32,8492
Conformação 3	32,8007
Conformação 9	32,6419
Conformação 8	32,6179
Conformação 5	32,2343
Conformação 6	31,5409
Média ± Desvio Padrão	32,7850 ± 0,570

Tabela 5a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(5) Fenil

Conformação	Escore
Conformação 3	42,0615
Conformação 4	41,9266
Conformação 5	41,3709
Conformação 2	40,8482
Conformação 9	40,7663
Conformação 6	40,4674
Conformação 7	40,1974
Conformação 1	40,1331
Conformação 10	39,9641
Conformação 8	39,9501
Média ± Desvio Padrão	40,7685 ± 0,743

Tabela 6a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(6) Benzil

Conformação	Escore
Conformação 4	44,7020
Conformação 1	44,0754
Conformação 3	43,8671
Conformação 10	43,7970
Conformação 2	43,6223
Conformação 8	43,5044
Conformação 7	43,2564
Conformação 6	43,1922
Conformação 9	42,2826
Conformação 5	41,5450
Média ± Desvio Padrão	43,3844 ± 0,857

Tabela 7a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(7) Amina Primária

Conformação	Escore
Conformação 5	36,2544
Conformação 1	36,0046
Conformação 8	35,9530
Conformação 3	35,8615
Conformação 7	35,7281
Conformação 10	35,6814
Conformação 9	35,6788
Conformação 6	35,6767
Conformação 2	35,5995
Conformação 4	35,5775
Média ± Desvio Padrão	35,8015 ± 0,204

Tabela 8a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(8) Amina Secundária

Conformação	Escore
Conformação 1	39,7122
Conformação 6	39,5255
Conformação 8	39,5072
Conformação 2	39,4553
Conformação 10	39,4547
Conformação 9	39,4336
Conformação 7	39,3481
Conformação 5	39,3383
Conformação 4	39,2566
Conformação 3	39,0821
Média ± Desvio Padrão	39,4113 ± 0,161

Tabela 9a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(9) Amina Terciária

Conformação	Escore
Conformação 1	38,9560
Conformação 5	37,3911
Conformação 2	37,3362
Conformação 8	37,1763
Conformação 6	37,1103
Conformação 9	36,9960
Conformação 3	36,4056
Conformação 7	36,3803
Conformação 10	36,1351
Conformação 4	34,8033
Média ± Desvio Padrão	36,8690 ± 1,014

Tabela 10a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(10) Flúor

Conformação	Escore
Conformação 8	33,9457
Conformação 9	33,8245
Conformação 4	33,7786
Conformação 10	33,7705
Conformação 5	33,6758
Conformação 1	33,5750
Conformação 6	33,5638
Conformação 3	33,5014
Conformação 2	33,1223
Conformação 7	32,9697
Média ± Desvio Padrão	33,5727 ± 0,294

Tabela 11a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(11) Cloro

Conformação	Escore
Conformação 8	37,7618
Conformação 1	37,6275
Conformação 10	37,4117
Conformação 2	37,3797
Conformação 6	37,3257
Conformação 4	37,2493
Conformação 3	36,6702
Conformação 7	36,6416
Conformação 5	34,1011
Conformação 9	33,6109
Média ± Desvio Padrão	36,5779 ± 1,407

Tabela 12a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(12) Hidroxila

Conformação	Escore
Conformação 1	35,3528
Conformação 10	35,2863
Conformação 3	35,0190
Conformação 8	35,0005
Conformação 7	34,7324
Conformação 9	34,6805
Conformação 2	34,6526
Conformação 6	34,3825
Conformação 4	34,0502
Conformação 5	33,6899
Média ± Desvio Padrão	34,6846 ± 0,501

Tabela 13a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(13) Ácido Carboxílico

