



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Isabella Otenio de Lourenço

Estudo da interação da proteína NS1 do vírus sincicial respiratório humano (hRSV) com flavonoides por espectroscopia de fluorescência e dinâmica molecular

São José do Rio Preto
2019

Isabella Otenio de Lourenço

Estudo da interação da proteína NS1 do vírus sincicial respiratório humano (hRSV) com flavonoides por espectroscopia de fluorescência e dinâmica molecular

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq - Proc.:134461/2017-7

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza

São José do Rio Preto
2019

L892e Lourenço, Isabella Otenio de
Estudo da interação da proteína NS1 do vírus sincicial respiratório humano (hRSV) com flavonoides por espectroscopia de fluorescência e dinâmica molecular / Isabella Otenio de Lourenço. -- São José do Rio Preto, 2019
97 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientador: Marcelo Andres Fossey
Coorientadora: Fátima Pereira de Souza

1. Biofísica molecular. 2. Virologia. 3. Moléculas. 4. Biomoléculas. 5. Proteínas recombinantes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Isabella Otenio de Lourenço

Estudo da interação da proteína NS1 do vírus sincicial respiratório humano (hRSV) com flavonoides por espectroscopia de fluorescência e dinâmica molecular

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq - Proc.134461/2017-7

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Dr. Alexandre Suman de Araujo
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli
UNESP – Câmpus de Araraquara

São José do Rio Preto
12 de abril de 2019

Dedico este trabalho a minha mãe, que nunca mediu esforços para que eu pudesse focar nos meus estudos e por me apoiar e me incentivar a continuar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador e co-orientadora, Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey e Prof.^a Dr.^a Fátima Pereira de Souza, por terem me dado a oportunidade de continuar minha carreira científica, por todos os ensinamentos passados a mim que, com toda certeza, levarei comigo por toda a minha carreira profissional e, também, pessoal. Sou muito grata por tudo que aprendi durante o período e pelo crescimento profissional durante o mestrado.

Aos professores Dr. Márcio Colombo, Dr. Fernando Alves de Melo e Dr. Raghuvir K. Arni pela ajuda prestada disponibilizando o uso de equipamentos ou reagentes de seus laboratórios para a realização deste projeto. Assim como o Prof. Dr. Luis Octávio Regasini por ter disponibilizado os ligantes utilizados neste estudo.

Agradeço a Dr.^a Gabriela Campos de Araújo pelo primeiro contato com os estudos dos métodos computacionais, indicação de materiais de estudo da fundamentação e metodologia e ao Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso pelos conhecimentos e discussões nos estudos computacionais. Também agradeço aos alunos de estágio, IC e alunos da Pós-Graduação do laboratório de Biologia Molecular por toda a ajuda prestada e amizade. À Evelyn Pedroso Toscano Quintino pela parceria, amizade e companheirismo no projeto e por nunca medir esforços para me ajudar nos experimentos e discussões sobre os resultados.

Agradeço a minha família pelo apoio e por me incentivar nos estudos, principalmente, minha mãe Marilda Ottenio e meu namorado, Felipe Vieira dos Santos Izumi, pelo apoio e ajuda em me manter focada e não desistir nos momentos difíceis.

A FAPESP (Processo FAPESP 2011/07137-6, 2013/24355-2, 2016/17378-4) e FINEP (Processo FAPESP 2016/01749-3) pelo apoio no desenvolvimento de pesquisa, proporcionando infraestrutura, e a PROPG pelo apoio na divulgação do trabalho em congressos.

RESUMO

As infecções causadas pelo vírus sincicial respiratório humano (hRSV) podem provocar sintomas leves e indistinguíveis de resfriados comuns em adultos e crianças saudáveis, mas também é uma das principais causas de infecções agudas do trato respiratório inferior, como pneumonia e bronquiolite, em recém nascidos prematuros, crianças de até dois anos e idosos. A infecção por hRSV não garante proteção contra contaminações subsequentes, e o desenvolvimento de terapias antivirais efetivas ou vacina preventiva ainda não estão disponíveis. Neste sentido, faz-se necessária a busca por alvos proteicos importantes para o combate da infecção viral e de potenciais inibidores destas proteínas. A proteína Não-Estrutural 1 (NS1) é de suma importância para o sucesso da replicação viral, capaz de reduzir a resposta imunológica, em particular a resposta do interferon do tipo I, e prevenir a apoptose celular, sendo um possível alvo de tratamento contra a infecção por hRSV. Mediante a isto, o estudo sobre a interação da NS1 com ligantes para o seu bloqueio pode possibilitar o entendimento dos mecanismos de inibição, nos quais os flavonoides têm sido descritos como sendo supressores eficazes. Além disso, essas moléculas são potenciais fármacos pelo seu baixo custo de obtenção e poucos efeitos adversos. O objetivo deste estudo foi investigar a interação entre a proteína NS1 do hRSV com alguns flavonoides utilizando espectroscopia de fluorescência e *docking* molecular. A NS1 foi expressa, purificada e quantificada por espectroscopia de UV/VIS e dicroísmo circular. A flexibilidade estrutural foi verificada por dinâmica molecular. A análise da interação proteína/ligante foi realizada por espectroscopia de fluorescência. A interação da NS1 com os flavonoides estudados teve maior contribuição devido a interações hidrofóbicas. Os resultados sugerem que a interação depende das estruturas dos flavonoides e da posição de suas hidroxilas. Entretanto, a ordem de grandeza de ligação foi moderada (10^4 M^{-1}) para todas as moléculas estudadas, com isso o flavonoide poderia interagir com a NS1 impedindo, momentaneamente, a proteína de bloquear as vias do IFN- α , e logo desassociarem para que o flavonoide possa ser complexado por outras proteínas NS1.

Palavras-chaves: hRSV, proteína NS1, flavonol, espectroscopia de fluorescência, *docking* molecular, dicroísmo circular, dinâmica molecular.

ABSTRACT

Human respiratory syncytial virus (hRSV) infections can cause mild symptoms of common colds in adults and children, but it is also a leading cause of acute lower respiratory tract infections such as pneumonia and bronchiolitis in premature newborns, children until two years old and elderly people. The hRSV infections does not guarantee protection against subsequent contamination, and the development of effective antiviral therapies or preventive vaccine is not available yet. Therefore, it is necessary to search for important proteins targets to combat viral infection and potential inhibitors of these proteins. Non-Structural 1 protein (NS1) is of utmost importance for the viral replication success, capable of reducing the immune response, in particular the interferon type I response, and preventing cell apoptosis, being a possible target of treatment against hRSV infection. It is important to study the interaction of NS1 with ligands for the blockade of this protein, and thus to use it as a possible target for treatment against hRSV infection. The study on the interaction of NS1 with ligands is important to understanding the mechanisms of inhibition, which flavonoids have been described as affective suppressors. These molecules are potential drugs because of their low cost of procurement and few adverse. The aim of this study was to investigate the interaction between the hRSV NS1 protein and some flavonoids using fluorescence spectroscopy and molecular docking. NS1 protein was expressed, purified and quantified by UV/VIS spectroscopy and circular dichroism. Structural flexibility was verified by molecular dynamics. Protein-ligands interaction analysis was performed by fluorescence spectroscopy. The interaction of the protein with the studied flavonoids had their greatest contribution due to hydrophobic interactions. The results suggest the interaction depends on the flavonoid structures, the position of their hydroxyls, and the affinity to NS1. However, the order of magnitude of binding was moderate (10^4 M^{-1}) for the molecules in this study, so the flavonoid could interact with NS1 momentarily impossibility the protein from blocking IFN- α pathways, and then disassociating to that the flavonoid can be complexed by other NS1.

Keywords: hRSV, NS1 protein, flavonol, fluorescence spectroscopy, molecular docking, circular dichroism, molecular dynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da estrutura e organização do vírion e a organização gênica do hRSV.....	17
Figura 2: Ciclo replicativo do RSV.....	22
Figura 3: Inibição da resposta imune do hospedeiro pelas proteínas virais NS1 e NS2.	24
Figura 4: Estrutura química dos flavonoides.	27
Figura 5: Estrutura química do flavonoide quercetina.	28
Figura 6: Luz polarizada circularmente para a direita.....	31
Figura 7: Rotações das moléculas e espectro padrão de CD.	32
Figura 8: Diagrama de <i>Jablonski</i>	34
Figura 9: Fluoróforos intrínsecos bioquímicos e seus espectros de emissão e absorção.....	36
Figura 10: Representação de interações entre átomos e a representação das diferentes descrições dos 20 aminoácidos em um campo de força.	44
Figura 11: Mapa do plasmídeo pJexpress401-NS1.	51
Figura 12: Representação em <i>cartoon</i> e superfície da estrutura cristalográfica da proteína NS1 depositada no PDB 5CJ2.	58
Figura 13: SDS-PAGE a 15% corado com <i>Coomassie brilliant blue</i> R250 com o resultado do teste de indução da expressão da proteína NS1 com diferentes combinações de antibióticos.	61
Figura 14: SDS-PAGE a 15% corado com <i>Coomassie brilliant blue</i> R-250 da purificação por cromatografia de afinidade.....	63
Figura 15: SDS-PAGE a 15% corado com <i>Coomassie brilliant blue</i> R-250 da purificação por cromatografia de exclusão molecular.	64
Figura 16: Espectro de dicroísmo circular da proteína NS1.	65
Figura 17: Avaliação da dinâmica molecular da proteína NS1.	67
Figura 18: Espectro característico do coeficiente de absorvidade dos flavonoides.	69
Figura 19: Espectro de coeficiente de absorvidade molar em tampão PBS pH 7,4 e 2 mM de DTT dos flavonoides miricetina, kaempferol, morina e morina penta acetilada.	70

Figura 20: Espectro de emissão normalizado do complexo NS1-ligante em 292 K.....	71
Figura 21: Gráfico de <i>Stern-Volmer</i> para a supressão de fluorescência da NS1 pela formação de complexo com ligantes em 292 e 310 K.	72
Figura 22: Gráfico de duplo-log para a supressão de fluorescência da NS1 pelos flavonoides em 2 temperaturas.	73
Figura 23: Atracamento dos flavonoides na proteína NS1 com miricetina por <i>docking</i> molecular.	80
Figura 24: Atracamento dos flavonoides na proteína NS1 com kaempferol por <i>docking</i> molecular.	81
Figura 25: Atracamento dos flavonoides na proteína NS1 com morina por <i>docking</i> molecular.....	82
Figura 26: Atracamento dos flavonoides na proteína NS1 com morina penta acetilada por <i>docking</i> molecular.	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Forças atuantes de acordo com a energia do sistema.....	42
Quadro 2: Parâmetros da proteína NS1 gerados pela ferramenta ProtParam.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativa da estrutura secundária da proteína NS1 por CD comparada com as estimativas da estrutura resolvida por cristalografia (CHATTERJEE <i>et al.</i> , 2017) e com a estrutura clusterizada pela dinâmica molecular.....	66
Tabela 2: Constantes de supressão de <i>Stern-Volmer</i> (k_{SV}) do complexo NS1-ligantes em 292 e 310K. $R > 0,99$	73
Tabela 3: Valores das constantes de ligação (k_b) e número de ligantes por sítio de interação (n) para as temperaturas de 292 e 310K. $R > 0,99$	75
Tabela 4: Valores de $1/T$ e $-R \ln k_b$ para as temperaturas de 292 e 310K para o gráfico de van't Hoff.	76
Tabela 5: Valores das variações da energia livre de Gibbs ΔG , de entalpia ΔH e entropia ΔS	77
Tabela 6: Relação das distâncias das ligações entre resíduos da cadeia lateral da proteína NS1 envolvidos na ligação com a miricetina.	97
Tabela 7: Relação das distâncias das ligações entre resíduos da cadeia lateral da proteína NS2 envolvidos na ligação com a kaempferol.....	97
Tabela 8: Relação das distâncias das ligações entre resíduos da cadeia lateral da proteína NS1 envolvidos na ligação com a morina.	97
Tabela 9: Relação da distância da ligação entre resíduo da cadeia lateral da proteína NS1 envolvidos na ligação com a morina penta acetilada.	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

k_{SV}	Constante de <i>Stern-Volmer</i>
k_b	Constante de ligação
BME	<i>β-mercaptoetanol</i>
CD	Dicroísmo Circular
D.O	Densidade óptica
DM	Dinâmica molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
hRSV	Vírus Sincicial Respiratório Humano
IFN	<i>Interferon</i>
IFNAR	Receptor Interferon α/β
IL	Interleucina
IPS-1	estimulador de promotor de interferon beta do tipo 1
IPTG	<i>Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside</i>
IRF-3	Fator 3 Regulatório de Interferon
ISG	Gene Estimulado por Interferon
LRTI	Infecções agudas do trato respiratório inferior
MAVS	Proteína de sinalização mitocondrial
n	Número de ligantes por sítios de ligação
NF-$\kappa$$\beta$	Fator Nuclear Kappa β
NS1	Proteína Não-estrutural 1
NS2	Proteína Não-estrutural 2
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RANTES	Regulador da Ativação, Expressão e Secreção em Células T Normais
RIG-I	Gene Induzível pelo Ácido Retinóico 1
RLR	Receptor tipo RIG-I
RNP	Ribonucleoproteína
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
STAT	Transdutora de sinal e ativadora de transcrição
Th1	Linfócitos

TLR3	Receptor do Tipo Toll 3
TRAF3	Fator Associado ao Receptor de Necrose Tumoral 3
Tris	N-tris[hidroximetil]aminoetano
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	O Vírus Sincicial Respiratório	15
1.2	Classificação do Vírus Sincicial Respiratório	17
1.3	As proteínas do RSV	18
1.4	Ciclo replicativo viral	21
1.5	Papel das proteínas Não Estruturais (NS) na infecção viral	23
1.6	Flavonoides.....	25
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	30
2.1	Determinação da fração de estruturas secundárias de proteína por medidas espectroscópicas de Dicroísmo Circular (CD)	30
2.2	Absorção de radiação e emissão de fluorescência.....	33
2.3	Efeitos da geometria e da amostra	36
2.4	Supressão de fluorescência e quenching colisional.....	37
2.5	Equilíbrio de ligação dos complexos proteína-ligante	39
2.6	Termodinâmica da interação de proteína e ligante	41
2.7	Dinâmica molecular (DM).....	43
2.8	Docking molecular	47
3	OBJETIVOS	49
3.1	Objetivo geral.....	49
3.2	Objetivos específicos	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	DNA recombinante pJexpress401-NS1	50
4.2	Transformação do plasmídeo pJexpress401-NS1	51
4.3	Teste de indução da expressão da proteína NS1 em Rosetta-Gami 2 (DE3).....	52
4.4	Indução de expressão da proteína NS1 em larga escala	53
4.5	Preparação da amostra para purificação	53
4.6	Purificação da proteína NS1 por cromatografia de afinidade em sistema AKTA.....	53
4.7	Purificação da proteína NS1 por cromatografia de exclusão molecular em sistema AKTA.....	54

4.8	Caracterização dos flavonoides e quantificação de proteína por medidas espectrofotométricas	54
4.9	Estrutura secundária por deconvolução espectral de CD	56
4.10	Espectroscopia de Fluorescência da NS1 por titulação de flavonoides para verificação de interação	57
4.11	Simulação de DM da proteína NS1 e docking molecular dos complexos	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1	Parâmetros físicos e químicos fornecidos pela ferramenta ProtParam	60
5.2	Teste de indução da expressão da proteína NS1	60
5.3	Purificação da proteína NS1 por cromatografias de afinidade e exclusão molecular.....	62
5.4	Determinação da fração de estruturas secundárias de proteína por CD	64
5.5	Dinâmica Molecular da proteína NS1	66
5.6	Determinação do coeficiente de extinção molar de flavonoides	68
5.7	Supressão de Fluorescência da NS1 pela Morina	70
5.8	Parâmetros termodinâmicos da interação da NS1 com flavonoides.....	76
5.9	Interação proteína-ligante por docking molecular	78
6	CONCLUSÃO	84
7	TRABALHOS FUTUROS	85
8	BIBLIOGRAFIA	86
9	ANEXOS.....	95
9.1	Anexo A: Sequenciamento do gene NS1.....	95
9.1.1	Sequência de nucleotídeos do gene NS1.....	95
9.1.2	Sequência de aminoácidos da proteína NS1.....	95
9.2	Anexo B: Meio de cultura LB pH 7,5.....	95
9.2.1	Meio líquido LB.....	95
9.2.2	Meio sólido LB	96
9.3	Anexo C: Tampão PBS pH 7,4	96
10	APÊNDICE.....	97
10.1	Distâncias das interações entre os átomos da NS1 com os flavonoides	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Vírus Sincicial Respiratório

O vírus sincicial respiratório humano (hRSV) foi isolado pela primeira vez em 1956, por Morris, Blount e Savage, em estudo para investigar o agente etiológico responsável pela doença respiratória aguda em chimpanzes do Instituto de Pesquisa Walter Reed Army, nos Estados Unidos da América, sendo descrito como “agente de coriza de chimpanzé” (MORRIS *et al.*, 1956; COLLINS & GRAHAM, 2008). Em 1957, após estudos em cultura de tecido, o vírus foi renomeado para vírus sincicial respiratório (RSV), devido ao seu padrão exclusivo de formar sincícios celulares multinucleados e, só em 1981, começou a caracterização detalhada do RSV com a clonagem molecular e sequenciamento do seu genoma (COLLINS *et al.*, 2013; HOGAN *et al.*, 2018).

A maioria das infecções por hRSV ocorrem em surtos sazonais no mundo todo (GRIFFITHS *et al.*, 2017) e é transmitido por contato direto e indireto com secreções nasais ou orais contaminadas (HOGAN *et al.*, 2018). Apresenta sintomas leves e indistinguíveis de resfriados comuns em adultos e crianças saudáveis, mas também é uma das principais causas de infecções virais agudas do trato respiratório inferior (LRTI), como pneumonia e bronquiolite, em recém nascidos prematuros, crianças e idosos (IM *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2019), asma e alergias (CAO *et al.*, 2016). Além disso, também atinge indivíduos imunocomprometidos, causando elevada mortalidade (COLLINS & GRAHAM, 2008; ROSSEY *et al.*, 2014; CAO *et al.*, 2016).

Globalmente, o hRSV é responsável por mais de 30 milhões de infecções do LRTI, três milhões de hospitalizações e de 50 a 75 mil mortes a cada ano em crianças menores de cinco anos de idade, tendo a maior incidência em países em desenvolvimento (XIE *et al.*, 2019). Em idosos, as infecções por hRSV causam morbidade e mortalidade tanto quanto as infecções por influenza. Já em pacientes com transplante de células-tronco a mortalidade por infecção por hRSV é estimada entre 6 e 80%. Entretanto, as infecções por hRSV também produzem morbidade significativa em populações adultas saudáveis (CULLEN *et al.*, 2019).

Alguns fatores podem aumentar o risco de infecção por hRSV, como uma associação entre doenças graves e indução de hiper-reatividade das vias aéreas durante a infância, pneumonia em pacientes imunocomprometidos e infecção em

idosos que resultam no excesso de mortalidade. Outros fatores estão relacionados a condições dos pacientes, incluindo nascimento prematuro, baixa imunidade, doenças pulmonares ou cardíacas crônicas ou imunossupressão, vias aéreas estreitas ou fatores de natureza genética (COLLINS *et al.*, 2013).

A infecção por RSV afeta principalmente o epitélio bronquial, bronquíolo e alveolar humano (COLLINS *et al.*, 2013; LAY *et al.*, 2013) que resulta em aglomerados de células epiteliais das vias respiratórias apicais ciliadas induzindo seu desprendimento, perda de cílios, formação de sincícios esporádicos, hipersecreção de muco (SEMPLE *et al.*, 2007; COLLINS *et al.*, 2013), infiltração pulmonar aguda (LAY *et al.*, 2013), aumento da replicação viral e a redução da atividade imunológica antiviral, acarretando a redução na produção de interferon (IFN) (COLLINS *et al.*, 2013).

Estudos com células humanas imortalizadas *in vitro* demonstraram que o vírus pode replicar em células derivadas de tecidos pulmonares, de rim, fígado, tecido neural, cólon, mama e ovário (ZHANG *et al.*, 2002, COLLINS *et al.*, 2013). Portanto, a replicação do RSV não está necessariamente restrita ao seu tecido de origem no trato respiratório ou ao epitélio, mas as células altamente diferenciadas são muito mais permissivas do que outras células.

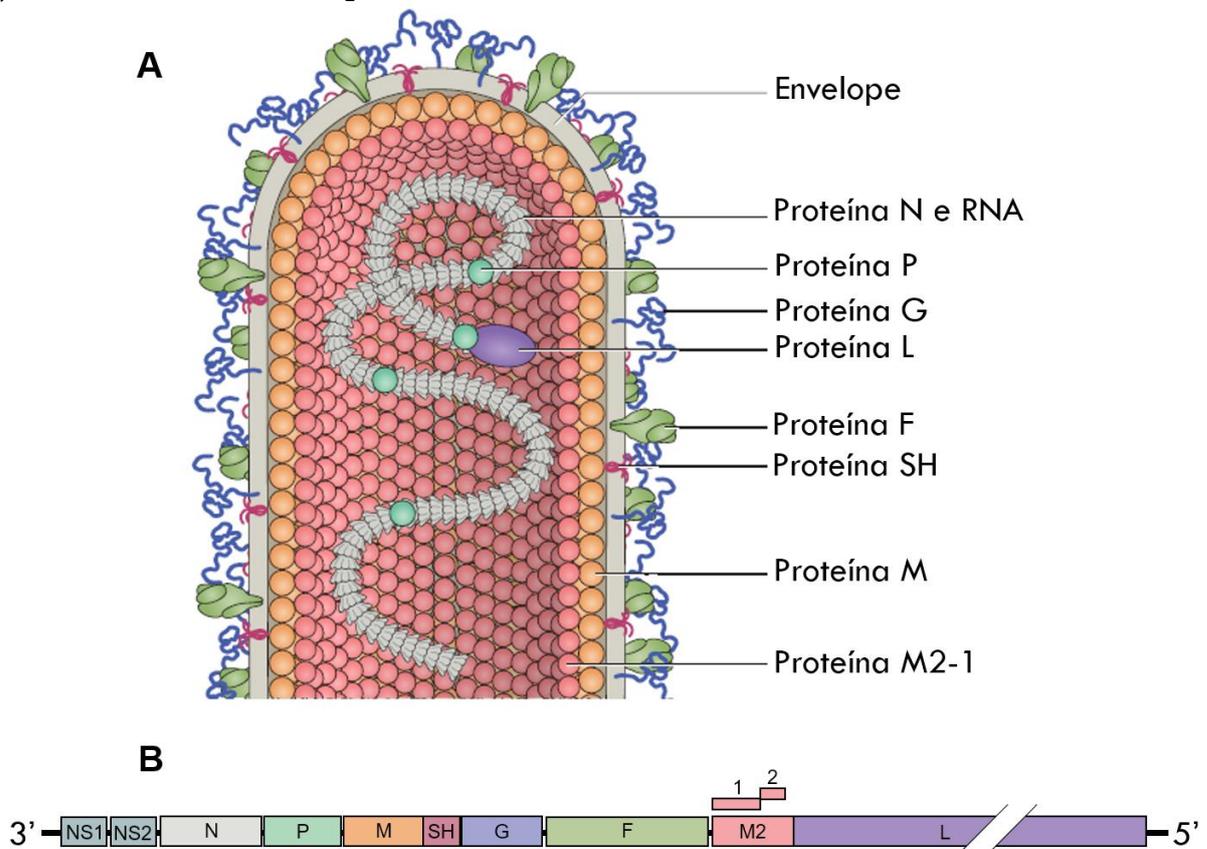
Nenhuma terapia antiviral efetiva ou vacina preventiva está atualmente disponível, embora muitos alvos candidatos tenham sido avaliados em estudos pré-clínicos e clínicos ao longo de várias décadas (ATWELL *et al.*, 2016; CAO *et al.*, 2016; CULLEN *et al.*, 2019). Uma das dificuldades é pelo fato de a infecção por hRSV não garantir proteção em infecções subseqüentes, podendo ocorrer repetidas vezes ao longo de vários anos ou na mesma estação. Este fato indica que os seres humanos possuem uma deficiência nas respostas da memória à infecção por RSV devido a falha na ativação da memória preexistente após uma segunda infecção, além das mutações nas proteínas de Fusão (F) e Glicoproteína (G) presentes no envelope viral (**Figura 1.A**) prejudicarem a especificidade dos candidatos a antivirais (CULLEN *et al.*, 2019).

O palivizumab (Synagis®), um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra um epítipo conservado da proteína F do hRSV, é a única terapia profilática aprovada para a prevenção da infecção pelo hRSV em recém-nascidos com menos de 24 meses de idade. No entanto, seu uso atualmente é limitado a um subconjunto de bebês de alto risco devido aos altos custos e efeitos colaterais exacerbados. O uso

é aprovado para prematuros nascidos com menos de 29 semanas de gestação, lactentes com doença pulmonar crônica de prematuridade como idade gestacional menor do que 32 semanas de gestação e lactentes com necessidade de oxigênio suplementar nos primeiros 28 dias de vida, com congênitos hemodinamicamente significativos doença cardíaca, e distúrbios neuromusculares que prejudicam a depuração das vias aéreas (REZAEI *et al.*, 2017; HOGAN *et al.*, 2018; XEI *et al.*, 2019; XING & PROESMANS, 2019).

1.2 Classificação do Vírus Sincicial Respiratório

Figura 1: Esquema da estrutura e organização do vírion e a organização gênica do hRSV. **(A)** A glicoproteína (G), proteína de Fusão (F) e a Pequena Proteína Hidrofóbica (SH) estão situadas no envelope viral. Uma camada abaixo da membrana viral é formada pela proteína de matriz (M) e é responsável pela forma filamentosa do vírion. A proteína M2-1 interage tanto com a proteína M como a Nucleoproteína (N), que envolve o genoma viral. A proteína Polimerase (L) e a Fosfoproteína (P) também se associam à proteína N. **(B)** Representação do genoma do vírus sincicial respiratório (RSV) contendo 10 genes que codificam 11 proteínas, sendo que o gene M2 codifica as proteínas M2-1 e M2-2. Os genes mais transcritos são aqueles que codificam as proteínas Não-Estrutural 1 (NS1) e Não-Estrutural 2 (NS2), que inibem a apoptose e respostas do interferon. responsável pela codificação das proteínas virais contendo 10 genes.



FONTE: Adaptado BATTLE *et al.* (2019).

O RSV é classificado na família *Pneumoviridae* na ordem *Mononegavirales* (ESNEAU *et al.*, 2019), e existe como dois subgrupos antigénicos, tipo A e tipo B, que podem ser diferenciados pelo sequenciamento de nucleotídeos e pelo padrão de reação de anticorpos monoclonais à Glicoproteína (G) e a proteína de Fusão (F) (HOGAN *et al.*, 2018).

O vírion do RSV consiste em partículas esféricas de 100 a 350 nm formadas por nucleocapsídeo envolto num envelope lipídico derivado da membrana plasmática da célula hospedeira (COLLINS *et al.*, 2013), (**Figura 1.A**). O genoma viral do RSV consiste em RNA de cadeia simples de sentido negativo 3'-5' (CAO *et al.*, 2016) e não-segmentado de 15,2 kb organizado em 10 genes (ESNEAU *et al.*, 2019; XING & PROESMANS, 2019) que codificam, separadamente, 11 proteínas: NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2 e L, sendo que as proteínas M2-1 e M2-2 são codificadas pelo mesmo gene, M2 (CAO *et al.*, 2016; XING & PROESMANS, 2019) (**Figura 1.B**).

1.3 As proteínas do RSV

Ambas as proteínas G e F do RSV podem interagir com o polímero de açúcar heparan sulfato sendo fortemente glicosiladas. Embora a glicoproteína (G) seja conhecida como proteína de ligação devido às suas propriedades de ligação a glicosaminoglicanos, ela não é necessária para a infecção de células *in vitro*, e assim a proteína de Fusão (F) pode ter mais probabilidade de ter uma ligação específica ao receptor da membrana plasmática da célula hospedeira (BATONICK *et al.*, 2008; COLLINS *et al.*, 2013), porém a infecção *in vivo* requer a proteína G (LAY *et al.*, 2013).

A proteína G, com 298 resíduos de aminoácidos, além de ser responsável pela adsorção, é também um importante alvo para anticorpos neutralizantes (LAY *et al.*, 2013). As mais extensivas diferenças genéticas e antigénicas entre os tipos A e B do vírus estão localizados nesta glicoproteína devido a suas mutações (HOGAN *et al.*, 2018).

A proteína de Fusão (F), com 574 resíduos de aminoácidos, medeia a ligação do RSV a células hospedeiras, fusão das membranas lipídicas e distribuição do material genético do vírus ao citoplasma (HOGAN *et al.*, 2018; COLLINS *et al.*, 2013) e diferentemente da proteína G, a proteína F é bem conservada, tornando-a uma boa candidata para o desenvolvimento de vacinas. No entanto, é estruturalmente

complexa com múltiplas conformações e numerosos epítomos antigénicos (XIE *et al.*, 2018).

A SH é uma proteína transmembrana, de 64 resíduos de aminoácidos, e mesmo não sendo essencial para a infecção viral (SCHMIDT & VARGA, 2017), estudos sugerem que a SH pode ter um papel na fusão viral. Por ser uma viroporina, uma classe de proteínas virais pequenas, pode modificar a permeabilidade da membrana e inibir a apoptose da célula durante a infecção por formar uma estrutura semelhante a poros na membrana das células infectadas. Embora o papel exato da atividade dos canais iónicos SH na infecção pelo RSV permaneça incerto, esta proteína parece funcionar como um canal seletivo de cátions que altera a permeabilidade da membrana implicando em implicações importantes para a resposta imune (COLLINS *et al.*, 2013; LAY *et al.*, 2013; ARAUJO *et al.*, 2016; SCHMIDT & VARGA, 2017).

A proteína de Matriz (M), de 256 resíduos de aminoácidos, não é necessária para iniciar a formação de partículas virais, mas na sua ausência, as partículas permanecem atrofiadas e imaturas, pois a M está envolvida na montagem viral e brotamento (COLLINS *et al.*, 2013). É uma proteína fosforilada, não glicosilada, localizada externamente à camada de nucleocapsídeo, ligando o envelope da bicamada lipídica com o nucleocapsídeo. Assim, desempenha um papel na condução da interação coordenada entre os componentes estruturais virais, facilitando a montagem do vírus. A proteína M está presente em corpos de inclusão citoplasmáticos formados durante a infecção viral e é associada ao nucleocapsídeo, direcionando-o às regiões da membrana celular, onde se localizam as glicoproteínas virais (OLIVEIRA *et al.*, 2013; SHAHRIARI *et al.*, 2018).

