



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E
BIOPROCESSOS**

HENRIQUETA MONALISA FARIAS

**ANÁLISE *IN SILICO* DE INIBIDORES EM POTENCIAL DE UMA PROTEÍNA DE
REPLICAÇÃO VIRAL (NS5 Rdrp) DO VÍRUS DA ZIKA**

**SUMÉ-PB
2018**

HENRIQUETA MONALISA FARIAS

**ANÁLISE *IN SILICO* DE INIBIDORES EM POTENCIAL DE UMA PROTEÍNA DE
REPLICAÇÃO VIRAL (NS5 Rdrp) DO VÍRUS DA ZIKA**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Trindade Maia
Co-orientador: Prof. Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega

**SUMÉ - PB
2018**

F224s Farias, Henriqueta Monalisa.
Análise *in silico* de inibidores em potencial de uma proteína de replicação viral (NS5 RdRd) do Vírus de Zika. / Henriqueta Monalisa Farias. – Sumé – PB: [s.n], 2018.

58 f.

Orientador: Professor. Dr. Rafael Trindade Maia.

Co-Orientador: Professor Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega

Monografia (Graduação) – Universidade Federal de Campina Grande. Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido. Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Saúde Pública. 2. Arbovírus. 3. Bioinformática. 4. Docking Molecular. I. Título.

CDU: 575.112(043.1)

HENRIQUETA MONALISA FARIAS

**SELEÇÃO *IN SILICO* DE INIBIDORES EM POTENCIAL DE UMA
PROTEÍNA DE REPLICAÇÃO VIRAL (NS5 Rdrp) DO VÍRUS DA ZIKA**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA



Professor Dr. Rafael Trindade Maia
UAEB/CDSA/UFCG
Orientador



Professora Dr. Jean César Farias de Queiroz
UATEC/CDSA/UFCG
Examinadora



Msc. Luana Camilla Cordeiro Braz
IFPB
Examinadora

Trabalho aprovado em 21 de dezembro de 2018.

SUMÉ – PB

**A minha mãe de
consideração “Tia Santa”,
minha querida bisavó
Henriqueta Maria e Miguel
Antônio (*In memoriam*),
dedico.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar forças quando tudo parecia que não iria dar certo;

À minha mãe de consideração, Inácia (tia santa), por todo incentivo dedicado a mim durante tantos anos, sem ela eu não seria nada do que sou. Jamais acharia agradecimentos suficientes para homenageá-la, você é meu ponto de luz e admiração maior. Ao meu avô “Seu Santos” que sempre ajudou juntamente com ela com que eu buscasse meu próprio caminho, mesmo que isso me levasse para longe;

A meu pai, Francisco, meus irmãos Higor, Laisa e Rodolfo que sempre foram extremamente carinhosos e amorosos comigo; por todos os reencontros cobertos de risos e felicidade e por terem suportado a saudade;

Aos orientadores da minha vida acadêmica, e mais que isso, minhas referências: Rafael, que apesar de sempre dizer que na vida quase nunca temos segundas chances, sempre estendeu sua mão para mim, foi e sempre será como um Pai. Franklin, foi o primeiro professor que tenho lembranças capaz de me fazer querer crescer e ser como ele. Norma e Amanda por todas as parcerias e ensinamentos, pela amizade e carinho. Jean, suas palavras de otimismo e conforto foram tão importantes para o meu envolvimento com pesquisa. A todos eles, meu muito obrigada, vocês foram e são minha base, e tem todo meu reconhecimento e “salário extra”, vocês são pessoas e profissionais maravilhosos;

Ao Professor Nilton do UFCG campus cuité e seu aluno Rafael Medeiros, foram orientadores e amigos. Obrigado por todo aprendizado, paciência e exemplos de humildade.

A Luana Camilla, pela presença na banca, paciência e por toda inspiração que foi para mim.

A Leonardo, Gerbeson e Vitória por todo o apoio durante a minha trajetória de vida, amo vocês.

RESUMO

Doenças relacionadas com vetores transmissores de epidemias a preocupam e são responsáveis por um alto número de mortalidade e mobilidade humana. O Zika Vírus (ZIKV) é um arbovírus transmitido pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, e recentes evidências apontam também o mosquito *Culex quinquesfasciatus* como vetor. O primeiro registro desta doença foi em 1947 na Floresta Zika, em Uganda, no Brasil a confirmação de transmissão da febre causada pelo ZIKV surgiu em meados de abril de 2015, apresentou-se inicialmente nos estados do Rio Grande do Norte e da Bahia na região Nordeste do país. Apesar dos sintomas parecem ser triviais, a febre Zika tornou-se uma das maiores preocupações na saúde pública mundial e do Brasil, principalmente depois da recente descoberta de sua associação com casos de microcefalia. Até o momento não existe vacina disponível para o ZIKV e o tratamento é sintomático. Em uma recente pesquisa foi elucidada a estrutura tridimensional da ZIKV NS5 RdRp, uma proteína associada à RNA polimerase e importante ativadora do processo de replicação do vírus, com esta informação, veio a possibilidade de tornar esta enzima um alvo de novos fármacos. Neste âmbito, estudos teórico-computacionais são de grande valia para sinalizar possíveis inibidores desta enzima que funcionem com antivirais, logo, a pesquisa atual tem como objetivo principal selecionar *in silico* possíveis inibidores da proteína de replicação NS5. A metodologia seguiu os seguintes passos: Análise da estrutura tridimensional da NS5, bem como seu sítio ativo; busca na literatura e nos bancos de dados de moléculas por possíveis inibidores; Simulações de *docking* molecular e investigação de interações nos complexos proteína-ligantes e/ou proteína-proteína gerados. Buscou-se destacar quatro parâmetros considerados mais importantes na avaliação para o melhor complexo de cada docking: A proximidade com o sítio ativo da proteína (PSAP); a Constante de Inibição Estimada (CIE), a Energia Intermolecular Final (EIF) e a Energia livre de ligação (ELL) estimada pelo programa. A energia individual dos aminoácidos da NS5 RdRp de maior interação com os ligantes de interesse foi quantificada através de cálculos *ab initio* por do Fracionamento Molecular com Caps Conjugados (MFCC), ainda na utilização do mesmo, foi obtido os cálculos do balanço quântico final da interação proteína com o ligante candidato a inibidor. O composto INDA obteve o melhor resultado, com -1,8eV, seguido do TERPENO (1) com -1,41eV, o composto TERPENO (2) e TERPENO (4) indicaram respectivamente -1,00eV e -1,02eV, os dois últimos foram os o TERPENO (3) com -0,27eV e a QUECERTINA que obteve em seu balanço quântico de energia final de -0,48eV. Com isto, é possível afirmar que todos os seis compostos se mostraram negativamente expressivos, sendo demonstrado quanticamente que os ligantes tem alta afinidade pela proteína, e quatro destes, com evidência de formação de ligação covalente no sítio ativo da NS5 RdRp, o que caracteriza, *stricto sensu*, como uma inibição irreversível. Os resultados deste trabalho de conclusão de curso mostraram-se altamente promissores, indicando estes seis compostos com potencial antiviral para inibição da proteína NS5 RdRp, tendo em vista, as várias evidências de excelente e confortável interação demonstradas através das técnicas de *Docking Molecular* e *Fracionamento de Caps Conjugados*. Logo, estes compostos podem auxiliar no desenvolvimento de um futuro fármaco que possa intervir na efetividade do vírus da Zika.

Palavras-chave: Saúde Pública. Arbovírus. Bioinformática. Simulações Computacionais.

ABSTRACT

Diseases related to the transmitting vectors of epidemics still concern and are responsible for a high number of mortality and human lethality. The Zika virus (ZIKV) is an arbovirus transmitted by the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, and recent evidences also points to the mosquito *Culex quinquesfasciatus* as vector. The first record of this disease was in 1947 in the Zika Forest in Uganda, in Brazil the first ZIKV transmission confirmation arose in mid-April 2015, presented initially in the states of Rio Grande do Norte and Bahia, in the northeast region of the Country. Although symptoms appears to be trivial, Zika fever has become one of the biggest concerns in world public health and Brazil, especially after the recent discovery of its association with cases of microcephaly. Until now, there is no vaccine available for ZIKV, and the treatment is symptomatic. In a recent research was solved the three-dimensional structure of ZIKV NS RdRp X-Ray crystallography, a protein associated with RNA polymerase and important activator of the process of replication of the virus, with this information, came the possibility of making this enzyme a target of new drugs. In this context, theoretical-computational studies are of great value to signal possible inhibitors of this enzyme that work with antiviral, so the current research has as main objective to select in silico possible inhibitors of the protein of NS5 replication. The methodology adopted the following steps: analysis of the three-dimensional structure of the NS5 and its active site; search for by potential inhibitors in the literature and databases of molecules; molecular docking simulations and analysis of interactions in protein-ligands and/or protein-protein complexes generated. Four parameters, considered to be important in the evaluation for the best complex of each docking, were used: The proximity to the active site of the protein (PSAP); the estimated inhibition constant (EIC), the Final Intermolecular Energy (FIE) and the Free Binding Energy (FBE) estimated by the program. The individual energy of the amino acids of NS5 RdRp with the highest interaction with the ligands of interest was quantified by ab initio calculations by Molecular Fraction with Conjugated Caps (MFCC), while using the calculations of the final quantum balance of the interaction protein with the inhibitor candidate linker. The compound INDA obtained the best result, with -1.8eV, followed by TERPENO (1) with -1.41eV, the compound TERPENO (2) and TERPENO (4) indicated respectively -1.00eV and -1.02eV, the two last were the TERPENE (3) with -0.27eV and the QUECERTINE that obtained in its final energy quantum balance of -0.48eV. Thus, it is possible to affirm that all six compounds showed to be negatively expressive, being shown quantically that the ligands have high affinity for the protein, and four of these, with evidence of covalent binding in the active site of NS5 RdRp, stricto sensu, as an irreversible inhibition. The results of this course completion work were highly promising, indicating these six compounds with antiviral potential for inhibition of the NS5 RdRp protein, in view of the various evidences of excellent and comfortable interaction demonstrated by the Molecular Docking and Fractionation Conjugated Caps. Thus, these compounds may aid in the development of a future vaccine that may intervene in the effectiveness of the Zika virus

Keywords: Public health. Arbovirus. Bioinformatics. Computational Simulations.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Países com registro do ZIKV em janeiro de 2016.....	18
Figura 2: Diferença entre <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	18
Figura 3: Morfologia das partículas virais dos membros da família Flaviviridae. A) Foto de microscopia eletrônica de partícula viral; B) Ilustração esquemática de uma partícula viral indicando seus componentes.....	19
Figura 4: Estrutura e organização genômica da fita simples de RNA de polaridade positiva dos Flavivirus.....	19
Figura 5: Visão geral da ZIKV NS5 RdRp; (a) domínios nas cores verde (“polegar”), amarelo (“dedos”) e azul (“palma”); (b) detalhe do domínio “dedos” mostrando resíduos de interação com o átomo de zinco; (c) detalhe do domínio “polegar” mostrando resíduos de interação com o átomo de zinco.....	20
Figura 6: Representação da formação do complexo proteína-ligante no <i>docking</i> molecular.....	21
Figura 7: Em azul é evidenciado a estrutura proteica da NS5, em cinza os resíduos/aminoácidos que rodeiam a ancoragem do ligante Terpeno (3) (verde) com o aminoácido âncora Asp535 (vermelho).....	22
Figura 8: Ilustração conceitual de uma paisagem de energia de proteína.....	23
Figura 9: Visualização do ZIKV NS5 RdRp em destaque os resíduos âncoras 665 (Amarelo) e o 535 (Verde).	
Figura 10: Método de fracionamento Molecular com capuzes conjugados (MFCC) exemplificado pelo cálculo energético da interação proteína-ligante entre a NS5 RdRp e o ligante Inda, onde $EI (L - R^i) = \text{Fragmento 1} - \text{Fragmento 2} - \text{Fragmento 3} + \text{Fragmento 4}$	25
Figura 11: Visualização 2D do composto Inda e os Aminoácidos da NS5 de maior interação.....	27
Figura 12: Proteína NS5 RdRp com o composto inda (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação do receptor com o composto.....	29
Figura 13: Visualização 2D do composto Quercetina e os aminoácidos da NS5 de maior interação.....	29
Figura 14: Proteína NS5 RdRp com o composto Quercetina (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação do receptor com o composto.....	31