Conformação	Escore
Conformação 8	38,8101
Conformação 2	38,6850
Conformação 3	38,4191
Conformação 10	38,1390
Conformação 6	38,1140
Conformação 5	37,7690
Conformação 9	37,7020
Conformação 7	37,6855
Conformação 1	37,5551
Conformação 4	35,2997
Média ± Desvio Padrão	37,8178 ± 0,934

Tabela 14a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(14) Morfolina

Conformação	Escore
Conformação 4	40,1654
Conformação 3	40,0339
Conformação 2	39,9627
Conformação 9	39,9503
Conformação 5	39,9391
Conformação 10	39,8284
Conformação 1	39,8250
Conformação 6	39,4517
Conformação 8	37,2560
Conformação 7	36,8271
Média ± Desvio Padrão	39,3239 ± 1,159

Tabela 15a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(15) Tiomorfolina

Conformação	Escore
Conformação 10	42,4884
Conformação 9	42,1885
Conformação 4	42,1806
Conformação 1	42,0290
Conformação 3	41,8731
Conformação 5	41,3497
Conformação 7	41,3168
Conformação 2	40,5758
Conformação 8	40,0479
Conformação 6	39,4795
Média ± Desvio Padrão	41,3529 ± 0,960

Tabela 16a: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(16) Metilpiperazina

Conformação	Escore
Conformação 1	41,7974
Conformação 3	41,4670
Conformação 7	41,3131
Conformação 2	41,3012
Conformação 6	41,1979
Conformação 4	41,1778
Conformação 9	41,0412
Conformação 8	40,8364
Conformação 5	40,3973
Conformação 10	40,0181
Média ± Desvio Padrão	41,0547 ± 0,494

APÊNDICE B - Docking Molecular com substituintes na posição 2

Tabela 1b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(2) Metil

Conformação	Escore
Conformação 8	35,6300
Conformação 1	35,5183
Conformação 10	35,4365
Conformação 5	35,3755
Conformação 3	35,1970
Conformação 4	35,1919
Conformação 2	35,1796
Conformação 6	35,1498
Conformação 9	34,9026
Conformação 7	34,6103
Média ± Desvio Padrão	35,2191 ± 0,284

Tabela 2b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(3) Etil

Conformação	Escore
Conformação 5	38,9134
Conformação 3	38,8061
Conformação 4	38,7016
Conformação 10	38,6938
Conformação 1	38,6060
Conformação 8	38,3292
Conformação 9	38,1272
Conformação 7	38,0395
Conformação 2	35,2741
Conformação 6	35,0146

Média ± Desvio Padrão	37,8505 ± 1,381
------------------------------	------------------------

Tabela 3b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(4) Etileno

Conformação	Escore
Conformação 3	36,3538
Conformação 6	35,9495
Conformação 4	35,8667
Conformação 1	35,8196
Conformação 2	35,7491
Conformação 10	35,5671
Conformação 7	35,5421
Conformação 8	34,7913
Conformação 5	34,6484
Conformação 9	34,5584
Média ± Desvio Padrão	35,4846 ± 0,579

Tabela 4b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(5) Fenil

Conformação	Escore
Conformação 10	42,8898
Conformação 4	42,8319
Conformação 9	42,7676
Conformação 5	42,6792
Conformação 6	42,5093
Conformação 3	42,3366
Conformação 2	39,0291
Conformação 8	37,4894
Conformação 7	37,1064
Conformação 1	36,7679
Média ± Desvio Padrão	40,6407 ± 2,548

Tabela 5b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(6) Benzil

Conformação	Escore
Conformação 3	46,6627
Conformação 1	45,0498
Conformação 8	42,7147
Conformação 2	42,3406
Conformação 7	41,1917
Conformação 10	38,9396
Conformação 9	38,7208
Conformação 6	38,6122
Conformação 5	38,4188
Conformação 4	37,7778
Média ± Desvio Padrão	41,0428 ± 2,922

