

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS AZÓLICOS SOBRE HSV-1

Sara Calzavara Polido (PIBIC/CNPq/FA/UEM), André Henrique Dos Santos, Tania Ueda Nakamura (Orientador). E-mail: tunakamura@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Farmácia/ Farmacognosia

Palavras-chave: Herpes simples tipo 1; compostos azólicos; atividade antiviral.

RESUMO

O vírus Herpes simples tipo 1 (HSV-1) é um vírus envelopado de DNA de dupla fita, que causa lesões orofaciais e é uma das infecções virais mais comuns. Pertence à família Herpesviridae e é transmitido pelo contato direto com indivíduos infectados. O tratamento usual emprega análogos de nucleosídeos como o aciclovir, mas seu uso prolongado pode levar ao desenvolvimento de cepas resistentes, especialmente em pacientes imunocomprometidos, evidenciando a necessidade de novas substâncias antivirais. Este estudo investigou a citotoxicidade e a atividade anti-HSV-1 de compostos heterocíclicos do grupo dos azólicos em culturas celulares Vero, usando o método colorimétrico do MTT. Dos doze compostos testados, quatro mostraram-se menos tóxicos e foram selecionados para investigar a atividade anti-HSV-1 *in vitro*. Apenas um composto apresentou atividade anti-HSV-1, cujo EC₅₀ foi igual a 51,3 µg/mL.

INTRODUÇÃO

O vírus Herpes simples (HSV) é um patógeno humano altamente prevalente, com soroprevalência estimada em 66% em nível mundial. É classificado em dois subtipos principais: HSV-1 e HSV-2, geralmente associados a lesões orofaciais e genitais, respectivamente (LOOKER et al 2020).

No caso do HSV-1, após a infecção primária, o vírus estabelece latência nos gânglios trigeminais, de modo que aproximadamente 80% dos indivíduos permanecem sem sintomas durante a infecção primária, o que dificulta a intervenção precoce e favorece a disseminação. Além disso pode haver reativação do vírus em diferentes momentos ao longo da vida. [KRISHNAN; STUART, 2021]. Assim sendo, muitos agentes antimicrobianos sintéticos e semissintéticos estão sendo pesquisados e testados na clínica para tratar diversas infecções microbianas [PENG; DAMU; ZHOU, 2013].

Entre as classes químicas em estudo, os azóis, pertencentes ao grupo dos compostos heterocíclicos, que contêm nitrogênio e estrutura aromática rica em elétrons, têm despertado grande interesse científico. Seus derivados apresentam potencial de aplicação em diversas áreas, desde medicina à agricultura, em razão

da capacidade de estabelecer múltiplas interações [PENG; CAI; ZHOU, 2013]. Assim, considerando esse potencial, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade anti-HSV-1 de compostos heterocíclicos da classe dos azólicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo celular, vírus e compostos

Doze compostos azólicos foram sintetizados e fornecidos pelo Laboratório de Síntese de Heterocíclicos SINTHET, pela aluna de doutorado Julia Poletto, coordenado pela Profa. Dra. Fernanda Andréia Rosa. Os ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral foram realizados em células Vero cultivadas em DMEM e suplementadas com SFB (soro fetal bovino). Amostras de HSV-1 (cepa KOS) foram propagadas em monocamadas de células Vero incubadas a 37 °C. A suspensão de vírus obtida após a centrifugação do sobrenadante, foi quantificada, separada em alíquotas em criotubos e armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

Ensaio de citotoxicidade

A partir de uma monocamada de células Vero foi preparada a suspensão celular em DMEM com 10% de SFB, que foi distribuída nos poços de uma placa de 96 poços e incubada a 37 °C durante 24h. As monocamadas de células foram lavadas com PBS (tampão fosfato salino) e diluições seriadas (1000 a 1,25 µg/mL) dos compostos foram adicionadas aos poços. A placa foi incubada por 72 h, a 37 °C com 5% de CO₂. Após a incubação, os poços foram lavados com PBS, e, posteriormente, adicionado solução de MTT, exceto no branco, seguido de incubação por 4 h ao abrigo da luz, em estufa 37 °C. Em seguida, o MTT foi removido e adicionado DMSO (dimetilsulfóxido) em todos os poços. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca, em 570 nm. Foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes.

Atividade antiviral

Monocamadas de células Vero preparadas em placas de 96 poços e infectadas com a suspensão de HSV-1 (cepa KOS) TCID₅₀, exceto nos poços destinados ao controle de células, onde foram adicionados DMEM, e incubadas por 1h, 37 °C, 5% CO₂. Sobre as monocamadas infectadas foram adicionadas as concentrações dos compostos preparados em DMEM, em triplicata. A placa foi incubada a 37°C durante 72h. A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico do MTT e a percentagem de proteção celular foi calculada a partir da curva de dose-resposta por regressão não linear. Os resultados considerados representam a média de 3 experimentos independentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, estão apresentados na Figura 01. Observa-se que os compostos 11 e 12 são os menos tóxicos às células, apresentando CC_{50} de 845 e 440 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Assim, estes foram escolhidos para seguir com os experimentos de avaliação da atividade anti-HSV-1, uma vez que os demais compostos foram tóxicos. Considerando que os compostos 13 e 14 apresentam estrutura molecular similar e radicais substituídos na mesma posição, estes também foram eleitos para prosseguir com os testes antivirais.