Figura 15: Visualização 2D do composto terpeno 1 e os aminoácidos da NS5 de maior interação.....	31
Figura 16: Proteína NS5 RdRp com o composto terpeno 1 (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação do receptor com o composto.....	33
Figura 17: Visualização 2D do composto terpeno 2 e os aminoácidos da NS5 de maior interação.....	33
Figura 18: Proteína NS5 RdRp com o composto terpeno 2 (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação do receptor com o composto.....	35
Figura 19: Visualização 2D do composto terpeno 3 e os aminoácidos da NS5 de maior interação.....	35
Figura 20: Proteína NS5 RdRp com o composto terpeno 3 (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação do receptor com o composto.....	36
Figura 21: Visualização 2D do composto terpeno 4 e os aminoácidos da NS5 de maior interação.....	37
Figura 22: Proteína NS5 RdRp com o composto terpeno 4 (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação do receptor com o composto.....	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Energia de ligação dos principais aminoácidos da proteína NS5 com o ligante INDA.	40
Gráfico 2: Energia de ligação dos principais aminoácidos da proteína NS5 com o ligante QUECERTINA.	42
Gráfico 3: Energia de ligação dos principais aminoácidos da proteína NS5 com o ligante TERPENO (1).	43
Gráfico 4: Energia de ligação dos principais aminoácidos da proteína NS5 com o ligante TERPENO (2).	44
Gráfico 5: Energia de ligação dos principais aminoácidos da proteína NS5 com o ligante TERPENO (3).	45
Gráfico 6: Energia de ligação dos principais aminoácidos da proteína NS5 com o ligante TERPENO (4).	46
Gráfico 7: Representação da Energia total (Kmol/mol) de todos os ligantes ancorados com a proteína de replicação viral NS5 RdRp.	47
Gráfico 8: Representação da Energia total (eV) de todos os ligantes ancorados com a proteína de replicação viral NS5 RdRp.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: KI ou Constante de inibição expressa (CIE) em uM, Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4 entre a NS5 RdRp e o composto Inda.	28
Tabela 2: KI ou Constante de inibição expressa (CIE) em uM, Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4 entre a NS5 RdRp e o composto quecertina.	30
Tabela 3: KI ou Constante de inibição expressa (CIE) em uM, Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4 entre a NS5 RdRp e o composto terpeno (1).	32
Tabela 4: KI ou Constante de inibição expressa (CIE) em uM, Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4 entre a NS5 RdRp e o composto terpeno (2).	34
Tabela 5: KI ou Constante de inibição expressa (CIE) em uM, Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4 entre a NS5 RdRp e o composto terpeno (3).	36
Tabela 6: KI ou Constante de inibição expressa (CIE) em uM, Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4 entre a NS5 RdRp e o composto terpeno (4).	38
Tabela 7: Evidenciação dos aminoácidos da NS5 de maior interação com os 6 ligantes testados, em destaque os aminoácidos que mais apareceram nas análises computacionais.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
LGA	Algoritmo Genético Lamarckiano
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
DS	<i>Discovery Studio</i>
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
LDA	<i>Local Density Approximation</i>
GGA	Generalized Gradient Approximation
CAPS	Aminoácidos Conjugados (Vizinhos)
MFCC	Método de Fracionamento de Caps Conjugados
ALA	Alanina
ARG	Arginina
ASN	Asparagina
ASP	Ácido Aspártico
GLU	Ácido Glutâmico
GLN	Glutamina
GLY	Glicina
LYS	Lisina
PRO	Prolina
SER	Serina
THR	Trionina
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO GERAL	17
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 ZIKA VÍRUS.....	18
3.2 PROTEÍNA NS5.....	19
3.3 BIOQUÍMICA COMPUTACIONAL.....	20
3.4 DOCKING MOLECULAR.....	21
3.5 MÉTODOS AB INITIO.....	23
3.6 FRACIONAMENTO MOLECULAR COM CAPS CONJUGADOS (MFCC).....	24
4. METODOLOGIA	26
4.1 ESTRUTURA DO ZIKV NS5 RdRp.....	26
4.2 SELEÇÃO DAS MOLÉCULAS.....	26
4.3 DOCKING MOLECULAR.....	27
4.4 DETERMINAÇÃO ENERGÉTICA DOS COMPLEXOS PROTEÍNA-LIGANTE OBTIDA ATRAVÉS DO MFCC.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 DOCKING MOLECULAR.....	30
5.1.1 DOCKING DA NS5 E DO COMPOSTO INDA.....	30
5.1.2 DOCKING DA NS5 COM O COMPOSTO QUECERTINA.....	32
5.1.3 DOCKING NS5 COM O COMPOSTO TERPENO (1).....	34
5.1.4 DOCKING NS5 COM O COMPOSTO TERPENO (2).....	36
5.1.5 DOCKING NS5 COM O COMPOSTO TERPENO 3.....	38
5.1.6 DOCKING NS5 COM O COMPOSTO TERPENO 4.....	39
5.2 DETERMINAÇÃO ENERGÉTICA DOS AMINOÁCIDOS PROTEÍNA-LIGANTE OBTIDA ATRAVÉS DO FRACIONAMENTO MOLECULAR COM CAPS CONJUGADOS (MFCC).....	42
5.2.1 MFCC PARA O COMPOSTO INDA.....	42
5.2.2 MFCC PARA O COMPOSTO QUECERTINA.....	44
5.2.3 MFCC PARA O COMPOSTO TERPENO (1).....	45
5.2.4 MFCC PARA O COMPOSTO TERPENO (2).....	46
5.2.5 MFCC PARA O COMPOSTO TERPENO (3).....	47
5.2.6 MFCC PARA O COMPOSTO TERPENO (4).....	48
5.3 ENERGIA TOTAL OBTIDA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FRACIONAMENTO DE CAPS E CONJUGADOS (MFCC).....	50
5.4 EVIDÊNCIA DE POTENCIAIS AMINOÁCIDOS ÂNCORA NO SÍTIO ATIVO DA PROTEÍNA	51
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo, doenças relacionadas com vetores transmissores de epidemias ainda preocupam e são responsáveis por um alto número de mortalidade e mobilidade humana. O agravante disto é antecedido por alguns fatores, como: ciclo de vida do mosquito, condições ambientais e sanitárias onde estes se desenvolvem e hospedeiros e/ou reservatórios que são diretamente responsáveis por encabeçar a cadeia de transmissão das doenças (CARVALHO & SOUZA). No Brasil, o país ainda vive uma época de carência em termos de saneamento básico, dez anos após a incisão da lei de saneamento básico (Lei 11.445/2007) tem-se 49,07% da população brasileira sem acesso a coleta de esgoto e 57,3% sem esgoto tratado (G1, 2017), um número considerável e agravante em termos de proliferação de doenças virais.

O Zika Vírus (ZIKV) é um arbovírus transmitido pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, e recentes evidências apontam também o mosquito *Culex quinquesfasciatus* como vetor. Também pode ser transmitida por relações sexuais e transfusão sanguínea, mesmo com parceiros e doadores assintomáticos. Os meios de transmissão saliva, urina ou leite materno ainda não foram confirmados. O primeiro registro desta doença foi em 1947 na Floresta Zika, em Uganda, detectado inicialmente em macacos. Em 1954, na Nigéria, foram registrados os primeiros casos humanos (Zanluca et al., 2015).

A confirmação de transmissão da febre causada pelo Zika vírus surgiu no Brasil em meados de abril de 2015, apresentou-se inicialmente nos estados do Rio Grande do Norte e da Bahia na região Nordeste do país. A semana Epidemiológica (SE) alertou no mesmo ano sobre a sinalização de 19 unidades da Federação sobre a confirmação laboratorial da doença, porém não foram divulgados dados quantitativos. Já em 2016 a SE divulgou não só as unidades (13) como também os dados quantitativos que se mostraram alarmantes: 35.505 casos da doença na região Sudeste, seguido pelo Nordeste, 30.286 casos e no geral foram 91.387 casos de Zika no Brasil (CARVALHO & SOUZA, 2016).

A epidemia causada pelo ZKV começa a se propagar entre 3 a 12 dias após a picada e tem como sintoma marcante a febre baixa (entre 37,8° e 38,5°C), que vem acompanhada se sintomas gerais, dores articulares, conjuntivite, erupções cutâneas com coceira, dor muscular e dor de cabeça. Apesar dos sintomas parecem ser triviais surgiram casos mais severos no Brasil e Polinésia Francesa ligados a microcefalia, uma doença neurológica congênita (síndrome de Guillain-Barré) tem sido catalogada. Dentro desse contexto, com o aumento exponencial de casos surgiu a preocupação dos órgãos públicos em respeito à saúde mundial, além de imprescindibilidade

em vigiar síndromes neurológicas em pacientes febris agudos, também existe a necessidade de mais estudos relacionados ao Vírus da zika e pesquisas voltadas a cessar o culminio de seu efeito sobre a população (ZANLUCA, 2015).

Até o momento não existe vacina disponível para o ZIKV e o tratamento é sintomático, ou seja, não há tratamento específico para a doença, apenas medicamentos para amenizar os sintomas. No entanto, diversos estudos focam em desenvolver vacinas e medicamentos específicos. Em uma recente pesquisa foi elucidada a estrutura tridimensional da ZIKV NS5 RdRp, uma proteína associada à RNA-polimerase e importante ativadora do processo de replicação (GODOY, A. et al. 2017).

A estrutura tridimensional de uma proteína alvo, preferivelmente com um ligante para a possível elucidação do seu sitio receptor é o segredo para o desenho de fármacos com base na estrutura, uma vez definida a estrutura do sitio receptor pode ser utilizada para determinar um farmacóforo para a triagem virtual em bibliotecas de compostos e em pesquisas de *docking* molecular que podem ser usados para aclarar e aperfeiçoar a estrutura dos compostos líderes (Willis, 2002).

Com a elucidação da estrutura da ZIKV NS5 RdRp, proteína associada à replicação viral, surgem possibilidades de tornar esta enzima um alvo de novos fármacos, intentando a busca de inibidores e experimentos *in silico*, como o docking molecular (atracamento) e Fracionamento de caps conjugados, podem ser extremamente úteis para a sinalização de possíveis moléculas com potencial para inibição da proteína NS5.

2. OBJETIVO GERAL

- Analisar *in silico* possíveis inibidores da proteína de replicação NS5 do Zika vírus.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

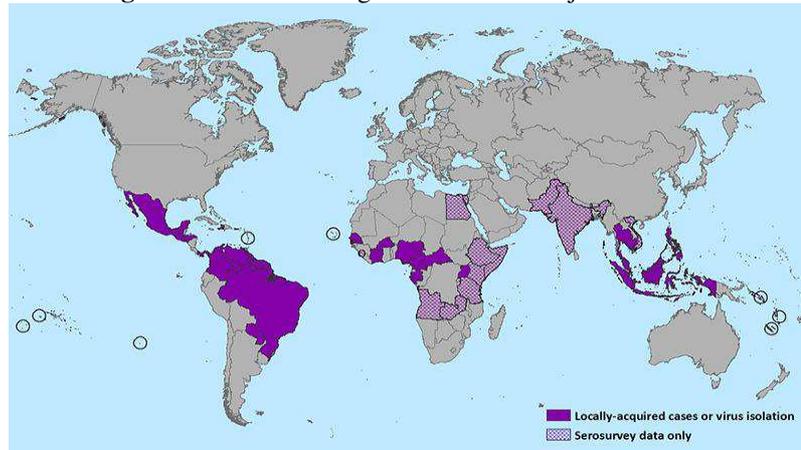
- Analisar a estrutura tridimensional da NS5, bem como seu sítio ativo.
- Buscar na literatura e nos bancos de dados de moléculas por possíveis inibidores.
- Fazer simulações de docking molecular e gerar complexos proteína-ligantes e/ou proteína-proteína.
- Analisar os resultados dos *dockings* com auxílio do programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) e o Discovery Studio (DS);
- Através do *Método De Fracionamento De Caps Conjugados*, dentro da teoria do funcional da densidade, quantificar as energias individuais de cada aminoácido da NS5 em interação com os ligantes propostos;
- Quantificar as energias de interações a nível quântico, entre os possíveis inibidores e os resíduos do sítio ativo da proteína.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ZIKA VÍRUS

A febre Zika é uma epidemia global transmitida principalmente por mosquitos, entre eles o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* e causada por um vírus da família *Flaviviridae* e possui distribuição tropical (Figura 1). Recentes estudos apontam o mosquito *Culex quinquefasciatus* como um possível vetor (Ayres et al., 2016)

Figura 1: Países com registro do ZIKV em janeiro de 2016.



Fonte: Natureza Terráquea, 2016.

Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são pequenos (menos de 1cm), de coloração negra com manchas brancas distribuídas nas patas e no corpo. A principal diferença morfológica entre estas duas espécies é o desenho no tórax, onde o primeiro apresenta um desenho em forma de lira e o segundo apresenta uma única linha longitudinal (Figura 2). Também são diferentes na sua distribuição, o *Aedes aegypti* é mais comum em ambientes urbanos enquanto o *Aedes albopictus* é mais frequente em ambientes silvestres e de transição. Ambos são de hábitos diurnos, evitando as horas mais quentes do dia (Consoli Lourenço-de-Oliveira, 1994). Já o mosquito *Culex quinquefasciatus* é o mosquito doméstico conhecido popularmente como “pernilongo” nas regiões centro-oeste, sul e sudeste; como “muriçoca” na região nordeste e como “carapanã” na região norte. Tem hábito noturno e coloração amarronzada (Figura 2). É extremamente urbano e antropofílico (Forattini, 2002).

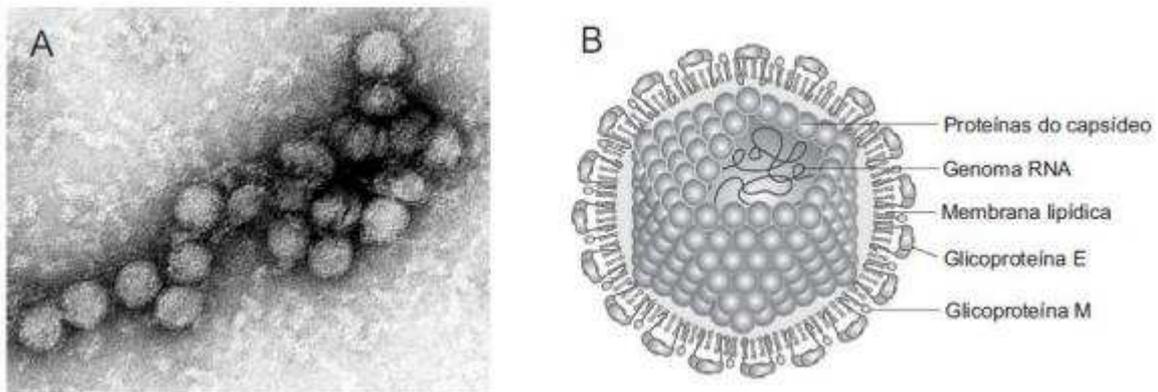
Figura 2: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Natureza Terráquea, 2016.

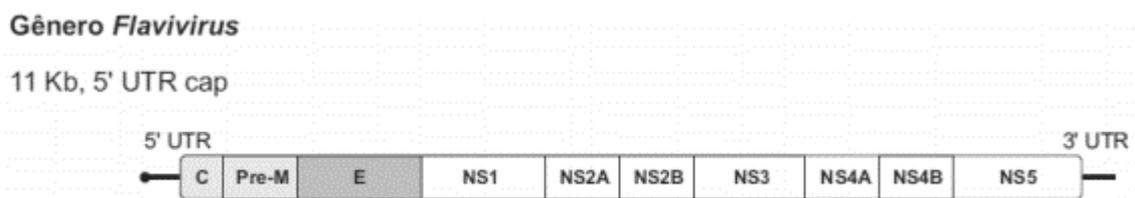
O Zika Vírus é categorizado como um flavivírus (25-30nm) da mesma família dos vírus da dengue, febre amarela e do Nilo ocidental, vírus envelopados por RNA (Ácido Ribonucleico) compostos por uma fita simples, de polaridade positiva (11kb) em capsídeo icosaedro (Figura 3). Esta conformação genômica codifica a poliproteína iniciadora das proteínas estruturais capsídeo, pré-membrana e envelope, e das sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 4) (RABELO, 2017).