Tabela 6b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(7) Amina Primária

Conformação	Escore
Conformação 4	33,7858
Conformação 6	33,6484
Conformação 5	33,6356
Conformação 2	33,6131
Conformação 1	33,5984
Conformação 7	33,5007
Conformação 8	33,4878
Conformação 9	33,4628
Conformação 3	33,3084
Conformação 10	33,2456
Média ± Desvio Padrão	33,5286 ± 0,155

Tabela 7b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(8) Amina Secundária

Conformação	Escore
Conformação 6	36,1741
Conformação 10	35,9277
Conformação 2	35,8609
Conformação 4	35,8172
Conformação 8	35,7782
Conformação 3	35,7108
Conformação 5	35,5784
Conformação 9	35,3360
Conformação 7	32,9328
Conformação 1	24,6312
Média ± Desvio Padrão	34,3747 ± 3,363

Tabela 8b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(9) Amina Terciária

Conformação	Escore
Conformação 1	35,1444
Conformação 8	34,9855
Conformação 2	34,6801
Conformação 6	34,5359
Conformação 3	34,3840
Conformação 10	34,2057
Conformação 5	34,0167
Conformação 7	34,0004
Conformação 4	33,9220
Conformação 9	33,1888
Média ± Desvio Padrão	34,3063 ± 0,543

Tabela 9b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(10) Flúor

Conformação	Escore
Conformação 9	32,3826
Conformação 2	32,2074
Conformação 3	32,1692
Conformação 7	31,9549
Conformação 4	31,8219
Conformação 6	31,7570
Conformação 1	31,1800
Conformação 5	31,1703
Conformação 10	30,8142
Conformação 8	30,1497
Média ± Desvio Padrão	31,5607 ± 0,676

Tabela 10b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(11) Cloro

Conformação	Escore
Conformação 10	33,0231
Conformação 2	33,9579
Conformação 3	32,8514
Conformação 4	32,8293
Conformação 8	32,7874
Conformação 1	32,3736
Conformação 7	32,2042
Conformação 6	31,9807
Conformação 9	31,9272
Conformação 5	31,8534
Média ± Desvio Padrão	32,5788 ± 0,614

Tabela 11b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(12) Hidroxila

Conformação	Escore
Conformação 1	32,6416
Conformação 3	32,5094
Conformação 6	32,4218
Conformação 10	32,4171
Conformação 7	32,3745
Conformação 2	32,3170
Conformação 8	32,3096
Conformação 4	32,1754
Conformação 9	32,1154
Conformação 5	32,0421
Média ± Desvio Padrão	32,3323 ± 0,173

Tabela 12b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(13) Ácido Carboxílico

Conformação	Escore
Conformação 10	35,7863
Conformação 8	35,6615
Conformação 1	35,6531
Conformação 6	35,6251
Conformação 7	35,5990
Conformação 2	35,5627
Conformação 3	35,4369
Conformação 4	35,3085
Conformação 5	35,1670
Conformação 9	33,3700
Média ± Desvio Padrão	35,3170 ± 0,672

Tabela 13b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(14) Morfolina

Conformação	Escore
Conformação 9	40,3509
Conformação 4	38,9405
Conformação 8	38,6887
Conformação 5	37,7445
Conformação 1	36,7330
Conformação 2	35,8935
Conformação 10	34,4242
Conformação 6	34,3866
Conformação 3	34,3759
Conformação 7	34,274
Média ± Desvio Padrão	36,5811 ± 2,138

Tabela 14b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(15) Tiomorfolina

Conformação	Escore
Conformação 8	43,0523
Conformação 4	42,7412
Conformação 1	42,4015
Conformação 9	41,9881
Conformação 7	38,2908
Conformação 3	38,1548
Conformação 6	37,7224
Conformação 2	37,3903
Conformação 10	37,3192
Conformação 5	36,9822
Média ± Desvio Padrão	39,6042 ± 2,441

Tabela 15b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(16) Metilpiperazina