A proteína M2-1, com 194 resíduos de aminoácidos, forma um tetrâmero e medeia a associação da proteína M com o nucleocapsídeo, formado pelas proteínas N, P, L e a M2-1 (OLIVEIRA *et al.*, 2013; BATTLES *et al.*, 2019). Funciona como um cofator transcricional do complexo RNA polimerase dependente de RNA, aumentando a processabilidade da polimerase, e previne a interrupção da transcrição prematura (TEIXEIRA *et al.*, 2017; GUIMARAES *et al.*, 2018). A proteína M2-2, com 88 ou 90 resíduos de aminoácidos, é responsável pela substituição da transcrição do RNA pela replicação do genoma. Ambas as proteínas têm suas funções principais desconhecidas (COLLINS *et al.*, 2013; REZAEI *et al.*, 2017).

A proteína Polimerase (L), com 2.165 resíduos de aminoácidos, consiste na principal subunidade de RNA polimerase dependente de RNA (TREMAGLIO *et al.*, 2013) e é responsável pela replicação do genoma viral (COLLINS *et al.*, 2013; SCHMIDT & VARGA, 2017).

A Nucleoproteína N, com 391 resíduos de aminoácidos, associa-se com o genoma para formar o complexo ribonucleoproteína (RNP) para encapsular tanto o genoma viral quanto o seu homólogo de sentido positivo. Assim, protege o genoma e reduz o reconhecimento pelos receptores de reconhecimento padrão da célula (SCHMIDT & VARGA, 2017). Além disso, proteína N modula a transcrição e replicação viral (ASENJO *et al.*, 2012; COLLINS *et al.*, 2013).

A Fosfoproteína (P), com 241 resíduos de aminoácidos, serve como um cofator importante para o complexo polimerase e auxilia na proteção do genoma do vírus, interagindo com a nucleoproteína (N) e a com a Polimerase (L) dependente de RNA, para formar o nucleocapsídeo (GALLOUX *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013; ASENJO & VILLANUEVA, 2016).

As proteínas Não Estrutural 1 (NS1), com 139 resíduos de aminoácidos, e a proteína Não Estrutural 2 (NS2), com 124 resíduos de aminoácidos (COLLINS *et al.*, 2013), são expressas em células infectadas, em que os mRNAs são relativamente abundantes, devido à proximidade das suas extremidades 3' ao promotor no genoma de cadeia negativa (YANG *et al.*, 2015). A estrutura cristalográfica da proteína NS1 mostrou uma homologia estrutural com a proteína de Matriz (M) de *Monogavirales*, além de partilharem sequências significativas (CHATTERJEE *et al.*, 2017), porém, a proteína NS2 continua não apresentando nenhuma homologia com outras proteínas (SWEDAN *et al.*, 2009, LING *et al.*, 2009).

As proteínas NS não são essenciais para o processo de replicação do RSV, porém a deleção de qualquer um dos genes atenua significativamente a replicação *in vitro* e *in vivo* (SCHMIDT & VARGA, 2017). As proteínas NS desempenham um papel chave na subversão da resposta imune inata do hospedeiro e podem cooperar ou atuar individualmente para inibir a indução de interferon do tipo I (IFN) e genes estimulados por IFN (YANG *et al.*, 2015; COLLINS *et al.*, 2013). Podem, também, inibir a apoptose para prolongar a vida da célula e aumentar a eficiência da replicação (COLLINS *et al.*, 2013).

1.4 Ciclo replicativo viral

A infecção na célula hospedeira, especialmente nas células epiteliais das vias respiratórias, inicia-se com a adsorção do RSV pela ligação da proteína G às proteínas de superfície celular, permitindo que a proteína F do RSV se ligue a receptores *Toll-like* 4 (TLR4) na superfície celular, desencadeando a ativação de quinases que potencializam a entrada de partículas virais de RSV nas células hospedeiras alvo. Durante ou após a ligação ao receptor, o envelope viral se funde à membrana da célula hospedeira liberando o conteúdo da partícula viral infectante e, em seguida, ocorre a dissociação do complexo RNP da proteína de Matriz pela fosforilação da proteína P (GRIFFITHS *et al.*, 2017; LAY *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2013).

As proteínas envolvidas na transcrição do vírus podem ser transportadas da partícula viral para a célula-alvo pois, o RSV é um vírus de RNA de sentido negativo e o RNA genômico isolado não é infeccioso, ao contrário de muitos vírus de RNA de sentido positivo (GRIFFITHS *et al.*, 2017). Então, uma vez dentro do citoplasma, o RNA de fita simples sentido negativo é transcrito pela RNA polimerase viral para produzir RNA viral de sentido positivo. Os RNAs de sentido positivo são utilizados tanto como mRNA para a tradução das proteínas estruturais do vírus quanto servem de molde para a replicação do genoma, sendo que esses processos ocorrem simultaneamente no citoplasma celular (LAY *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2013).

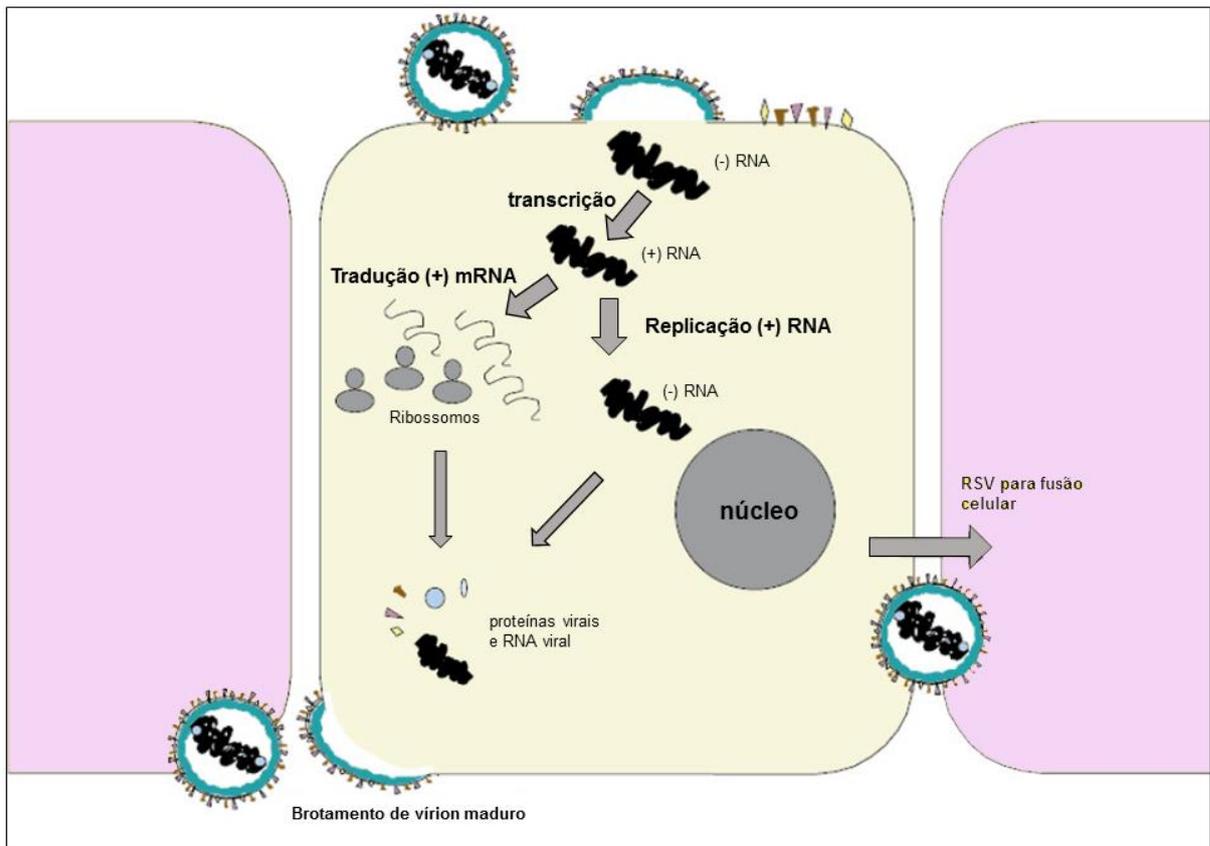
Após a síntese das proteínas e a replicação do material genético, a montagem e brotamento dos vírions maduros de RSV ocorrem na membrana plasmática, onde contém bolsas lipídicas modificadas pelo vírus envolvendo todas as proteínas de superfície virais e a proteína de Matriz (M). Dentro do vírion, a proteína M se liga à proteína M2-1 do complexo RNP e recruta esta estrutura para a membrana celular para a montagem do vírus e a ruptura das células infectadas para a fusão do vírus com células adjacentes (COLLINS *et al.*, 2013; HACKING *et al.*, 2002; LAY *et al.*, 2013). O ciclo replicativo viral é ilustrado na **Figura 2**.

Porém, a célula possui mecanismos para impedir a replicação viral reconhecendo por meio de receptores o material genético invasor e, assim, iniciando cascatas de respostas imunológicas. Os receptores consistem em receptores de *Toll-like* (TLRs), sendo o TLR3 e TLR4 os mais abundantes, que reconhecem qualquer RNA de cadeia dupla em compartimentos endocíticos, já o Gene Induzível pelo Ácido Retinóico 1 (RIG-I), membros da família de *like* receptores (RLR) detecta trifosfato

contendo RNA de cadeia simples no citoplasma durante o ciclo viral reprodutivo (SPANN *et al.*, 2005; LAY *et al.*, 2013). E tendo identificado o RNA viral, iniciam as cascatas de sinalização que ativam os fatores de transcrição nuclear *Factor-k β* (NF- κ β) e fatores reguladores de interferon 3 (IRF-3). Estes são translocados para o núcleo para promover a transcrição de genes pró-inflamatórios no pulmão.

A ativação de NF- κ β e IRF-3 é mediada pela RIG-I e o estimulador de promotor de interferon beta do tipo 1 (IPS-1) nos estágios iniciais da infecção por RSV e induzem a expressão de IFNs do tipo I, quimiocinas pró-inflamatórias, CCL5/RANTES e produção da interleucinas 8 (IL-8). Os IFNs do tipo I são moduladores importantes na resposta imune adaptativa, especialmente por ativar a resposta de células Nk (*natural killer*) e de células T citotóxicas (LAY *et al.*, 2013).

Figura 2: Ciclo replicativo do RSV. O vírus entra por fusão na membrana plasmática e libera seu RNA gênico senso negativo (preto) no citoplasma. A polimerase usa o genoma como molde para produzir RNAs senso positivo, que é utilizado tanto como mRNAs que traduzem proteínas virais quanto para a replicação e saem da célula hospedeira por brotamento pela membrana plasmática, produzindo vírions maduros descendentes que infectam outras células.



FONTE: adaptado de HACKING *et al.* (2002).

1.5 Papel das proteínas Não Estruturais (NS) na infecção viral

Uma vez que TLRs ativam caminhos que negligenciam uma infecção viral em desenvolvimento, o RSV possui mecanismos moleculares que suprimem a imunidade inata sem afetar a resposta inflamatória do hospedeiro. As proteínas NS1 e NS2 inibem os IFNs do tipo I, IFN- α e IFN- β (SCHMIDT & VARGA, 2017) das células epiteliais das vias respiratórias inibindo uma resposta imunológica de células T citotóxicas, especialmente a Th1 (LAY *et al.*, 2013) podendo cooperar ou agir individualmente para inibir a indução de IFNs de tipo I e genes estimulados por IFN (ISGs) (SPANN *et al.*, 2005).

A NS1 é a principal responsável pela supressão do IFN tipo I em células dendríticas humanas e foi relatada para co-localizar com a proteína de sinalização mitocondrial (MAVS) associada às mitocôndrias e o receptor *Toll-like* 3 (TLR3) (SCHMIDT & VARGA, 2017; PRETEL *et al.*, 2013), já a NS2 pode ligar-se ao N-terminal da RIG-I, que está envolvida na sinalização para a produção de IFN (LING *et al.*, 2009; SCHMIDT & VARGA, 2017). As ações das proteínas NS1 e NS2 impedem que o RIG-I e o MAVS se unam, resultando na inibição da ativação do IRF-3 e a fosforilação e translocação para o núcleo celular de IRF-3, destacando a importância das interações entre NS1 e NS2 com RIG-I e MAVS (OPENSHAW *et al.*, 2017; SCHMIDT & VARGA, 2017).

Alternativamente, a NS1 também pode inibir o IRF-3 por ligação direta ao IRF-3 e seu coativador transcricional, necessário para a atividade de ligação de DNA do IRF-3, o rompimento dessa interação pela NS1 impede que o IRF-3 se ligue e ative a transcrição do promotor do IFN- β (OPENSHAW *et al.*, 2017; SCHMIDT & VARGA, 2017).

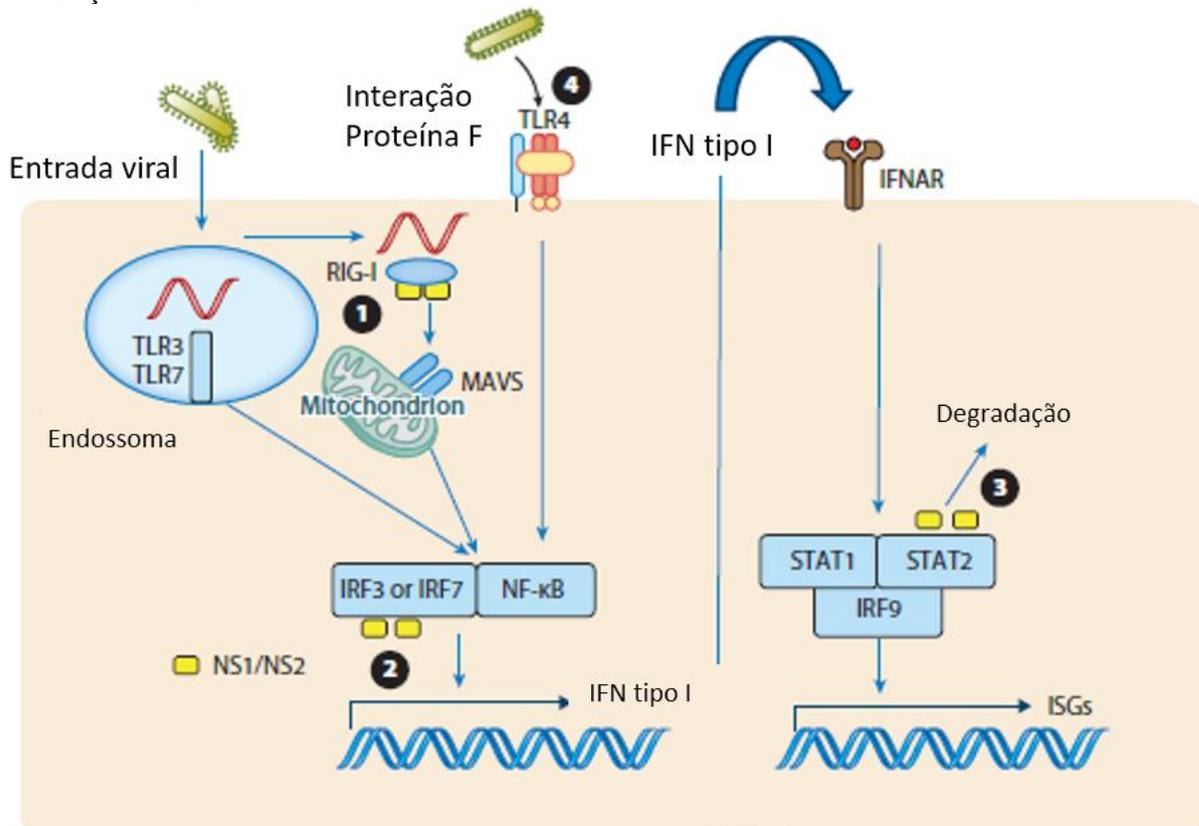
Tanto a NS1 como a NS2 previnem a apoptose precoce de uma forma independente do IFN e suprimem a maturação das células dendríticas e da resposta dos linfócitos T (YANG, *et al.* 2015). Com isso, NS1 inibe a diferenciação de linfócitos T através de mono-ubiquitinação, o que pode estar associado com aumento da susceptibilidade à asma após a infecção pelo RSV (LING e al., 2009; PRETEL *et al.*, 2013; LAY *et al.*, 2013).

O IFN- α e o IFN- β ligam a receptores de IFN (IFNAR), que se multimeriza e se torna fosforilado por tirosinas quinases, tornando-se um local de ancoragem para as proteínas de sinalização STAT2 e STAT1. Essas proteínas se ativam e associam-se

ao IRF-9 e translocam-se para o núcleo, ativando a transcrição de vários ISGs. A NS1 e NS2 atuam cooperativamente para reduzir os níveis de STAT2 total degradando-as por agregação e, assim, impedem a transcrição de ISGs e, conseqüentemente, inibem a sinalização dependente de IFN, no entanto, as NS podem inibir a STAT2 em algum grau isoladamente (OPENSHAW *et al.*, 2017; SCHMIDT & VARGA, 2017).

A capacidade de reduzir a resposta antiviral da célula, em particular a resposta do IFN do tipo I, é um fator importante para a replicação viral e os múltiplos mecanismos que o RSV evoluiu para bloquear a resposta do IFN na célula mostra a importância desta inibição para o vírus (COLLINS *et al.* 2013; GRIFFITHS *et al.*, 2017; SCHMIDT & VARGAS, 2017). A **Figura 3** esquematiza as ações das proteínas NS1 e NS2 durante o bloqueio do interferon.

Figura 3: Inibição da resposta imune do hospedeiro pelas proteínas virais NS1 e NS2. O RSV pode entrar na célula hospedeira por interação da proteína F em receptores na membrana da célula (TLR4) ou por endocitose. Após a ativação dos receptores de reconhecimento de padrões, principalmente RIG-I, TLR4 e TLR3, por infecção por RSV nas células, IRF-3 e NF- κ B são translocados para o núcleo, promovendo a transcrição de genes pró-inflamatórios no pulmão, incluindo IFN e genes estimulados por Interferon. Porém, (1) a proteína NS2 do RSV liga-se ao RIG-I e prejudica a sinalização inata via MAVS e (2) a NS1 perturba a ligação de IRF3 ao promotor de IFN- β . (3) A NS1 e NS2 aumentam a degradação de STAT2. (4) A proteína F do RSV liga-se ao TLR4 e pode dessensibilizar as vias de sinalização de TLR.



FONTE: adaptado de OPENSHAW *et al.* (2017).

1.6 Flavonoides

Os Flavonoides são compostos de baixo peso molecular de origem natural, sendo encontrados em quase todos os alimentos vegetais, como frutas, vegetais e sementes, assim como em bebidas, como o vinho tinto, chá, café e cerveja. Embora não sejam sintetizados pelo Ser Humano nem por outros animais (TARAHOVSKY *et al.*, 2014; DANIHELOVÁ *et al.*, 2012), são importantes componentes da dieta humana e, geralmente, considerados não nutrientes por não terem valor nutricional (BEHLING *et al.*, 2004).

O termo flavonoide deriva do latim '*flavus*', que significa amarelo, e durante muito tempo foram conhecidos como 'pigmento das flores', por serem considerados responsáveis pela tonalidade amarela, laranja e vermelha das flores e folhas durante o outono (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Descobertos pelo bioquímico Alberto Gyorgi, possuem propriedades antioxidantes (ALVES *et al.*, 2007), anti-inflamatória, antialérgica e antitumoral e antiviral. Sabe-se que a quercetina tem atividade antiviral contra o vírus herpes simples do tipo I e vírus parainfluenza do tipo 3. De modo semelhante, foi demonstrado que a morina é eficaz contra o vírus herpes, porém a rutina não tem qualquer atividade antiviral para este vírus (KAUL *et al.*, 1985). Os flavonoides também possuem atividade vasodilatadora, analgésica, anti-hepatotóxica, bem como atividade antimicrobiana (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Os flavonoides são moléculas que possuem papel protetor da saúde humana atuando contra toxinas e infecções (ALMEIDA *et al.*, 2004; DANIHELOVÁ *et al.*, 2012), por influenciarem nas propriedades físicas e estruturais da bicamada lipídica podendo agir na transdução de sinais celulares e regulação do metabolismo. Além disso, são capazes de são mais solúveis em regiões ou ambientes hidrofóbicos como na interfase das membranas biológicas, particularmente nas regiões contendo colesteróis da membrana celular (TARAHOVSKY *et al.*, 2014).

As classes de flavonoides diferem-se no nível de oxidação e no modelo de substituição da cadeia heterocíclica C e sua grande diversidade estrutural é devida a modificações que esses compostos podem sofrer, como hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação (ALMEIDA *et al.*, 2004). Mas todos os compostos possuem como estrutura básica um esqueleto de difenil propano (C₆C₃C₆) com dois anéis

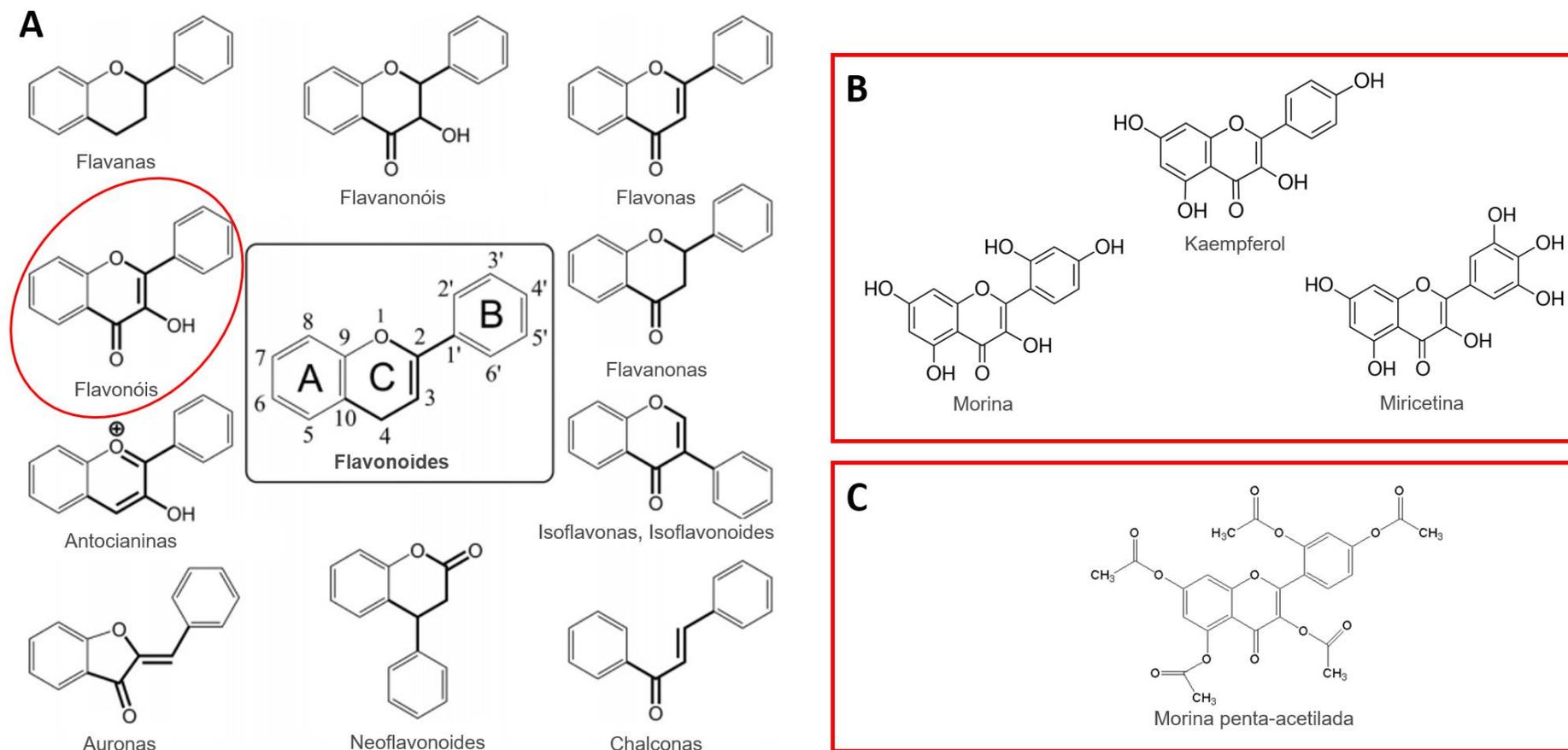
benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (**Figura 4.A**) (BEHLING *et al.*, 2004; TARAHOVSKY *et al.*, 2014).

Os flavonoides utilizados neste trabalho são da família das flavonol (**Figura 4.A**), sendo eles a miricetina, kaempferol e morina (**Figura 4.B**). Além disso, estudou-se um derivado de morina, morina penta-acetilada (**Figura 4.C**), que contém cinco substituições de hidroxilas por acetilações. Como já foi demonstrado que a quercetina (**Figura 5**) possui atividade antiviral no RSV em cultura de célula (ZAKARYAN *et al.*, 2017), buscou-se uma molécula da mesma família que pudesse ter uma atividade antiviral pelo RSV, atuando como um inibidor de proteína viral.

A morina (**Figura 4.B**) é um dos flavonóis mais comuns presentes na natureza, e especialmente abundante em cebola, folhas de goiabeira e algas (WANG *et al.*, 2014). Este flavonol possui propriedades antioxidantes e protege as células contra os danos causados pelos radicais livres. As propriedades antioxidantes da morina são direcionadas à eliminação de hidroxilas (OH^-) e ânion superóxido (O_2^-), espécies altamente reativas, devido as hidroxilas de sua estrutura doarem um átomo de hidrogênio aos radicais e, assim, inibir a peroxidação lipídica (ZENG *et al.*, 1997; NAFISI *et al.*, 2008; GUSDINER *et al.*, 2011), e também apresenta propriedades antibacteriana, anti-inflamatória e antiviral para o vírus da herpes (SUCIPTO *et al.*, 2017).

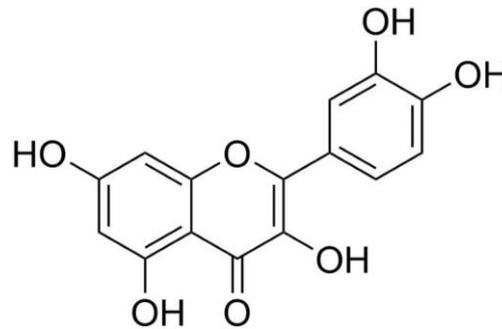
O estudo de GUSDINER *et al.* (2011) sugeriu que a acetilação protege os grupos hidroxila da quercetina de reações metabólicas, como metilação, sulfatação ou glicosilação, melhorando a ação anti-inflamatória em úlcera gástrica de ratos, já que esses metabolitos não possuem ação anti-inflamatória. Em outro estudo, de SANTOS *et al.* (2003), a ação antiviral de compostos polihidroxisterois sulfatados aumentou com a adição de acetilação em testes de culturas de célula com o vírus. Mediante estes estudos (GUSDINER *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2003) e ao fato de a morina ser um dos flavonoides mais abundantes na natureza, a acetilação deste flavonoide poderia ter uma ação antiviral melhorada, tendo, então, produzido um produto derivado da morina, morina penta acetilada (**Figura 4.C**).

Figura 4: Estrutura química dos flavonoides. **(A)** Ao centro tem-se a estrutura básica dos flavonoides sendo os anéis A e B anéis benzênicos e o anel C é pirano, e ao redor, estruturas dos grupos que compõem os flavonoides **(B)**. Flavonoides da família flavonol utilizados neste estudo. **(C)** Morina penta acetilada onde os grupos hidroxilas da estrutura da morina foram substituídas por grupos acetil. As estruturas em A e C foram construídas pelo software ChemDraw.



FONTE: adaptada de TARHOVSKY *et al.* (2014)

Figura 5: Estrutura química do flavonoide quercetina. A quercetina é um flavonoide do grupo flavonol, contendo cinco grupos hidroxila em sua estrutura, nas posições 5, 7, 3' e 4' nos anéis benzênicos, além da hidroxila fixa ao grupo flavonol na posição 3 do anel pirano.



FONTE: SIGMA¹

A miricetina (**Figura 4.B**) é um composto fenólico muito comum em frutas vermelhas, vegetais e em chás e vinhos e possui variações glicosiladas. Foi isolada pela primeira vez no final do século XVIII, a partir da casca de *Myrica esculenta* (Myricaceae), colhidas na Índia, pelo interesse na propriedade de tingimento do composto, que forma cristais amarelos de cor clara (SEM WAL *et al.*, 2016).

Este flavonoide apresenta atividades anti-inflamatórias, analgésicas, antitumorais, hepatoprotetores, antidiabéticas e antivirais (SEM WAL *et al.*, 2016), e foi demonstrado que a combinação de miricetinas glicosiladas possuem atividade antiviral contra o vírus da herpes (MEDINI *et al.*, 2016) e HIV (ORTEGA *et al.*, 2017), sugerindo que a mesma ação ocorra com a miricetina. A miricetina, e outros flavonoides com grupos hidroxilas, possui atividade antiviral contra RSV, sugerindo que tais características estruturais poderiam aumentar a atividade antiviral, sendo um grande potencial na prevenção e tratamento da infecção por RSV (SONG *et al.*, 2016).

O kaempferol (**Figura 4.B**) é um flavonol natural encontrado em brócolis, repolho, feijão, tomate, morango e maçã. Foi descoberto que o kaempferol exercia atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antivactericidas e antitumoral (CHEN & CHEN, 2013). E dois trabalhos (LANI *et al.*, 2015; PENG *et al.*, 2016) evidenciaram que o kaempferol possui função antiviral contra Chikungunya e contra infecção por vírus da herpes bovina, além de terem efeitos anti-inflamatórios mediados por macrófagos (ZHU *et al.*, 2018).