Figura 3: Morfologia das partículas virais dos membros da família Flaviviridae. A) Foto de microscopia eletrônica de partícula viral; B) Ilustração esquemática de uma partícula viral indicando seus componentes.



Fonte: RIDPATH et al., 2012.

Figura 4: Estrutura e organização genômica da fita simples de RNA de polaridade positiva dos Flavivirus.



Fonte: RIDPATH et al., 2012.

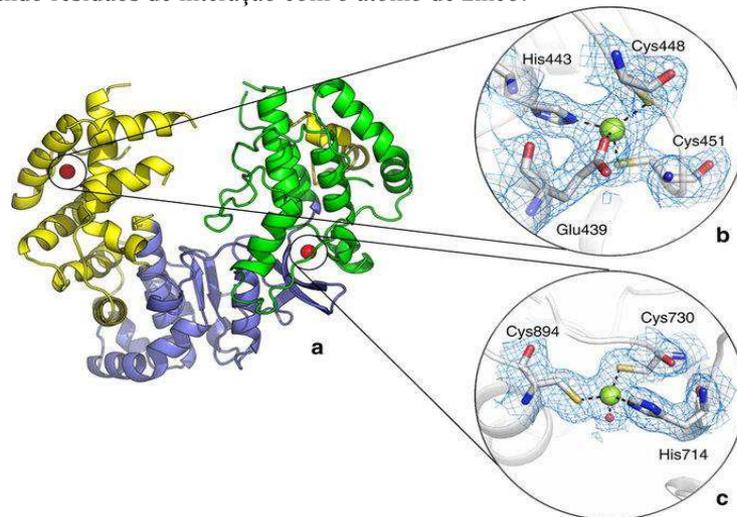
3.2 PROTEÍNA NS5

A NS5 é uma proteína flaviviral não estrutural (do inglês *Non-structural 5*) maior e mais conservada entre os flavivírus, apresenta o peso molecular na ordem de 100 KDa. A mesma desempenha duas atividades essenciais na replicação viral: A primeira é a de RNA polimerase dependente de RNA (*RNA- dependent RNA polymerase - RdRp*), em sua porção amino-terminal, na região carboxi-terminal e outra de metiltransferase, a qual está envolvida na formação do capta RNA, provavelmente na metilação da estrutura cap RNA 5' (MADRID, 2007). Isto,

somado ao fato de que esta proteína é ausente nos hospedeiros mamíferos, torna esta molécula uma forte candidata a alvos de fármacos específicos com ação antiviral. Inibidores de polimerase tem tido sucesso clínico no tratamento do vírus da hepatite C, porém eles dependem da ativação de quinase e causam problemas devido à sua toxicidade (Godoy et al. 2017).

Alguns estudos com NS5 evidenciam ainda a relevância funcional desta proteína para a patogênese viral, uma vez que a realização de mutações na proteína reduziu a neurovirulência em camundongos. Existe, a possibilidade de que essas mutações alterem as bases da interação vírus-célula hospedeira, o que poderia interferir na patogênese da doença. Quando a localização celular, existem evidências de que, além da ação citoplasmática quanto da replicação do RNA, a NS5 é também identificada no núcleo de células infectadas com YFV e DENV (MADRID, 2007). A Figura 5 a seguir descreve a visão geral da NS5 RdRp do vírus da Zika.

Figura 5: Visão geral da ZIKV NS5 RdRp; (a) domínios nas cores verde (“polegar”), amarelo (“dedos”) e azul (“palma”); (b) detalhe do domínio “dedos” mostrando resíduos de interação com o átomo de zinco; (c) detalhe do domínio “polegar” mostrando resíduos de interação com o átomo de zinco.



Fonte: Godoy et al. (2017).

3.3 BIOQUÍMICA COMPUTACIONAL

Um conjunto de ferramentas constitui a bioquímica computacional, esta baseia-se em técnicas que tem como base diversas ciências como: Química, física, biologia, ciências da computação e estatística, com o objetivo de realizar análises, simulações e pôr fim a interpretação de sistemas biológicos complexos que são essenciais para a solução de problemáticas bioquímicas. Os softwares realizam estes cálculos baseados em equações de física clássica e quântica, procurando averiguar a exibição ou representação de diversas estruturas moleculares, a partir disto, é possível simular o perfil de ambiente fisiológico desta estrutura e obter informações acerca

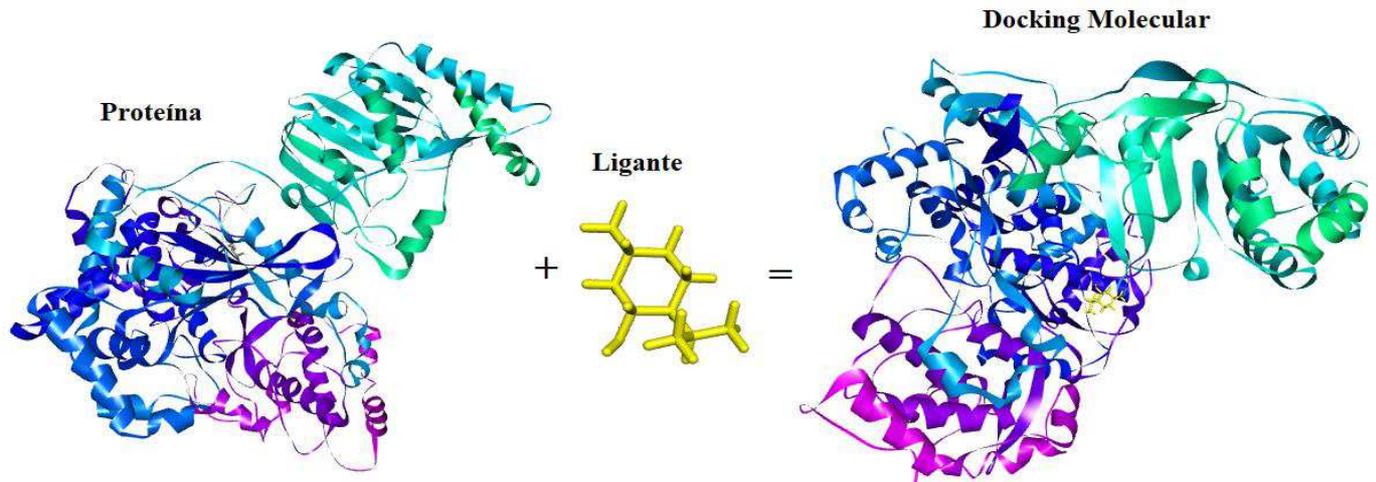
de sua geometria (Ângulos de torção e ligação, Comprimento de ligação), energia (Energia de ligação, calor de formação), propriedades espectroscópicas (modo de agitação), propriedades eletrônicas (afinidade eletrônica, potencial de ionização, momento dipolo), além de outras informações como volume, superfície, viscosidade (MATTA, 2010) (MOTA, 2016).

Um grande viés da bioquímica computacional é o estudo das interações entre proteínas e seus possíveis ligantes. O intuito é conseguir descrever e localizar possíveis sítios ativos e dimensionar o grau de energia de interação entre os ligantes (candidatos a fármacos) e suas proteínas alvo. Nestes casos, a bioquímica computacional proporciona importantes contribuições, tendo em vista, que a partir desta ciência é possível alcançar a compreensão de fenômenos biológicos e compreender o planejamento de novas drogas farmacológicas (VERLI; BARREIRO, 2005). Dentro desse contexto, a investigação estrutural de moléculas, ou complexos agiliza o andamento da elucidação de novos fármacos por meio da utilização de estruturas tridimensionais, que podem ser obtidas através de algumas técnicas, como: Ressonância magnética nuclear, difração de raio-x ou por modelagem molecular (HENNING; SATTLE, 2014). As técnicas de modelagem podem ser classificadas em três categorias: Métodos semi-empíricos, *ab initio* (MFCC) e mecânica molecular (Docking Molecular) (MOTA, 2016). Neste trabalho destaca-se a utilização de mecânica molecular e métodos *ab initio*.

3.4 DOCKING MOLECULAR

O *docking* molecular, também conhecido como atracamento molecular ou ainda ancoragem molecular, é um experimento *in silico* (computacional) que visa simular a interação entre duas moléculas, gerando complexos proteína-ligante ou ainda proteína-proteína (Verli, 2014). Existem diversas metodologias de *docking* baseadas no modelo chave-fechadura proposto por Emil Fischer, em 1894. Neste modelo, o receptor (geralmente uma proteína) é comparado a uma “fechadura”, seu sítio de ligação com o “buraco da fechadura” e o ligante seria uma possível “chave”, como é visto na figura 6 a seguir.

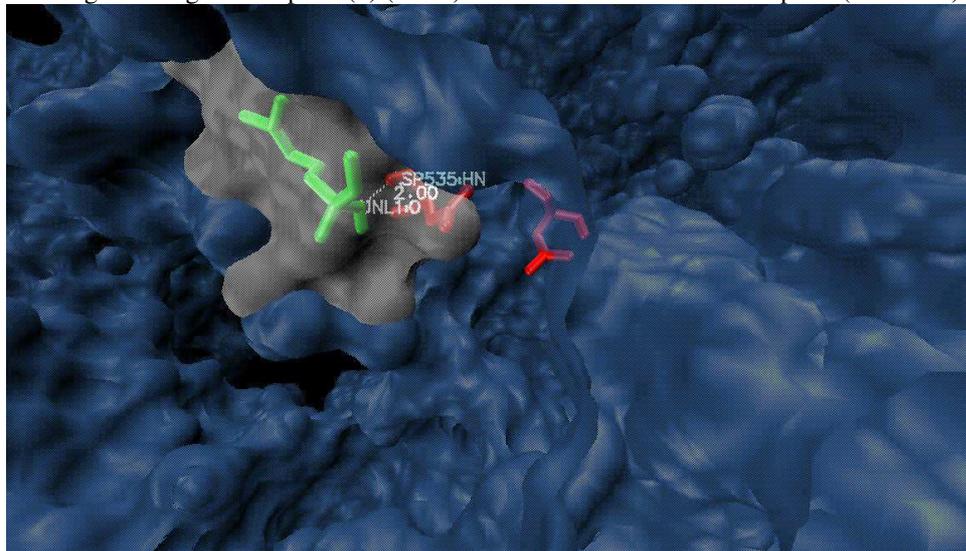
Figura 6: Representação da formação do complexo proteína-ligante no *docking* molecular.



Fonte: Autoria própria a partir do *Software* Discovery Studio.

O reconhecimento molecular está baseado na complementaridade de características físico-químicas e estruturais das moléculas interagentes. As características físico-químicas definem o grau de afinidade e de especificidade do ligante pela proteína, e estão relacionadas com as interações intermoleculares existentes no complexo. Estas interações incluem as ligações de hidrogênio, as interações provenientes do efeito hidrofóbico, as interações de van der Waals, as interações eletrostáticas e as ligações covalentes que possam ser formadas durante o processo de interação receptor-ligante. As características estruturais, por sua vez, estão associadas aos arranjos espaciais moleculares, dados por variações na orientação, posicionamento espacial e rotações de ligações químicas das moléculas interagentes (Verli, 2014), a figura 7 a seguir, elucida um *Docking* proteína-ligante entre a NS5 e um composto ligante teste.

Figura 7: Em azul é evidenciado a estrutura proteica da NS5, em cinza os resíduos/aminoácidos que rodeiam a ancoragem do ligante Terpeno (3) (verde) com o aminoácido âncora Asp535 (vermelho).



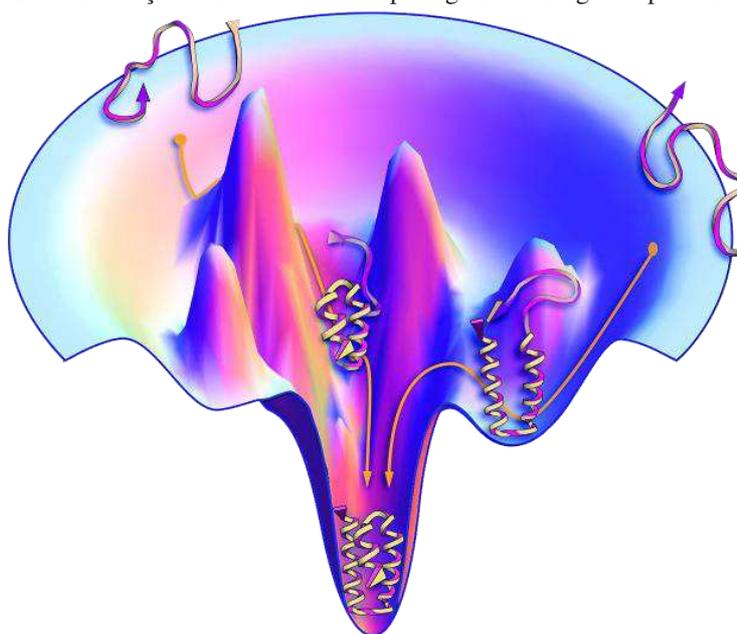
Fonte: Autoria própria.

Dentro deste contexto, a técnica de *docking* representa uma alternativa eficaz, rápida e de baixo custo para o estudo inicial de moléculas candidatas à inibidores da ZIKV NS5 RdRp.

3.5 MÉTODOS AB INITIO

Oriundo do latim “a partir do início”, o método baseia-se em cálculos que tem como alicerce leis da mecânica quântica (massas e cargas de elétrons, núcleos atômicos). Métodos ab initio são consistentes e precisos, tendo em vista que podem fornecer resultados com excelente nível de concordância quando comparados com resultados experimentais. Utilizado na química computacional, o mesmo parte de dois pressupostos: A estrutura tridimensional de uma proteína é dita a partir de sua sequência de aminoácidos e que ocorre um envelopamento das proteínas para um estado nativo que encontra-se próximo ao mínimo de energia total (Figura 8), colaborando para a compreensão dos princípios ligados a física sobre o envelopamento de proteínas (LEWARS, 2011).