Conformação	Escore
Conformação 6	40,7322
Conformação 5	40,6285
Conformação 1	39,4773
Conformação 8	38,2436
Conformação 4	36,6323
Conformação 3	35,5846
Conformação 2	35,0887
Conformação 9	34,4983
Conformação 7	31,8826
Conformação 10	29,0448
Média ± Desvio Padrão	36,1812 ± 3,600

APÊNDICE C - Docking Molecular com substituintes na posição 3

Tabela 1c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(2) Metil

Conformação	Escore
Conformação 9	33,8536
Conformação 5	33,8032
Conformação 2	33,7764
Conformação 3	33,5209
Conformação 10	33,4707
Conformação 7	33,3102
Conformação 6	33,2960
Conformação 4	33,2222
Conformação 8	33,2031
Conformação 1	32,9947
Média ± Desvio Padrão	33,4451 ± 0,276

Tabela 2c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(3) Etil

Conformação	Escore
Conformação 8	35,8965
Conformação 9	35,8917
Conformação 3	35,6099
Conformação 7	35,4521
Conformação 5	35,2699
Conformação 4	35,1618
Conformação 6	34,9435
Conformação 10	34,9063
Conformação 2	34,0960
Conformação 1	34,0500

Média ± Desvio Padrão	35,1277 ± 0,620
------------------------------	------------------------

Tabela 3c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(4) Etileno

Conformação	Escore
Conformação 6	36,2991
Conformação 2	35,4486
Conformação 3	35,1322
Conformação 1	34,8274
Conformação 5	34,5385
Conformação 8	34,3193
Conformação 4	34,1901
Conformação 10	33,6864
Conformação 7	33,5767
Conformação 9	33,4025
Média ± Desvio Padrão	34,5420 ± 0,865

Tabela 4b: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(5) Fenil

Conformação	Escore
Conformação 3	41,4412
Conformação 7	41,3688
Conformação 4	41,2645
Conformação 5	41,1988
Conformação 1	41,1744
Conformação 9	41,1056
Conformação 10	40,7501
Conformação 6	40,0215
Conformação 8	39,9982
Conformação 2	39,9036
Média ± Desvio Padrão	40,8226 ± 0,582

Tabela 5c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(6) Benzil

Conformação	Escore
Conformação 5	47,9316
Conformação 3	47,8368
Conformação 10	47,7722
Conformação 9	46,8244
Conformação 2	44,8747
Conformação 8	44,8344
Conformação 6	44,6496
Conformação 7	43,7045
Conformação 1	43,6405
Conformação 4	43,3283
Média ± Desvio Padrão	45,5397 ± 1,767

Tabela 6c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(7) Amina Primária

Conformação	Escore
Conformação 8	34,1588
Conformação 7	34,0987
Conformação 4	34,0936
Conformação 6	34,0435
Conformação 1	33,7798
Conformação 9	33,7645
Conformação 2	33,7467
Conformação 3	33,6845
Conformação 10	33,5729
Conformação 5	33,3545
Média ± Desvio Padrão	33,8297 ± 0,249

Tabela 7c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(8) Amina Secundária

Conformação	Escore
Conformação 7	37,1537
Conformação 1	36,8960
Conformação 9	36,4725
Conformação 8	35,5860
Conformação 2	34,8121
Conformação 10	34,4323
Conformação 5	33,9410
Conformação 6	33,7002
Conformação 4	33,5803
Conformação 3	33,5287
Média ± Desvio Padrão	35,0102 ± 1,345

Tabela 8c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(9) Amina Terciária

Conformação	Escore
Conformação 5	36,2966
Conformação 7	35,2413
Conformação 8	35,1180
Conformação 2	34,4570
Conformação 10	34,4480
Conformação 6	34,1939
Conformação 3	34,1543
Conformação 1	33,2098
Conformação 9	32,8130
Conformação 4	32,6182
Média ± Desvio Padrão	34,2550 ± 1,088