Os compostos naturais têm sido estudados em várias áreas, incluindo aqueles relacionados ao desenvolvimento de medicamentos antivirais, devido à sua alta

¹ <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>

disponibilidade e baixa toxicidade (ZAKARYAN *et al.*, 2017). Por isso, a busca por um potencial ligante às proteínas virais associados com estudos em cultivo celular buscam, nesta classe de moléculas, potenciais inibidores de infecções provocadas por RSV. Além disso, é de suma importância a investigação de possíveis antivirais para um tratamento acessível e com baixos efeitos adversos. Sendo necessário expandir os conhecimentos e investigar o melhor alvo assim como o inibidor de maior eficiência, para desta forma, propor desenho de moléculas mais eficientes na absorção celular.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Determinação da fração de estruturas secundárias de proteína por medidas espectroscópicas de Dicroísmo Circular (CD)

As ondas eletromagnéticas, como por exemplo um raio de luz, são constituídas pela junção da variação do campo elétrico com o campo magnético dispostos em planos ortogonais (REITZ *et al.*, 2008). A espectroscopia de dicroísmo circular utiliza-se de feixe de luz circularmente polarizada na ausência de campo magnético (**Figura 6.D**), sendo constituída por dois feixes planares polarizados fora de fase por 90° (**Figura 6.A**). Em tal feixe, o vetor do campo elétrico gira em torno da direção de propagação à direita ou à esquerda (**Figura 6.B**), executando uma volta completa em um comprimento de onda (**Figura 6.C**). Para um observador olhando em direção à fonte de luz, o vetor elétrico irá girar no sentido horário ou anti-horário.

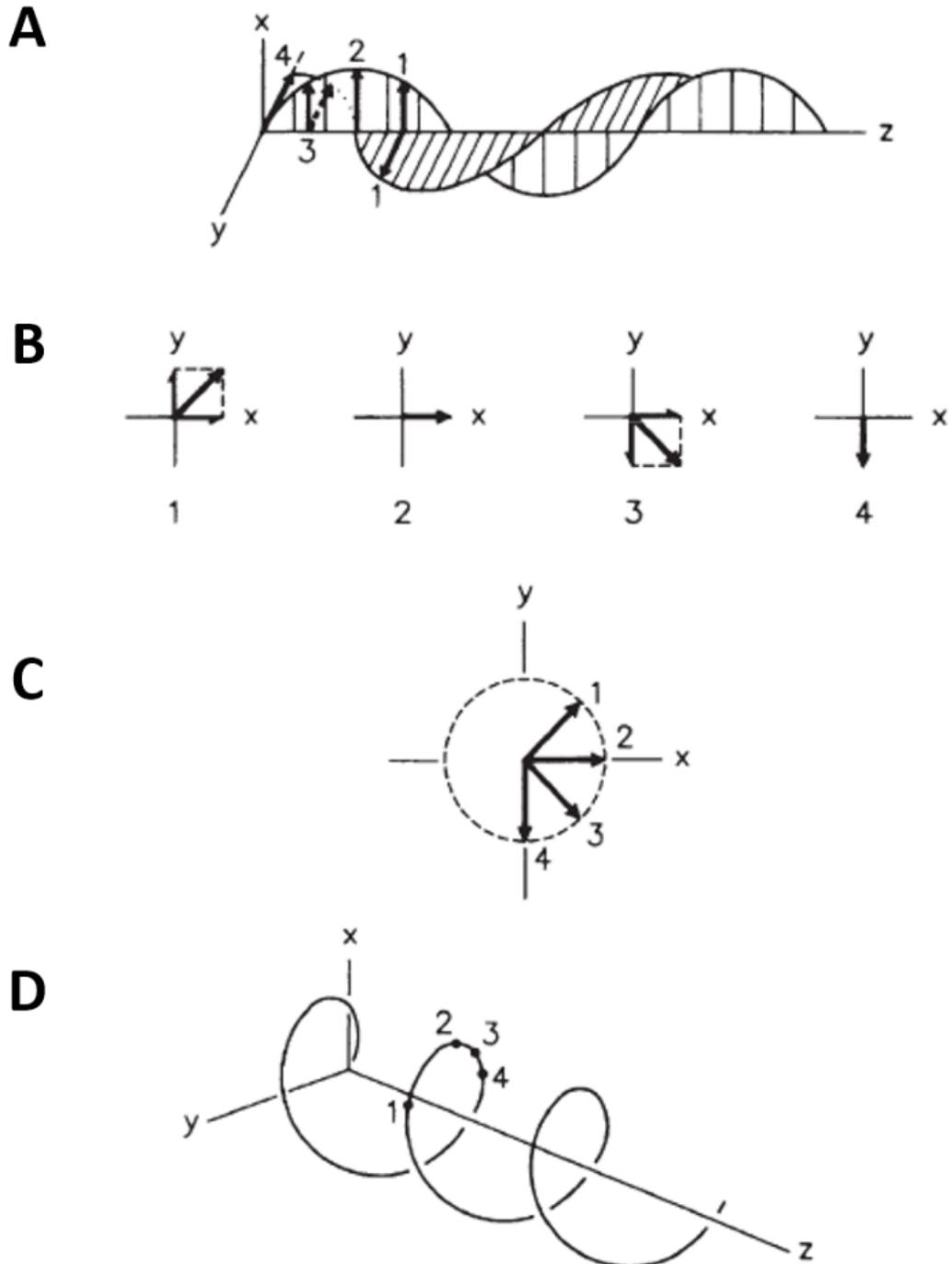
A passagem de luz polarizada através de uma molécula assimétrica, resulta na produção de luz elipticamente polarizada, no qual o vetor elétrico traça uma elipse em vez de oscilar em um plano ou formar um círculo. Quando as duas componentes circulares dos vetores elétricos estão na mesma direção, a soma das suas magnitudes forma o semieixo maior da elipse, e quando em direções oposta, a diferença das magnitudes forma o semieixo menor. O CD pode ser caracterizado pela relação entre os semieixos maior e menor, que é a tangente de ângulo zero, chamado de elipticidade (FASMAN, 1996; REITZ *et al.*, 2008).

Outra forma de descrevê-lo é pela diferença ($\Delta\epsilon$) entre a absorção de luz polarizada circularmente à esquerda (ϵ_R) e a direita (ϵ_L) que resulta na rotação do plano de polarização da luz. Porém, os espectros de CD são frequentemente relatados em termos de elipticidade molar ao invés de $\Delta\epsilon$ (FASMAN, 1996). A conversão entre $\Delta\epsilon$ e graus de elipticidade molar é descrita pelas relações a seguir:

$$\begin{aligned} [\Theta] &= 100. \theta / Cl \\ [\Theta] &= 3.298 \Delta\epsilon \end{aligned} \tag{1}$$

sendo $[\Theta]$ a elipticidade molar em $\text{deg.cm}^2\text{dmol}^{-1}$, θ é a elipticidade, C é a concentração média de resíduos, l é o caminho óptico e $\Delta\epsilon$ a diferença de absorbância de ϵ_R e ϵ_L (FASMAN, 1996; GREENFIELD, 2006).

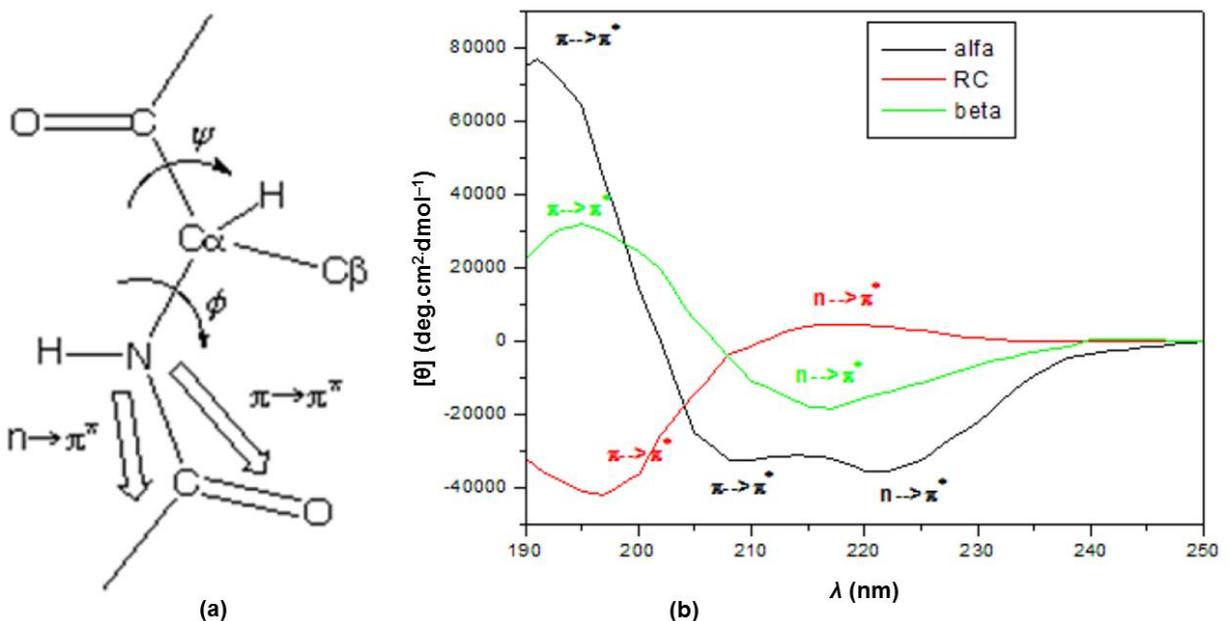
Figura 6: Luz polarizada circularmente para a direita. **(A)** Representação do vetor elétrico de feixes polarizados ortogonalmente fora de fase por 90° com setas representando o mesmo ponto z nos dois feixes numerados de 1 a 4. **(B)** Componentes x e y e suas resultantes ao longo do eixo z marcados de 1 a 4 em (A). **(C)** As resultantes em (B), projetadas em um plano XY , seguem um caminho circular ao longo da direção de propagação z . **(D)** A luz circularmente polarizada à direita é representada mostrando o vetor elétrico em função da posição ao longo da direção de propagação. As pontas dos vetores elétricos formam uma hélice direita, pois. Para um observador em um ponto fixo no eixo z olhando em direção à fonte de luz, o ponto 1 chegará primeiro e o ponto 4 por último. Então, o vetor elétrico parecerá girar no sentido horário sobre a direção de propagação em função do tempo. Na luz circularmente polarizada à esquerda, a ponta do vetor elétrico forma uma hélice à esquerda e um observador no eixo z olhando para a fonte de luz verá o vetor elétrico girar no sentido anti-horário.



Quando as proteínas estão no estado nativo, ou enoveladas, elas geralmente possuem elementos estruturais secundários, descritas pelos ângulos diedros Φ e Ψ (**Figura 7.a**), altamente assimétricos, tais como α -hélices e folhas- β , que possuem espectros de CD característicos (**Figura 7.b**). Quando as proteínas estão desnaturadas, elas perdem, parcialmente ou completamente, estas estruturas altamente ordenadas e as bandas de CD mudam (FASMAN, 1996; GREENFIELD, 2006).

Pode-se associar as bandas do espectro de CD com a absorção eletrônica por consistirem de uma série de bandas, cada uma delas correspondendo a uma transição eletrônica do estado fundamental para um estado eletronicamente excitado. Sendo as proteínas moléculas complexas, pode-se dividi-las em grupos funcionais com transições eletrônicas identificáveis que são apenas fracamente acopladas ao resto da molécula. Esses grupos, chamados de cromóforos, incluem aminoácidos de peptídeos e grupos fenil, fenólico e indólico de aminoácidos aromáticos (FASMAN, 1996).

Figura 7: Rotações das moléculas e espectro padrão de CD. (a) Diagrama de ligação peptídica mostrando a orientação das transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ (setas) e os ângulos diedros Φ e Ψ . (a) Espectros padrões de CD correspondes a configurações α -hélice (em preto), folha- β (em verde) e estrutura aleatória ou *random coil* (em vermelho).



FONTE: adaptada de GREENFIELD (2006).

O espectro de CD de uma proteína com estrutura em α -hélice, o acoplamento de *éxitons* das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ produzem uma banda positiva em 192 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$),

banda negativa em 209 nm ($n \rightarrow \pi^*$) e negativa em 222 nm deslocada para o vermelho (*red shifted*) ($n \rightarrow \pi^*$). Quando a estrutura secundária é aleatória ou *random coil* (RC) o espectro de CD apresenta banda positiva em 212 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$), banda negativa em 197 nm ($n \rightarrow \pi^*$). Já no caso de a estrutura ser fita- β o espectro de CD apresenta banda negativa em 218 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) positiva em 196 nm ($n \rightarrow \pi^*$) (**Figura 7.b**) (FASMAN, 1996).

Utilizando estas propriedades, foram desenvolvidos métodos de deconvolução para a análise dos dados obtidos por CD, levando em consideração as contribuições espectrais dos diferentes tipos de estruturas secundárias presentes nas proteínas. Os espectros de proteínas com estruturas puramente compostas de α -hélice, ou folha- β ou estrutura aleatória são utilizados como referência para a estimativa de estrutura secundária de uma dada proteína. Sendo assim, as análises foram desenvolvidas através de um grande número de algoritmos empíricos que assumem o espectro característico de uma proteína como uma combinação linear de espectros primários de estruturas secundárias (FASMAN, 1996; SREERAMA & WOODY, 2000; GREENFIELD, 2006).

2.2 Absorção de radiação e emissão de fluorescência

Um átomo ou molécula pode absorver radiação eletromagnética em forma de fótons em determinada frequência (ν), sendo que o ganho de energia (E) faz com que os elétrons passem para seus estados excitados eletronicamente. Quando esses elétrons retornam ao estado fundamental é emitida a luminescência, que é fortemente dividida em duas categorias: fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. As substâncias que emitem fluorescência são denominadas fluoróforos (VALEUR, 2002; LAKOWICZ, 2006).

O fenômeno da emissão de fluorescência apresenta propriedades gerais, sendo elas: o mesmo espectro de emissão de fluorescência é observado independentemente do comprimento de onda de excitação, e a energia de emissão é tipicamente menor que a energia de absorção, conseqüentemente, em um comprimento de onda maior (LAKOWICZ, 2006). Essa energia é dada pela seguinte relação:

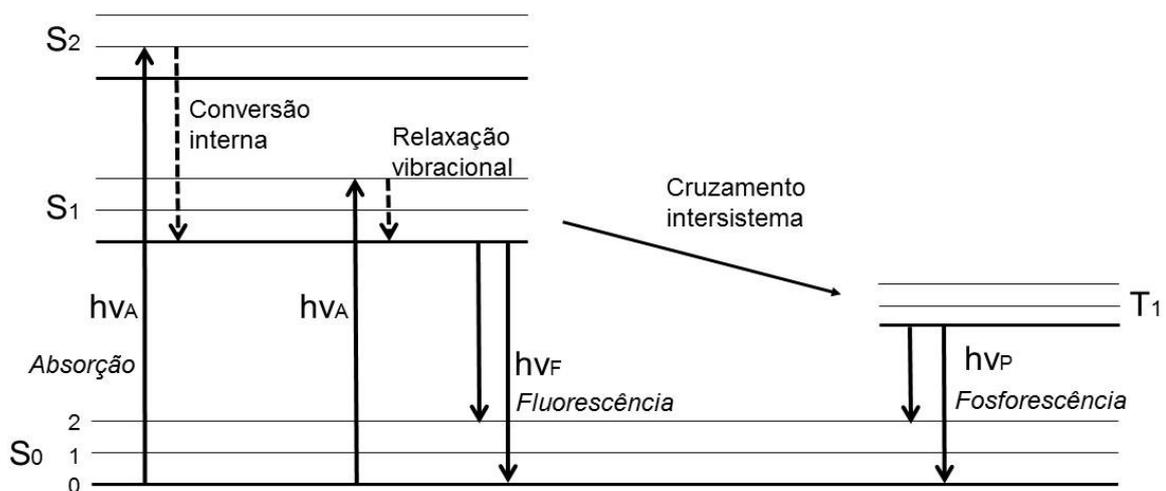
$$E = h\nu \quad (2)$$

sendo h a constante de Planck ($6,63 \cdot 10^{-34}$ Js), e ν , a frequência. Assim, a radiação eletromagnética é descrita corpuscularmente.

Nos espectros de absorção para moléculas poliatômicas são consideravelmente mais complexos que os espectros atômicos, pois, a energia E é constituída por três componentes. Sendo elas, a energia eletrônica da molécula, que provém dos estados de energia acessíveis pelo movimento dos elétrons ao redor do núcleo atômico, a energia vibracional, que se refere ao total de energia associada a uma quantidade de vibrações interatômicas moleculares, e a energia rotacional, que resulta dos movimentos rotacionais na molécula. Como consequência, o número de níveis de energia possíveis para uma molécula é, normalmente, várias ordens de grandeza maior que o número de níveis de energia possíveis para uma partícula (SKOOG *et al.*, 2002; CARUSO, 2012).

O ganho de energia durante o processo de absorção promove os elétrons dos fluoróforos para seus estados de singletos excitados (S_1 e S_2), em que o spin do elétron no orbital excitado é emparelhado no sentido oposto ao elétron no orbital do estado fundamental (S_0). Entretanto, os elétrons não permanecem nos seus estados excitados e retornam ao seu estado fundamental através de diferentes mecanismos. Esses mecanismos são representados no diagrama de *Jablonski*, como mostrado na **Figura 8** (VALEUR, 2002; LAKOWICZ, 2006).

Figura 8: Diagrama de *Jablonski*. Esquema mostrando os estados eletrônicos de singlete (S_0 , S_1 e S_2) e tripleto (T_1), e vibracionais (0, 1 e 2) numa molécula. As setas com orientação para cima indicam energia de absorção de radiação ($h\nu_A$), as com orientação para baixo, energia de emissão de radiação ($h\nu_F$ e $h\nu_P$) e a pontilhada, conversão interna.



FONTE: Adaptada de LAKOWICZ (2006).

Quando um fluoróforo é excitado para seu estado eletrônico singleto de maior energia (S_1 ou S_2), os elétrons podem acessar vários níveis de energia vibracional, representados por 0, 1 e 2 (**Figura 8**). As transições entre os estados geralmente são representadas como linhas verticais ilustrando a natureza instantânea da absorção da radiação e ocorrem na ordem de 10^{-15} s. A transição entre os estados eletrônicos singleto (S_1 e S_2) é denominada como conversão interna. Esse processo é seguido por relaxação vibracional (**Figura 8**) para o nível vibracional mais baixo do menor estado eletrônico com tempo característico da ordem de 10^{-12} s. Como o tempo de vida de um elétron no estado excitado é da ordem de 10^{-8} s, a energia absorvida restante no processo é, então, irradiada permitindo o seu retorno ao estado fundamental, esse fenômeno é chamado de fluorescência e possui uma menor energia que a radiação de excitação e, por consequência, um maior comprimento de onda devido a sua dependência inversamente proporcional com a energia (VALEUR, 2002; LAKOWICZ, 2006), devido à frequência ser escrita como:

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (3)$$

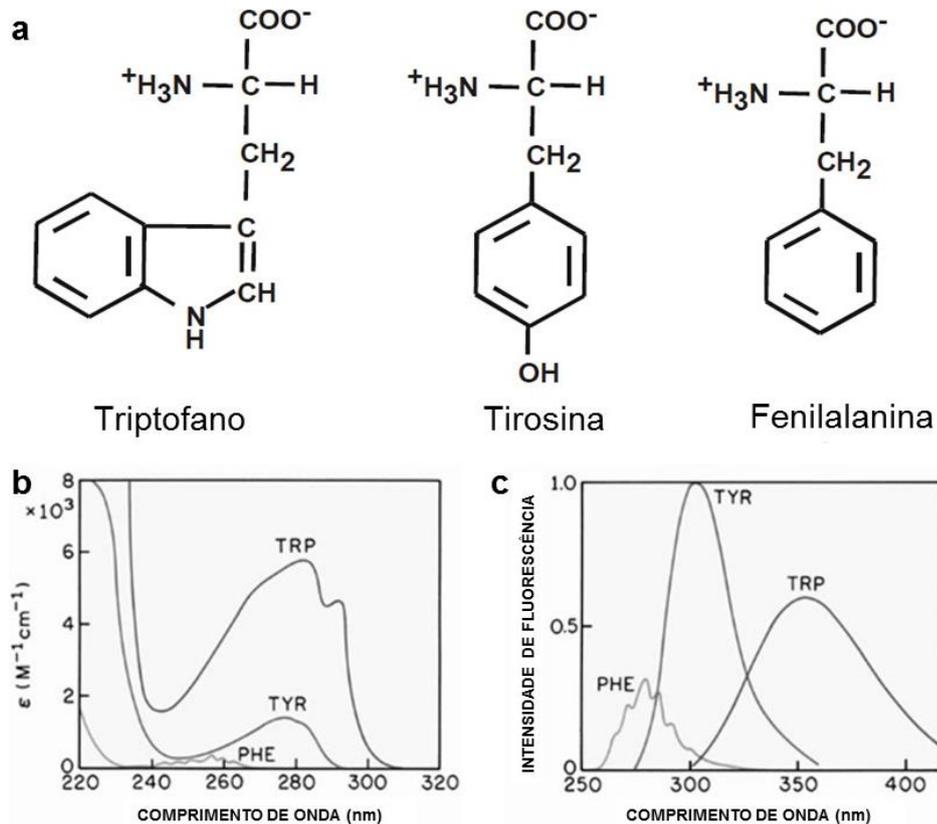
sendo ν a frequência, c a velocidade da luz e λ , comprimento de onda (EINBERG & RESNICK, 1979).

Os fluoróforos no estado S_1 podem sofrer também uma conversão de spin para o primeiro estado de tripleto T_1 . A transição entre esses níveis vibracionais isoenergéticos é denominada cruzamento intersistema (**Figura 8**), com a emissão do primeiro estado de tripleto denominada fosforescência e é geralmente deslocada para comprimentos de onda maiores e energias mais baixas envolvendo tempos de até milissegundos (LAKOWICZ, 2006; VALEUR, 2002).

Nas proteínas, os fluoróforos são os aminoácidos aromáticos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) (**Figura 9.A**), entretanto, os grupos indólicos de resíduos de triptofano são a fonte dominante de absorção e emissão UV em proteínas e sua emissão é altamente sensível. Embora a tirosina tenha rendimento quântico semelhante ao triptofano, nas proteínas nativas a emissão de tirosina é frequentemente desativada devido a interação com a cadeia peptídica, conseqüentemente, com a desnaturação ocorre o aumento da emissão. J a a emissão de fenilalanina   observada apenas quando a proteína não possui r s duos de tirosina ou triptofano. Na espectroscopia de absorção, costuma-se utilizar o comprimento de onda de 295 nm (**Figura 9.B**), para que a emissão tenha influência somente do

triptofano (**Figura 9.C**), já que a absorção da tirosina e fenilalanina ocorrem em comprimentos de onda mais baixos (**Figura 9.B**) (LAKOWICZ, 2006; VALEUR, 2002).

Figura 9: Fluoróforos intrínsecos bioquímicos e seus espectros de emissão e absorção. **(A)** Estrutura dos aminoácidos aromáticos. Espectro de absorção **(B)** e de emissão **(C)** dos aminoácidos aromáticos em água de pH neutro.



FONTE: adaptado de LAKOWICZ (2006).

2.3 Efeitos da geometria e da amostra

A intensidade de fluorescência aparente e a distribuição espectral podem depender da densidade óptica da amostra e do caminho que a luz irradiada na amostra possa percorrer. Por isso, a geometria mais comum usada para a fluorescência é a observação perpendicular ao caminho de luz de excitação no equipamento de espectroscopia de fluorescência, pois essa disposição de ângulos são para minimizar o efeito de filtragem interna devido a altas densidades ópticas, ou a turbidez, da amostra. Deve-se examinar sempre o espectro de emissão em condições de máxima supressão da amostra pois, à medida que a intensidade diminui, a contribuição da fluorescência de fundo pode tornar-se significativa (LAKOWICZ, 2006).

Os supressores utilizados nos experimentos são muitas vezes utilizados em altas concentrações e podem conter impurezas fluorescentes. Além disso, a intensidade dos picos de espalhamento *Raman* e *Rayleigh* da água é independente da concentração do agente supressor. Assim a contribuição relativa do espalhamento da luz aumenta sempre com o aumento da supressão (LAKOWICZ, 2006).

O efeito de filtro interno, ou fator de correção, devido à absorção dos ligantes, pode diminuir a intensidade de fluorescência aparente, e, assim, distorcer os dados de supressão (FEROZ *et al.*, 2015). A fim de anular o efeito de filtro interno, os valores de intensidade de fluorescência das amostras foram corrigidos para a sua absorção nos comprimentos de onda de excitação e emissão usando a seguinte relação:

$$F_C = F \cdot 10^{((A_{ex}+A_{em})/2)} \quad (4)$$

onde F_C e F são as fluorescências corrigida e medida experimentalmente, respectivamente, A_{ex} é o valor da absorbância no comprimento de onda de excitação, e A_{em} , a absorbância no comprimento de onda de emissão (FEROZ *et al.*, 2015). Sendo as absorbâncias, pela lei de *Beer-Lambert* (GRIMSLEY & PACE, 2003), as relações:

$$\begin{aligned} A_{ex} &= \varepsilon_{ex} \cdot c \cdot l \\ A_{em} &= \varepsilon_{em} \cdot c \cdot l \end{aligned} \quad (5)$$

onde ε_{ex} e ε_{em} são os coeficientes de extinção molar no comprimento de onda de excitação e emissão, respectivamente, c é a concentração da solução e l , o caminho óptico da cubeta utilizada na medida.

2.4 Supressão de fluorescência e *quenching* colisional

A supressão da fluorescência, ou *quenching*, de uma amostra pode ocorrer devido a interações moleculares, incluindo reações de estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo de estado fundamental e supressão colisional. Os diferentes mecanismos de supressão de fluorescência são classificados como estática ou colisional e podem ser diferenciadas pelas suas dependências com a temperatura, viscosidade ou pela medida do tempo de vida de fluorescência (VALEUR, 2002; LAKOWICZ, 2006). A supressão de fluorescência pode ser analisada pela relação de *Stern-Volmer*:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[L] = 1 + K_q\tau_0[L] \quad (6)$$

sendo que F_0 e F são respectivamente as intensidades de fluorescência do estado estacionário antes do contato e após o contato com o ligante L; K_{SV} é a constante de supressão de *Stern-Volmer* e $[L]$, a concentração do ligante; K_q é a constante de supressão biomolecular e τ_0 p tempo de vida do fluoróforo na ausência do ligante, da ordem de 10^{-8} s (LAKOWICZ, 2006; VALEUR, 2002).

No caso de *quenching* colisional, o supressor deve se difundir para o fluoróforo durante a vida útil do estado excitado. Em contato, o fluoróforo retorna ao estado fundamental, sem emissão de fóton. Em geral, a supressão ocorre sem qualquer alteração permanente nas moléculas. No *quenching* estática, um complexo é formado entre o fluoróforo e o inibidor, e este complexo é não-fluorescente. Para ocorrer *quenching* estático ou colisional, o fluoróforo e o supressor devem estar em contato.

A constante de *Stern-Volmer* (K_{SV}) indica a sensibilidade do fluoróforo a um supressor e, um fluoróforo enterrado em uma macromolécula é geralmente inacessível para os supressores solúveis em água, tendo valores baixos na constante K_{SV} . Já fluoróforos livres em solução, ou na superfície de uma macromolécula, são encontrados valores maiores na constante K_{SV} (LAKOWICZ, 2006).

Uma maneira de medir K_{SV} é relacionando a supressão de fluorescência com a concentração de ligante, pois a concentração de ligante está relacionada à razão de florescência pela relação de *Stern-Volmer* modificada:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D[L])(1 + K_S[L]) \quad (7)$$

onde K_D é a constante de *Stern-Volmer* para mecanismo colisional e K_S , a constante de *Stern-Volmer* para o mecanismo estático. Abrindo a equação, temos:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_S)[L] + K_D K_S [L]^2 \quad (8)$$

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[L] \quad (9)$$

sendo previsto uma dependência quadrática com a concentração de ligante, mostrada equação (8), se a relação for uma curva com concavidade positiva no gráfico de *Stern-Volmer*. Mas havendo dependência linear entre F_0/F e $[L]$, a constante de K_{SV} , na equação (9), é determinada pela inclinação da reta no gráfico. Neste caso, a concentração de ligante (total de ligante) é admitida como igual à concentração de

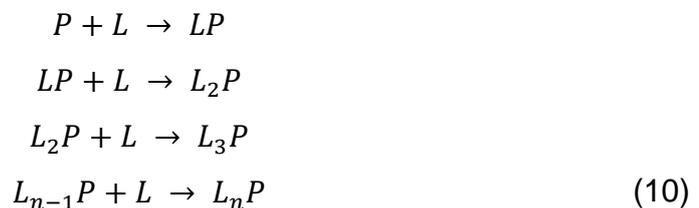
ligante livre para que, experimentalmente, sejam utilizadas as razões de ligante livre pelo ligante total superior a 1 (LAKOWICZ, 2006).

O gráfico de *Stern-Volmer* linear é geralmente indicativo de uma única classe de fluoróforos, todos igualmente acessíveis ao supressor. Se duas populações de fluoróforos estão presentes, e uma classe não é acessível ao supressor, então os gráficos de *Stern-Volmer* desviam-se da linearidade em direção ao eixo x. Este resultado é frequentemente encontrado para a supressão da fluorescência do triptofano em proteínas por supressores polares ou carregados. Estas moléculas não penetram prontamente no interior hidrofóbico das proteínas, e apenas aqueles resíduos de triptofano na superfície da proteína são suprimidos. (LAKOWICZ, 2006).

As supressões estática e colisional podem ser distinguidas por suas distintas dependências com a temperatura e viscosidade. Temperaturas mais altas resultam em difusão mais rápida e, portanto, maiores quantidades de *quenching* colisional, e, tipicamente, resultarão na dissociação de complexos fracamente ligados e, portanto, quantidades menores de *quenching* estático. (LAKOWICZ, 2006; CARUSO, 2012).