Figura 8: Ilustração conceitual de uma paisagem de energia de proteína.



Fonte: DILL & MACCALLUM, 2012.

Nas simulações computacionais de grandes sistemas de moléculas é comum não se utilizar parâmetros empíricos para se estimar as frequências vibracionais do sistema, em vez disso considera-se a aproximação harmônica, maximizando-as em comparação com valores experimentais (COSTA et al., 2012). Algumas de suas principais aplicações é a geração de dados de energia e função de onda de microsistemas por intermédio da resolução da equação de Schrödinger, entretanto, o êxito ocorre quando aproximações são embutidas dentro das teorias ab

início, como: Teoria do Funcional da Densidade (DFT) que considera a densidade eletrônica como foco do problema, tornando possível simular o sistema real, por meio de um sistema multieletrônico não interagente (GORDON, 2012).

A Teoria do Funcional da Densidade ou como foi batizada no inglês “Density Functional Theory” (DFT) é um dos métodos mais utilizados para resolver problemas no âmbito da teoria quântica e, é um método de confiança para calcular a energia do estado fundamental de sistemas da ordem de 300 átomos (MATTA, 2010). O método é eficaz na análise da estrutura eletrônica de átomos, moléculas e sólidos, possibilitando os cálculos de ligações químicas e da estrutura de bandas na física atômica e na física do estado sólido (MOTA, 2016). Além disso, apresenta grandes vantagens ao ser aplicada a sistemas biológicos, como: Alta taxa de processamento para realização dos cálculos, baixo custo computacional, em comparação a outros métodos tradicionais como o Hartree Fock (modelo atualmente mais utilizado como ponto de partida ab initio) e é imprescindível salientar que os resultados alcançados a partir da DFT convergem satisfatoriamente quando comparados com dados estabelecidos experimentalmente, estas características atribuíram a teoria um título de excelência em resultados e eficiência computacional (PERDEW, 1996; MOTA, 2016).

Apesar de sua alta eficiência o DFT apresenta uma problemática: Os funcionais exatos para os termos de energia de troca de spin e correlação eletrônica não são conhecidos, com exceção do gás de elétrons livre. Todavia, existem algumas aproximações que podem ser utilizadas para a resolução dessa problemática, os mais comuns são: Local Density Approximation (LDA) ou em português Aproximação da densidade local e Generalized Gradient Approximation (GGA) ou Aproximação do gradiente generalizado, este trabalho fez uso do funcional GGA para aproximar o termo de troca e correlação nas interações entre elétrons neste trabalho (PERDEW, 1996).

O GGA considera a energia de troca e correlação de um sistema como sendo idêntica a energia de um gás de elétrons, e a densidade eletrônica variável na forma de um gradiente, podendo assim, descrever de maneira mais precisa as a natureza não homogênea das densidades moleculares. O GGA melhorou exponencialmente a explicação de ligações, em especial ligações de hidrogênios, com a vantagem de não haver alteração na demanda computacional (MOTA, 2016).

3.6 FRACIONAMENTO MOLECULAR COM CAPS CONJUGADOS (MFCC)

Foram desenvolvidos métodos que facilitassem o estudo de sistemas biológicos, tendo em vista que a maior dificuldade até então, eram as grandes quantidades de átomos, logo, os cálculos

baseados em mecânica quântica tornavam-se inviáveis nas análises de energias de interação destes sistemas proteicos (AMARA, 2000; MOTA, 2016).

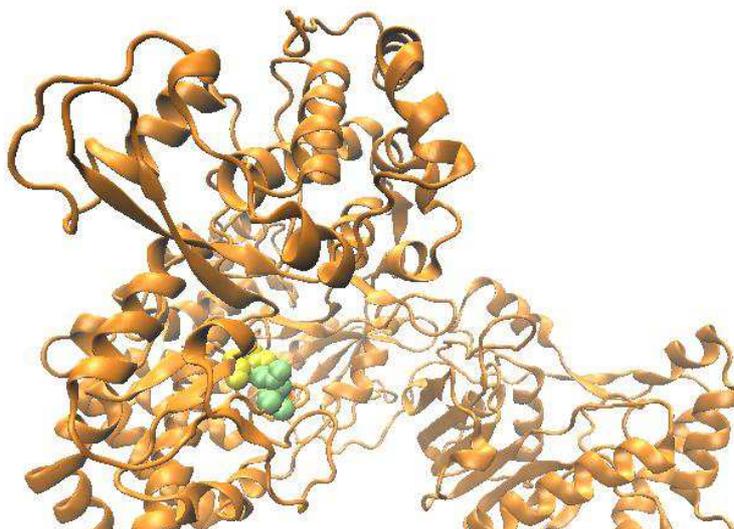
O MFCC ou cálculos de primeiros princípios é capaz de fornecer resultados a nível ab initio com eficiência para energias de interação entre uma proteína e uma dada molécula. O método baseia-se na divisão da estrutura molecular tridimensional, basicamente em grupos de aminoácidos, tornando possível computar a energia de interação entre as duas moléculas (uma proteína e um composto ligante pequeno) (MOTA, 2016). De maneira mais objetiva, o complexo (proteína-ligante) que está em estudo é fracionado em subsistemas menores, mantendo as características eletrônicas do complexo original, alguns aminoácidos vizinhos (CAPS) e suas ligações peptídicas são mantidas no complexo, assim como suas pontes dissulfeto (ZHANG, 2003). Deste modo, estes pequenos fragmentos podem ser tratados e calculados através de métodos quânticos de alta precisão, trazendo como resultado a energia obtida entre a proteína e o ligante através das combinações entre os pequenos fragmentos analisados, além da possível determinação energética de cada aminoácido.

4. METODOLOGIA

4.1 ESTRUTURA DO ZIKV NS5 RdRp

As coordenadas atômicas da ZIKV NS5 RdRp foram obtidas no banco de dados *PDB-Protein Data Bank* através do código de acesso 5U0B (Godoy et al. 2017), onde vale salientar que o artigo que disponibilizou a estrutura apontava os aminoácidos ASP535 e ASP665 como âncoras, ou seja, essenciais para a ativação funcional da proteína. A estrutura foi analisada visualmente pelos softwares *VMD-Visual Molecule Dynamics* (Humphrey et al., 1996) e *Discovery Studio* (BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, 2014).

Figura 9: Visualização do ZIKV NS5 RdRp em destaque os aminoácidos âncoras 665 (Amarelo) e o 535 (Verde).



Fonte: Autoria própria.

4.2 SELEÇÃO DAS MOLÉCULAS

Foi realizada uma revisão de literatura, com a perspectiva de melhor desenvolvimento de pesquisa e elucidar possível moléculas ligantes que possam vir a mostrar bons resultados computacionais quanto a sua inibição a NS5. A pesquisa se deu nos sites de busca acadêmica Google acadêmico onde foi possível visitar banco de informações como SciELO, PubMed, Lilacs, Medline entre outras plataformas.

Com relação a estrutura dos ligantes foram feitas buscas na literatura e em bancos de dados de pequenas moléculas, como o *ZINC Database* (<http://zinc.docking.org/>), *Pubchem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e também o banco do *Chemspider* (<http://www.chemspider.com/>). Foram gerados arquivos na extensão *.pdb* e as estruturas dools

compostos a serem testados serão analisadas visualmente pelo *VMD-Visual Molecule Dynamics* e pelo *Discovery Studio*.

Seis ligantes foram selecionados para compor este estudo foram, estes são substâncias naturais encontradas nas plantas e para manter o sigilo devido a direitos intelectuais optou-se por utilizar nomes fantasia, os ligantes foram: Inda, Quecertina, Terpeno (1), Terpeno (2), Terpeno (3) e Terpeno (4).

4.3 DOCKING MOLECULAR

Os experimentos de docking proteína-ligante ZIKV NS5 RdRp + Ligante foram realizados no programa Autodock1.5.6 (Morris et al., 2009), no qual ocorreu um pré-dimensionamento da grade cúbica de energia de volume 126 x 126 x 126 Å, que foi centrada no receptor. Utilizou-se o algoritmo genético Lamarckiano (LGA). No programa Autodock4 a proteína foi previamente considerada rígida em todas as simulações de Docking, enquanto os ligantes flexíveis, ao fim, foram obtidos dez conformações de cada interação proteína-ligante testados neste trabalho. Destacou-se três parâmetros que foram considerados mais importantes para a busca do objetivo proposto, estes foram: A Constante de Inibição Estimada (mM), A Energia intermolecular Final e a Energia livre de ligação (kcal/mol) estimada pelo programa.

4.4 DETERMINAÇÃO ENERGÉTICA DOS COMPLEXOS PROTEÍNA-LIGANTE OBTIDA ATRAVÉS DO MFCC

Os cálculos de energia entre os ligantes e os aminoácidos da proteína NS5 RdRp foram realizados através da técnica do MFCC, o mesmo possibilita os cálculos que envolvem proteínas, macromoléculas biológicas e DNA, tendo como foco a fornecimento de informações exatas sobre as energia de interação entre os complexos (ZHANG 2003; GORDON et al., 2011; MOTA, 2016).

Para realização dos cálculos de energia de interação utilizou-se o software computacional *Materials Studio*, empregando o código Dmol3, bem como o funcional de troca e correlação: Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA). Calculadas através do método de fracionamento molecular com capas conjugadas (MFCC).

Para verificar a distância entre os resíduos de interação do receptor (com o ligante utilizou-se o *software Discovery studio*, através dos monitores Centroid que marca o centro geométrico dos átomos selecionados (BIOVIA, 2016). O raio de corte atribuído ao *software* foi $R=12\text{Å}$, possibilitando levar em conta todos os resíduos de potencial interação. A otimização das estruturas foram realizadas através do mesmo software com adição de hidrogênios por meio da opção

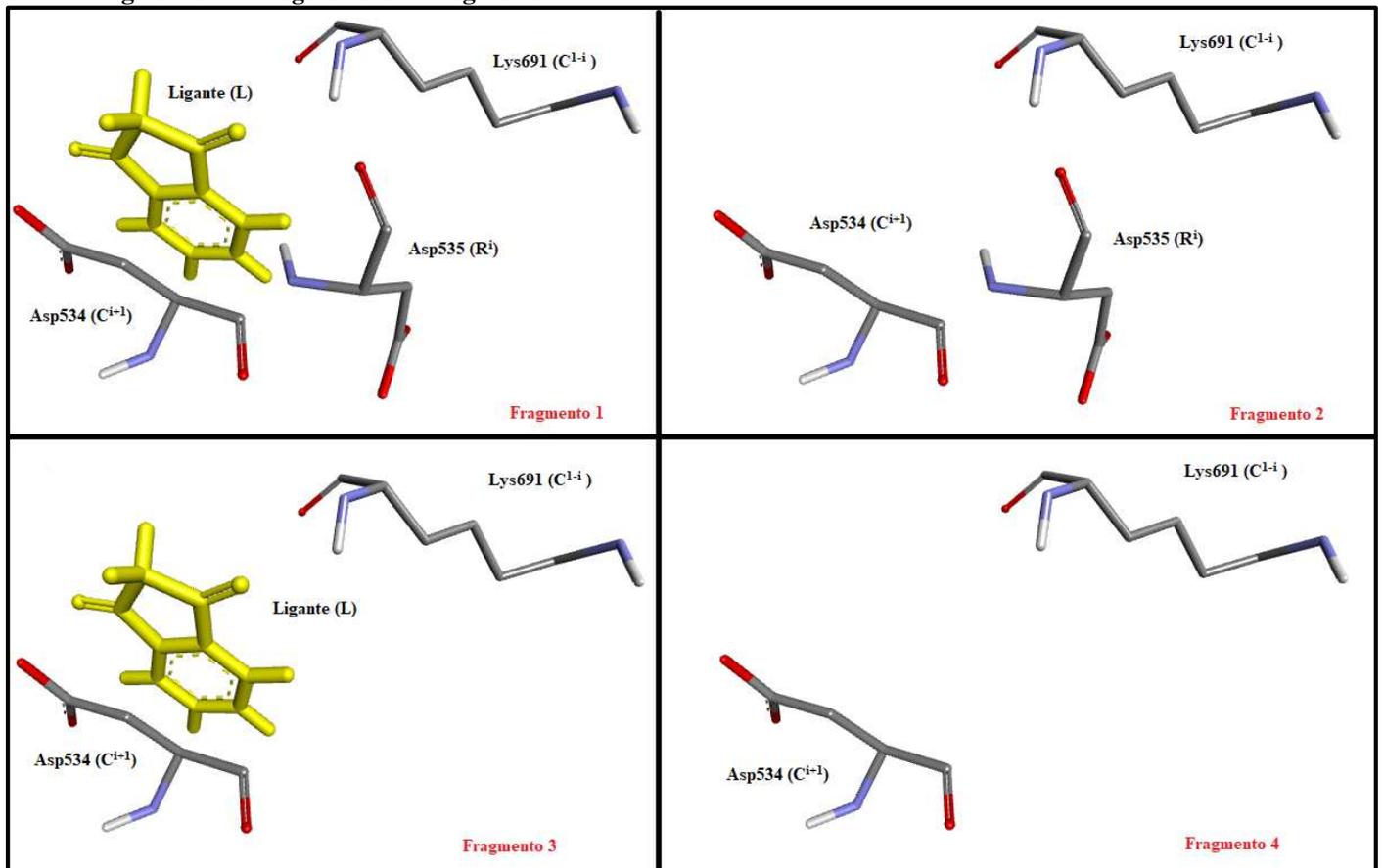
chemistry -hydrogens – add, isto foi necessário, para fechar todas as camadas de valência nas estruturas obtidas inicialmente por Difração de raio X ou Ressonância nuclear, isso ocorre geralmente por causa da falta de resolução da imagem, que seria necessário 1,2 Å metodologia similar à adotada por Mota (2016).