Tabela 9c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(10) Flúor

Conformação	Escore
Conformação 10	33,8803
Conformação 4	33,8205
Conformação 2	33,6994
Conformação 1	33,5698
Conformação 3	33,4067
Conformação 9	33,3399
Conformação 5	33,3315
Conformação 8	33,2549
Conformação 7	33,2156
Conformação 6	32,9114
Média ± Desvio Padrão	33,4430 ± 0,285

Tabela 10c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(11) Cloro

Conformação	Escore
Conformação 9	34,0368
Conformação 10	33,8493
Conformação 3	33,7417
Conformação 7	33,4738
Conformação 4	33,4352
Conformação 6	33,4008
Conformação 5	33,2405
Conformação 8	33,2231
Conformação 2	32,9798
Conformação 1	31,1966
Média ± Desvio Padrão	33,2577 ± 0,749

Tabela 11c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(12) Hidroxila

Conformação	Escore
Conformação 10	35,3896
Conformação 8	35,1258
Conformação 9	35,0335
Conformação 3	34,7771
Conformação 2	34,6222
Conformação 1	33,8174
Conformação 6	33,1966
Conformação 4	33,1369
Conformação 5	32,5252
Conformação 7	31,9859
Média ± Desvio Padrão	33,9610 ± 1,136

Tabela 12c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(13) Ácido Carboxílico

Conformação	Escore
Conformação 1	35,0918
Conformação 2	34,4309
Conformação 3	34,2084
Conformação 4	34,1426
Conformação 8	33,9648
Conformação 10	33,9609
Conformação 6	33,8860
Conformação 7	33,8084
Conformação 5	33,6357
Conformação 9	33,4282
Média ± Desvio Padrão	34,0557 ± 0,438

Tabela 13c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(14) Morfolina

Conformação	Escore
Conformação 1	38,2962
Conformação 6	38,2270
Conformação 10	38,1190
Conformação 5	38,0726
Conformação 9	38,0172
Conformação 7	37,8976
Conformação 3	37,7487
Conformação 8	37,5775
Conformação 4	37,5093
Conformação 2	34,8695
Média ± Desvio Padrão	37,6334 ± 0,954

Tabela 14c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(15) Tiomorfolina

Conformação	Escore
Conformação 10	41,8925
Conformação 9	40,6280
Conformação 8	40,0974
Conformação 7	39,8934
Conformação 4	39,7863
Conformação 2	39,6639
Conformação 5	39,6059
Conformação 1	39,6043
Conformação 6	39,4341
Conformação 3	39,2768
Média ± Desvio Padrão	39,9882 ± 0,729

Tabela 15c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 3(16) Metilpiperazina

Conformação	Escore
Conformação 1	40,9853
Conformação 2	40,6382
Conformação 7	40,4234
Conformação 4	40,3533
Conformação 3	40,3138
Conformação 5	40,2955
Conformação 6	40,2769
Conformação 10	40,1821
Conformação 8	40,1589
Conformação 9	40,1353
Média ± Desvio Padrão	40,3762 ± 0,246

APÊNDICE D - *Docking* Molecular com compostos dissustituídos

Tabela 1d: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(fenil)2(fenil)

Conformação	Escore
Conformação 7	50,4497
Conformação 3	45,9574
Conformação 5	45,8068
Conformação 1	45,7598
Conformação 4	45,5705
Conformação 9	44,8881
Conformação 2	44,6031
Conformação 6	41,5303
Conformação 10	35,4426
Conformação 8	33,5123
Média ± Desvio Padrão	43,3520 ± 4,904

Tabela 2d: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(fenil)3(fenil)

Conformação	Escore
Conformação 5	50,6514
Conformação 9	50,5251
Conformação 4	50,5018
Conformação 3	50,4932
Conformação 10	50,3517
Conformação 2	50,2878
Conformação 1	49,9732
Conformação 7	48,9358
Conformação 6	48,4718
Conformação 8	48,3884