2.5 Equilíbrio de ligação dos complexos proteína-ligante

Para os processos nos quais o mecanismo de supressão de fluorescência é estático, onde o ligante ligado suprime totalmente a fluorescência da proteína, a suposição adotada é que os sítios de ligação na proteína são iguais e independentes. Este modelo permite escrever a equação de equilíbrio da reação como (FEROZ *et al.*, 2015):



onde P é proteína, L é o ligante, L_nP é a molécula do complexo formado cuja constante de ligação é k_b para cada reação. Para as reações acima, as constantes de ligação são:

$$k_{b1} = k_{b1} = \dots = k_{bn} = k_b \tag{11}$$

Então:

$$k_b^n = \frac{[L_nP]}{[L_f]^n[P_f]} \quad (12)$$

onde $[L_nP]$ é a concentração do complexo formado, $[L_f]$ é a concentração de ligante livre, $[P_f]$ é a concentração de proteína livre. Assumindo um modelo de dois estados no qual a proteína na solução encontra-se complexada com o ligante ou livre, então:

$$\begin{aligned} [P_t] &= [P_f] + [L_nP] \\ [L_t] &= [L_f] + [L_nP] \end{aligned} \quad (13)$$

de tal forma que a razão entre a intensidade de fluorescência de solução que contém proteína livre, F_0 , e a intensidade de fluorescência após a adição de ligante na solução, F , é igual à razão entre a concentração de proteína livre e proteína total:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{[P_f]}{[P_t]} \quad (14)$$

Então, utilizando a equação (14) e substituindo nas relações (13):

$$[P_f] = \frac{F[P_t]}{F_0} \quad (15)$$

$$[L_nP] = \frac{(F_0 - F)[P_t]}{F_0} \quad (16)$$

$$[L_f] = [L_t] - \frac{(F_0 - F)[P_t]}{F_0} \quad (17)$$

Substituindo as equações (15) a (17) na equação (12) e aplicando o logaritmo:

$$\begin{aligned} k_b^n &= \left(\frac{F_0 - F}{F}\right) \left(\frac{1}{[L_t] - \left(\frac{F_0 - F}{F_0}\right)[P_t]}\right)^n \\ \log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) &= n \log k_b - n \log\left(\frac{1}{[L_t] - \left(\frac{F_0 - F}{F_0}\right)[P_t]}\right) \end{aligned} \quad (18)$$

onde, F_0 e F são as fluorescências antes e após a adição de ligante [L].

Através do gráfico $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log[1/([L] - ([P](F_0 - F)/F_0))]$, duplo log, onde se observa dependência linear, pode-se obter os valores relativos ao número n de sítios de ligação da proteína e a constante de ligação k_b relativa à interação dos ligantes com as proteínas, sendo a inclinação igual ao valor de n e o valor de $\log k_b$ fixado na ordenada (FEROZ *et al.*, 2015).

2.6 Termodinâmica da interação de proteína e ligante

As forças que atuam na interação entre moléculas pequenas e uma proteína podem ser do tipo interações hidrofóbicas, ligação de hidrogênio, interações de *van der Waals* e interações eletrostáticas. Com o intuito de elucidar a interação entre proteína e fármaco, os parâmetros termodinâmicos são importantes para confirmar as forças não covalentes atuantes (TENG *et al.*, 2011).

Antes que um complexo proteína-ligante seja formado, a proteína e o ligante livres estão envolvidos em ligações de hidrogênio com a água circundante. Uma vez formado o complexo, essas ligações de hidrogênio são substituídas por ligações de hidrogênio entre o ligante e a proteína. A contribuição das interações hidrofóbicas para a ligação proteína-ligante é normalmente considerada proporcional ao tamanho da superfície hidrofóbica enterrada durante a formação do complexo. Interações hidrofóbicas também são consideradas como a principal força motriz da mudança conformacional do receptor na interação com ligante (YUNTA, 2016).

Já o reconhecimento molecular pode ser atribuído às contribuições das interações eletrostáticas e de *van der Waals*, à solvatação e à flexibilidade do ligante e da proteína, podendo haver ligações de hidrogênio resultantes da atração eletrostática entre um átomo eletronegativo e hidrogênio que está conectado a um átomo eletronegativo. Entretanto, a força de uma ligação de hidrogênio depende de sua direcionalidade e seu entorno e são mais fortes no interior das proteínas do que as das regiões expostas ao solvente. As interações de *van der Waals*, ou forças de dispersão de London, podem ser muito importantes quando duas superfícies de moléculas se encaixam com pequena distância entre elas, já que modelam as forças atrativas e repulsivas entre as moléculas devido à proximidade entre os átomos e seus raios de *van der Waals* (YUNTA, 2016).

Ao mesmo tempo, a alteração nos graus de liberdade do ligante e da proteína ao se complexarem resulta numa alteração da entropia. Em analogia com qualquer processo espontâneo, a ligação proteína-ligante ocorre somente quando a mudança na energia livre de Gibbs (ΔG) do sistema é negativa, sendo alcançado um estado de equilíbrio a pressão e temperatura constantes. Como a extensão de associação proteína-ligante é determinada pela magnitude da ΔG negativa (DU *et al.*, 2015).

Pode-se considerar que ΔG determina a estabilidade de qualquer complexo proteína-ligante, ou, alternativamente, a afinidade de ligação de um ligante a um dado

receptor, descrevendo um balanço energético entre entropia (ΔS) e entalpia (ΔH) (DU *et al.*, 2015). Se a maior contribuinte for a entalpia, a reação será entálpicamente dirigida tendo que ultrapassar uma barreira de energia para que a reação aconteça, mas se a maior contribuinte do balanço energético foi a entropia, a reação será entropicamente dirigida, onde a energia livre de Gibbs diminuirá e será mais favorável ocorrer a formação do complexo. Esses parâmetros interferem em como ocorre as interações, conforme mostrado no **Quadro 1** (ALLEWELL *et al.*, 2013; TENG *et al.*, 2011).

Quadro 1: Forças atuantes de acordo com a energia do sistema. As forças de interações estão relacionadas com as energias de entropia e entalpia do sistema. ΔH : variação de entalpia; ΔS : variação entropia.

ΔH	ΔS	INTERAÇÃO
Positiva ou Levemente positiva	Positiva	Hidrofóbica
Negativa	Negativa	<i>van der Waals</i> ou protonação
Negativa	Negativa	Ligações de Hidrogênio
Negativa	Positiva	Interação Eletrostática
Levemente positiva ou levemente negativa	Positiva	Iônica

FONTE: adaptado de TENG *et al.* (2011).

Se em um intervalo de temperatura, a variação de entalpia (ΔH) não variar significativamente, ambas as variações (ΔH) e (ΔS) podem ser calculadas com base na equação de *van't Hoff*:

$$\ln k_b = - \left(\frac{\Delta H}{R} \right) \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (19)$$

onde R é a constante universal dos gases ideais ($1,98 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e k_b é a constante de ligação na temperatura T em Kelvin correspondente.

No gráfico de *van't Hoff*, ($\ln k_b$) versus ($1/T$), a inclinação da reta será a variação de entalpia (ΔH). E a variação de energia livre de Gibbs (ΔG) para cada temperatura será calculada pela relação:

$$\Delta G = -TR \ln k_b \quad (20)$$

onde R é a constante universal dos gases ideais ($1,98 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e k_b , constante de ligação na temperatura T em Kelvin.

Obtidos os valores da entalpia (ΔH) e da energia de Gibbs (ΔG) pelo gráfico de *van't Hoff*, é possível obter a variação da entropia (ΔS) para as reações em cada temperatura pela equação:

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (21)$$

2.7 Dinâmica molecular (DM)

A dinâmica molecular (DM) descreve a variação do comportamento molecular em função do tempo de um conjunto de propriedades de uma molécula em estudo, como estrutura secundária, orientação de cadeias laterais e a energia da interação entre moléculas. Assim, é possível reproduzir por dinâmica molecular os métodos experimentais em solução, buscando-se médias representativas de comportamentos biológicos medidos experimentalmente (VERLI, 2014).

A fundamentação da DM baseia-se na segunda lei de Newton fazendo parte dos métodos denominados de métodos Clássicos, baseadas em coordenadas cartesianas das partículas e usando um campo de força conservativo, em oposição aos métodos baseados na física quântica (VERLI, 2014; BERENDSEN *et al.*, 1995). A segunda lei de Newton é descrita como:

$$F_{x_i} = \frac{d^2 x_i}{dt^2} m_i = \frac{dv_i}{dt} m_i = a_i m_i \quad (22)$$

onde F_{x_i} é a força aplicada ao átomo i na posição x , t é o tempo, v a velocidade e a_i a aceleração do átomo i .

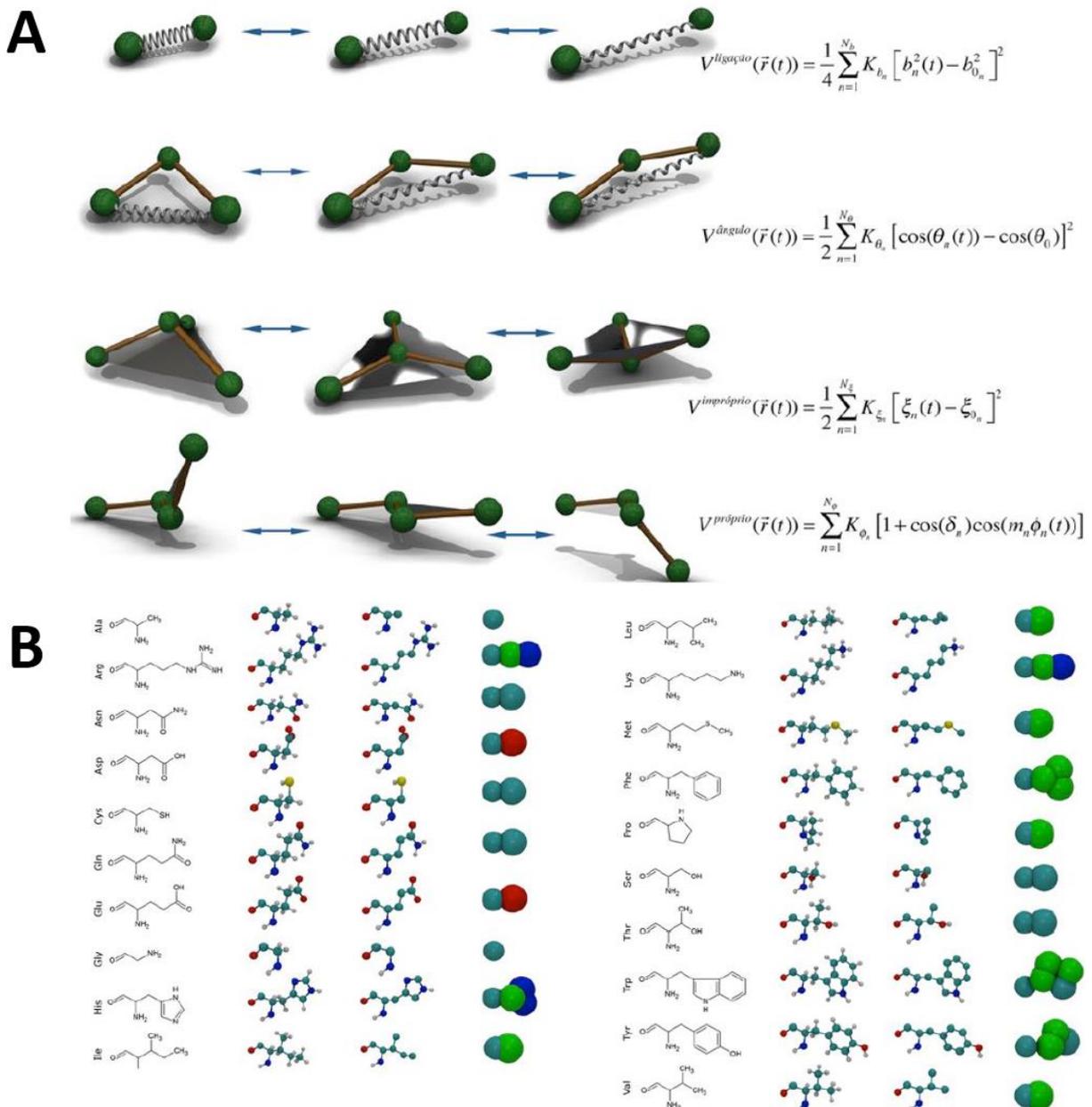
A DM possibilita o estudo de modelos moleculares mais próximos da realidade biológica, pois inclui diretamente características como a flexibilidade molecular (através da variação temporal de propriedades) e a temperatura (através da velocidade dos átomos). Porém, para descrever a variação da posição x de um átomo i como função do tempo, precisa-se conhecer o valor da massa de cada átomo, m_i , e a força (F_{x_i}) sobre cada átomo i em uma determinada posição (VERLI, 2014).

A temperatura fornece energia para que os átomos sofram uma aceleração e mudem suas posições no espaço, assim como as forças iniciais atuantes sobre a molécula. Contudo, como os átomos interagem entre si para formar moléculas, e interagem com outras moléculas, eles estão sujeitos a forças interatômicas e intermoleculares (BERENDSEN *et al.*, 1995; VERLI, 2014).

O campo de força é um conjunto de funções e parametrizações usados em cálculos de dinâmica molecular onde cada campo de força é dedicado a reproduzir aspectos do comportamento molecular, como estiramento de um ângulo de ligação

química, deformação de um ângulo de ligação ou a torção de um diedro (**Figura 10.A**). Cada equação e parametrização pode ser empregada gerando campos de força diferentes, com vantagens, limitações e diferentes níveis de simplificação na descrição dos átomos (**Figura 10.B**), por isso o campo de força pode variar dependendo do tipo de molécula (VERLI, 2014).

Figura 10: Representação de interações entre átomos e a representação das diferentes descrições dos 20 aminoácidos em um campo de força. **(A)** Representação de alguns termos que compõem o campo de força GROMOS96 para descrever a interação entre átomos onde termos semelhantes são encontrados em outros campos de força. **(B)** Representação dos 20 aminoácidos (primeira e quinta coluna) em um campo de força descrevendo todos os átomos (segunda e sexta coluna), em um campo de força de átomos unidos (terceira e sétima coluna) e *coarse-grained* (quarta e oitava coluna).



FONTE: adaptado de VERLI, 2014.

No pacote GROMACS, um dos programas utilizados para se realizar a DM, existem três tipos de força: forças de ligação baseadas em listas fixas e incluindo interações de até quatro corpos, forças não ligadas com base em listas dinâmicas de pares de partículas e forças externas que permitem forças de condução não-equilibradas. As forças são derivadas no que diz respeito às coordenadas da partícula e as forças não vinculadas são consideradas apenas para pares de átomos que pertencem a grupos de carga dentro de um dado raio de corte, isto significa que, embora as forças sejam derivadas de potenciais, os potenciais V não são iguais as integrais das forças V' (BERENDSEN *et al.*, 1995):

$$V(r) \neq V'(r) = \int_{-\infty}^r F(r') dr' \quad (23)$$

considerando uma posição $r_{ij} = r_i - r_j$ e $r = |r|$, onde r é a distância de um átomo até outro átomo.

As forças não ligadas são baseadas em um banco de dados de pares que também contém informações sobre deslocamento de modelos para se obter o modelo mais próximo do par considerado onde as possíveis interações são a repulsão de curto alcance, interação de dispersão e interação de *Coulomb*, os componentes da força são calculados por:

$$F_i = -F_j = \frac{\partial V(r_{ij})}{\partial r_{ij}} \frac{\vec{r}_{ij}}{r_{ij}} \quad (24)$$

Já as forças de ligação, são baseadas em uma lista fixa de átomos por interação considerando ligações covalentes, equação (25), e ângulos covalentes, equação (26), sendo um potencial harmônico de dois e três corpos, respectivamente, que podem ser substituídos por restrições, além de ângulos diedros (potencial de quatro corpos), que pode ser descrita pelo potencial de *Ryckaert-Bellemans* (Equação 27), diedros impróprios (potencial harmônico de quatro corpos) para manter os grupos planares ou impedir que os ângulos diédricos criem imagens espelhadas não desejadas e potenciais de restrição à distância que incorporam os dados experimentais na distância entre determinados pares de átomos, que podem ser derivados de medidas de efeito nuclear *Overhauser* por RMN (BERENDSEN *et al.*, 1995). Os potenciais são descritos como:

$$V(r) = \frac{1}{2} k_b (r - b)^2 \quad (25)$$

$$V(r_1, r_2, r_3) = \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (26)$$

$$V(r_1, r_2, r_3, r_4) = \frac{1}{2} V_0 [1 + \cos(n\phi - \phi_0)] \quad (27)$$

$$V(\phi) = \sum_{n=0}^5 a_n \cos^n(\phi)$$

onde θ é o ângulo entre r_{21} e r_{23} . O potencial do ângulo de ligação também pode ser substituído por uma restrição da distância entre a ligação 2-3, se as duas ligações 1-2 e 2-3 também forem limitadas. Nos ângulos diedros, ϕ é o ângulo entre os planos definidos por $\{r_{12}, r_{31}\}$ e $\{r_{32}, r_{43}\}$ e em conjunto com este potencial periódico, uma interação de par especial pela soma da repulsão de curto alcance e da interação de dispersão pode ser adicionada entre as partículas 1 e 4.

As forças externas também podem ser consideradas na DM devido a forças de restrição de posição, equação (28), que restringe uma estrutura próxima a uma determinada referência, por exemplo em uma casca externa para sistemas reduzidos ou durante um equilíbrio para evitar mudanças estruturais irreais, e também acelerações externas onde acelerações adicionais são aplicadas a grupos específicos de átomos (BERENDSEN *et al.*, 1995). A restrição de posição pode ser descrita como:

$$V = \frac{1}{2} \sum_i k_i (r_i - r_i^0)^2 \quad (28)$$

onde r_i^0 é dado pela estrutura de referência.

Outra diferença entre os campos de força diz respeito à descrição das moléculas de água, incluídas na DM para descrever suas interações, como função do tempo, com os compostos em estudo. Da mesma forma que para os campos de força, existem diversos modelos para descrição de moléculas de água dependendo de cada campo de força, podendo ser divididas em modelos explícitos e implícitos. Enquanto os modelos explícitos incluem os átomos de água, fisicamente, na simulação, os modelos implícitos incluem de maneira indireta através da representação das propriedades dielétricas do solvente (VERLI, 2014).

2.8 Docking molecular

O *docking* molecular é uma ferramenta fundamental na biologia molecular estrutural e na concepção computacional, enquanto tenta prever a estrutura do complexo intermolecular formado entre duas ou mais moléculas constituintes prevendo a posição e a orientação de um ligante para conhecer o(s) modo(s) de ligação predominante(s). Os métodos de *docking* bem-sucedidos pesquisam espaços de alta dimensão com eficiência e usam uma função de pontuação que classifica corretamente os atracamentos de candidatos.

Esta técnica pode ser usada para realizar triagem virtual em grandes bibliotecas de compostos, classificar os resultados e propor hipóteses estruturais de como os ligantes inibem o alvo. A configuração das estruturas de entrada para o *docking* é tão importante quanto o atracamento em si, e a análise dos resultados dos métodos de pesquisa estocástica pode, às vezes, não ser clara (YUNTA, 2016).

No entanto, há duas dificuldades no *docking* molecular envolvendo o posicionamento e a pontuação, sendo que, no primeiro caso, o processo de identificar se uma determinada conformação e orientação de um ligante se encaixa no sítio ativo é geralmente um procedimento difuso que retorna muitos resultados alternativos. E no segundo caso, o *score* de pose é uma medida do ajuste de um ligante no sítio ativo.

O *score* durante a fase de levantamento geralmente envolve cálculos simples de energia (eletrostática, *van der Waals* e tensão do ligante). Um novo *score* pode tentar estimar com mais precisão a energia livre de Gibbs (ΔG), talvez incluindo propriedades como entropia e solvatação (YUNTA, 2016). Esse processo de reconhecimento molecular proteína-ligante é dirigido por uma combinação de efeitos entálpicos e entrópicos, pois os efeitos podem ser estimados através da energia livre de Gibbs e a constante de equilíbrio de ligação k_{eq} , a qual pode ser medida experimentalmente (VERLI, 2014) como mostra a equação abaixo:

$$\Delta G_{lig} = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln k_{eq} \quad (29)$$

onde ΔH é a variação de entalpia, T é a temperatura absoluta, ΔS é a variação de entropia e R é a constante universal dos gases.

A obtenção das coordenadas das estruturas tridimensionais das moléculas interagentes são parâmetros importantes para o atracamento, sendo que as estruturas dos ligantes podem ser obtidas em bancos de dados através de estruturas 1D ou 2D,

e as estruturas de proteínas a partir de bando de dados PDB² (*Protein Data Bank*) de resolução de estrutura por cristalografia ou RMN, ou por modelagem computacional *ab initio* ou por estruturas advindas de DM (VERLI, 2014).

Para que um processo de atracamento seja bem-sucedido, é necessário que a conformação correta do complexo ligante-receptor seja prevista e que a classificação das estruturas finais esteja correta, a função *scoring*. O procedimento precisa ser capaz de diferenciar entre conformações similares do mesmo sistema, bem como prever a relativa estabilidade de diferentes complexos (YUNTA, 2016).

² <https://www.rcsb.org/>

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Devido a importância da proteína Não-Estrutural 1 (NS1) na inibição a via do interferon (IFN) e respostas imunológicas, o estudo da interação da proteína com ligantes é necessário para buscar um potencial bloqueador para a NS1, para dificultar sua ação na infecção. Para essa busca o objetivo deste trabalho foi investigar a interação da proteína NS1 do vírus sincicial respiratório humano (hRSV) com flavonoides da família flavonol e um flavonoide acetilado, utilizando espectroscopia de fluorescência e *docking* molecular.

3.2 Objetivos específicos

Para que a investigação da interação da proteína NS1 com os flavonoides seja realizada, os objetivos específicos compreendem-se por:

- Expressar a proteína NS1 em bactéria *Escherichia coli*;
- Purificar a proteína NS1;
- Quantificar e caracterizar a estrutura secundária da proteína NS1;
- Realizar simulação por Dinâmica Molecular da estrutura cristalográfica da NS1;
- Quantificar e caracterizar os flavonoides morina, kaempferol, miricetina e morina penta acetilada;
- Caracterizar os parâmetros da interação da proteína NS1 com os flavonoides morina, kaempferol, miricetina e morina penta acetilada;
- Caracterizar os parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔS e ΔH) da interação entre a proteína NS1 e flavonoides;
- Verificar o possível sítio de ligação da proteína NS1 aos flavonoides;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DNA recombinante *pJexpress401-NS1*

A construção do plasmídeo *pJexpress401-NS1*, contendo os códons otimizados do gene NS1 e o vetor *pJexpress401*, foi realizada pela empresa DNA 2.0 (WELCH *et al.*, 2009) e contém o promotor T5, gene de resistência à canamicina e a proteína contém cauda de Histidina (6xHis-tag) no seu C-terminal. O mapa do gene é mostrado na **Figura 11** e o sequenciamento do gene que traduz a proteína NS1 está contido no Anexo A.

Utilizando a ferramenta *Expasy-ProtParam*³ (GASTEIGER *et al.*, 2005), analisou-se a sequência de aminoácidos da proteína NS1 para obter parâmetros físico e químico, como o número e composição dos resíduos, peso molecular, ponto isoelétrico (pI) e valor do coeficiente de extinção molar. Esses parâmetros são importantes para determinar a carga da proteína pelo seu pI acima ou abaixo do pH do tampão para o processo de purificação e para obter a concentração de proteína utilizou-se seu coeficiente de extinção molar pela lei de *Beer-Lambert* (GRIMSLEY & PACE, 2003).

³ <https://web.expasy.org/protparam/>

foram incubadas no *shaker* por uma hora à 37 °C, centrifugadas um minuto, à 10.000 xg, e ressuspensas em 50 µL de meio de cultura LB. A cultura foi plaqueada em placa de *Petri* contendo 20 mL de meio de cultura LB com ágar (Anexo B) com 50 µ/mL de canamicina. As placas foram incubadas *overnight* à 37°C.

Após o crescimento, colônias isoladas de bactéria foram escolhidas da placa de *Petri* e incubadas em meio LB com 50 µ/mL de canamicina *overnight* no *shaker* a 37 °C para a purificação dos plasmídeos utilizando *Spin Miniprep Kit* (Qiagen®). Após o miniprep, os plasmídeos purificados foram estocados em -20 °C.

Para o teste de indução da expressão da proteína NS1, o plasmídeo foi transformado em *E. coli*, linhagem Rosetta-Gami 2 (DE3), por choque térmico e a cultura foi plaqueada em placa de *Petri*, contendo 20 mL de meio de cultura LB, contendo 50 µ/mL de canamicina e 34 µg/mL de clorafenicol, 12,5 µg/mL de tetraciclina e 50 µg/mL de estreptomicina, e incubada em estufa *overnight* à 37 °C. Após o período para formação das colônias na placa, pegou-se colônias isoladas da placa de *Petri* e inoculou-se em 5 mL de meio LB, com os antibióticos, para a incubação à 37 °C *overnight*, sob agitação de 100 rpm. Terminado a incubação *overnight*, estocou-se as culturas com adição de glicerol em freezer -80 °C.

4.3 Teste de indução da expressão da proteína NS1 em Rosetta-Gami 2 (DE3)

Devido a linhagem ter resistência a muitos antibióticos, fez-se o teste de combinações de antibióticos para verificar uma melhor condição da expressão da proteína NS1 mantendo-se apenas a canamicina, pois o plasmídeo tem o gene de resistência a este antibiótico. O estoque contendo as culturas de bactérias de linhagem Rosetta-Gami 2 (DE3) foi inoculado em 10 mL de meio LB líquido, contendo 50 µ/mL de canamicina e 34 µg/mL de clorafenicol, 12,5 µg/mL de tetraciclina e 50 µg/mL de estreptomicina, à 37 °C em agitação de 100 rpm *overnight* e transferidas para 50 mL de meio de cultura LB com as combinações de antibiótico: (1) 50 µ/mL de canamicina e 34 µg/mL de clorafenicol, 12,5 µg/mL de tetraciclina e 50 µg/mL de estreptomicina; (2) somente 50 µg/mL de canamicina; (3) 50 µg/mL de canamicina e 34 µg/mL de clorafenicol; (4) 50 µg/mL de canamicina, 50 µg/mL de estreptomicina e 12,5 µg/mL de tetraciclina; (5) 50 µg/mL de canamicina e 12,5 µg/mL de estreptomicina; (6) 50 µg/mL de canamicina e 12,5 de tetraciclina e (7) 50 µg/mL de canamicina, 34 µg/mL de clorafenicol e 12,5 µg/mL de estreptomicina. A cultura foi

encubada à 37 °C até atingir a D.O de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm e, então, as culturas foram induzidas com 0,3 mM de IPTG por 4 horas em 37 °C e 100 rpm de agitação. Coletou-se alíquotas antes e depois da indução para verificação do resultado em SDS-PAGE a 15%.

4.4 Indução de expressão da proteína NS1 em larga escala

Os inóculos das culturas de *pJexpress401-NS1* em Rosetta-Gami 2 (DE3) foram incubados a 37 °C em agitação de 100 rpm *overnight* e a cultura foi transferida para 2 L, mantendo-a incubada a 37 °C com agitação de 100 rpm até atingir a D.O de 0,6 (600 nm). Então, as culturas foram induzidas com 0,3 mM de IPTG por 4 horas a 37 °C em agitação de 100 rpm. Posteriormente às 4 horas, a amostra foi centrifugada a 4000 xg por 50 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de 2 L de cultura foi armazenado no *freezer* -80 °C.

4.5 Preparação da amostra para purificação

O *pellet* obtido, a partir da indução de 2 L de cultura de células, foi ressuscitado em 40 mL de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 100 mM de NaCl e 1 mM de BME) para cada 1L de pellet, e 10 µL de inibidor de protease (Sigma-aldrich® Protease Inhibitor Cocktail) para cada 100 mL de cultura pelletada. Após ressuscitada, a amostra foi sonicada (700 W QSONICA SONICATORS Q700, QSONICA, LLC, Newtown, CT, USA) por seis minutos (em pulsos, dois segundos ON e um segundo OFF, 32 W). Em seguida, a amostra foi centrifugada por 40 minutos à 28.000 xg (4 °C) e filtrada com filtro de 0,45 µm.

4.6 Purificação da proteína NS1 por cromatografia de afinidade em sistema AKTA

O sobrenadante filtrado foi submetido a cromatografia por afinidade em sistema *AKTA Purifier* (GE® *Healthcare Life Sciences*), sendo aplicado em um fluxo constante de 0,5 mL/min, em coluna com resina de afinidade por histidina *HiTrap™* (GE® *Healthcare Life Sciences*) regenerada com cobalto (0,1 mM de Cloreto de cobalto) e equilibrada com tampão de equilíbrio (50 mM de Tris-HCl, 100 Mm de NaCl; 1 mM de

BME e 5 mM de imidazol). Após ser aplicada toda a amostra, lavou-se a resina com tampão de purificação (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 100 mM de NaCl e 1 mM de BME) variando a concentração em 10, 20, 30, 40, 50, 80 e 100 mM de imidazol para a remoção de contaminantes restantes ainda interagindo com a resina e eluição da proteína. As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE 15% para verificação do resultado da cromatografia.

4.7 Purificação da proteína NS1 por cromatografia de exclusão molecular em sistema AKTA

A fração em que a proteína NS1 foi eluída na cromatografia de afinidade foi concentrada por centrifugação à 2500 xg (4 °C) em filtro *Amicon Ultra* para centrífuga (Merck Millipore®), com membrana de celulose de 3 kDa e centrifugada por dois minutos à 10.000 xg.

Como a amostra ainda continha contaminantes, realizou-se uma segunda purificação por cromatografia de exclusão molecular, em coluna *Superdex 75 10/300 GL* (GE Healthcare) equilibrada com tampão contendo tampão PBS pH 7,4 (Anexo C) e 2 mM de DTT. A amostra foi aplicada com um fluxo constante de 0,3 mL/min e eluída em frações de 300 µL. As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE a 15% para verificação do resultado da cromatografia.

4.8 Caracterização dos flavonoides e quantificação de proteína por medidas espectrofotométricas

Os flavonoides utilizados neste trabalho foram comprados da empresa SIGMA, sendo eles a miricetina e o kaempferol, já a morina e a morina penta acetilada, foram fornecidos pelo prof. Dr. Luis Octávio Regasini, do Departamento de Química e Ciências Ambientais (IBILCE/UNESP).

Para a determinação da concentração dos ligantes, usou-se o valor de coeficiente de absorvidade molar para a miricetina de $\epsilon_{378\text{nm}} = 20.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (GRIEP *et al.*, 2007), para o kaempferol, morina e morina penta-acetilada, os valores dos coeficientes foram determinados. Para isto, a miricetina e o kaempferol foram dissolvidos em EtOH e, a morina e morina penta-acetilada foram solubilizados em DMSO.

Para calcular o coeficiente de absorvidade molar do kaempferol, morina e morina penta-acetilada, uma quantidade de massa dos ligantes foi diluída em volume específico para determinar a concentração do estoque. Com o valor das massas molares, determinou-se a concentração do estoque diluído pela relação:

$$c_0 = \frac{m(g)}{MM(g/mol) \times V(L)} \quad (30)$$

onde $m(g)$ é a massa de cada composto em gramas, diluída num volume V (em litros) e MM é a massa molar de cada composto.

As concentrações estoques dos ligantes foram 7 mM para a miricetina, 3,5 mM para o kaempferol, 14,6 mM morina penta-acetilada e 6,6 mM para a morina. diluiu-se uma determinada massa dos ligantes em dimetilsulfóxido (DMSO) ou EtOH.