Determinou-se a molécula do ligante como L e o resíduo de aminoácidos que interage com o ligante como Rⁱ. O *cap* Cⁱ⁻¹ (Cⁱ⁺¹) é formado a partir dos resíduos vizinhos do resíduo Rⁱ ao longo da cadeia de proteína. Empregou-se a linha de investigação em que os dois fragmentos de aminoácidos mais próximos de cada lado do resíduo Rⁱ foram usados para construir o *cap* Cⁱ⁻¹ e Cⁱ⁺¹, proporcionando uma melhor exposição do ambiente eletrônico. Para estas estruturas fragmentadas, a energia de interação entre o ligante e os fragmentos individuais é calculado de acordo com a seguinte equação, proposta por Gordon (2012):

$$EI (L - R^i) = E (L + C^{i-1} R^i C^{i+1}) - E (C^{i-1} R^i C^{i+1}) - E (L + C^{1-i} C^{i+1}) + E (C^{1-i} C^{i+1}) \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde EI (L – Rⁱ) representa a energia quântica total do sistema, que será igual a E (L + C¹⁻ⁱ Rⁱ Cⁱ⁺¹) energia do ligante mais o resíduo Rⁱ junto a seus Caps conjugados (Fragmento 1 da figura 10), menos, E (C¹⁻ⁱ Rⁱ Cⁱ⁺¹) que equivale ao Rⁱ mais os aminoácidos Caps (Fragmento 2 da figura 10), menos, E (L + C¹⁻ⁱ Cⁱ⁺¹) que será o ligante mais os Caps conjugados (Fragmento 3 da figura 10) e por fim, soma-se E (C¹⁻ⁱ Cⁱ⁺¹) apenas os aminoácidos conjugados, Caps (Fragmento 4 da figura 10). O cálculo de energia de interação EI (L – RI) expressa-se em kcal/mol, a figura 10 trás de forma ilustrativa como essa equação foi utilizada.

Figura 10 : Método de fracionamento Molecular com capuzes conjugados (MFCC) exemplificado pelo cálculo energético da interação proteína-ligante entre a NS5 RdRp e o ligante Inda, onde $EI (L-R^i) = \text{Fragmento 1} - \text{Fragmento 2} - \text{Fragmento 3} + \text{Fragmento 4}$.



Fonte: Autoria própria a partir do *Software* Discovery Studio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DOCKING MOLECULAR

Foram realizados experimentos de Docking Molecular em cerca de 60 ligantes que pudessem ser possíveis candidatos a inibidores da proteína NS5 RdRp do Zika Vírus, onde cada ligante gerava 10 complexos (conformações distintas), logo, foram analisados no total 600 complexos. Neste trabalho de conclusão de curso foram selecionadas 6 ligantes que demonstraram alto índice para potencial inibitório da proteína.

5.1.1 DOCKING DA NS5 E DO COMPOSTO INDA

Através da simulação de *docking* entre a NS5 RdRp e o Inda, foram obtidos os dados evidenciados na Tabela 1, ranqueados na ordem dos complexos gerados. A partir desses resultados pode-se observar que a menor energia livre de ligação e energia intermolecular calculada para a NS5 foi -6,18 kcal/mol, valor expressivamente negativo que implica na afirmação que é termodinamicamente mais favorável a existência das moléculas em um complexo do que separadas (BRAZ, 2016). Em sequência, as constantes de inibição K_i variaram de 30 μM a 310 μM , onde é dito pela literatura que abaixo de 50 μM a ancoragem já causa disfuncionalidade na proteína, em outras palavras, o ligante em questão consegue interferir diretamente na funcionalidade da proteína (MAIA, 2013).

Tabela 1: K_i ou Constante de inibição expressa (CIE) em μM , Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4 entre a NS5 RdRp e o composto Inda.

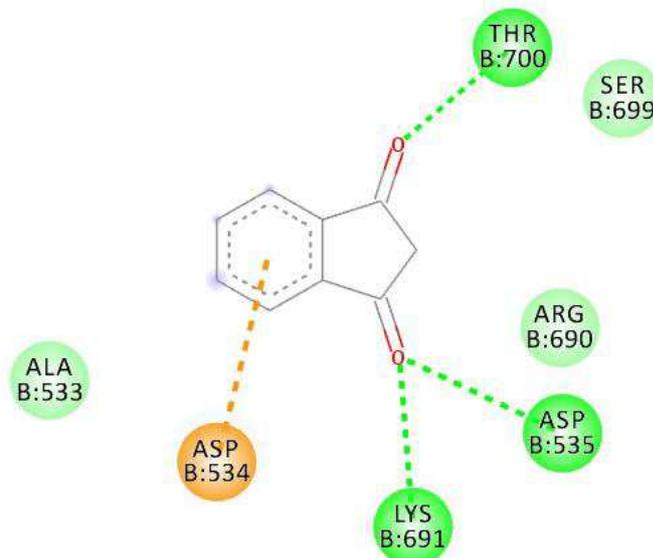
Complexo	Energia Livre de Ligação	Energia Intermolecular	K_i
1	-6.18	-6.18	30
2	-5.90	-5.90	50
3	-5.17	-5.17	160
4	-4.93	-4.93	240
5	-5.17	-5.17	160
6	-4.85	-4.85	280
7	-4.82	-4.82	300
8	-5.17	-5.17	160
9	-5.17	-5.17	160
10	-4.79	-4.79	310

Fonte: Autoria própria.

Após a realização dos cálculos de docking do composto Inda, utilizando o programa Discovery Studio (BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, 2014), foi possível identificar

as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade, apresentando ligações de hidrogênio com os aminoácidos Lys691, Asp535 e Thr700. Como pode-se ver na Figura 11.

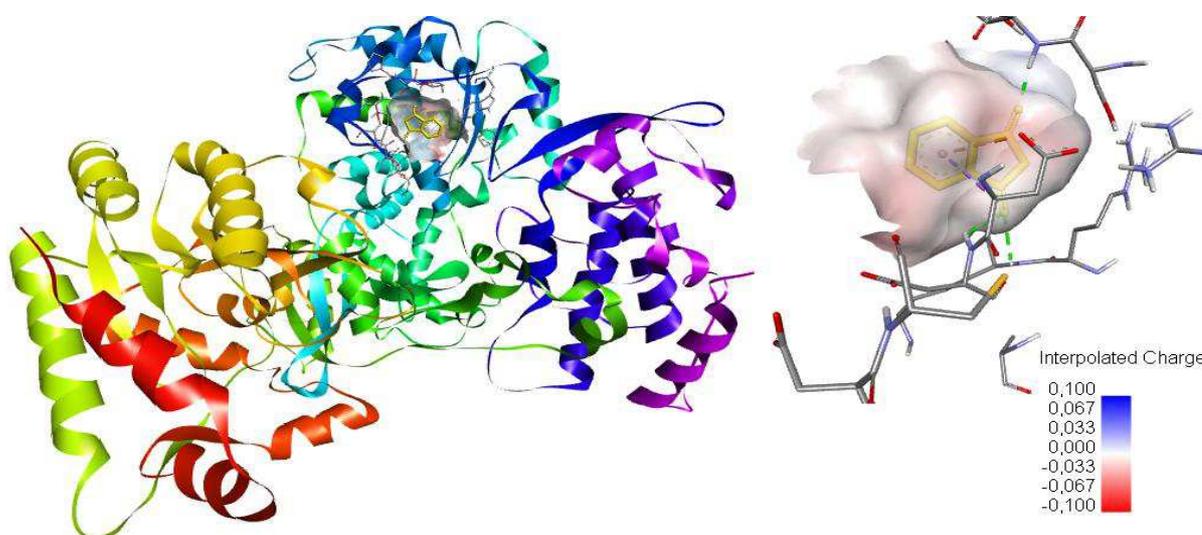
Figura 11: Visualização 2D do composto Inda e os Aminoácidos da NS5 de maior interação.



Fonte: Autoria própria a partir do *Software* Discovery Studio.

Ainda no uso do software Discovery Studio (BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, 2014) foi possível analisar a nuvem eletrostática do receptor (NS5), onde é possível notar que o local de atracamento está situado em uma região de interação neutra. Próximo ao local de encontro, também é possível notar uma região eletronegativa, um dos aminoácidos responsáveis é o resíduo âncora 535. Essas afirmações podem ser observadas na Figura 12.

Figura 12: Proteína NS5 RdRp com o composto inda (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação do receptor com o composto.



Fonte: Autoria própria a partir do *Software* Discovery Studio.

Oliveira (2017) analisou derivados da INDA testados contra esses alvos a West Nile vírus, dengue e zikv. Foi realizado ensaio enzimático com a protease de WNV; ensaios virucida, pré-tratamento e pós-tratamento em células Vero com os vírus DENV e ZIKV; além de estudo de docking para a proteína E do DENV e ZIKV e protease de WNV. A INDA se destacou apresentando alta taxa de inibição viral e baixa toxicidade contra WNV, DENV e ZIKV, atuando como inibidor alostérico da protease de WNV e por neutralização direta do DENV e ZIKV. Já Souza (2016) pesquisa objetivou a síntese e a avaliação das atividades antiviral, citotóxica e leishmanicida de uma série de derivados da INDA. Os resultados da avaliação do ensaio antiviral contra a protease NS2B-NS3 do West Nile Virus (WNV) e contra o vírus dengue-1 (DENV-1) mostraram que dos dezessete compostos submetidos aos ensaios, dois deles, 2-(4-hidroxibenzilideno)-1H-indeno[1,3(2H)-diona e 2-(3,4-diidroxibenzilideno)-1H-indeno-1,3(2H)-diona (17) foram os mais ativos em inibir a protease do WNV e bem como o vírus DENV-1.

5.1.2 DOCKING DA NS5 COM O COMPOSTO QUERCETINA

O Docking Molecular do flavonoide Quercetina com a Proteína NS5 RdRp apresentou constantes de inibição que variaram de 194.77 μ M a 6110 μ M. A Energia Livre de ligação foi negativa em basicamente todos os complexos, tendo atingindo -5.28 kcal/mol. Enquanto a Energia Intermolecular Final apresentou resultados expressivamente negativos atingindo -6.85 kcal/mol. Logo, os parâmetros evidenciam uma perfeita interação ligante-proteína entre as moléculas propostas (Tabela 2).

Tabela 2: KI ou Constante de inibição expressa (CIE) em μ M, Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4 entre a NS5 RdRp e o composto Flavonoide.

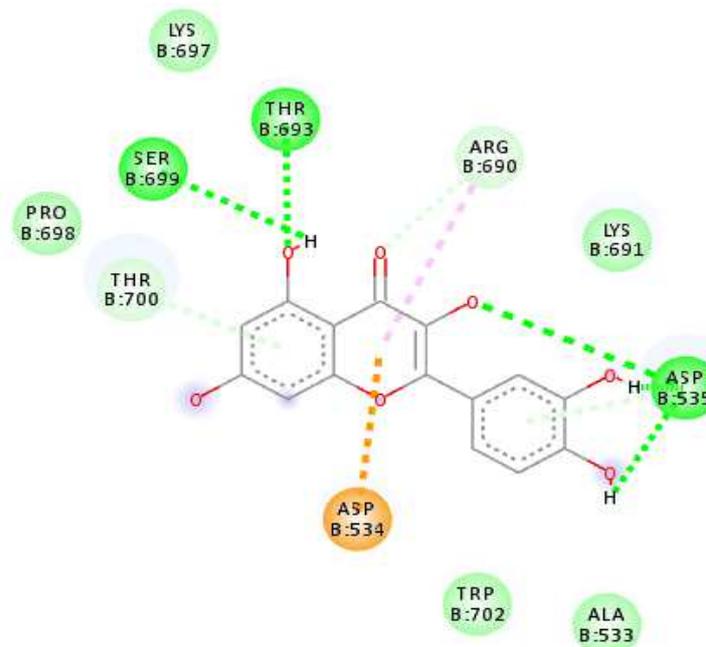
Complexo	Energia Livre de Ligação	Energia Intermolecular	Ki
1	-4.26	-6.05	753.20
2	-3.42	-5.51	3090
3	-4.67	-6.46	377.39
4	-3.17	-4.96	4720
5	-5.06	-6.85	194.77
6	-3.83	-5.62	1560
7	-5.28	-3.49	2760
8	-3.02	-4.81	6110
9	-3.17	-4.96	4720
10	-3.62	-5.41	2.20

Fonte: Autoria própria.

Com os cálculos de docking da Quercetina, utilizando Discovery Studio, foi possível identificar as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade, apresentando ligação

de hidrogênio com os aminoácidos Thr693, Ser699 e curiosamente ligada fortemente em três pontos ao aminoácido âncora Asp535, além de apresentar atração eletrostática com Asp 534. Como pode-se ver na Figura 13.

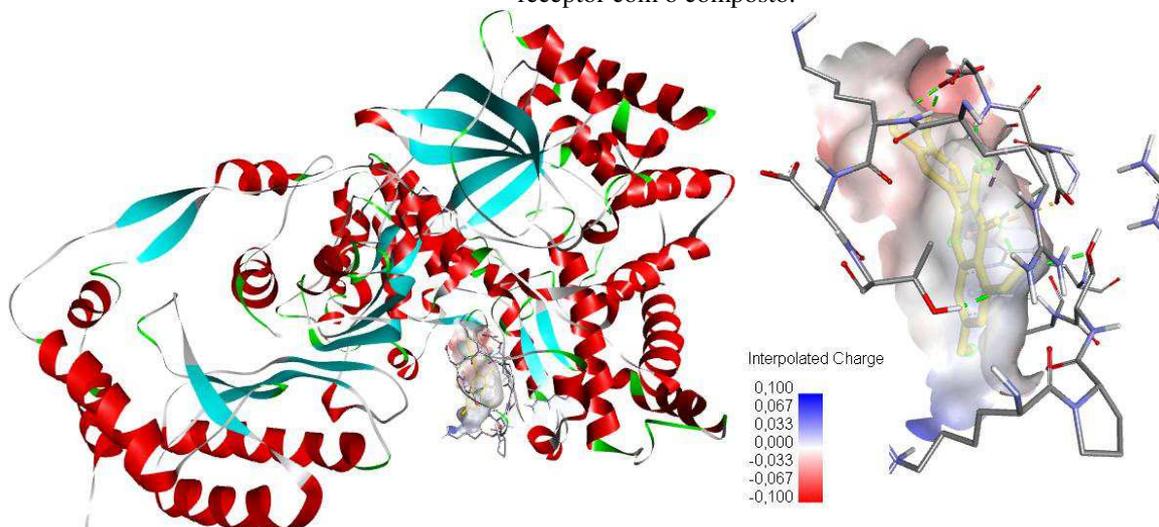
Figura 13: Visualização 2D do composto Quecertina e os aminoácidos da NS5 de maior interação.