Média ± Desvio Padrão	49,8580 ± 0,852
------------------------------	------------------------

Tabela 3c: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(fenil)3(fenil)

Conformação	Escore
Conformação 3	49,0150
Conformação 1	48,9734
Conformação 9	48,6612
Conformação 4	48,5754
Conformação 8	48,2595
Conformação 7	48,1817
Conformação 5	46,5336
Conformação 6	46,4714
Conformação 10	41,9988
Conformação 2	41,3291
Média ± Desvio Padrão	46,7999 ± 2,710

Tabela 4d: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(benzil)2(benzil)

Conformação	Escore
Conformação 6	48,6024
Conformação 2	48,5680
Conformação 8	43,2573
Conformação 7	41,3935
Conformação 1	41,2125
Conformação 3	40,7861
Conformação 5	40,4104
Conformação 9	39,8721
Conformação 4	39,0196
Conformação 10	35,2602
Média ± Desvio Padrão	41,8382 ± 3,897

Tabela 5d: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(benzil)3(benzil)

Conformação	Escore
Conformação 2	52,6336
Conformação 1	48,8617
Conformação 7	48,0059
Conformação 9	47,9761
Conformação 6	47,7594
Conformação 8	47,5395
Conformação 3	47,3030
Conformação 10	47,0485
Conformação 4	44,3324
Conformação 5	43,8179
Média ± Desvio Padrão	47,5278 ± 2,293

Tabela 6d: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(benzil)3(benzil)

Conformação	Escore
Conformação 9	48,5414
Conformação 1	48,4070
Conformação 3	46,5781
Conformação 8	46,1449
Conformação 7	45,6755
Conformação 4	45,2412
Conformação 5	45,1030
Conformação 2	41,5193
Conformação 6	40,9416
Conformação 10	40,4921
Média ± Desvio Padrão	44,8644 ± 2,778

Tabela 7d: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(tiomorfolina)2(tiomorfolina)

Conformação	Escore
Conformação 10	47,3163
Conformação 3	43,2546
Conformação 7	43,2204
Conformação 4	42,5422
Conformação 9	40,7484
Conformação 2	39,2709
Conformação 5	39,0407
Conformação 6	38,5052
Conformação 8	36,5312
Conformação 1	36,1172
Média ± Desvio Padrão	40,6547 ± 3,287

Tabela 8d: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(tiomorfolina)3(tiomorfolina)

Conformação	Escore
Conformação 5	47,6130
Conformação 14	42,9182
Conformação 3	42,3484
Conformação 2	39,0740
Conformação 8	38,2318
Conformação 7	38,1178
Conformação 10	37,6448
Conformação 1	37,4311
Conformação 9	36,9582
Conformação 6	35,9611
Média ± Desvio Padrão	39,6298 ± 3,404

Tabela 9d: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(tiomorfolina)3(tiomorfolina)

Conformação	Escore
Conformação 2	45,1021
Conformação 10	44,2729
Conformação 8	43,8004
Conformação 3	43,4041
Conformação 1	39,0951
Conformação 9	33,5623
Conformação 5	33,1650
Conformação 4	31,7682
Conformação 6	31,4791
Conformação 7	21,6965
Média ± Desvio Padrão	36,7345 ± 7,267

Tabela 10d: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(metilpiperazina)2(metilpiperazina)

Conformação	Escore
Conformação 2	42,4507
Conformação 6	41,3241
Conformação 10	40,3619
Conformação 8	39,9115
Conformação 3	39,2950
Conformação 4	39,1637
Conformação 1	38,8651
Conformação 9	38,8019
Conformação 7	37,7094
Conformação 5	34,2021
Média ± Desvio Padrão	39,2085 ± 2,108

Tabela 11d: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(metilpiperazina)3(metilpiperazina)