A espectroscopia de absorção foi usada para determinar a concentração da amostra de proteína e o coeficiente de absorvidade molar da solução estoque dos ligantes. Os espectros de absorção na faixa ultravioleta e visível (UV/Vis) foram obtidos em espectrofotômetro BioMate™ 3S (ThermoFisher®) em cubeta de 1 cm de caminho óptico.

Alíquotas dos flavonoides diluídos em DMSO foram titulados, e coletou-se os espectros para cada volume titulado na faixa UV/Vis no comprimento de onda de 240 nm à 500 nm, em 25 °C. A concentração dos ligantes no DMSO foi determinada pela relação:

$$c(\text{solução}) = c_0 \left(\frac{\Delta V}{V_0 + \Delta V} \right) \quad (31)$$

onde ΔV é o incremento de volume da titulação de ligante, c_0 é a concentração do estoque dos ligantes e V_0 , o volume de DMSO na cubeta.

Para a determinação dos coeficientes de absorvidade molar de cada composto, usa-se a lei de *Beer-Lambert* (GRIMSLEY & PACE, 2003):

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c(\text{solução}) \quad (32)$$

$$\varepsilon = \frac{A \cdot l}{c_0 \left(\frac{\Delta V}{V_0 + \Delta V} \right)} \quad (33)$$

onde A é a absorbância em determinado comprimento de onda, ε coeficiente de absorvidade molar em um determinado comprimento de onda e l é o caminho óptico da cubeta. Pelo gráfico ε versus comprimento de onda, tem-se o valor do coeficiente de absorvidade molar para cada comprimento de onda.

Utilizou-se a mesma metodologia para a determinação dos coeficientes de Absortividade molar dos ligantes em tampão PBS pH 7,4 com 2 mM de DTT e utilizou-se os valores para filtragem interna nos comprimentos de onda de excitação e emissão no experimento de espectroscopia de fluorescência. Esta caracterização se faz necessária pois o coeficiente de absortividade molar dos compostos muda quando solubilizados em tampão e, por isso é necessário recalculá-los para fazer a correção de filtragem interna.

Os espectros de absorção da proteína para a determinação da sua concentração foram obtidos na faixa UV/Vis na extensão de 240 nm à 500 nm e subtraiu-se a linha de base com tampão PBS pH 7,4 com 2 mM de DTT. No cálculo da concentração da proteína NS1 foi utilizado o valor do coeficiente de extinção molar $\epsilon_{280}=10.220 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ em 280 nm, estimado pela ferramenta *Expasy-ProtParam*⁴ (GASTEIGER *et al.*, 2005).

4.9 Estrutura secundária por deconvolução espectral de CD

As medidas de CD foram realizadas em espectropolarímetro Jasco-810 em 25 °C utilizando-se de uma cubeta com caminho óptico de 0,5 mm. O espectro da amostra de proteína na faixa de comprimento de onda de 200 a 260 nm foi coletado com 10 acumulações a velocidade de 20 nm/min, com resposta de 2 s e abertura de fenda de 1,0 nm. A amostra em concentração de 27,7 μM .

O princípio básico envolvido na análise dos espectros de CD de proteínas para a estimativa das frações de estrutura secundária é que um espectro de CD da determinada proteína, θ_λ , pode ser expresso como uma combinação linear de espectros de estruturas secundárias individuais, então:

$$\theta_\lambda = \sum f_k \Theta_{k,\lambda} \quad (34)$$

onde f_k é a fração de estrutura secundária e $\Theta_{k,\lambda}$ é o espectro padrão da estrutura secundária k .

A análise do resultado da deconvolução foi feita pelo método de CONTIN/LL (SREERAMA & WOODY, 2000). Com estes dados foi possível verificar a integridade da proteína purificada.

⁴ <https://web.expasy.org/protparam/>

4.10 Espectroscopia de Fluorescência da NS1 por titulação de flavonoides para verificação de interação

As medidas de fluorescência foram realizadas com espectrofluorímetro ISS PC1 (Champaign, IL, USA) equipado com banho térmico Nestlab RTE-221 (Thermo Electron Corporation, USA), em cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. As medidas foram realizadas nas temperaturas de 292 K (19 °C) e 310 K (37 °C) com excitação em 295 nm e emissão entre 305 e 500 nm e abertura da fenda em 0,5 mm na excitação e 1,0 mm na emissão.

Os ligantes foram diluídos em um estoque de modo que, para cada titulação fosse obedecida a razão 0,1 entre as concentrações de proteína e ligante. Para a miricetina, a concentração estoque foi de 1,5 mM para a concentração de 5,6 µM de proteína NS1, 0,99 mM de kaempferol para a concentração de 5,2 µM de proteína NS1, 0,943 mM de morina penta-acetilada para 5,6 µM de proteína NS1 e 1,1 mM de morina para 5,7 µM de proteína NS1. A concentração da solução estoque de cada ligante e a amostra de proteína em tampão PBS pH 7,4 com 2 mM de foram determinadas por UV/VIS.

A interação entre a NS1 e os flavonoides foi realizada por meio de titulações dos ligantes na cubeta contendo a proteína. Os dados da interação da proteína com os flavonoides foram posteriormente analisados pela relação de *Stern Volmer* (LAKOWICZ, 2006) e, pelo Método de duplo log descrito no ítem 2.5 (FEROZ *et al.*, 2015).

4.11 Simulação de DM da proteína NS1 e *docking* molecular dos complexos

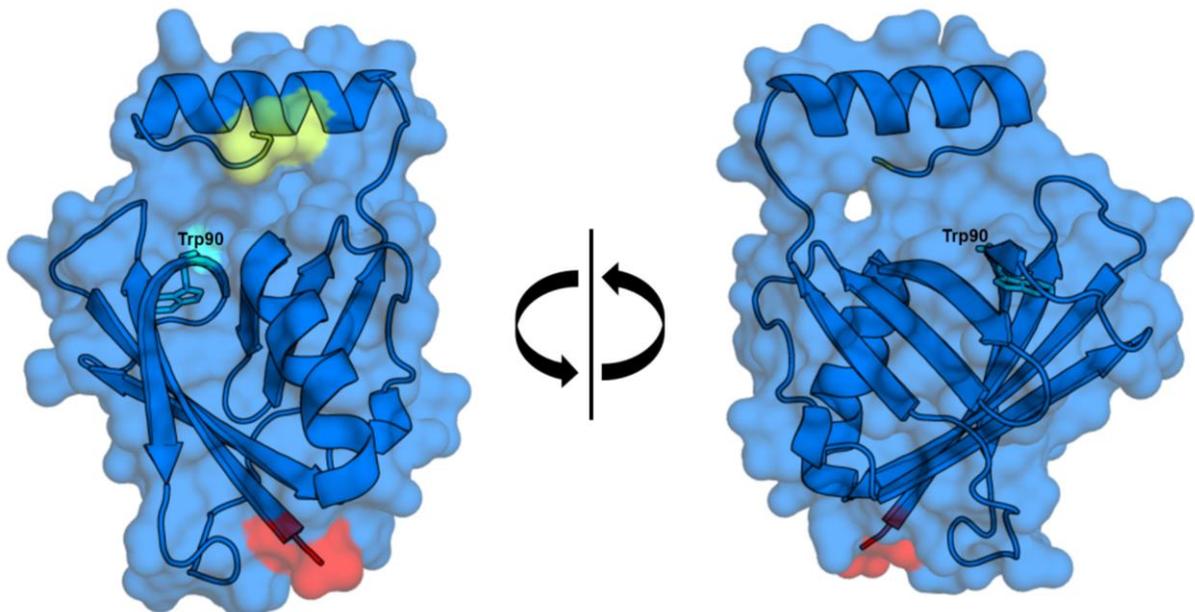
Devido ao fato de a estrutura da proteína NS1 depositada no banco de dado PDB (5VJ2) ser uma estrutura cristalográfica (**Figura 12**), a flexibilidade estrutural da proteína em solução foi explorada a partir de uma simulação de DM de 100 ns, pois a estrutura resolvida da proteína por cristalografia foi obtida em condições extremas de salinidade e solvatação para formação de um cristal com a molécula de proteína rígida, sendo a composição do tampão utilizado contendo 100 mM de MÊS pH 6,1, 1,5 mM sulfato de amônio e 10% de dioxano (PDB 5VJ2⁵).

⁵ <https://www.rcsb.org/pdb/explore/materialsAndMethods.do?structureId=5VJ2>

É possível observar pela estrutura resolvida da proteína NS1 que o triptofano está em uma cavidade na superfície da proteína (**Figura 12**) próximo a α -hélice no C-terminal que é descrito como uma região conservada e flexível, podendo ser uma região importante para a função biológica da proteína (CHATTERJEE *et al.*, 2017).

Foi utilizada as coordenadas da estrutura da proteína NS1 depositada no arquivo PDB da proteína (5VJ2) e o estado de protonação dos resíduos de lisinas (Lys), argininas (Arg), glutaminas (Gln), ácidos aspárticos (Asp), ácidos glutâmicos (Glu) e histidinas (His) da estrutura foram calculados pelo servidor H++⁶ (GORDON *et al.*, 2005). O programa VMD (HUMPHREY *et al.*, 1996) foi utilizado para gerar as figuras e análises da simulação de DM. A proteína foi modelada com o campo de força GROMOS54A7 (SCHMID *et al.*, 2011) e o modelo de água utilizado foi SPC (BERENDSEN *et al.*, 1981).

Figura 12: Representação em *cartoon* e superfície da estrutura cristalográfica da proteína NS1 depositada no PDB 5CJ2. A proteína está em azul marinho com mostrando o triptofano (cian) em *stick*, o N-terminal está em vermelho e o C-terminal está em verde limão. Figura gerada utilizando ferramenta PyMol (DELANO, 2002).



FONTE: Elaborado pelo autor

A estrutura da proteína NS1 obtida por cristalografia (CHATTERJEE *et al.*, 2017) foi utilizada nas simulações de dinâmica molecular, colocando-a no centro de uma caixa cúbica de 100 Å de aresta solvatada por uma solução de 150 mM de NaCl em água e, o estado de protonação de resíduos ionizáveis foi ajustado de acordo com

⁶ <http://biophysics.cs.vt.edu/>

os resultados do servidor H++, considerando um pH 7,4. Condições de contorno periódicas foram utilizadas e as simulações foram realizadas em *ensemble* NPT, mantendo o sistema em 301 K (28 °C) e 1,0 bar usando um termostato *Berendsen* modificado ($\tau_t=0,1$ ps) e barostato *Parrinello–Rahman* ($\tau_p=2,0$ ps e compressibilidade = $4,5 \cdot 10^{-5}$ bar⁻¹).

Um valor de corte de 12 Å foi utilizado para ambos potenciais de *Lennard-Jones* e *Coulomb* e as interações eletrostáticas de longo alcance foram calculadas utilizando o algoritmo *Particle Mesh Ewald* (PME). Na simulação de DM um passo de tempo de 2,0 fs foi utilizado e todas as ligações covalentes envolvendo átomos de hidrogênio foram restringidas para suas distâncias de equilíbrio. Um algoritmo de minimização de gradiente conjugado foi utilizado para relaxar a superposição de átomos gerada no processo de construção da caixa que contém o sistema molecular. A minimização de energia foi realizada com um integrador de *steepest descent* e algoritmo de gradiente conjugado, usando $1000 \text{ k J mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ como critério de força máxima. Foi realizada uma simulação de DM de 100 ns para aquisição de dados e uma análise de cluster foi realizada para os 10 ns finais da simulação.

A estrutura da proteína NS1 de maior cluster após a DM foi utilizada para o *docking* molecular com os ligantes miricetina (Molid 340681), kaempferol (Molid 340679) e morina (Molid 339713) do banco ATB (STROET *et al.*, 2018). A morina penta acetilada foi submetida ao ATB para ser calculado o arquivo de topologia e o arquivo PDB, que foram depositados com o Molid 354073.

Utilizou-se a ferramenta *AutoDockTools* (ADT) (SANNER, 1999) para preparar a proteína NS1 e os ligantes e foi gerado mapa grid com espaçamento de 0,375 Å e dimensão de 126 x 126 x 126 pontos pelo programa *AutoGrid* 4.2.6 (MORRIS *et al.*, 1998) centrado na proteína NS1. O programa *AutoDock* 4.2.6 (MORRIS *et al.*, 1998) foi empregado para estudar o local de ligação entre a NS1 e os ligantes, aplicando o algoritmo genético *Lamarckiano* (LGA) para minimização, com o número de avaliações de energia de 25 milhões, o tamanho da população foi de 250 e a tolerância do RMSD de 2 Å. Para a simulação de *docking* molecular, foram consideradas posições iniciais aleatórias em toda a superfície da proteína e orientações aleatórias para cada ligante gerando 100 conformações diferentes cada um. A representação estrutural foi preparada usando *PyMol* (DELANO, 2002) e o mapa de interação foi calculado usando programa *LigPlot* v 1.4 (WALLACE *et al.*, 199).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros físicos e químicos fornecidos pela ferramenta ProtParam

A proteína NS1 possui 139 resíduos de aminoácidos e foram adicionados 6 resíduos de His no seu C-terminal, formando a His-tag, totalizando 145 aminoácidos. A proteína NS1 possui apenas um resíduo de triptofano e quatro resíduos de cisteína, massa molecular de aproximadamente 16 kDa, ponto isoelétrico teórico (pI) de 6,33 e coeficiente de extinção molar de $10.220 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (**Quadro 2**). O pI foi utilizado para a determinação do pH dos tampões utilizados na purificação, que determinam a estabilidade da proteína e sua carga, o coeficiente de extinção molar foi utilizado para o cálculo de concentração das amostras de proteína.

Quadro 2: Parâmetros da proteína NS1 gerados pela ferramenta ProtParam.

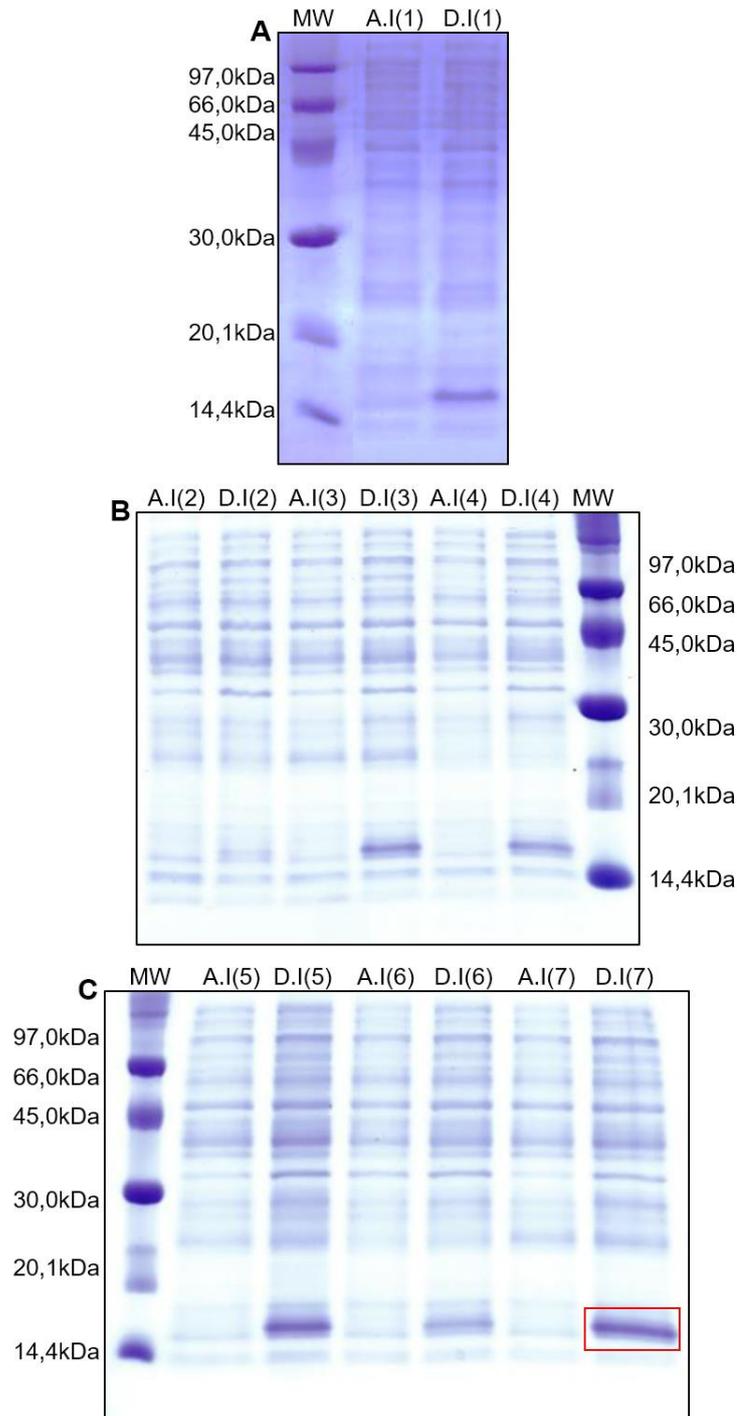
Número de aminoácidos	145 (139+6)
Massa molecular	~16 kDa
pI teórico	6,33
Coeficiente de extinção molar	$10.220 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$

FONTE: Elaborado pelo autor.

5.2 Teste de indução da expressão da proteína NS1

O teste de indução variando os antibióticos (**Figura 13**) indicou que a melhor combinação de antibióticos uma indução mais satisfatória da expressão da proteína NS1 foi a com $50 \mu\text{g/mL}$ de canamicina, $34 \mu\text{g/mL}$ de clorafenicol e $50 \mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, a banda correspondente a proteína NS1 está destacada no SDS-PAGE que mostra a expressão de uma proteína de 16 kDa. (**Figura 13.C**).

Figura 13: SDS-PAGE a 15% corado com *Coomassie brilliant blue R250* com o resultado do teste de indução da expressão da proteína NS1 com diferentes combinações de antibióticos. **(A)** MW (marcador de massa molecular), antes (A.I) e depois (D.I) da indução da cultura contendo todos os antibióticos (1). **(B)** Antes (A.I) e depois (D.I) da indução da cultura contendo somente canamicina (2); canamicina e clorafenicol (3); canamicina, estreptomicina e tetraciclina (4), seguido do MW. **(C)** MW seguido de antes (A.I) e depois (D.I) da indução da cultura contendo canamicina e estreptomicina (5); canamicina e tetraciclina (6) e canamicina, clorafenicol e estreptomicina (7). Banda indicada em vermelho correspondente a melhor condição para indução da proteína NS1 (~16 kDa).



FONTE: elaborado pelo autor

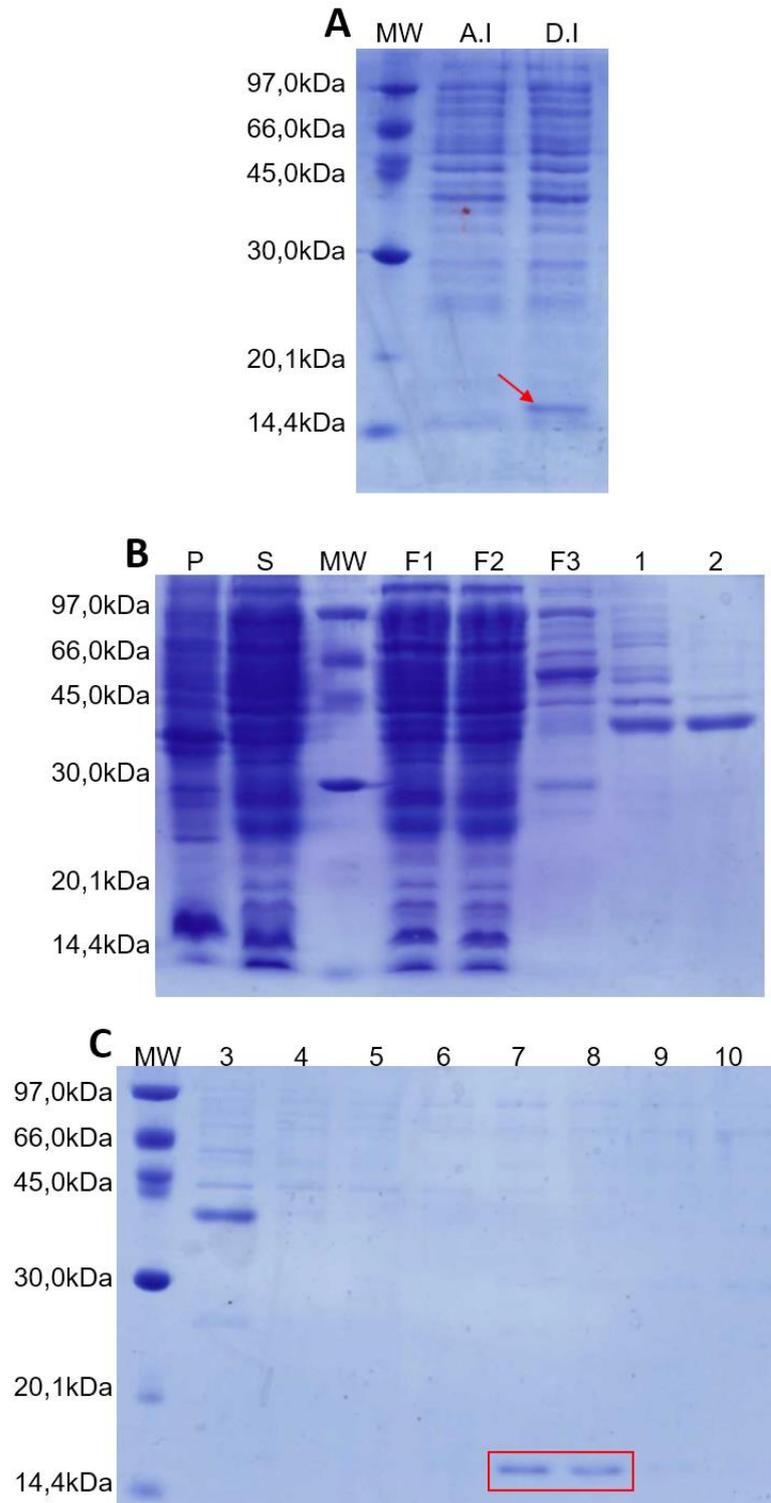
5.3 Purificação da proteína NS1 por cromatografias de afinidade e exclusão molecular

A proteína foi expressa (**Figura 14.A**) e após a lise, observou-se que uma parte das proteínas estavam na fração insolúveis (**Figura 14.B**). A fração solúvel submetida às etapas de purificação por cromatografia de afinidade mostraram que a proteína foi eluída na fração com tampão de purificação (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 100 mM de NaCl e 1 mM de BME) contendo 80 mM de imizazol (**Figura 14.C**).

Após realizada a concentração destas frações pode-se verificar que ainda existia contaminantes na amostra (**Figura 15.B**), então a amostra foi submetida a uma segunda purificação por exclusão molecular, pois a amostra advinda da cromatografia de afinidade ainda apresentavam contaminantes (**Figura 15.C**) e, com as eluições subsequentes, a proteína NS1 foi obtida pura (**Figura 15.D**). É possível verificar que a proteína NS1 é eluída pura a partir de 12 mL, após a injeção da amostra, até 14,5 mL de volume de eluição (**Figura 15.A**).

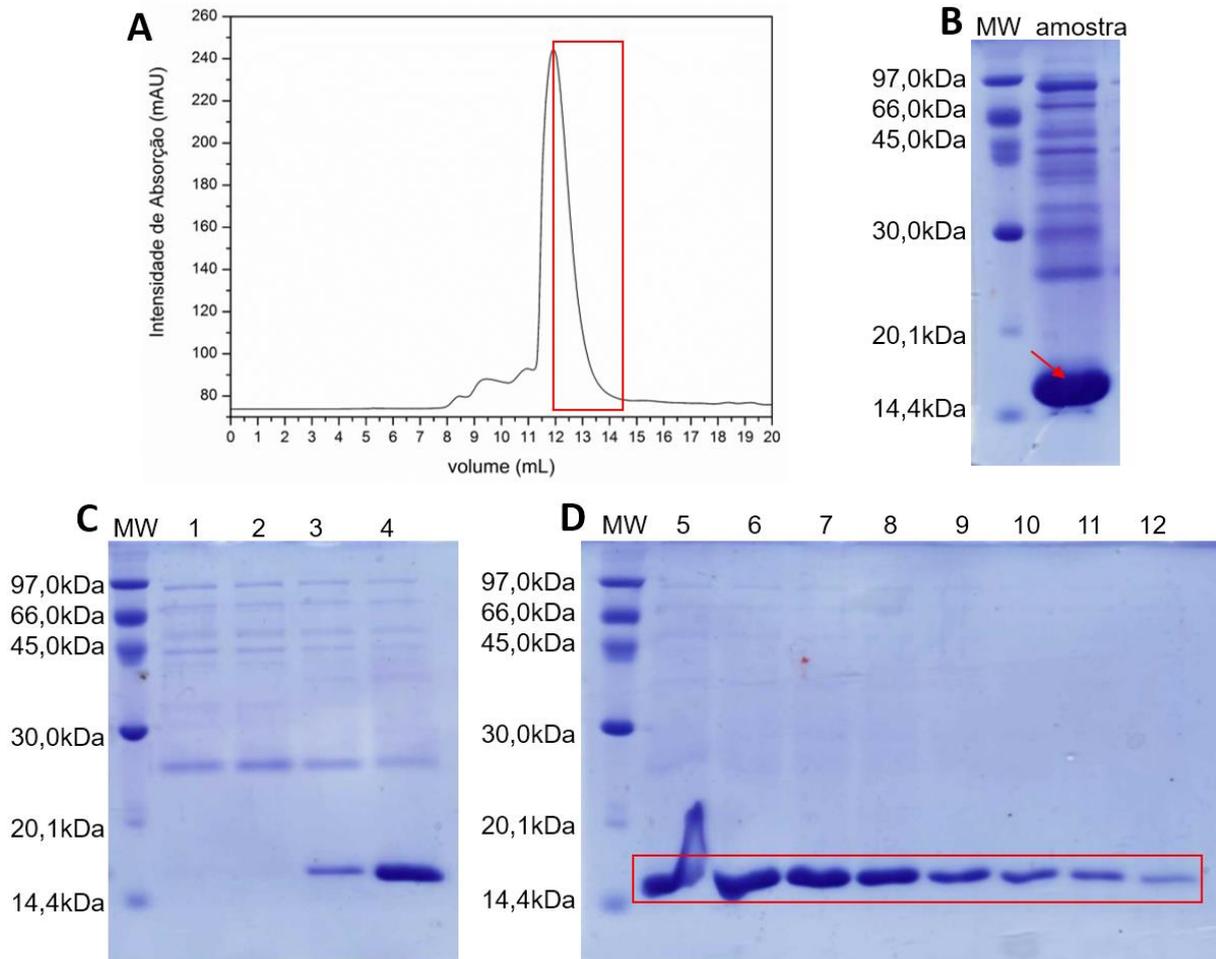
A proteína NS1 foi produzida com concentração de 33 μ M, esta quantificação foi obtida utilizando a lei de *Beer-Lambert* (GRIMSLEY & PACE, 2003).

Figura 14: SDS-PAGE a 15% corado com *Coomassie brilliant blue* R-250 da purificação por cromatografia de afinidade. **(A)** MW, antes (A.I) e após (D.I) a indução da expressão da proteína NS1 em Rosetta-Gami 2 (DE3). **(B)** Fração insolúvel (P), fração solúvel (S), MW, *Flow through* (F1, F2 e F3), lavagem com 20 mM de imidazol (1 e 2). **(C)** Lavagem com 40 (3 e 4), 60 (5 e 6), 80 (6 e 8), 100 (9) e 200 (10) mM de imidazol no tampão de purificação. A banda no SDS-PAGE correspondente a proteína induzida está destacada com a seta vermelha e a banca correspondente a eluição da proteína NS1 na cromatografia de afinidade está destacada.



FONTE: elaborado pelo autor

Figura 15: SDS-PAGE a 15% corado com *Coomassie brilliant blue* R-250 da purificação por cromatografia de exclusão molecular. **(A)** Cromatograma da eluição da proteína NS1 entre 12 e 14,5 mL, destacada em vermelho. **(B)** MW e amostra, eluída com tampão de purificação contendo 80 mM de imidazol, após concentração. **(C-D)** MW, frações de eluição da proteína NS1, sendo obtida a proteína NS1 pura entre 12 e 14,5 mL, correspondendo as frações entre as colunas 5 e 12 do SDS-PAGE (D).



FONTE: elaborado pelo autor

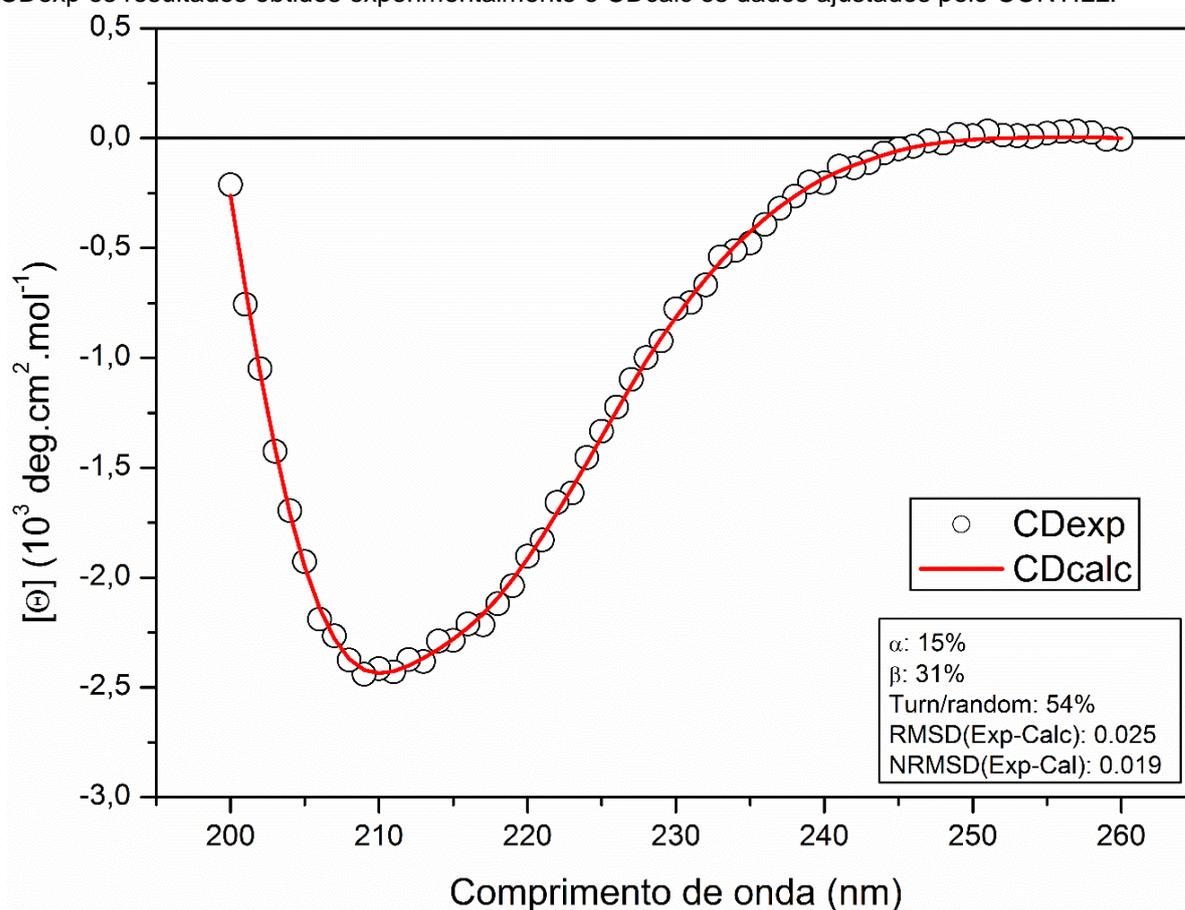
5.4 Determinação da fração de estruturas secundárias de proteína por CD

Os espectros de CD da proteína NS1 à 25 °C mostram que a estimativa de estrutura secundária é constituída pelas seguintes frações: 15% de α -hélice, 31% de folha- β , 54% de voltas e estruturas aleatórias (**Figura 16**), segundo a análise de deconvolução espectral realizada pelo método de CONTIN/LL (SREERAMA & WOODY, 2000).