Fonte: Autoria própria a partir do *Software* Discovery Studio.

Utilizando o Discovery Studio foi possível analisar a nuvem eletrostática do receptor, onde notou-se que o local de atracamento está situado em uma região de interação neutra. As regiões mais próximas a ligação mostram-se negativas, o Asp535 é um dos aminoácidos responsáveis nessa interação. Essas afirmações podem ser observadas na Figura 14.

Figura 14: Proteína NS5 RdRp com o composto Quecertina (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação do receptor com o composto.



Fonte: Autoria própria a partir do *Software* Discovery Studio.

Ribeiro (2018) avaliou a atividade antiviral in vitro da Quercetina Penta-acetilada (QPA) em células permissivas à infecção/replicação por hRSV (HEp-2). Os ensaios antivirais foram realizados com diferentes MOIs (0.1, 0.5 e 1.0) e analisados por adição do sal de MTT e posteriormente confirmados por ensaio de placa de lise. O composto QPA apresentou atividade anti-hRSV nos protocolos virucida e de pós-tratamento. Carvalho et al (2013) demonstraram em ensaios in vitro a atividade virucida da quercetina sobre o parvovírus canino. Para avaliação do efeito antiviral, a redução do título viral foi de 93% para concentração de 3 micrograma/ml de quercetina incubada com vírus. No mesmo estudo, foi observada também a redução do título viral na dose dependente na concentração de 1,5 micrograma/ml em testes de determinação de atividade sobre a células (CARVALHO et al, 2013).

5.1.3 DOCKING NS5 COM O COMPOSTO TERPENÓ (1)

Os resultados do Docking (Tabela 3) demonstraram que mesmo com a variação em cada conformação, os dez complexos de mostraram boas constantes de inibição (K_i), variando de 1.01 μM a 985.52 μM , além de baixos valores de Energia Intermolecular Final e Energia Livre, demonstrando respectivamente -6.21 kcal/mol e -6.26 kcal/mol evidenciando uma eficiência na ligação do terpeno com a NS5.

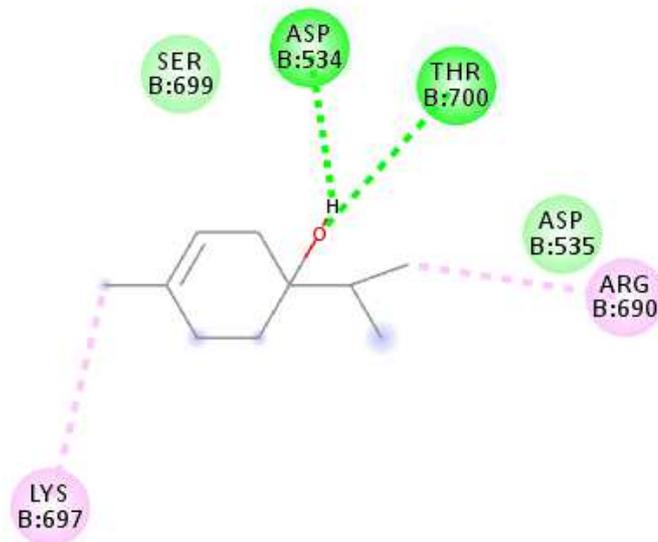
Tabela 3: K_i ou Constante de inibição expressa (CIE) em μM , Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4 entre a NS5 RdRp e o composto terpeno 1.

Complexo	Energia Livre de Ligação	Energia Intermolecular	K_i
1	-4.74	-5.34	333.9
2	-4.73	-5.32	342.31
3	-4.03	-4.63	1.11
4	-5.61	-6.21	77.28
5	-4.09	-4.68	1.01
6	-4.51	-5.10	497.7
7	-4.40	-3.80	1.63
8	-4.70	-4.10	985.52
9	-6.18	-5.58	81.35
10	-6.26	-5.67	69.99

Fonte: Autoria própria.

A partir dos complexos obtidos com o Docking Molecular foi possível identificar as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade, apresentando ligação de hidrogênio com os aminoácidos Asp534, além de apresentar ligações de van der Waals com Asp 535 e Ser699. Como pode-se ver na Figura 15.

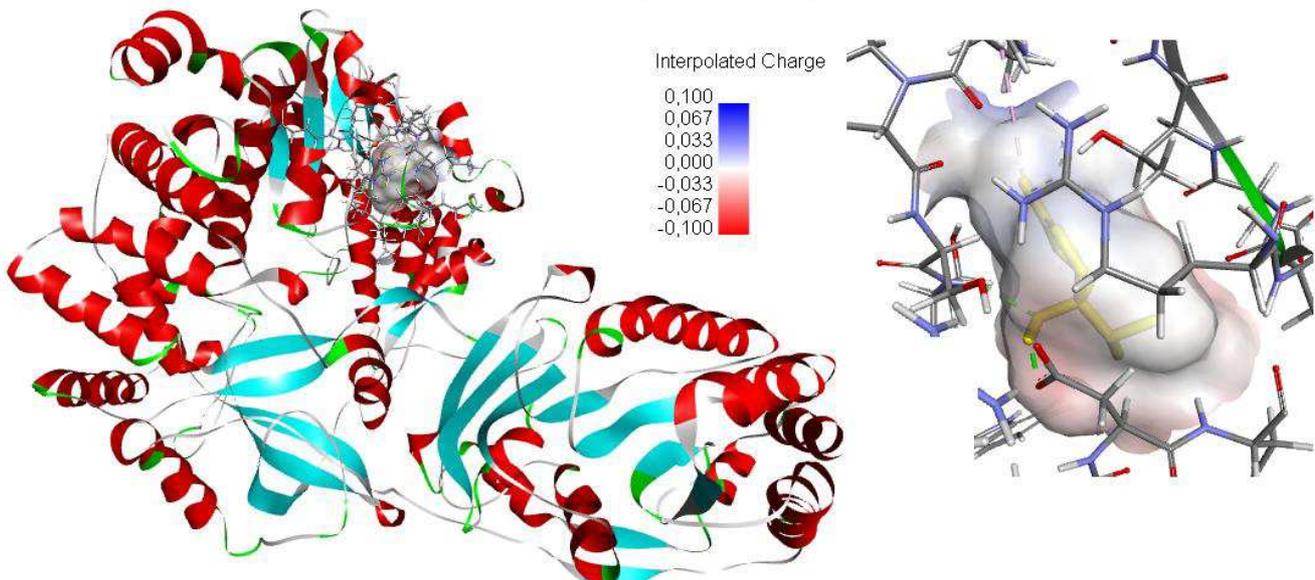
Figura 15: Visualização 2D do composto terpeno 1 e os aminoácidos da NS5 de maior interação.



Fonte: Autoria própria a partir do *Software* Discovery Studio.

Na figura 16 a seguir, é demonstrado a análise feita a partir do DS a nuvem eletrostática do receptor, onde é possível notar que o local de atracamento está situado em uma região de interação neutra.

Figura 16: Proteína NS5 RdRp com o composto terpeno 1 (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação do receptor com o composto.



Fonte: Autoria própria a partir do *Software* Discovery Studio.

Alguns trabalhos já relatam a atividade antiviral desta molécula, Garozzo et. Al. (2011) realizou uma investigação a atividade antiviral dos metabólitos secundários do óleo essencial de

Melaleuca alternifolia (ETT), os resultados mostraram que o ETT tem uma atividade antiviral contra o subtipo H1N1 do vírus influenza A/PR/8 e que a atividade antiviral tem sido atribuída principalmente ao terpeno (-) como principal componente ativo. Astani et. Al. (2010) realizou um trabalho com os óleos essenciais provenientes do eucalipto para validar sua atividade antiviral contra a herpes simplex vírus tipo 1 (HSV -1), os monoterpenos (inclusive o terpeno (-)) conseguiram cerca de 80% de inibição do HSV. Além de atividade contra o vírus da gripe (Garozzo et al., 2011). Outro trabalho que vale a pena ressaltar, evidencia a multiação do terpeno (-) foi realizado por Bishop (1995), onde o monoterpeno apresentou atividade antiviral contra o vírus do mosaico do tabaco.

5.1.4 DOCKING NS5 COM O COMPOSTO TERPENO (2)

Análise semelhante foi feita para a simulação de *docking* entre a NS5 e o outro enantiômero do composto terpeno (1), o composto terpeno (2). O resultado também evidencia uma termodinâmica favorável do complexo, porém com um valor menor de energia livre de ligação, de -5.22 kcal/mol. Já a energia intermolecular de menor valor foi vista no complexo 2, -5.82 kcal/mol. Da mesma forma que o composto terpeno (1), os resultados de Ki se mostraram eficientes, variando de 1.03 μ M a 807.38 μ M

Tabela 4: KI ou Constante de inibição expressa (CIE) em μ M, Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4 entre a NS5 RdRp e o composto terpeno 2.

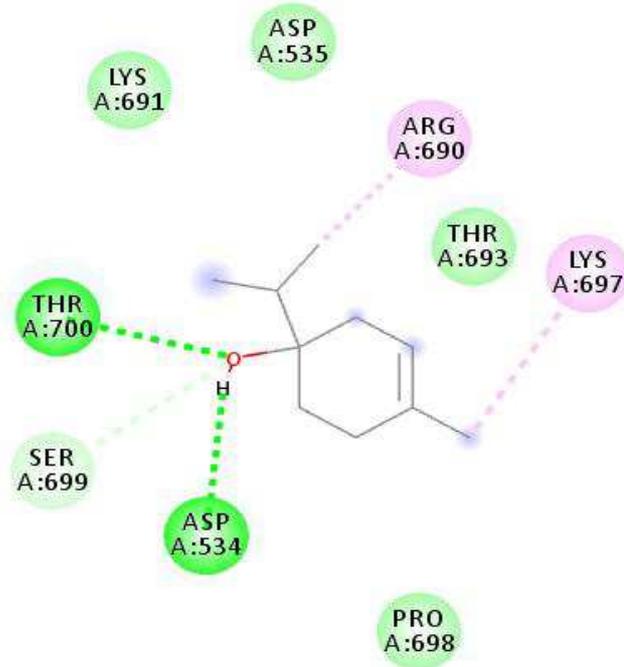
Complexo	Energia Livre de Ligação	Energia Intermolecular	Ki
1	-4.08	-4.73	1.03
2	-5.22	-5.82	148.49
3	-4.88	-5.48	264.87
4	-3.81	-4.41	1.60
5	-4.03	-4.62	1.12
6	-4.75	-5.34	331.91
7	-4.82	-5.42	293.16
8	-4.22	-4.82	807.38
9	-4.28	-4.88	723.36
10	-4.69	-5.29	365.31

Fonte: Autoria própria.

Na análise feita com o Discovery Studio, o Docking do enantiômetro terpeno (2), identificou-se as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade, apresentando ligação de hidrogênio com os aminoácidos Asp534, assim como no terpeno (1), além da mesma

ligação com o aminoácido Thr700. Além disso, ligações de van der Waals com Asp 535, Ser699, Lys691, Thr693 (Figura 17).

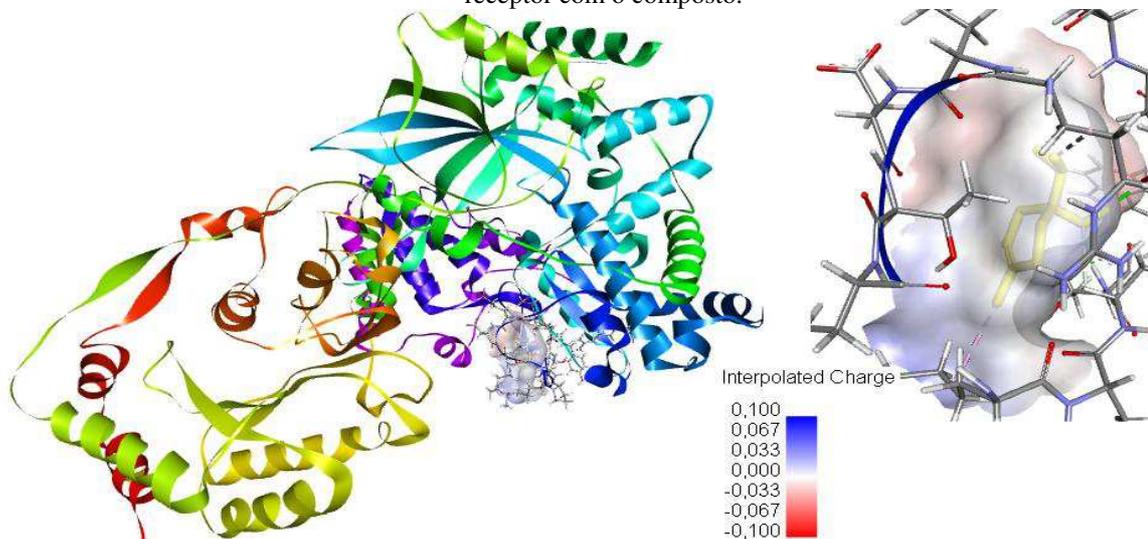
Figura 17: Visualização 2D do composto terpeno 2 e os aminoácidos da NS5 de maior interação.



Fonte: Autoria própria a partir do *Software* Discovery Studio.

Ainda em uso do Discovery Studio foi possível analisar a nuvem eletrostática do receptor (Figura 18), onde é notável que o local de atracamento está situado em uma região de interação neutra, porém percebe-se que perto da interação existem locais carregados eletronegativamente.

Figura 18: Proteína NS5 RdRp com o composto terpeno 2 (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação do receptor com o composto.