Conformação	Escore
Conformação 10	42,5101
Conformação 1	41,8355
Conformação 5	41,8259
Conformação 7	41,7749
Conformação 4	41,0311
Conformação 6	40,2350
Conformação 2	40,0942
Conformação 8	39,9534
Conformação 3	39,7212
Conformação 9	39,7202
Média ± Desvio Padrão	40,8701 ± 0,993

Tabela 12d: *Goldscore.fitness* obtidos para o 2(metilpiperazina)3(metilpiperazina)

Conformação	Escore
Conformação 1	37,0437
Conformação 2	37,0133
Conformação 9	36,8775
Conformação 4	36,8513
Conformação 10	36,7220
Conformação 6	36,6878
Conformação 5	36,5947
Conformação 8	36,5734
Conformação 7	29,8718
Conformação 3	26,8795
Média ± Desvio Padrão	35,1115 ± 3,437

APÊNDICE E - *Docking* Molecular com compostos trissubstituídos

Tabela 1e: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(benzil)2(benzil)3(benzil)

Conformação	Escore
Conformação 1	50,7556
Conformação 3	50,2263
Conformação 6	48,8876
Conformação 4	48,2043
Conformação 9	46,3416
Conformação 10	46,2686
Conformação 8	46,1039
Conformação 7	43,5573
Conformação 5	42,9195
Conformação 2	30,8394
Média ± Desvio Padrão	45,4104 ± 5,438

Tabela 2e: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(tiomorfolina)2(tiomorfolina)3(tiomorfolina)

Conformação	Escore
Conformação 5	35,8143
Conformação 9	34,6476
Conformação 2	10,5701
Conformação 3	9,8752
Conformação 7	5,3013
Conformação 6	2,8317
Conformação 4	-6,1528
Conformação 8	-6,5078
Conformação 1	-13,2160
Conformação 10	-19,1075

Média ± Desvio Padrão	5,4056 ± 17,482
------------------------------	------------------------

Tabela 3e: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(benzil)2(benzil)3(fenil)

Conformação	Escore
Conformação 7	52,5334
Conformação 10	51,3667
Conformação 1	49,9699
Conformação 6	49,9552
Conformação 2	44,2255
Conformação 4	43,6110
Conformação 3	41,6583
Conformação 9	41,3394
Conformação 5	40,9412
Conformação 8	37,1891
Média ± Desvio Padrão	45,2789 ± 5,003

Tabela 4e: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(benzil)2(tiomorfolina)3(fenil)

Conformação	Escore
Conformação 4	43,4411
Conformação 1	41,0577
Conformação 2	38,0549
Conformação 3	36,4599
Conformação 5	36,1893
Conformação 7	34,0071
Conformação 6	32,0882
Conformação 8	31,8130
Conformação 9	31,6098
Conformação 10	8,1308
Média ± Desvio Padrão	33,2851 ± 9,190

Tabela 5e: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(benzil)2(tiomorfolina)3(benzil)

Conformação	Escore
Conformação 5	30,4954
Conformação 4	28,8980
Conformação 2	26,9397
Conformação 1	25,9971
Conformação 7	25,1910
Conformação 10	24,2256
Conformação 8	22,7844
Conformação 3	20,0694
Conformação 6	19,4231
Conformação 9	19,0862
Média ± Desvio Padrão	24,3109 ± 3,759

Tabela 6e: *Goldscore.fitness* obtidos para o 1(benzil)2(tiomorfolina)3(tiomorfolina)

Conformação	Escore
Conformação 9	37,1549
Conformação 5	18,1008
Conformação 6	15,7327
Conformação 10	15,0979
Conformação 1	14,3501
Conformação 7	14,0903
Conformação 4	7,7590
Conformação 2	7,3162
Conformação 3	6,0529
Conformação 8	4,4123
Média ± Desvio Padrão	14,0067 ± 8,922