Comparado com a estrutura cristalográfica (CHATTERJEE *et al.*, 2017), a estimativa da estrutura secundária por dicroísmo circular difere pela diminuição de α -hélice e folha β , de 24 para 15 % e de 47 para 31%, respectivamente, e um ganho de

estruturas aleatórias e voltas, de 29 para 54%. Essa divergência pode ter ocorrido devido ao fato de que as condições de solvatação da amostra da proteína utilizada para a cristalografia foram em tampão contendo 100 mM de MÊS pH 6,1, 1,5 mM sulfato de amônio e 10% de dioxano (PDB 5VJ2⁷). Além disso, a baixa hidratação da proteína pode contribuir para a formação de estruturas secundárias de folha β , já que as moléculas de água podem afetar não apenas a estabilidade da estrutura macromolecular, mas também processos de sua transição de fase e cristalização termodinâmica (HU *et al.*, 2008).

Figura 16: Espectro de dicroísmo circular da proteína NS1. O espectro de CD da proteína obtido experimentalmente está representado pelos círculos pretos e o ajuste da curva utilizando programa CONTILL. A concentração da proteína foi de 27,7 μ M em tampão PBS com 2 mM de DTT. Sendo CDexp os resultados obtidos experimentalmente e CDcalc os dados ajustados pelo CONTILL.



FONTE: elaborado pelo autor.

Comparando com a estrutura obtida pela análise de cluster da dinâmica molecular, as estimativas de estruturas secundária estão próximas (**Tabela 1**), sendo

⁷ <https://www.rcsb.org/pdb/explore/materialsAndMethods.do?structureId=5VJ2>

que os parâmetros para a dinâmica foram os mesmos utilizados experimentalmente, sugerindo uma flexibilidade estrutural da proteína NS1 em diferentes condições de solvatação e temperatura.

Tabela 1: Estimativa da estrutura secundária da proteína NS1 por CD comparada com as estimativas da estrutura resolvida por cristalografia (CHATTERJEE *et al.*, 2017) e com a estrutura clusterizada pela dinâmica molecular.

	Amostra obtida	Estrutura resolvida por cristalografia	Dinâmica molecular
α-hélice	15%	24%	23%
folha-β	31%	47%	27%
Estruturas aleatórias e voltas	54%	29%	50%

FONTE: elaborado pelo autor.

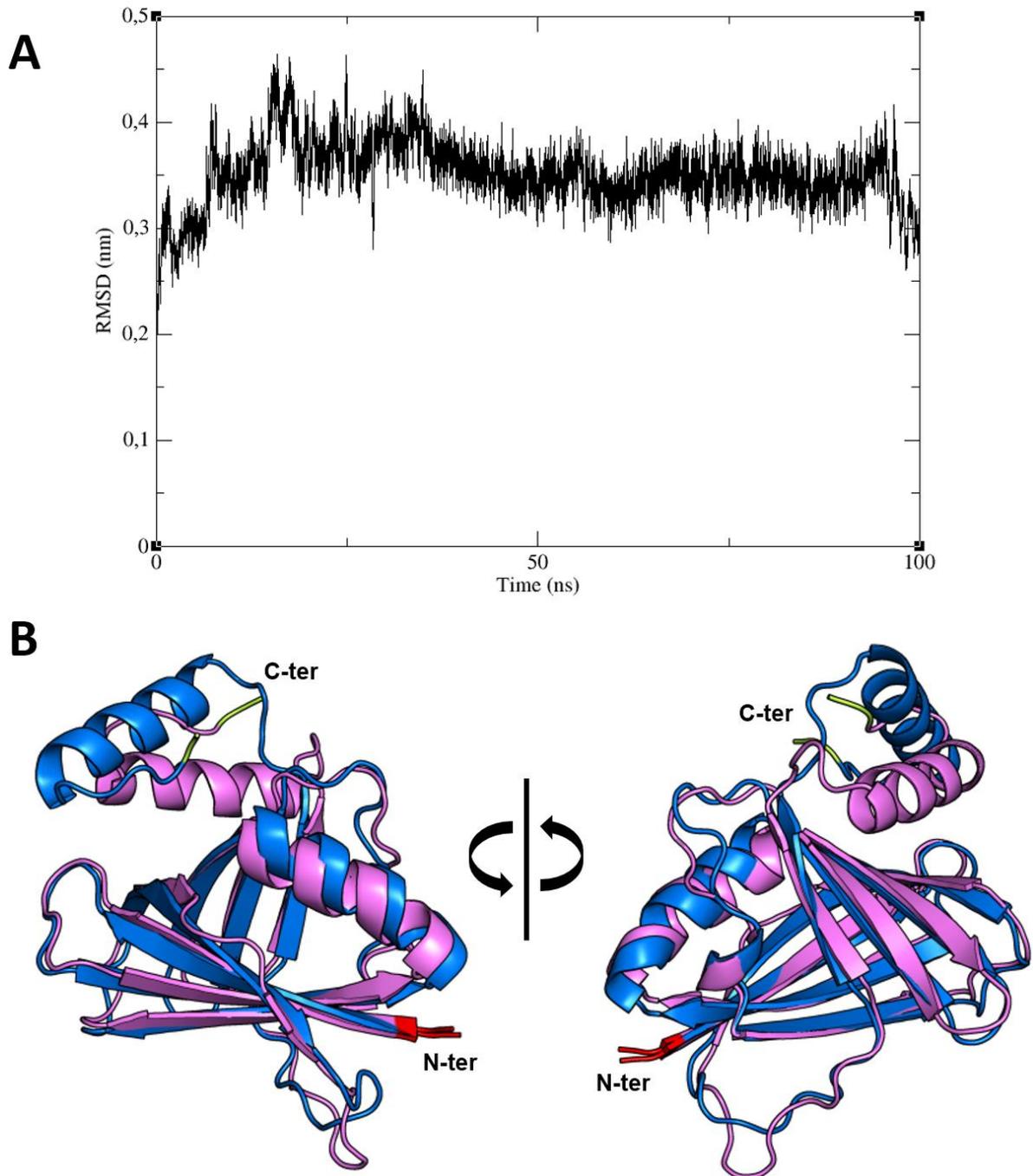
5.5 Dinâmica Molecular da proteína NS1

Os valores de RMSD dos átomos da cadeia principal da proteína são reportados como função do tempo de simulação (**Figura 17.A**) e alcança valores estáveis logo após o início da simulação. A estrutura tridimensional pela cristalografia e a clusterizada de dinâmica molecular foram comparadas (**Figura 17.B**). A partir da **Figura 17.B** é possível observar que a estrutura da proteína obtida da simulação de DM possui uma mudança na posição da α -hélice próxima ao C-terminal da proteína. A proteína apresentou 23% de α -hélice, 27% de folha- β e 50% de estruturas aleatórias, e a estrutura cristalizada apresentava 24% de α -hélice, 47% de folha- β e 29% de estruturas aleatórias, pelo *PyMol*, indicando que houve uma diminuição de estruturas folha- β e um aumento de estruturas aleatórias.

Este resultado sugere uma flexibilidade da proteína NS1, já que varia sua conformação estrutural de acordo com temperatura e solvatação, considerando que para a dinâmica as condições de contorno, como temperatura e concentração salina, foram as mesmas das análises experimentais.

Além disso, como proposto por CHATTERJEE *et al.* (2017), a α -hélice próxima ao C-terminal é uma região conservada indicando possivelmente flexível e que pode ter uma função biológica. Esta região, pelo resultado obtido na DM, pode variar sua posição, como visto na **Figura 17.B**, corroborando com os indícios de poder ser uma região importante na interação com outras moléculas.

Figura 17: Avaliação da dinâmica molecular da proteína NS1. **(A)** RMSD dos átomos da cadeia principal da proteína NS1. **(B)** Estrutura tridimensional da proteína NS1 do modelo cristalográfico (azul marinho) (PBD 5VJ2) e a estrutura obtida pela análise de *cluster* pela DM (violeta) onde é possível visualizar a mudança na posição da α -hélice próxima ao C-terminal e a variação nas regiões de fita- β sendo região de estruturas aleatórias após a DM. O N-terminal (N-ter) da proteína NS1 está em vermelho e o C-terminal (C-ter) em verde limão nas estruturas cristalográficas e obtida pela DM.

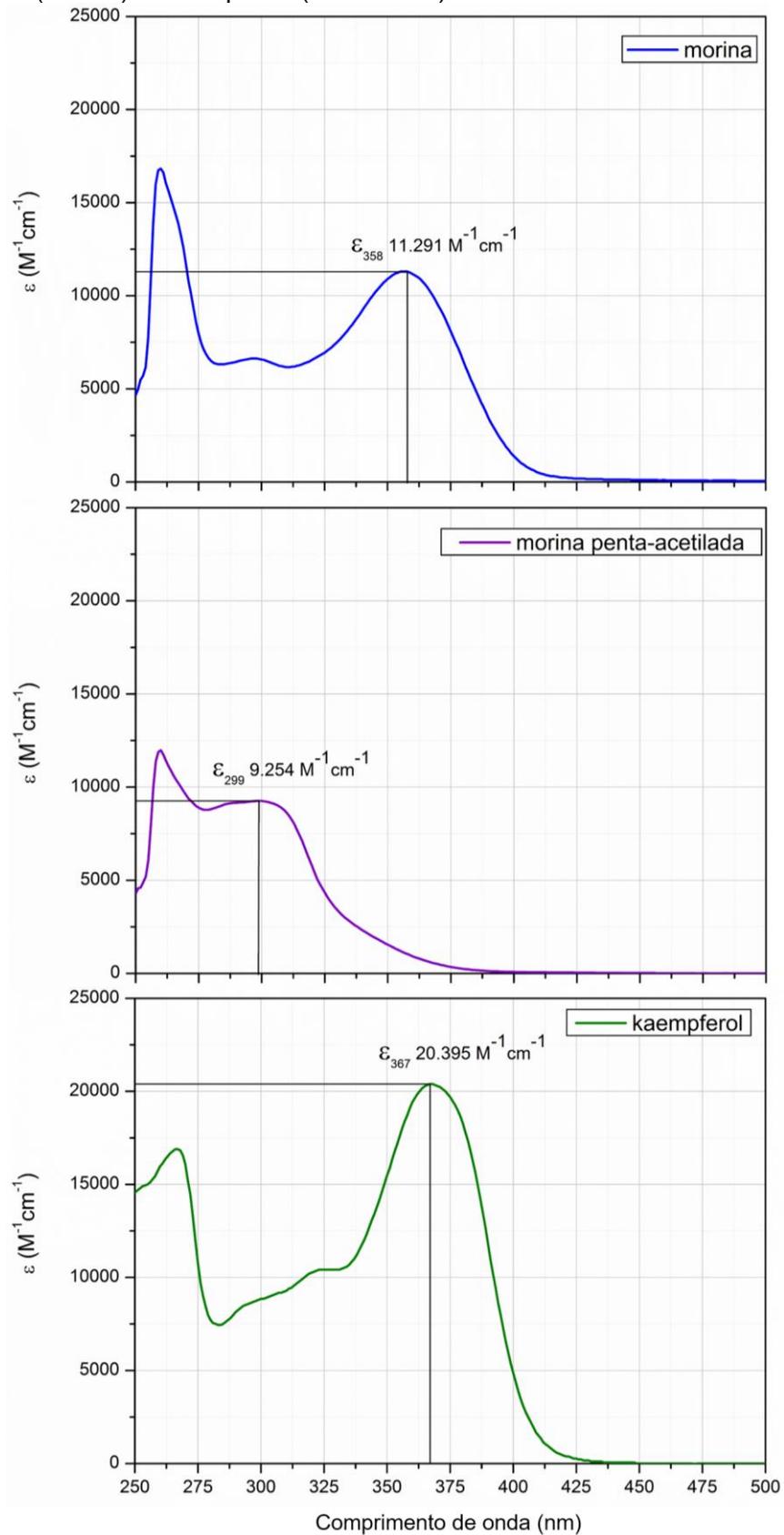


FONTE: elaborado pelo autor

5.6 Determinação do coeficiente de extinção molar de flavonoides

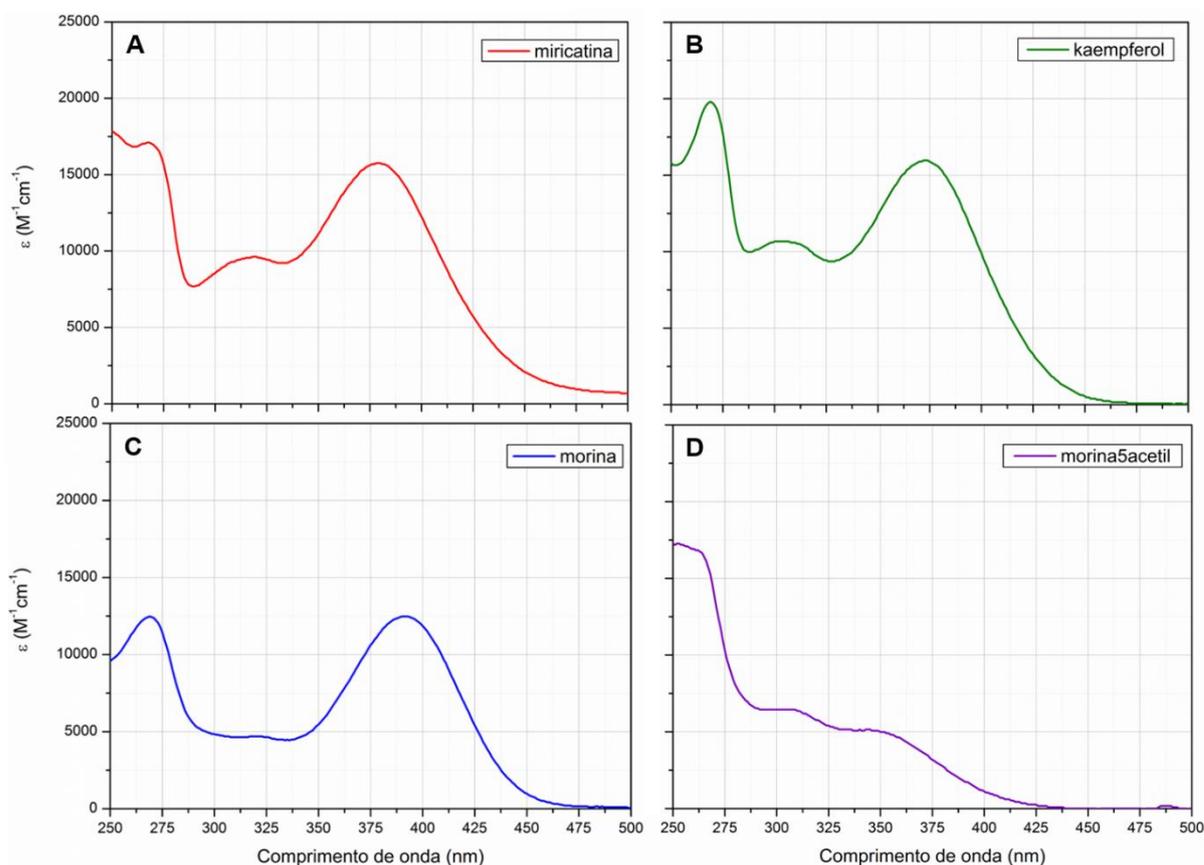
Os espectros característicos com os valores de coeficiente de absorvidade molar para cada ligante estão mostrados na **Figura 18**. Os coeficientes calculados foram de $20.395 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (em 367 nm) para o kaempferol, $9.254 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (em 299 nm) para a morina penta-acetilada e $11.291 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (em 358 nm) para a morina. Para a miricetina utilizou-se o coeficiente de extinção molar da literatura, $20.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (em 378 nm). Então, titulou-se os ligantes em tampão PBS pH 7,4 com 2 mM de DTT para se obter o espectro característico no tampão (**Figura 19**).

Figura 18: Espectro característico do coeficiente de absorvidade dos flavonoides. Destacado nos espectros estão os coeficientes utilizados para cada ligante, sendo, morina (azul), morina penta-acetilada (violeta) e kaempferol (verde oliva).



FONTE: elaborado pelo autor.

Figura 19: Espectro de coeficiente de absorvidade molar em tampão PBS pH 7,4 e 2 mM de DTT dos flavonoides miricetina, kaempferol, morina e morina penta acetilada. Sendo utilizados os coeficientes de extinção molar no comprimento de onda de 295 para a filtragem interna da excitação de $8.080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (miricetina), $10.364 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (kaempferol), $6.519 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (morina) e $6.442 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (morina penta acetilada), e para a emissão os coeficientes de $9.629 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (320 nm) para a miricetina, $9596 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (322 nm) para o kaempferol, $5.876 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (320 nm) para a morina e $5.755 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (320 nm) para a morina penta acetilada.



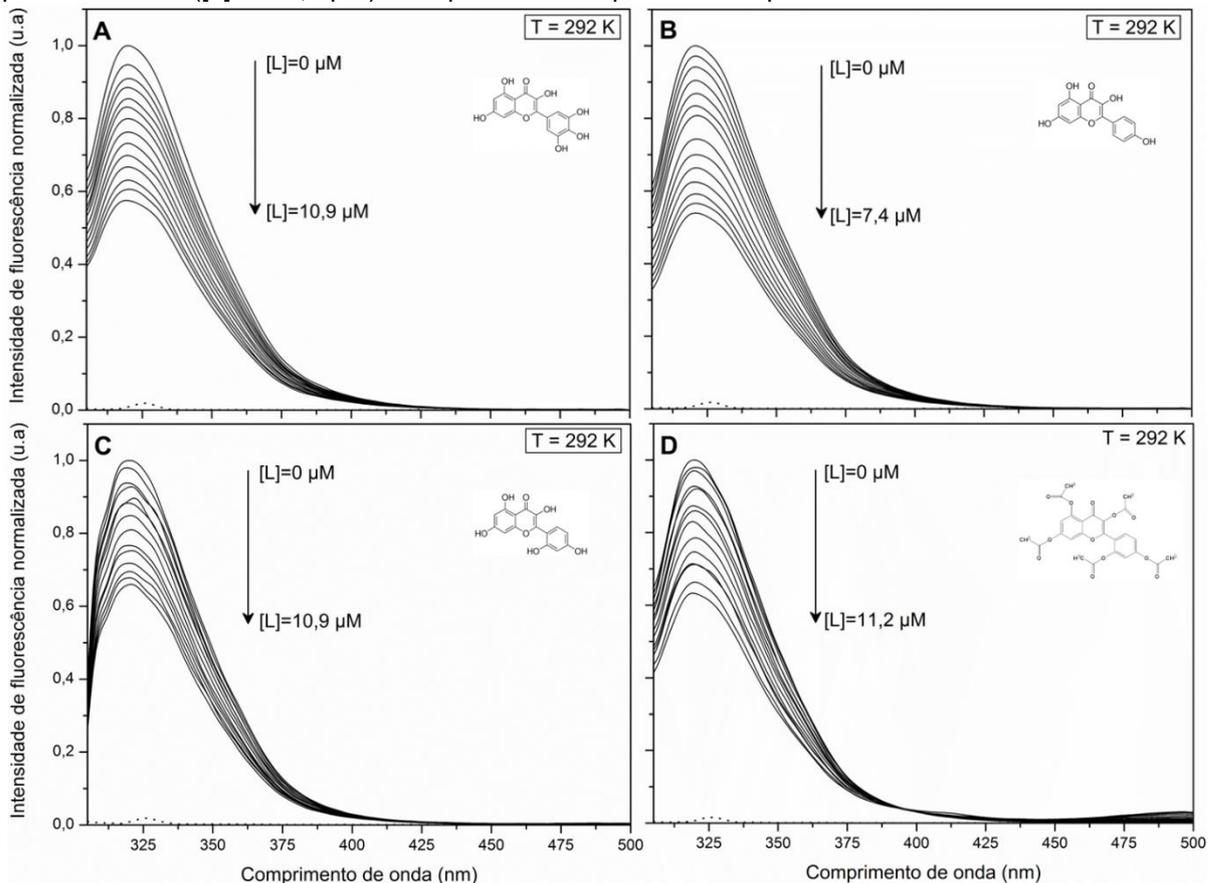
FONTE: elaborado pelo autor.

5.7 Supressão de Fluorescência da NS1 pela Morina

Nos experimentos de supressão de fluorescência da NS1 pela adição de ligante, a concentração da proteína foi considerada constante, pois o aumento do volume após as titulações foi da ordem de 1-2%. A concentração de miricetina variou de 0 a $10,9 \mu\text{M}$ na solução com incrementos de $0,55 \mu\text{M}$ em cada titulação (**Figura 20.A**). A concentração de kaempferol variou de 0 a $7,4 \mu\text{M}$ na solução com incrementos de $0,37 \mu\text{M}$ (**Figura 20.B**). A concentração da morina variou de 0 a $10,9 \mu\text{M}$ na solução com incrementos de $0,55 \mu\text{M}$ (**Figura 20.C**). Para o experimento com a morina penta-acetilada, a concentração variou de 0 a $11,2 \mu\text{M}$ na solução com incrementos de $0,56 \mu\text{M}$ (**Figura 20.D**).

A amostra da NS1 foi excitada em 295 nm, em que, somente o resíduo de triptofano (Tpr90) é excitado (LAKOWICZ, 2006), e a supressão da fluorescência mostra que a emissão da NS1 na ausência e na presença dos ligantes, registrada de 305 a 500 nm nas temperaturas de 292 e 310 K, diminui com o aumento da concentração dos flavonoides na solução. Esses resultados indicam que os flavonoides interagem nas proximidades do triptofano (Tpr90), havendo formação de complexo NS1-ligante (**Figura 20**) (LAKOWICZ, 2006).

Figura 20: Espectro de emissão normalizado do complexo NS1-ligante em 292 K. **(A)** Supressão da fluorescência da proteína NS1 ([NS1]: 5,6 μM) pela titulação de miricetina ([L]: 0-10,9 μM). **(B)** Supressão da fluorescência da proteína NS1 ([NS1]: 5,2 μM) pela titulação de kaempferol ([L]: 0-7,4 μM). **(C)** Supressão da fluorescência da proteína NS1 ([NS1]: 5,7 μM) pela titulação de morina ([L]: 0-10,9 μM). **(D)** Supressão da fluorescência da proteína NS1 ([NS1]: 5,6 μM) pela titulação de morina penta-acetilada ([L]: 0-11,2 μM). O espectro do tampão está em pontos.



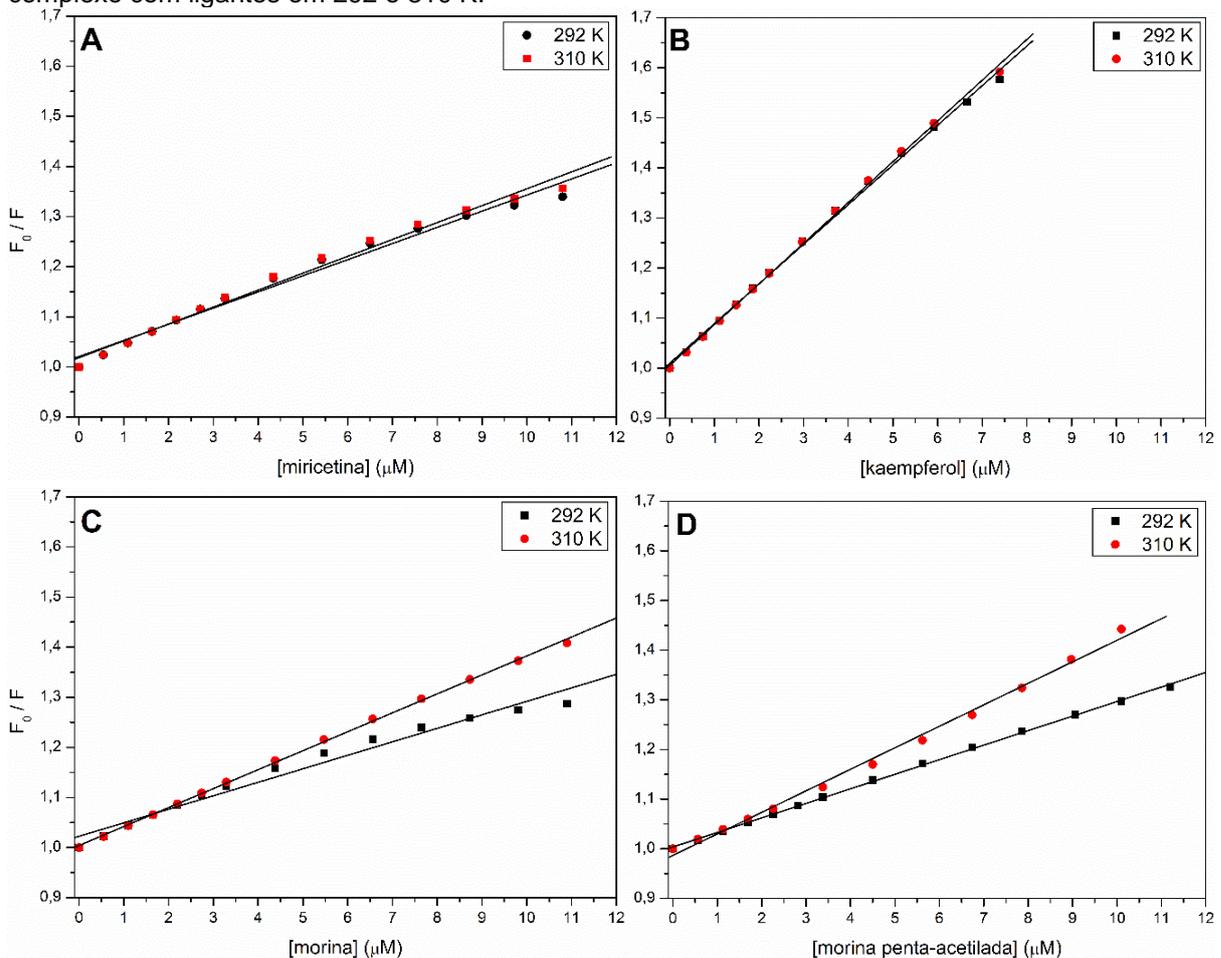
FONTE: elaborado pelo autor.

Nos intervalos de concentrações investigados para os ligantes, os resultados de supressão de fluorescência nas temperaturas de 292 K (19 °C) e 310 K (37 °C) estão em coerência com a equação de *Stern-Volmer*, equação (9), apresentando uma dependência linear (**Figura 21**). Os valores obtidos para as constantes de *Stern-*

Volmer para a morina, aumentam com o aumento da temperatura, assim como para a morina penta acetilada. Já para o kaempferol e miricetina, os valores da constante de *Stern-Volmer* pouco se alteram, sendo que para o kaempferol, os valores das constantes de *Stern-Volmer* são os maiores entre os flavonoides estudados (**Tabela 2**).

Em geral, pode-se dizer que para a morina e morina penta acetilada, o aumento da temperatura favoreceu a interação, pois as constantes de *Stern-Volmer* aumentam com o aumento da temperatura. Embora para a miricetina e o kaempferol não tenha tido uma variação significativa na constante em relação à temperatura, o valor da constante para o kaempferol foi o maior, sugerindo que esta molécula teve mais acesso ao Triptofano e/ou possa ter acesso a um bolsão enterrado da proteína mesmo em temperaturas mais baixas.

Figura 21: Gráfico de *Stern-Volmer* para a supressão de fluorescência da NS1 pela formação de complexo com ligantes em 292 e 310 K.