Fonte: Autoria própria a partir do *Software* Discovery Studio.

5.1.5 DOCKING NS5 COM O COMPOSTO TERPENOS 3

Como é exposto na Tabela 5, O terpeno (3) indicou índices de constante de inibição que chegaram a atingir 6170 (μM), enquanto as energias Intermolecular e Livre se mostraram nos dez complexos negativas, obtendo respectivamente -5.34kcal/mol e -4.16kcal/mol, o que é uma evidência forte de boa interação termodinâmica entre a NS5 e o composto em questão.

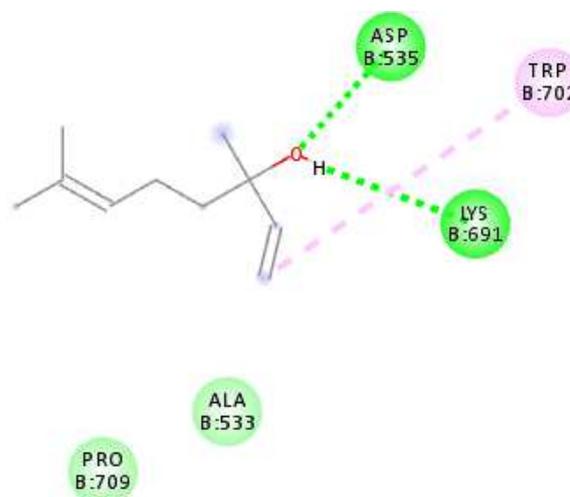
Tabela 5: KI ou Constante de inibição expressa (CIE) em μM , Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4 entre a NS5 RdRp e o composto terpeno 3.

Complexo	Energia Livre de Ligação	Energia Intermolecular	Ki
1	-3.51	-5.00	2670
2	-3.63	-5.12	2180
3	-3.84	-5.34	1520
4	-3.05	-4.54	5850
5	-3.83	-5.33	1550
6	-3.22	-4.71	4360
7	-3.20	-4.69	4510
8	-3.01	-4.51	6170
9	-4.16	-5.65	893.30
10	-3.25	-4.75	4120

Fonte: Autoria própria.

Com os cálculos de docking do composto terpeno 3, utilizando Discovery Studio, foi possível identificar as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade, apresentando ligação de hidrogênio com os aminoácidos Lys691 e o resíduo âncora Asp535, além de apresentar atração eletrostática com Trp702. A visualização destes resultados está em exposição na Figura 19.

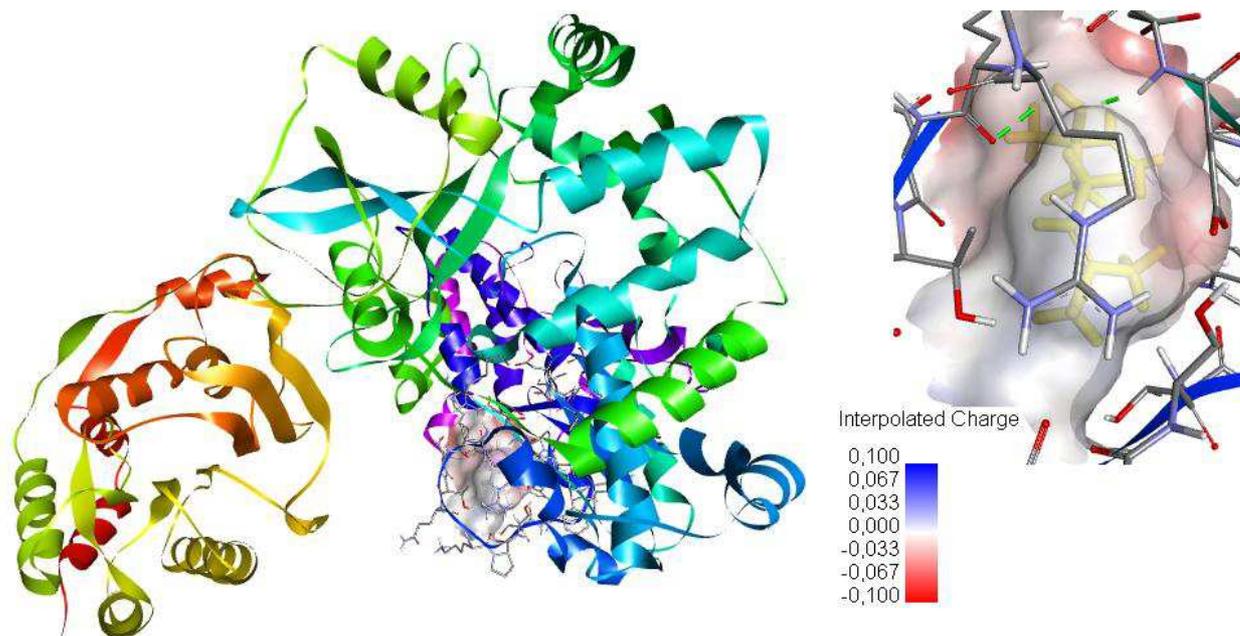
Figura 19: Visualização 2D do composto terpeno 3 e os aminoácidos da NS5 de maior interação.



Fonte: Autoria própria a partir do *Software* Discovery Studio.

A figura 20 evidencia a análise da nuvem eletrostática do receptor (NS5), feita a partir do *Discovery Studio*, permitiu notar que o local de atracamento está situado em uma região de interação neutra, porém as regiões mais próximas a ligação mostram-se negativas, o Asp535 mais uma vez é um dos aminoácidos responsáveis nessa interação.

Figura 20: Proteína NS5 RdRp com o composto terpeno 3 (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação do receptor com o composto.



Fonte: Autoria própria a partir do *Software* Discovery Studio.

Pereira (2014) que evidenciou que o terpeno (3) fornecem maior efeito larvicida contra *Aedes aegypti* L. Casian et al (2010) realizaram um trabalho investigativo sobre a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho, como resultados, foi comprovado ação antimicrobiana do óleo essencial sobre as bactérias testadas, além de comprovarem a atividade antioxidante atingindo valor máximo de 97,49%. Logo, o trabalho atual, mostra indícios claros de uma possível ação também como antiviral deste composto.

5.1.6 DOCKING NS5 COM O COMPOSTO TERPENO 4

Através da simulação de *docking* entre a NS5 RdRp e o composto terpeno 4, foram gerados os dados evidenciados na Tabela 6. A partir desses resultados pode-se observar que a menor energia livre de ligação e energia intermolecular calculada para a NS5 foi respectivamente -6,18 kcal/mol e -6.13kcal/mol, valores altamente negativos que implicam na afirmação que é mais

termodinamicamente favorável a existência das moléculas em um complexo do que separadas (BRAZ, 2016). Já as constantes de inibição K_i variaram de $87.41\mu\text{M}$ a $795.91\mu\text{M}$.

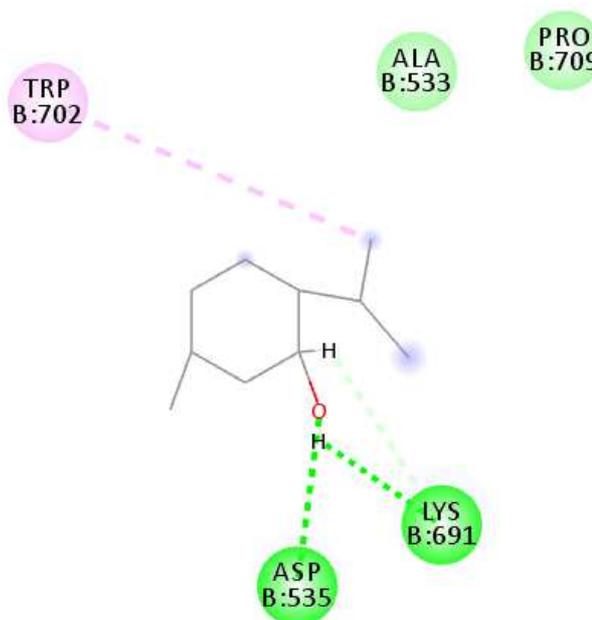
Tabela 6: K_i ou Constante de inibição expressa (CIE) em μM , Energia estimada livre (EEL) em kcal/mol e energia intermolecular final (EIF) estimada pelo programa AutoDock4 entre a NS5 RdRp e o composto terpeno 3.

Complexo	Energia Livre de Ligação	Energia Intermolecular	K_i
1	-5.06	-5.66	194.66
2	-5.26	-5.86	139.07
3	-4.23	-4.82	795.91
4	-5.08	-5.67	190.37
5	-4.64	-5.24	397.99
6	-5.50	-6.09	93.78
7	-5.28	-5.88	135.13
8	-5.43	-6.02	105.29
9	-5.54	-6.13	87.41
10	-5.35	-5.95	119.56

Fonte: Autoria própria.

O *Discovery studio* evidenciou em sua análise visual as interações diretas dos aminoácidos da NS5 que mais interagiram com o ligante (terpeno 4). A análise obteve como resultado ligação de hidrogênio com os aminoácidos Lys691 e o aminoácido âncora 535, além de apresentar ligações de van der Waals com Ala533 e Pro709 (Figura 21).

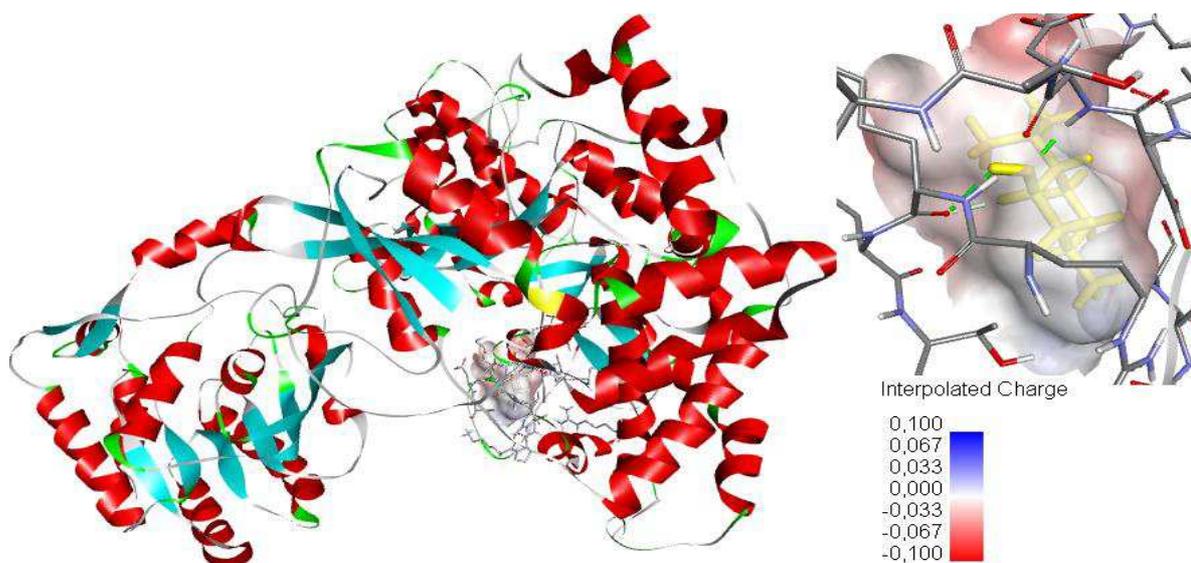
Figura 21: Visualização 2D do composto terpeno 4 e os aminoácidos da NS5 de maior interação.



Fonte: Autoria própria a partir do *Software* Discovery Studio.

A figura 22 evidenciou a análise da nuvem eletrostática do receptor (NS5), feita a partir do DS, permitiu-se notar que o local de atracamento está situado em uma região de interação neutra, porém as regiões mais próximas a ligação mostram-se negativas, o Asp535 mais uma vez é um dos aminoácidos responsáveis nessa interação.

Figura 22: Proteína NS5 RdRp com o composto terpeno 4 (em amarelo) e a nuvem eletrostática da interação do receptor com o composto.



Fonte: Autoria própria a partir do *Software* Discovery Studio.

Apesar de ainda não haver relatos de funções antivirais, este composto apresenta algumas atividades e funções diversas já relatadas na literatura, Lopes et al (2016) realizaram um trabalho de avaliação da eficácia do óleo essencial de *Mentha arvensis*, e de seu majoritário terpeno (4), no controle de *Haemonchus contortus* em ovelhas, apesar de obter apenas 61,6% de eficácia, não houveram resultados com relação a toxicidade do terpeno (4). Padua et al (2010) e Teixeira (2011), relataram a atividade analgésica do composto, em estudos in vivo. Almeida et al. (2015), comprovaram as respostas hipotensora, bradicárdica, inotrópica negativa e vasorrelaxante induzidas por OEMV, rotundifolona e Terpeno (4) foram significativamente mais potentes em ratos SHR. Já Moraes (2009) evidenciou alguns chás que contém substâncias com ação antioxidante, entre elas o terpeno (4).