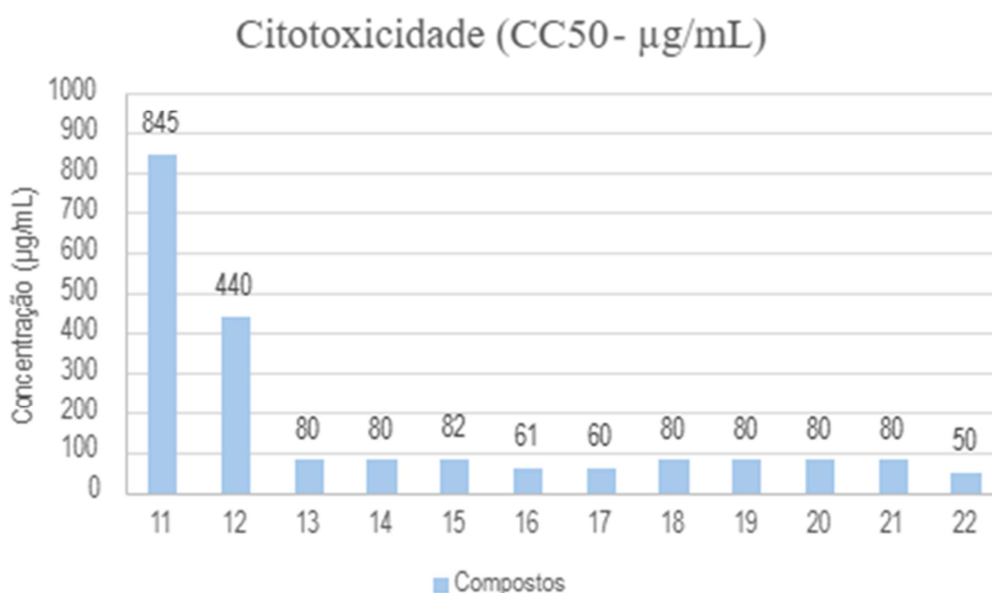


Figura 1 – Resultados do ensaio de citotoxicidade dos compostos azólicos realizados em cultura de células VERO, cuja viabilidade foi revelada pelo método colorimétrico do MTT. Os valores apresentados representam a concentração do composto capaz de matar 50% das células Vero (CC_{50}).

Os resultados dos ensaios realizados para verificar a atividade antiviral demonstrou que apenas o composto 13 foi capaz de atingir a concentração efetiva para proteger 50% das células Vero contra a infecção viral (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividade antiviral. Determinação da Concentração efetiva capaz de proteger 50% (EC_{50}) das células Vero contra a infecção de HSV-1 cepa KOS.

Composto	11	12	13	14
EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	>100	>100	51,3	>100

Os resultados mostram que embora os compostos 11 e 12 tenham apresentado menor toxicidade celular, estes não foram efetivos na proteção celular contra a infecção pelo HSV-1. Por outro lado, o composto 13 foi capaz de proteger 50% das células Vero contra a infecção por HSV-1, apresentando a concentração efetiva (EC_{50}) igual a 51,3 $\mu\text{g/mL}$, e um índice de seletividade (IS) igual a 1,6. As demais amostras não apresentaram atividade até a concentração máxima testada (100 $\mu\text{g/mL}$). Portanto, consideramos que estas não apresentam atividade antiviral, pois

nestes casos os valores do IS obtidos foram $< 1,0$, sendo que a amostra 13 apresentou IS igual a 1,5.

CONCLUSÕES

Dentre os doze compostos analisados, apenas o composto 13 foi capaz de proteger 50% das células Vero quando infectadas pelo HSV-1, mostrando-se aproximadamente duas vezes mais ativo sobre o HSV-1 do que sobre as células hospedeiras. Estes resultados indicam que dentre os compostos avaliados, o composto 13 apresenta atividade anti-HSV-1 *in vitro*. Assim, testes de avaliação complementares serão realizados para investigar o mecanismo de ação contra HSV-1.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Universidade Estadual de Maringá (PIBIC), à Fundação Araucária e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro. Ao André Henrique dos Santos no auxílio à realização dos experimentos e à Dra. Valéria Aquilino Barbosa pelo auxílio com os compostos.

REFERÊNCIAS

KRISHNAN, R.; STUART, P. M. Developments in Vaccination for Herpes Simplex Virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 798927, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.798927>>. Acesso em: 14 ago. 2025.

LOOKER, K. J.; JOHNSTON, C.; WELTON, N. J.; JAMES, C.; VICKERMAN, P.; TURNER, K. M. E.; *et al.* The global and regional burden of genital ulcer disease due to herpes simplex virus: a natural history modelling study. **BMJ Global Health**, v. 5, n. 3, p. e001875, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/bmjgh-2019-001875>>. Acesso em: 14 ago. 2025.

PENG, X. M.; CAI, G. X.; ZHOU, C. H. Recent developments in azole compounds as antibacterial and antifungal agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 16, p. 1963-2010, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/15680266113136660205>>. Acesso em: 14 ago. 2025.

PENG, X. M.; DAMU, G. L. V.; ZHOU, C. H. Current developments of coumarin compounds in medicinal chemistry. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 21, p. 3884-3930, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/1381612811319210006>>. Acesso em: 14 ago. 2025.