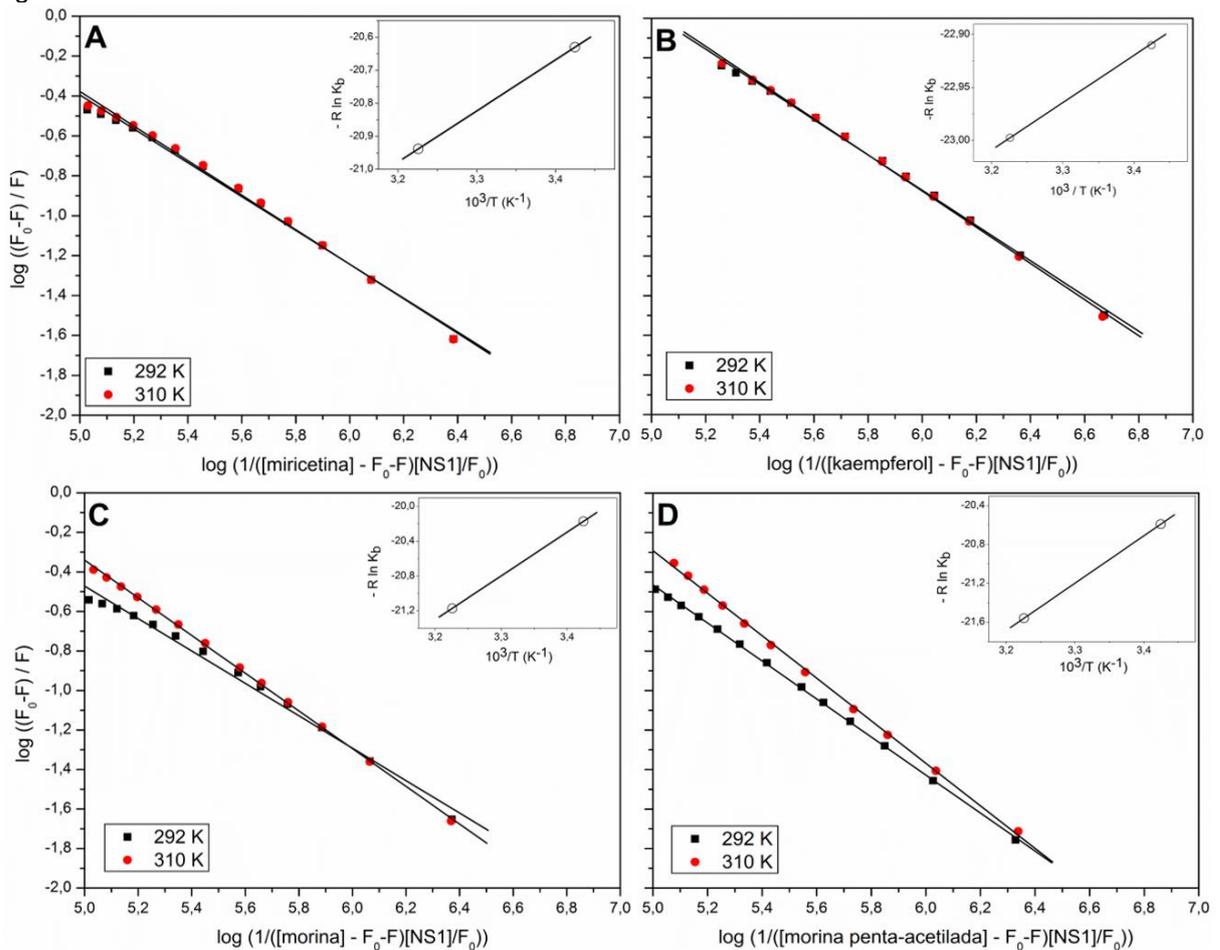
FONTE: elaborado pelo autor.

Tabela 2: Constantes de supressão de Stern-Volmer (k_{SV}) do complexo NS1-ligantes em 292 e 310K. $R > 0,99$.

Ligante	Temperatura (K)	K_{SV} (10^4 M^{-1})	R^*
miricetina	292	3,2	0,991
	310	3,4	0,993
kaempferol	292	7,9	0,998
	310	8,1	0,999
Morina	292	2,7	0,997
	310	3,8	0,999
Morina penta-acetilada	292	2,9	0,999
	310	4,3	0,997

* R é a constante de correlação. FONTE: elaborado pelo autor.

Figura 22: Gráfico de duplo-log para a supressão de fluorescência da NS1 pelos flavonoides em 2 temperaturas. As retas em preto representam os melhores ajustes lineares para a interação do complexo NS1-ligante. Nos insertos de cada gráfico de duplo-log está o gráfico de van't Hoff para cada ligante.



FONTE: elaborado pelo autor.

A dependência é linear no gráfico de duplo-log para a supressão de fluorescência da NS1 na presença de ligantes (**Figura 22**), sendo a inclinação da reta igual ao número de ligantes por sítio de ligação (n) e o intercepto com a ordenada igual ao valor de $n \log(k_b)$. As análises da interação da NS1 com os flavonoides mostram que k_b é da ordem de 10^4 M^{-1} e o n é de aproximadamente 1,0, podendo considerar como um ligante por proteína. Sendo o valor aproximando de n para cada ligante de 0,85 para o complexo NS1-miricetina, 0,9 para o complexo NS1-kaempferol, 0,9 para o complexo NS1-morina e 1,0 para o complexo NS1-morina penta-acetilada (**Tabela 3**).

A constante de ligação ao kaempferol apresentou os maiores valores comparados com os outros ligantes enquanto que a morina apresentou os menores valores da constante de ligação (**Tabela 3**). A morina e a morina penta-acetilada apresentaram uma maior variação da constante de ligação com o aumento da temperatura. Para o kaempferol, a tendência de pouca variação dos valores de K_b com o aumento da temperatura (19 – 37 °C) sugere que a ligação é termicamente mais estável. Em geral, a ordem da afinidade dos flavonoides para a proteína de acordo com a constante de ligação (k_b) em 37 °C é kaempferol>morina penta acetilada>morina≥miricetina.

Para todos os flavonoides utilizados neste estudo, a constante de ligação foi do tipo moderada (10^4 M^{-1}), pois não é fraca para não ocorrer a ligação e nem forte para ocorrer a complexação definitiva. A constante de ligação sendo moderada mostra uma característica importante para perturbar interações intermoleculares em parceiros da NS1 nas vias da resposta imunológica, como por exemplo, pode-se supor que quando a NS1 interage com o flavonoide e isso pode impedir, momentaneamente a proteína de bloquear as vias do IFN- α , e logo desassociem-se para que o flavonoide possa ser complexado por outras proteínas NS1.

Entretanto, com os estudos realizados neste trabalho, não é possível saber se a constante de ligação do tipo moderada seria suficiente para inibir ou bloquear a atuação da proteína NS1 na via de indução de IFN ou se seria necessário uma ligação mais forte para ocorrer a complexação definitiva do ligante ao sítio de ligação da proteína NS1.

Tabela 3: Valores das constantes de ligação (k_b) e número de ligantes por sítio de interação (n) para as temperaturas de 292 e 310K. $R > 0,99$

Ligante	Temperatura (K)	n	$k_b(10^4 \text{ M}^{-1})$
miricetina	292	0,85	3,35
	310	0,86	3,91
kaempferol	292	0,89	10,59
	310	0,91	11,07
Morina	292	0,82	2,65
	310	0,95	4,40
Morina penta-acetilada	292	0,96	3,28
	310	1,08	5,36

FONTE: elaborado pelo autor.

Relacionando os resultados da supressão de fluorescência com as estruturas dos ligantes estudados, observa-se que o kaempferol é o ligante com a menor quantidade de grupo OH (4 grupos), e pode-se presumir que é o ligante com a menor solvatação e, conseqüentemente, mais susceptível a interagir com a proteína mais significativamente (NAFISI *et al.*, 2008), o que pode justificar o kaempferol ser o ligante com os maiores valores da constante de Stern-Volmer $K_{SV} = (7,9-8,1) 10^4 \text{ M}^{-1}$ e da constante de ligação $k_b = (10,59-11,07) 10^4 \text{ M}^{-1}$, entretanto, pela variação de K_{SV} ser pequena, sugere-se que o ligante tem pouca mobilidade no sítio.

Outro indício deste fato, é que para a morina (5 grupos OH) e a miricetina (6 grupos OH), os valores médios de K_{SV} possuem pouca variação de uma para a outra, sendo de $(2,7-3,8) 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $(3,2-3,4) 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivamente.

Porém, comparando as variações das constantes de ligação (k_b), $(2,65-4,40) 10^4 \text{ M}^{-1}$ para a morina e $(3,35-3,91) 10^4 \text{ M}^{-1}$ para a miricetina, os resultados mostram que a morina possui uma afinidade um pouco maior com o sítio de ligação da proteína do que a miricetina. O fato de os dois ligantes terem grupos OH em posições diferentes no anel benzênico B pode ter interferido na ligação e, conseqüentemente, terem tido uma constante de ligação mais baixa, já que a posição desses grupos pode interferir na posição de interação dos ligantes ao sítio de ligação da proteína, aumentando a afinidade ou diminuindo-a.

Com relação aos grupos acetilados, a constante de Stern-Volmer da interação com a morina penta-acetilada foi a de maior variação com o aumento da temperatura entre os ligantes, sendo $K_{SV} = (2,9-4,3) 10^4 \text{ M}^{-1}$, já a constante de ligação $k_b = (3,28-$

5,36) 10^4 M^{-1} , sugerindo que as 5 acetilações favoreceram a interação do ligante com a proteína mais que a morina e miricetina.

Além disso, o aumento da temperatura favoreceu a interação para todos os flavonoides, podendo ser devido ao fato de o aumento da temperatura expôs o triptofano para a interação com os flavonoides ou por mudanças estruturais na proteína ou, até mesmo, por mudança na posição de alguma região da proteína enterrando o triptofano para o seu interior.

Embora as acetilações não influenciaram significativamente a interação com a proteína NS1, essas modificações podem ser benéficas por poderem melhorar a ação antiviral e facilitar a absorção do composto no organismo pelas acetilações facilitarem a passagem por membranas celulares ou até, mesmo protegerem a molécula de sofrerem reações metabólicas (SANTOS *et al.*, 2003; GUSDINAR *et al.*, 2011).

5.8 Parâmetros termodinâmicos da interação da NS1 com flavonoides

Os parâmetros termodinâmicos para o complexo NS1-ligantes foram determinados a partir da equação de *van't Hoff* utilizando as constantes de ligação k_b para cada temperatura, como mostrado na **Tabela 4**. Os insertos nos gráficos de duplo-log (**Figura 22**) mostra os gráficos de *van't Hoff* para cada ligante, onde a inclinação da reta fornece o valor de ΔH .

Tabela 4: Valores de $1/T$ e $-R \ln k_b$ para as temperaturas de 292 e 310K para o gráfico de *van't Hoff*.

Ligante	T(K)	$1/T \text{ (K}^{-1}\text{)}$	$-R \ln k_b$
Miricetina	292	$3,42 \cdot 10^{-3}$	-20,63
	310	$3,23 \cdot 10^{-3}$	-20,94
Kaempferol	292	$3,42 \cdot 10^{-3}$	-22,91
	310	$3,23 \cdot 10^{-3}$	-23,00
Morina	292	$3,42 \cdot 10^{-3}$	-20,17
	310	$3,23 \cdot 10^{-3}$	-21,170
morina penta-acetilada	292	$3,42 \cdot 10^{-3}$	-20,59
	310	$3,23 \cdot 10^{-3}$	-21,56

FONTE: elaborado pelo autor.

As variações de entalpia (ΔH) a partir da inclinação da reta do gráfico de *van't Hoff*, inseridos na **Figura 22**, as variações de energia livre de Gibbs (ΔG), equação (12), e a variação da entropia (ΔS), obtida pela equação (13), são mostradas na **Tabela 5**.

Tabela 5: Valores das variações da energia livre de Gibbs ΔG , de entalpia ΔH e entropia ΔS .

Ligante	T(K)	ΔG (kcalmol ⁻¹)	ΔH (kcalmol ⁻¹)	T ΔS (kcalmol ⁻¹)
miricetina	292	-6,02	1,55	7,57
	310	-6,49		8,04
kaempferol	292	-6,69	0,44	7,13
	310	-7,13		7,57
Morina	292	-5,89	5,03	10,92
	310	-6,56		11,59
morina penta-acetilada	292	-6,01	4,88	10,89
	310	-6,68		11,56

FONTE: elaborado pelo autor.

Os valores negativos da variação de energia livre de Gibbs (ΔG), apresentados na **Tabela 5**, indicam que a ligação da NS1 com os flavonoides é espontânea. Com o aumento da temperatura a negatividade da ΔG aumenta, assim a formação do complexo NS1-ligante é mais favorável com o aumento da temperatura, sugerindo que as interações são entropicamente dirigidas, pois a maior contribuição é na variação de entropia (ΔS).

Embora para o kaempferol tenha sido obtido uma energia livre de Gibbs próxima das energias dos outros ligantes, foi o flavonoide com a menor entalpia, sendo uma ligação de pouco gasto energético.

Uma evidência de que a ligação entre NS1 e os flavonoides têm mais contribuição hidrofóbica, são os valores positivos de ΔS e ΔH que, pelo balanço entalpia-entropia, sendo a entropia a principal contribuição para a formação dos complexos NS1-ligantes.

A hidrofobicidade dos compostos melhora a capacidade de acessar locais hidrofóbicos e interfaces das membranas biológicas (ALMEIDA *et al.*, 2004), facilitando-os entrar nas células, assim como a interação com proteínas em regiões hidrofóbicas. Essas características são importantes para ensaios em cultura celular para uma maior penetração do ligante na célula e assim atuar sobre o alvo.

5.9 Interação proteína-ligante por *docking* molecular

A análise do *docking* molecular do complexo NS1-flavonoide para a miricetina revelou um total de 39 *clusters* de conformações, sendo o *cluster* mais populoso, com um total de 11 conformações, com score de -4,6 (**Figura 23.A**). Para o kaempferol, foi obtido um total de 18 *clusters* de conformações, sendo o *cluster* mais populoso o de menor score, -6,26, com um total de 18 conformações (**Figura 24.A**). Para a morina, a análise foi de um total de 21 *clusters* de conformações, sendo o *cluster* mais populoso o de menor score, -6,59, com um total de 28 conformações (**Figura 25.A**). E para a morina penta acetilada, a análise resultou em um total de 69 *clusters* de conformações, com o *cluster* mais populoso com o menor score, -6,44, com um total de 5 conformações (**Figura 26.A**). Foi considerada a primeira pose do *cluster* mais populoso dos ligantes no sítio de interação da proteína.

O mapa da interação no sítio de ligação do complexo NS1-flavonoides foi realizado pelo programa *LigPlot* v 1.4 (WALLACE *et al.*, 1995) a partir do *docking* molecular da proteína com cada ligante. Para a interação com a miricetina, os resíduos Ser63, Asp64, Leu117 e Pro139 (**Figura 23.C**) estão envolvidos na ligação em interações hidrofóbicas com o flavonoide. Os resíduos Asn68, Lys112, Phe113, Ser114, Lys115, Asp119 e Met122 (**Figura 24.C**) estão envolvidos na ligação por interações hidrofóbicas com o kaempferol. Os resíduos Ala42, Lys43, Ala44, Val45, Ile60, Thr61, Ser62, Lys116, Leu133 e Leu137 (**Figura 25.C**) estão envolvidos na ligação em interações hidrofóbicas com a morina. Já para a interação com a morina penta acetilada, os resíduos Leu16, Val45, Glu91, Leu133 e Leu137 (**Figura 26.C**) estão envolvidos por interações hidrofóbicas com o flavonoide.

Os resíduos Ser62, Lys116 e Ser118 estão envolvidos por interações de ligação de hidrogênio com os átomos de hidrogênio ligados a oxigênios da miricetina com as distâncias de 2,92, 3,09, 2,75 e 2,70 Å, respectivamente (**Figura 23.B e C**). Os resíduos His58, Pro67, Cys66 e Thr121 estão envolvidos por interações de ligação de hidrogênio com os átomos de hidrogênio ligados a oxigênios do kaempferol com as distâncias de 3,12, 2,77, 3,14 e 2,78 Å, respectivamente (**Figura 24.B e C**). Os resíduos Glu91 e Met92 estão envolvidos por interações de ligação de hidrogênio com os átomos de hidrogênio ligados a oxigênios da morina (**Figura 25.B e C**) em distâncias de 2,80 e 2,96 Å, respectivamente. E o resíduo Met92 está envolvido por

interações de ligação de hidrogênio com oxigênio da morina penta acetilada (**Figura 26.B**) com distância de 3 Å.

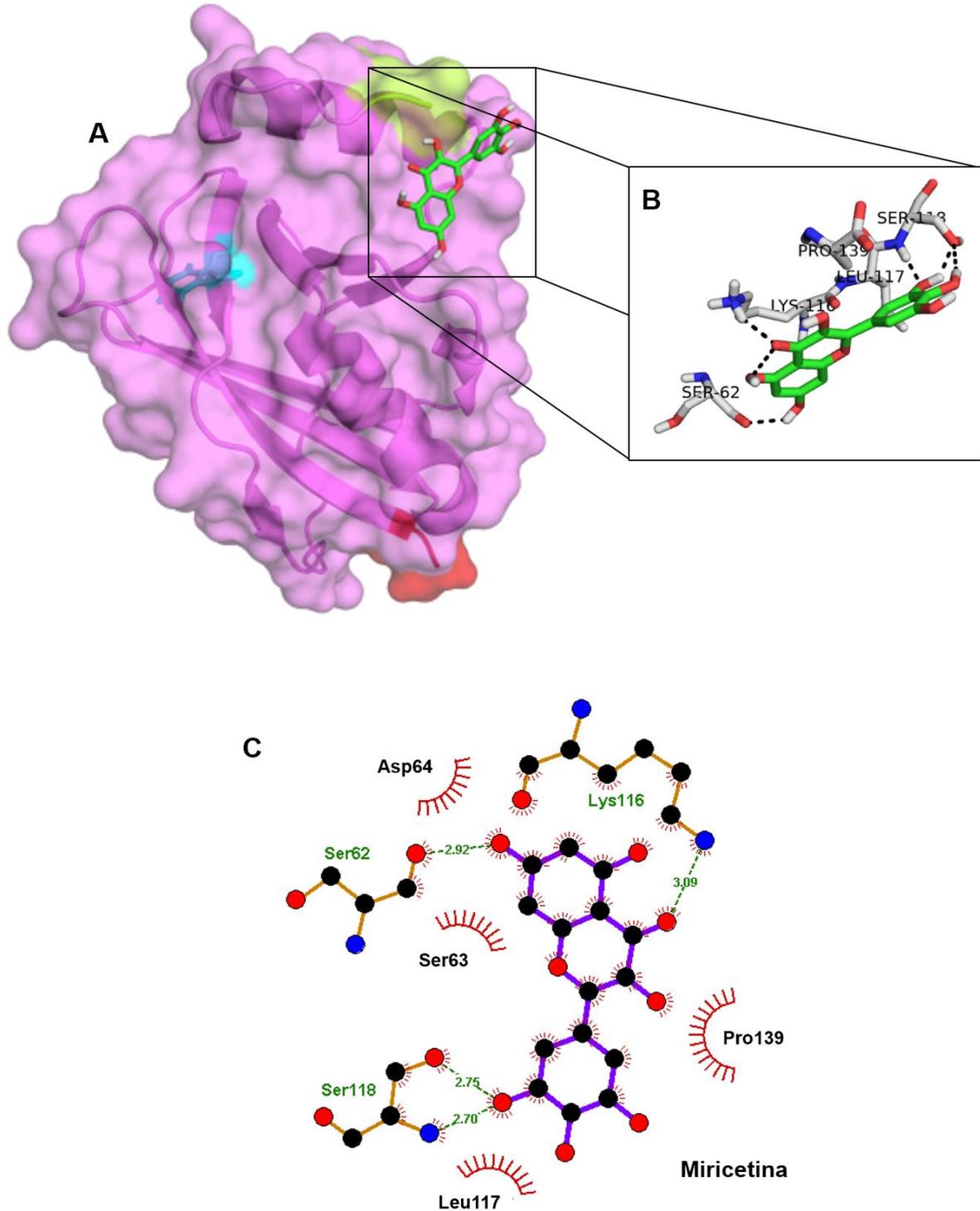
A análise do cálculo das interações demonstra que os contatos hidrofóbicos desempenham um papel importante na estabilidade do complexo. Os resultados corroboram com os dados experimentais, pois, como já descrito, a contribuição das interações hidrofóbicas para a ligação proteína-ligante é normalmente considerada proporcional ao tamanho da superfície hidrofóbica enterrada durante a formação do complexo (YUNTA, 2016).

Os resultados do *docking* molecular sugerem que os ligantes formam complexos com a proteína NS1 na região da α -hélice próxima ao C-terminal (**Figura 23.A, 23.B, 24.A, 24.B, 25.A, 25.B, 26.A e 26.B**). CHARLLEJEER *et al.* (2017), sugerem que esta α -hélice é uma região conservada, possivelmente uma região flexível e que pode ser importante para a estabilidade da proteína ou um potencial sítio de interações intermoleculares que são necessárias para a função da proteína NS1 (CHATTERJEE *et al.*, 2017). Os dados obtidos experimentalmente neste trabalho corroboram com esses indícios, sendo, então a formação do complexo em regiões que possam diminuir a flexibilidade desta região e assim, perturbar a interação da NS1 com outras moléculas, inativando a função da NS1 no bloqueio da via do IFN. As distâncias e os átomos envolvidos nas interações de ligação de hidrogênio estão descritas no APÊNDICE.

Os resultados obtidos pela fluorescência e *docking* molecular sugerem que os flavonoides estudados podem formar complexo temporário com a proteína NS1 e atuar como potenciais bloqueadores das interações biomoleculares da NS1. Sendo essas interações em uma possível região da proteína que é proposta por desempenhar interações com moléculas da célula epitelial envolvidas na via de produção de IFN.

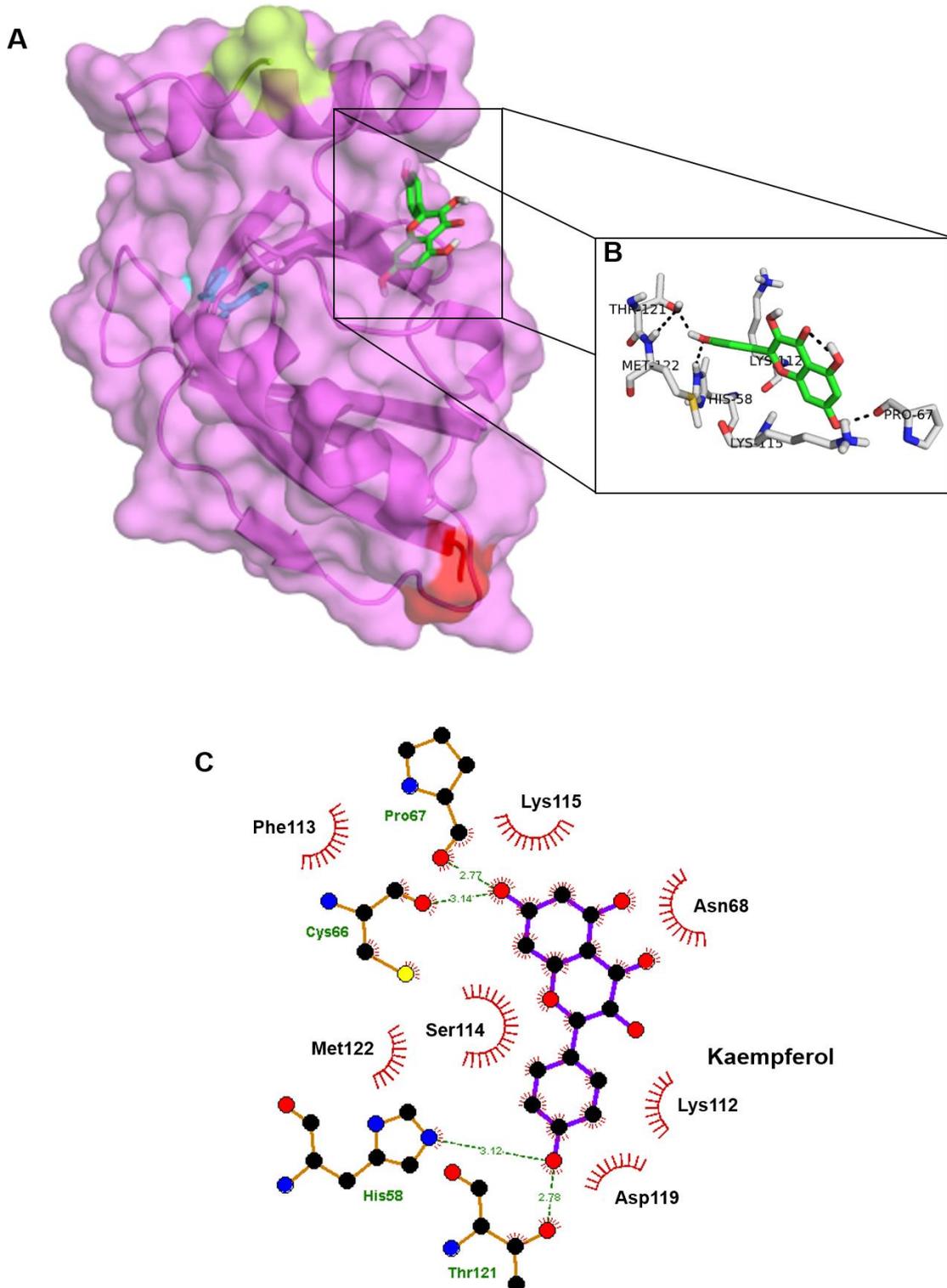
Faz-se necessário estudos envolvendo dinâmica estrutural por RMN que possam confirmar a hipótese da flexibilidade desta α -hélice e se ela está envolvida nas interações intermoleculares. Assim como a possível perturbação que estes flavonoides possam exercer nesta região. Além disso, as estruturas dos flavonoides influenciam na afinidade e na posição com que estes interagem com a proteína, sendo importante o estudo de moléculas derivadas que possam melhorar esta interação com a proteína.

Figura 23: Atracamento dos flavonoides na proteína NS1 com miricetina por *docking* molecular. **(A)** Imagem em *cartoon* e da superfície da proteína NS1 em violeta com o N-terminal da proteína em vermelho e o C-terminal em verde limão, mostrando a região da interação com o flavonoide miricetina e onde está situado o Trp90 (ciano). **(B)** Imagem com as cadeias laterais da proteína em *stick*, mostrando os resíduos próximos ao flavonoide. **(C)** Mapa da interação da miricetina com a proteína NS1, utilizando LigPlot. Sendo os cílios laranja resíduos não ligados envolvidos em contatos hidrofóbicos, átomos pretos com cílios são átomos correspondentes envolvidos em contatos hidrofóbicos, linhas tracejadas em verde são ligações de hidrogênio e suas distâncias.



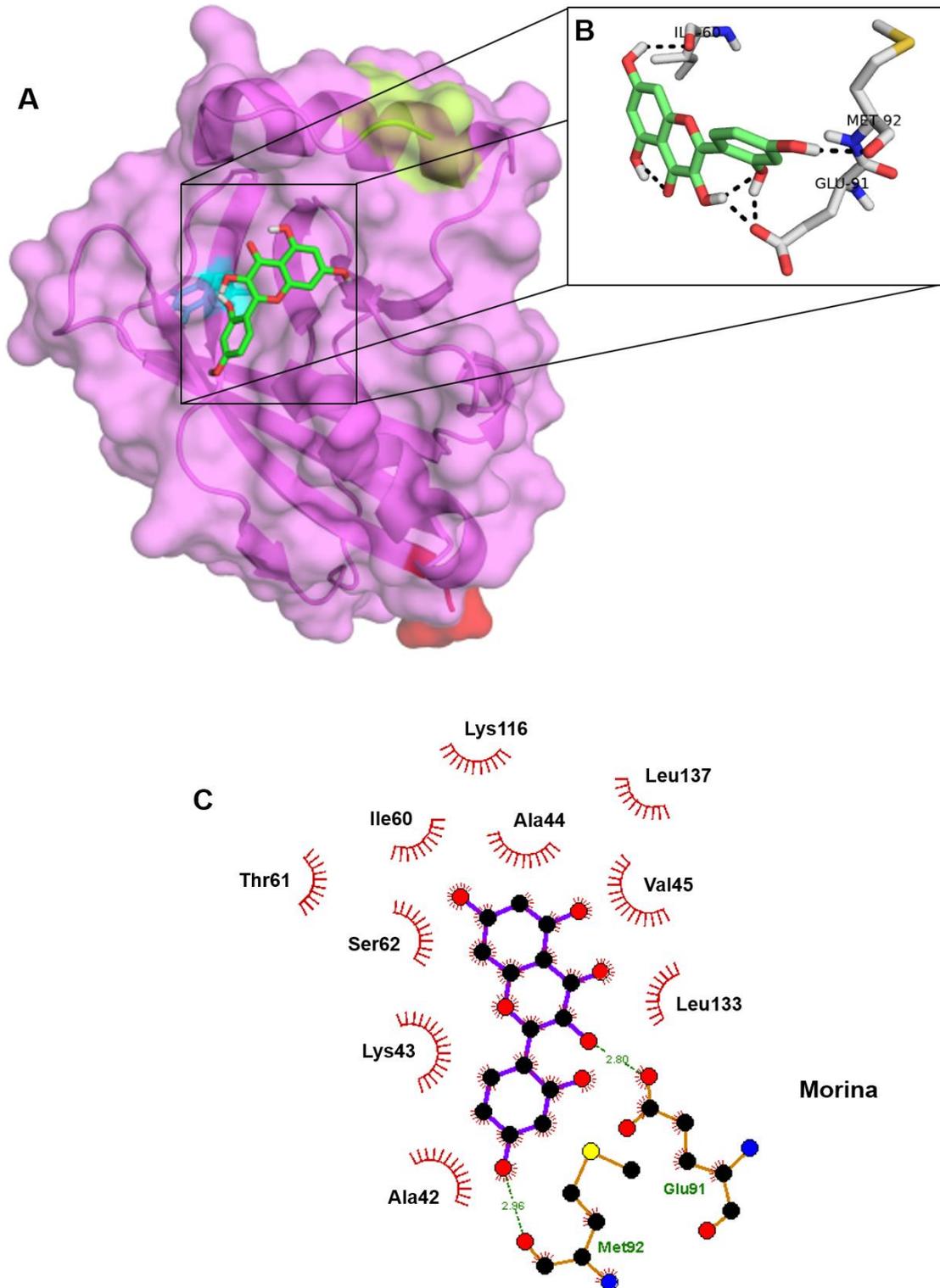
FONTE: elaborado pelo autor.

Figura 24: Atracamento dos flavonoides na proteína NS1 com kaempferol por *docking* molecular. **(A)** Imagem em *cartoon* e da superfície da proteína NS1 em violeta com o N-terminal da proteína em vermelho e o C-terminal em verde limão, mostrando a região da interação com o flavonoide kaempferol e onde está situado o Trp90 (ciano). **(B)** Imagem com as cadeias laterais da proteína em *stick*, mostrando os resíduos próximos ao flavonoide. **(C)** Mapa da interação da kaempferol com a proteína NS1, utilizando LigPlot. Sendo os cílios laranja resíduos não ligados envolvidos em contatos hidrofóbicos, átomos pretos com cílios são átomos correspondentes envolvidos em contatos hidrofóbicos, linhas tracejadas em verde são ligações de hidrogênio e suas distâncias.



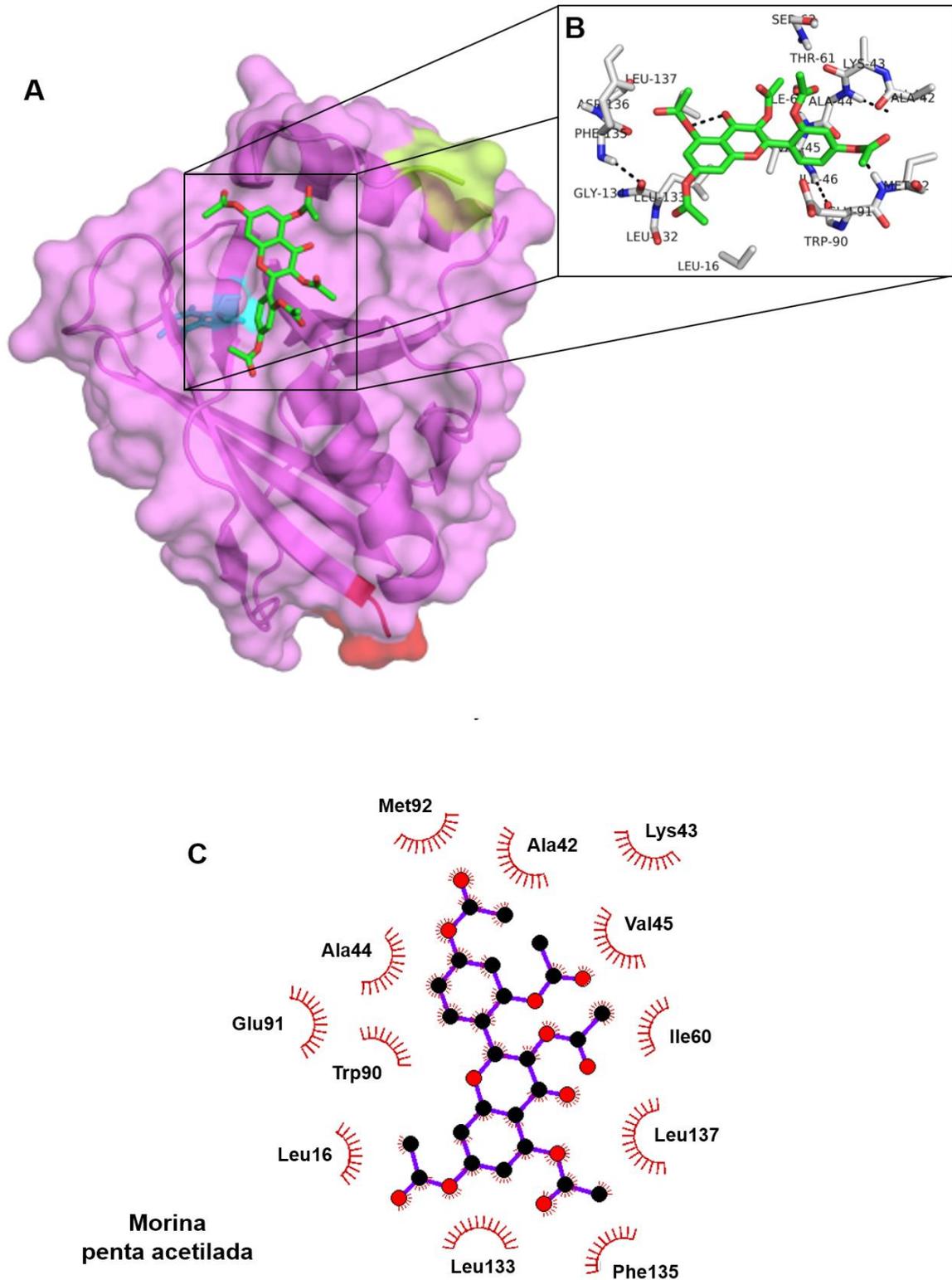
FONTE: elaborado pelo autor.

Figura 25: Atracamento dos flavonoides na proteína NS1 com morina por *docking* molecular. **(A)** Imagem em *cartoon* e de superfície da proteína NS1 em violeta com o N-terminal da proteína em vermelho e o C-terminal em verde limão mostrando a região da interação com o flavonoide morina e onde está situado o Trp90 (ciano). **(B)** Imagem com as cadeias laterais da proteína em *stick*, mostrando os resíduos próximos ao flavonoide. **(C)** Mapa da interação da morina com a proteína NS1, utilizando LigPlot. Sendo os cílios laranja resíduos não ligados envolvidos em contatos hidrofóbicos, átomos pretos com cílios são átomos correspondentes envolvidos em contatos hidrofóbicos, linhas tracejadas em verde são ligações de hidrogênio e suas distâncias.



FONTE: elaborado pelo autor.

Figura 26: Atracamento dos flavonoides na proteína NS1 com morina penta acetilada por *docking* molecular. **(A)** Imagem em *cartoon* e de superfície da proteína NS1 em violeta com o N-terminal da proteína em vermelho e o C-terminal em verde limão mostrando a região da interação com o flavonoide morina e onde está situado o Trp90 (cian). **(B)** Imagem com as cadeias laterais da proteína em *stick*, mostrando os resíduos próximos ao flavonoide. **(C)** Mapa da interação da morina penta acetilada com a proteína NS1, utilizando LigPlot. Sendo os cílios laranja resíduos não ligados envolvidos em contatos hidrofóbicos, átomos pretos com cílios são átomos correspondentes envolvidos em contatos hidrofóbicos, linhas tracejadas em verde são ligações de hidrogênio e suas distâncias.



FONTE: elaborado pelo autor

6 CONCLUSÃO

A proteína NS1 do RSV foi expressa, purificada em alto grau de pureza.

A estimativa de estrutura secundária por dicroísmo circular mostrou que a proteína apresenta 15% de α -hélice, 31% de folha- β , 54% de voltas e estruturas aleatórias. E possui flexibilidade em sua α -hélice próxima ao C-terminal, evidenciada pela DM.

Em relação a estabilidade térmica, todos os flavonoides estudados tiveram resultados próximos e com a maior contribuição por interações hidrofóbicas na formação espontânea do complexo NS1-ligante e entropicamente dirigidas.

A ordem dos flavonoides de acordo com o valor da constante de ligação (k_b) em 37 °C foi kaempferol>morina penta acetilada>morina \geq miricetina.

Os cálculos da abordagem computacional corroboram com os resultados experimentais, fornecendo um detalhamento das contribuições hidrofóbicas na interação dos flavonoides com a proteína NS1 e a influência da estrutural dos flavonoides na formação do complexo.

A interação dos ligantes com a proteína poderia reduzir a flexibilidade da α -hélice próxima ao C-terminal, perturbando a interação da NS1 com outras moléculas na via do IFN.

Os dados experimentais e computacionais obtidos neste trabalho evidenciam o indício de que a região da α -hélice próxima ao C-terminal ser uma possível região de interações intermoleculares sendo necessário investigações por espectroscopia de RMN e simulação de dinâmica molecular do complexo para se determinar com precisão o sítio e a flexibilidade da região de ligação.

7 TRABALHOS FUTUROS

- Verificar a estabilidade da interação por dinâmica molecular dos complexos;
- Verificar os epítomos de interação dos ligantes com a proteína utilizando Ressonância Magnética Nuclear por Diferença de Transferência de Saturação (*Saturation transfer difference* STD-NMR);
- Produzir a proteína NS1 marcada para estudos de dinâmica em solução por Ressonância Magnética Nuclear (RMN);

8 BIBLIOGRAFIA

ALLEWELL, N. M.; NARHI, L. O.; RAYMENT, I. *Molecular Biophysics for the Life Sciences*. Springer, 2013.

ALMEIDA, J. R. G. S., LIMA, J. T., NUNES, X. P., CERQUEIRA, G. S., FIGUEIREDO, C. S. Flavonóides da dieta e sua importância para a saúde humana. *Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança*, v.2, p.65-76, 2004.

ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. *Diálogos & Ciência*, v. 3, p. 1-8, 2007.

ARAUJO, G.C., SILVA, R.H., SCOTT, L.P., ARAUJO, A.S., SOUZA, F.P., DE OLIVEIRA, R.J. Structure and functional dynamics characterization of the ion channel of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein (SH) transmembrane domain by combining molecular dynamics with excited normal modes. *Journal of molecular modeling*, 22(12), p.286. 2016.

ASENJO, A. & VILLASNUEVAS, N. Phosphorylation of the human respiratory syncytial virus P protein mediates M2-2 regulation of viral RNA synthesis, a process that involves two P proteins. *Virus Research*: v. 211, p. 117–125, 2016.

ASENJO, A.; CUESTA, I.; VIVO, A.; VILLANUEVA, N. Phosphorylation of the human respiratory syncytial virus N protein provokes a decrease in viral RNA synthesis. *Virus Research*, v. 163, p. 396–400. 2012.

BATONICK, M.; OOMENS, A. G. P.; WERTZ, G. W. Human Respiratory Syncytial Virus glycoproteins are not required for apical targeting and release from polarized epithelial cells. *Journal of Virology*, v. 82, n. 17, p. 8664-8672, 2008.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 5(3): p. 285-292, 2004.

BERENDSEN, H.J., VAN DER SPOEL, D., VAN DRUNEN, R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer physics communications*, 91(1-3), pp.43-56. 1995.

CAO, Y.G., HAO, Y., LI, Z.H., LIU, S.T., WANG, L.X. Antiviral activity of polysaccharide extract from *Laminaria japonica* against respiratory syncytial virus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, p.1705-1710. 2016.

CARUSO, ICARO P. Estudo da interação entre flavonóides e a Albumina do soro humano. 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto. 2012.

CHATTERJEE, S., LUTHRA, P., ESAULOVA, E., AGAPOV, E., YEN, B. C., BOREK, D. M., EDWARDS, M. R., MITTAL, A., JORDAN, D., RAMANAN, P., MOORE, M. L., PAPPU, R. V., HOLTZMAN, M. J., ARTYOMOV, M. N., BASLER, C. F., AMARASINGHE, G. K., LEUNG, D. W. Structural basis for human respiratory syncytial virus NS1-mediated modulation of host responses. *Nature microbiology*, v. 2, n. 9, p. 17101, 2017.

CHEN, A.Y. & CHEN, Y.C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food chemistry*, 138(4), p.2099-2107. 2013.

COLLINS, P. L. & GRAHAM, B. S. Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *Journal of virology*, v. 82, n. 5, p. 2040–2055. 2008.

COLLINS, PETER L.; FEARN, R.; GRAHAM, B. S. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines*: 372, p. 3–38, 2013.

CULLEN, L.M., SCHMIDT, M.R., MORRISON, T.G. Effect of Previous Respiratory Syncytial Virus Infection on Murine Immune Responses to F and G Protein Containing Virus-like Particles. *Journal of virology*, p. JVI-00087. 2019.

DANIHELOVÁ, M., VISKUPIČOVÁ, J., ŠTURDÍK, E. Lipophilization of flavonoids for their food, therapeutic and cosmetic applications. *Acta Chimica Slovaca*, 5(1), p.59-69. 2012.

DeLano, W.L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography*, 40(1), p.82-92. 2002.

ESNEAU, C., RAYNAL, B., ROBLIN, P., BRÛLÉ, S., RICHARD, C.A., FIX, J., ELÉOUËT, J.F., GALLOUX, M. Biochemical characterization of the respiratory

syncytial virus N0-P complex in solution. *Journal of Biological Chemistry*, p.jbc-RA118. 2019.

FASMAN, G. D, Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules. Plenum Press, New York, ed. 1°. 1996.

FEROZ, S. R., MOHAMAD, S. B., LEE, G. S., MALEK, S. N. A., & TAYYAB, S. Supramolecular interaction of 6-shogaol, a therapeutic agent of *Zingiber officinale* with human serum albumin as elucidated by spectroscopic, calorimetric and molecular docking methods. *Phytomedicine*, 22(6), p. 621-630. 2015.

GALLOUX, M., TARUS, B., BLAZEVIC, I., FIX, J., DUQUERROY, S., ELÉOUËT, J.F. Characterization of a viral phosphoprotein binding site on the surface of the respiratory syncytial nucleoprotein. *Journal of virology*, 86(16), p.8375-8387. 2012.

GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTILER, A., DUVAUD, S., WILKINS, M. R., APPEL, R. D., BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbooks*. Humana Press. p. 571-607. 2005.

GORDON, J. C.; MYERS, J. B.; FOLTA, T.; SHOJA, V.; HEATH, L. S.; ONUFRIEV, A. H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Research*. (Web Server issue): v. 33, p. W368-W371. 2005.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nature protocols*, v.1 n. 6, 2006.

GRIEP, M.A., BLOOD, S., LARSON, M.A., KOEPESELL, S.A. AND HINRICHS, S.H. Myricetin inhibits *Escherichia coli* DnaB helicase but not primase. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(22), p.7203-7208. 2007.

GRIFFITHS, C., DREWS, S.J., MARCHANT, D.J. Respiratory syncytial virus: infection, detection, and new options for prevention and treatment. *Clinical microbiology reviews*, 30(1), p.277-319. 2017.

GRIMSLEY, G.R., PACE, C.N. Spectrophotometric determination of protein concentration. *Current protocols in protein science*, 33(1), pp.3-1. 2003.

GUIMARÃES, G.C., PIVA, H.R., ARAÚJO, G.C., LIMA, C.S., REGASINI, L.O., DE MELO, F.A., FOSSEY, M.A., CARUSO, Í.P., SOUZA, F.P. Binding investigation

- between M2-1protein from hRSV and acetylated quercetin derivatives: ¹H NMR, fluorescence spectroscopy, and molecular docking. *International journal of biological macromolecules*, 111, pp. 33-38. 2018.
- GUSDINAR, T., HEROWATI, R., KARTASASMITA, R.E., ADNYANA, I.K. Anti-inflammatory and antioxidant activity of quercetin-3, 3', 4'-triacetate. *Journal of pharmacology and toxicology*, 6, pp.182-188. 2011.
- HACKING, D.; HULL, J. Respiratory Syncytial Virus – Viral Biology and the Host Response. *Journal of infection*, v. 45, pp. 18-24, 2002.
- HOGAN, C.A., CAYA, C., PAPENBURG, J. Rapid and simple molecular tests for the detection of respiratory syncytial virus: a review. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18(7), pp. 617–629. 2018.
- HU, X., KAPLAN, D., CEBE, P. Dynamic protein– water relationships during β -sheet formation. *Macromolecules*, 41(11), pp.3939-3948. 2008.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics*, v. 14, pp. 33-38. 1996.
- IM, K., KIM, J., MIN, H. Ginseng, the natural effectual antiviral: protective effects of Korean Red Ginseng against viral infection. *Journal of ginseng research*, 40(4), pp.309-314. 2016.
- JO, Y.M., KIM, J., CHANG, J. Vaccine containing G protein fragment and recombinant baculovirus expressing M2 protein induces protective immunity to respiratory syncytial virus. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 8(1), pp.43-53. 2019.
- KAUL, T. N.; MIDDLETON, E.; OGRA, P. L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology*. v. 15, pp. 71-79, 1985.
- LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York: Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, Ed. 3, 2006.
- LANI, R., HASSANDARVISH, P., CHIAM, C.W., MOGHADDAM, E., CHU, J.J.H., RAUSALU, K., MERITS, A., HIGGS, S., VANLANDINGHAM, D., BAKAR, S.A., ZANDI, K. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. *Scientific reports*, 5, pp.11421. 2015.

- LAY, M. L.; GONZÁLEZ, P. A.; LEÓN, M. A.; CÉSPEDES, P. F.; BUENO, S. M.; RIEDEL, C. A.; KALERGIS, A. M. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. *Microbes and Infection*, v. 15, pp. 230-242, 2013.
- LING, Z.; TRAN, K. C.; TENG, M. N. Human Respiratory Syncytial Virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I. *Journal of Virology*, v. 83, n. 08, pp. 3734-3742, 2009.
- MEDINI, F., MEGDICHE, W., MSHVILDADZE, V., PICHETTE, A., LEGAULT, J., ST-GELAIS, A. AND KSOURI, R. Antiviral-guided fractionation and isolation of phenolic compounds from *Limonium densiflorum* hydroalcoholic extract. *Comptes Rendus Chimie*, 19(6), pp. 726-732. 2016.
- MORRIS, J.A., BLOUNT JR, R.E., SAVAGE, R.E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with goryza. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 92(3), pp. 544-549. 1956.
- MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K. B.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *Journal of Computational Chemistry*. v. 19, pp. 1639-1662. 1998.
- NAFISI, S., HASHEMI, M., RAJABI, M., TAJMIR-RIAHI, H. A. DNA Adducts with Antioxidant Flavonoids: Morin, Apigenin, and Naringin. *DNA and Cell Biology*, 27(8), pp. 433–442. 2008.
- OLIVEIRA, A. P.; SIMABUCO, F. M.; TAMURA, R. E.; GUERRERO, M. C.; RIBEIRO, P. G. G.; LIBERMANN, T. A.; ZERBINI, L. Z.; VENTURA, A. M. Human respiratory syncytial virus N, P and M protein interactions in HEK-293T cells. *Virus Research*, v. 177, pp. 108–112. 2013.
- OPENSHAW, P.J., CHIU, C., CULLEY, F.J., JOHANSSON, C. Protective and harmful immunity to RSV infection. *Annual review of immunology*, 35, pp. 501-532. 2017.
- ORTEGA, J.T., SUÁREZ, A.I., SERRANO, M.L., BAPTISTA, J., PUJOL, F.H. AND RANGEL, H.R. The role of the glycosyl moiety of myricetin derivatives in anti-HIV-1 activity in vitro. *AIDS research and therapy*, 14(1), pp.57. 2017.

- PENG, X., ZHANG, G., LIAO, Y., GONG, D. Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on α -glucosidase. *Food chemistry*, 190, pp.207-215. 2016.
- PRETEL, E.; CAMPOREALE, G.; TRAT-GAY, G. The Non-Structural NS1 Protein Unique to Respiratory Syncytial Virus: A Two-State Folding Monomer in Quasi-Equilibrium with a Stable Spherical Oligomer. *PLOS ONE*: v. 8, n. 9, ed. 74338, 2013.
- REITZ, J.R., MILFORD, F.J., CHRISTY, R.W. Foundations of electromagnetic theory. *Addison-Wesley Publishing Company*. 2008.
- REZAEI, F., LINFIELD, D.T., HARFORD, T.J., PIEDIMONTE, G. Ongoing developments in RSV prophylaxis: a clinician's analysis. *Current opinion in virology*, 24, pp.70-78. 2017.
- SANNER, MICHEL F. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 1999, Vol 17, February. pp. 57-61. 1999.
- SANTOS, G.A.G., MURRAY, A.P., PUJOL, C.A., DAMONTE, E.B., MAIER, M.S. Synthesis and antiviral activity of sulfated and acetylated derivatives of 2 β , 3 α -dihydroxy-5 α -cholestane. *Steroids*, 68(2), pp.125-132. 2003.
- SCHMID, N.; EICHENBERGER, A. P.; CHOUTKO, A.; RINIKER, S.; WINGER, M.; MARK, A. E.; van GUNSTEREN, W. F. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European Biophysics Journal*. v. 40(7). pp. 843. 2011.
- SCHMIDT, M.E. & VARGA, S.M. Modulation of the host immune response by respiratory syncytial virus proteins. *Journal of Microbiology*, 55(3), pp.161-171. 2017.
- SEMPLE, M. G.; DANKERT, H. M.; EBRAHIMI, B. et al. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infants is associated with reduced airway interferon gamma and substance P. *PLoS ONE*, n. 10, 2007.
- SEMWAL, D. K., SEMWAL, R. B., COMBRINCK, S., VILJOEN, A. Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients*, 8(2), pp.90. 2016.
- SHAHRIARI, S., WEI, K.J, GHILDYAL, R. Respiratory syncytial virus matrix (M) protein interacts with actin in vitro and in cell culture. *Viruses*, 10(10), pp.535. 2018.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. A. Princípios de Análise Instrumental. Porto Alegre: Bookma, Ed. 5. 2002.

SONG, M., GAO, M.H., HUANG, W.H., LI, M.M., LI, H., LI, Y.L., ZHANG, X.Q. AND YE, W.C. Flavonoids from the Seeds of *Hovenia acerba* and Their In vitro Antiviral Activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 6(6). 2016.

SPANN, K. M.; TRAN, K. C.; COLLINS, P. L. Effects of proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF- κ B, and proinflammatory cytokines. *Journal of Virology*, v. 79, n. 09, pp. 5353-5362, 2005.

SREERAMA, N.; WODDY, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Analytical Biochemistry*, 287 (2): 252–260, 2000.

STROET, M., CARON, B., VISSCHER, K.M., GEERKE, D.P., MALDE, A.K., MARK, A.E. Automated Topology Builder Version 3.0: Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane. *Journal of chemical theory and computation*, 14(11), pp.5834-5845. 2018.

SUCIPTO, T.H., CHURROTIN, S., SETYAWATI, H.S., MULYATNO, K.C., AMARULLAH, I.H., UEDA, S., KOTAKI, T., SUMARSIH, S., WARDHANI, P., BENDRYMAN, S.S., ARYATI, A. INHIBITORY ACTIVITY OF COBALT (II)–MORIN COMPLEX AGAINST THE REPLICATION OF DENGUE VIRUS TYPE 2. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*, 6(6), pp.141-144. 2017.

SWEDAN, S.; MUSIYENKO, A.; BARIK, S. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins decrease multiple members of the cellular interferon pathways. *Journal of Virology*, 85(19): 10090–10100, 2009.

TARAHOVSKY, Y.S., KIM, Y.A., YAGOLNIK, E.A., MUZAFAROV, E.N. Flavonoid-membrane interactions: Involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(5), pp.1235-1246. 2014.

TEIXEIRA, T.S.P., CARUSO, Í.P., LOPES, B.R.P., REGASINI, L.O., DE TOLEDO, K.A., FOSSEY, M.A., DE SOUZA, F.P. Biophysical characterization of the interaction between M2-1 protein of hRSV and quercetin. *International journal of biological macromolecules*, 95, p .63-71. 2017.

- TENG, Y., ZHANG, H., LIU, R. Molecular interaction between 4-aminoantipyrine and catalase reveals a potentially toxic mechanism of the drug. *Molecular BioSystems*, 7(11), pp.3157-3163. 2011.
- TREMAGLIO, C. Z.; NOTON, S. L.; DEFLUBÉ, L. R.; FEARNES, R. Respiratory Syncytial Virus Polymerase Can Initiate Transcription from Position 3 of the Leader Promoter. *Journal of Virology*, v. 87, n. 6, pp. 3196–3207. 2013.
- VALEUR, BERNARD. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: Willey-VCH. 2002.
- VERLI, H. *Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular*. 2014.
- WANG, Y., ZHANG, G., YAN, J., GONG, D. Inhibitory effect of morin on tyrosinase: insights from spectroscopic and molecular docking studies. *Food chemistry*, 163, pp.226-233. 2014.
- XIE, Q.; WANG, Z.; NI, F.; CHEN, X.; MA, J.; PATEL, N.; LU, H.; LIU, Y.; TIAN, J.H.; FLYER, D.; MASSARE, M.J. Structure basis of neutralization by a novel site II/IV antibody against respiratory syncytial virus fusion protein. *PloS one*, v. 14, n. 2, 2019.
- XING, Y. & PROESMANS, M. New therapies for acute RSV infections: where are we?. *European journal of pediatrics*, pp.1-8. 2019.
- YANG, P.; ZHENG, J.; WANG, S.; LIU, P.; XIE, M.; ZHAO, D. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2 are crucial pathogenic factors that modulate interferon signaling and Treg cell distribution in mice. *Virology*. v. 485, pp. 223-232. 2015.
- YUNTA, M.J. Docking and ligand binding affinity: uses and pitfalls. *American Journal of Modeling and Optimization*, v. 4, pp.74-114, 2016.
- ZAKARYAN, H., ARABYAN, E., OO, A., ZANDI, K. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Archives of virology*, v. 162, n. 9, pp.2539-2551, 2017.
- ZHANG, L.; PEEPLES, M. E.; BOUCHER, R. C.; COLLINS P. L.; PICKLES R. J. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *Journal of Virology*. v. 76, n 11, pp. 5654–5666, 2002.

ZHU, L.; WANG, P.; YUAN, W.; ZHU, G. Kaempferol inhibited bovine herpesvirus 1 replication and LPS-induced inflammatory response. *Acta virologica*, v. 62, n. 2, pp. 220-225, 2018.

ZENG, L.-H.; WU, J.; FUNG, B.; TONG, J. H.; MICKLE, D.; WU, T.-W. Comparative protection against oxyradicals by three flavonoids on cultured endothelial cells. *Biochemistry and Cell Biology*, 75(6), pp. 717–720, 1997.

ROSSEY, I; SEDEYN, K.; BAETS, SARAH DE; SCHEPENS, B.; SAELENS, X. CD8+T cell immunity against human respiratory syncytial virus. *Vaccine*. v. 32, pp. 6130–6137, 2014.

9 ANEXOS

9.1 Anexo A: Sequenciamento do gene NS1

9.1.1 Sequência de nucleotídeos do gene NS1

ATGGGTAGCAATTCTTTGAGCATGATTAAGGTACGTCTGCAAATCTGTTTGATA
 ACGACGAAGTTGCTCTGTTGAAAATCACGTGCTACACGGACAAACTGATTCACC
 TGACGAACGCCTTGGCGAAGGCGGTGATCCACACTATCAAGCTGAATGGTATTG
 TCTTTGTGCACGTCATCACCAGCTCCGACATCTGCCCGAACATAACATTGTTGT
 TAAAAGCAATTCACCACCATGCCAGCACTGCAAACGGCGGCTACATTTGGGA
 GATGATGGAGCTGACCCATTGTAGCCAGCCGAACGGTCTGATTGACGATAACTG
 TGAAATCAAATTCAGCAAAAAGCTGTCGGATAGCACCATGACCAACTATATGAAT
 CAGCTGAGCGAGCTGCTGGGTTTCGATCTGAATCCGCATCATCATCACCACCAC
 TAA

9.1.2 Sequência de aminoácidos da proteína NS1

MGSNSLSMIK VRLQNLFDND EVALLKITCY TDKLIHLTNA LAKAVIHTIK
 LNGIVFVHVI TSSDICPNNN IVVKSNTFTM PALQNGGYIW EMMELTHCSQ
 PNGLIDDNCE IKFSKLSDS TMTNYMNQLS ELLGFDLNPH HHHHH

9.2 Anexo B: Meio de cultura LB pH 7,5

9.2.1 Meio líquido LB

Reagentes	1000mL	1600mL
Triptona	10 g	16 g
NaCl	5 g	5 g
Extrato de Levedo	5 g	8 g
Água Mili-Q q.s.p.	1000 mL	1600 mL

FONTE: elaborado pelo autor

Diluir todos os reagentes na água Mili-Q q.s.p., acertar o pH para 7,5 e autoclavar.

9.2.2 Meio sólido LB

Reagentes	1000 mL	100 mL
Triptona	10 g	0,1 g
NaCl	5 g	0,05 g
Extrato de Levedo	5 g	0,05 g
Ágar bacteriológico	15 g	1,5 g
Água Mili-Q q.s.p.	1000 mL	100 mL

FONTE: elaborado pelo autor

Diluir todos os reagentes na água Mili-Q q.s.p., acertar o pH para 7,0 e autoclavar.

9.3 Anexo C: Tampão PBS pH 7,4

Reagentes	Massas solução 1x	Concentração solução 1x
NaCl	8 g	137 mM
KCl	0,2 g	2,7 mM
Fosfato de sódio dibásico	1,44 g	10 mM
Fosfato de potássio monobásico	0,24 g	1,8 mM
Água Mili-Q q.s.p.	1000 mL	

FONTE: elaborado pelo autor

Diluir todos os reagentes em aproximadamente 800 mL de água Mili-Q q.s.p., conferir o pH e completar o volume para 1 L. Estocar em temperatura ambiente.

10 APÊNDICE

10.1 Distâncias das interações entre os átomos da NS1 com os flavonoides

Tabela 6: Relação das distâncias das ligações entre resíduos da cadeia lateral da proteína NS1 envolvidos na ligação com a miricetina.

LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO							
Resíduo	Distância H-A	Distância D-A	Ângulo doador	Proteína doadora	Cadeia lateral	Átomo doador	Átomo aceitador
SER62	2.13	2.92	137.30	NÃO	NÃO	1371 [O3]	574 [O2]
LYS116	2.15	3.09	156.48	SIM	SIM	1113 [N3+]	1344 [O2]
SER118	2.50	3.46	168.55	NÃO	SIM	1365 [O3]	1132 [O3]
SER118	1.73	2.70	163.06	SIM	NÃO	1127 [N]	1363 [O3]
SER118	2.04	2.75	128.39	NÃO	SIM	1363 [O3]	1132 [O3]

H: hidrogênio, A: átomo aceitador, D: átomo doador. FONTE: elaborado pelo autor

Tabela 7: Relação das distâncias das ligações entre resíduos da cadeia lateral da proteína NS2 envolvidos na ligação com a kaempferol.

LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO							
Resíduo	Distância H-A	Distância D-A	Ângulo doador	Proteína doadora	Cadeia lateral	Átomo doador	Átomo aceitador
HIS58	2.16	3.12	160.83	SIM	SIM	540 [N]	1363 [O3]
PRO67	2.00	2.77	133.74	NÃO	NÃO	1367 [O3]	616 [O2]
LYS115	2.88	3.67	138.01	SIM	NÃO	1092 [N]	1348 [O2]
THR121	1.93	2.78	144.23	NÃO	SIM	1363 [O3]	1158 [O3]

H: hidrogênio, A: átomo aceitador, D: átomo doador. FONTE: elaborado pelo autor

Tabela 8: Relação das distâncias das ligações entre resíduos da cadeia lateral da proteína NS1 envolvidos na ligação com a morina.

LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO							
Resíduo	Distância H-A	Distância D-A	Ângulo doador	Proteína doadora	Cadeia lateral	Átomo doador	Átomo aceitador
GLU91	2.08	2.80	129.36	NÃO	SIM	1355 [O3]	867 [O2]
GLU91	1.98	2.73	133.03	NÃO	SIM	1365 [O3]	867 [O2]
MET92	3.07	3.61	115.40	SIM	NÃO	869 [N]	1367 [O3]
MET92	2.18	2.96	136.61	NÃO	NÃO	1367 [O3]	872 [O2]

H: hidrogênio, A: átomo aceitador, D: átomo doador. FONTE: elaborado pelo autor

Tabela 9: Relação da distância da ligação entre resíduo da cadeia lateral da proteína NS1 envolvidos na ligação com a morina penta acetilada.

LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO							
Resíduo	Distância H-A	Distância D-A	Ângulo doador	Proteína doadora	Cadeia lateral	Átomo doador	Átomo aceitador
MET92	2.02	3,00	168,58	SIM	NÃO	869[N]	1354 [O3]

H: hidrogênio, A: átomo aceitador, D: átomo doador. FONTE: elaborado pelo autor