5.2 DETERMINAÇÃO ENERGÉTICA DOS AMINOÁCIDOS PROTEÍNA-LIGANTE OBTIDA ATRAVÉS DO FRACIONAMENTO MOLECULAR COM CAPS CONJUGADOS (MFCC)

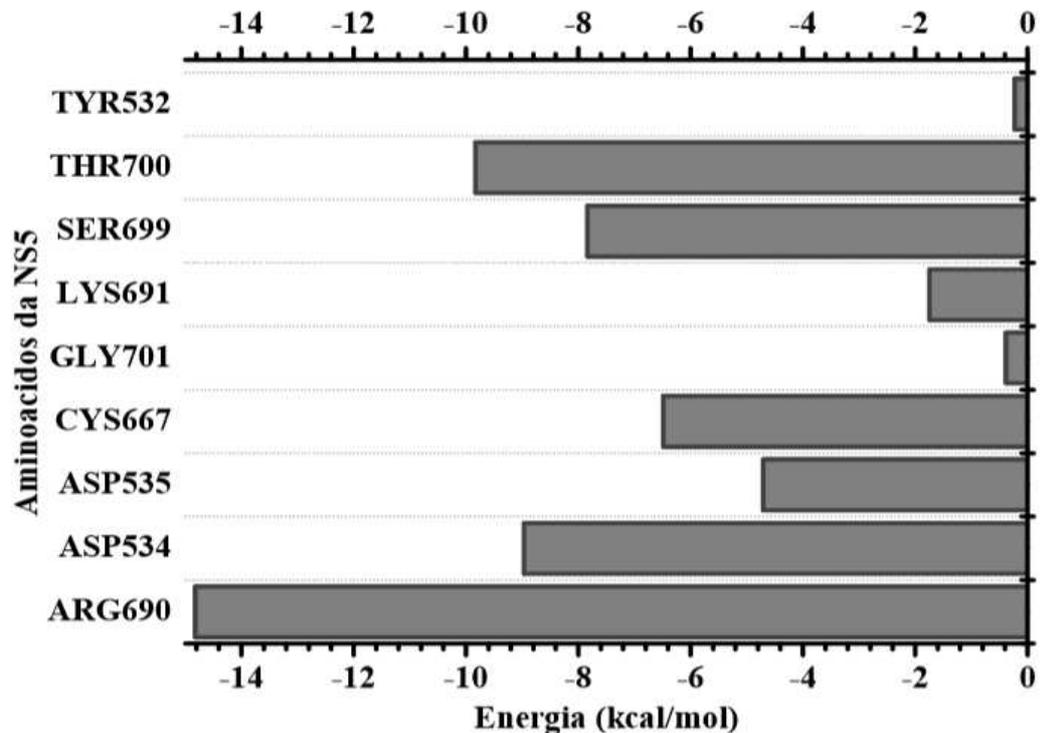
Os aminoácidos que apresentaram distância maior que 12 Å foram desconsiderados para a etapa de realização dos cálculos utilizando MFCC. Através de cálculos de Mecânica Quântica e do método de Fracionamento Molecular com Capuzes Conjugados (MFCC), as energias de interação entre a proteína de replicação viral (NS5 RdRp) e os ligantes foram determinadas.

5.2.1 MFCC PARA O COMPOSTO INDA

Os valores de energia evidenciados no gráfico 1 demonstram que os aminoácidos em destaque na ligação participam de forma atrativa no complexo de interação entre a NS5 e o ligante INDA, isto, tendo em vista as fortes energias negativas entre os nove aminoácidos (TYR 532, ASP 534, ASP 535, CYS 667, ARG 690, LYS 691, SER 699, THR 700 e GLY 701) do receptor (NS5) com o ligante em questão.

Comparando os valores energéticos com a distância individual de cada um, observa-se que as interações não estabelecem um padrão. Iniciando da menor interação para a maior, o aminoácido TYR 532 obteve energia de interação de -0,23 kcal/mol e 8,71 Å de distância de seu centroide para o centroide do receptor, o GLY 701 apresentou valor energético de interação de -0,38 kcal/mol e distância de 8,12 Å, a LYS 691 demonstrou energia de -1,75 e distância de 6,91 Å, o CYS 667 apresentou -3,07 kcal/mol e distância de 9,58 Å, o ASP 535 obteve -4,71 kcal/mol de energia enquanto sua distância foi de 5,41 Å, a SER 699 apresentou energia de -7,84 kcal/mol e distância de 6,53 Å, o ASP 535 demonstrou energia de -8,97 kcal/mol e distância de 3,92 Å, o THR 700 obteve energia de -9,83 kcal/mol e distância de 5,78 Å, o ultimo aminoácido em destaque, foi o ARG 690, demonstrando uma absurda energia de -14,82 kcal/mol e distância de 6,48 Å.

Gráfico 1: Energia de ligação dos principais aminoácidos da proteína NS5 com o ligante INDA.



Fonte: Autoria própria.

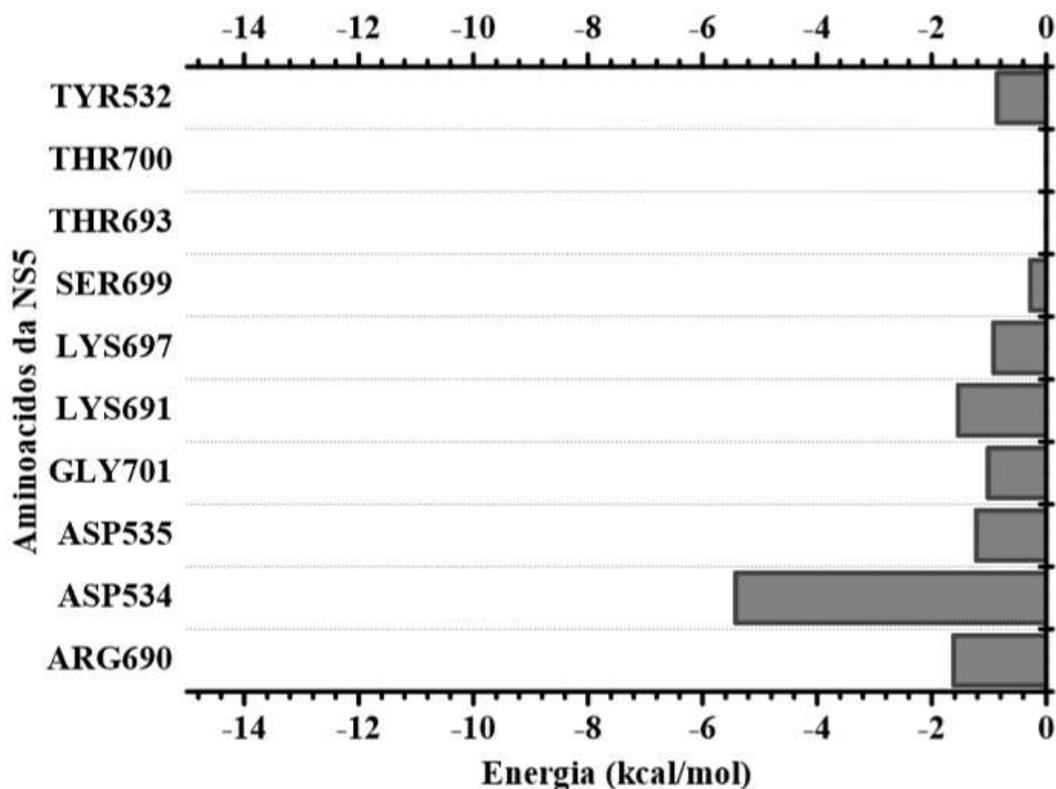
Conforme é exposto, os aminoácidos de maior energia de interação é a ARG, a arginina pode firmar ligações de hidrogênio com água, substrato ou cadeias laterais de aminoácidos, este último, é o motivo pelo qual este aminoácido pode ser identificado em sítios na cadeia polipeptídica de proteínas tendo relevância para a atividade e/ou regulação da atividade biológica das mesmas, outra característica a ser salientada é que a ARG possui preferencialmente energia positiva indicando que a mesma possui tendência a obter ligações com grupos negativamente carregados (CARDOSO, 2018), isto explica o que foi demonstrado neste trabalho, onde a arginina é responsável por 28,71% da atividade da NS5 com o ligante INDA. O segundo aminoácido de maior interação foi a TRH (treonina), obtendo 19,04% de energia entre a NS5 e o ligante, resultado similar ao de Oliveira (2015) que investigou a capacidade de transporte eletrônico formado por cadeias, onde o TRH sozinho demonstrou 14,94% de participação na interação entre as cadeias. O último aminoácido explícito é o ASP (Ácido aspártico) que apresentou 17,38% de valor energético, o mesmo é polimérico demasiadamente hidrofílico que vem sendo utilizado em estudos como um importante ligante de atividade catalítica (VARKEY; ANTONY; AJIL, 2018). Segundo Godoy (2017) o ASP 535 é um aminoácido âncora, tendo importância da ativação do sítio ativo da proteína, logo, este resultado do ASP 534 (aminoácido lateral do ASP 535) é correspondente com a literatura, de forma individual o ASP 535 obteve 9,12% de atividade individual pelo ligante.

5.2.2 MFCC PARA O COMPOSTO QUECERTINA

O gráfico 2 evidencia todos os aminoácidos que se destacaram na importância da interação entre a NS5 e o composto QUECERTINA, estes foram: ARG 690, ASP 534, ASP 535, GLY 701, LYS 691, LYS 697, SER 699, THR 693, THR 700 E TYR 532.

Partindo da mesma lógica de análise, do aminoácido que menos interagiu para o que mais interagiu, o THR 693 e o THR 700 obtiveram respectivamente 0,78 kcal/mol e 0,88kcal mol demonstrando uma leve repulsão pelo ligante, o fato dos mesmos estarem em um raio menor que 6Å do centroide do ligante, indica que a variável distância nem sempre é primordial para a atratividade entre as moléculas. A SER 699 apresentou -0,28 kcal/mol de energia e distância de 6,99 Å, o TYR 532 demonstrou -0,86 kcal/mol e 9,62 Å de distância, a LYS 697 obteve -0,92 kcal/mol e 9,27 Å de distância. A GLY 701 demonstrou -1,01 kcal/mol de energia, o ASP 535 indicou -1,22 kcal/mol de energia e 5,78 Å de distância, a LYS 691 apresentou -1,54 kcal/mol de energia e 6,47 Å de distância, a ARG 690 indicou -1,62 kcal/mol e 6,45 Å de distância, e o aminoácido com maior energia de interação foi o ASP 534 com -5,42 kcal/mol de energia e uma distância de 4,86 Å do centroide do receptor (NS5) até o ligante em questão (QUERCERTINA).

Gráfico 2: Energia de ligação dos principais aminoácidos da proteína NS5 com o ligante QUECERTINA.



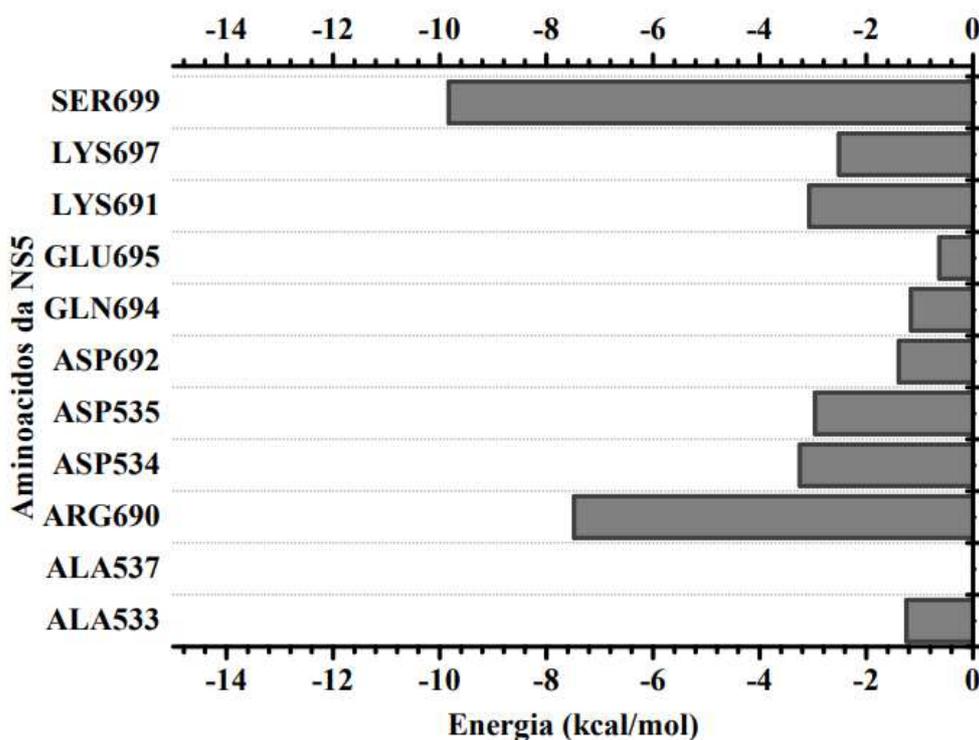
Fonte: Autoria própria.

Claramente o aminoácido ASP (ácido aspártico) obteve maior nível de atratividade, sendo responsável por 48,30 % da interação entre a NS5 e o ligante QUECERTINA. Seguido da ARG (arginina) com 14,44% e a LYS (lisina) com 13,72%.

5.2.3 MFCC PARA O COMPORTEO TERPENOS (1)

Os aminoácidos que demonstraram maior interação no atracamento da NS5 com o composto TERPENOS (1) foram: ALA 533, ALA 537, ARG 690, ASP 534, ASP 535, ASP 692, GLN 694, GLU695, LYS 691.

O aminoácido ALA 537 repeliu levemente com relação ao ligante, obtendo energia de 0,59 kcal/mol, o mesmo estava a uma distância de 8,94 Å de distância do centroide do TERPENOS (1). O GLU 695 apresentou energia de interação de -0,63 kcal/mol e 11,69 Å de distância, a GLN 694 demonstrou -1,16 kcal/mol de energia enquanto sua distância foi de 11,04 Å, a ALA 533 indicou energia de -1,25 kcal/mol e 8,94 Å de distância, o ASP 692 apresentou -1,39 Kcal/mol e 6,00 Å de distância, a LYS 697 demonstrou -2,51 Kcal/mol de energia e 10,13 Å de distância, o ASP 535 indicou -2,96 Kcal/mol de energia e 4,91 Å de distância, a LYS 691 demonstrou -3,07 Kcal de energia e 6,00 Å de distância, o ASP 534 apresentou -3,24 Kcal/mol de energia e 4,14 Å de distância, a ARG 690 demonstrou -7,48 de energia e 5,86 Å de distância, e por último, o aminoácido que interagiu mais fortemente foi o SER 699 com -9,83 Kcal mol de energia e 7,11 Å de distância do centro de massa (centroide) da NS5 para o centro de massa o ligante TERPENOS (1).

Gráfico 3: Energia de ligação dos principais aminoácidos da proteína NS5 com o ligante TERPENNO (1).

Fonte: Autoria própria.

A SER (serina) foi o aminoácido de maior atratividade no complexo de interação da NS5 com o ligante TERPENNO (1), obtendo um valor de representação de energia de 29,83%, a ARG (arginina) representou 22,70% e o terceiro aminoácido com maior participação foi o ASP (ácido aspártico) com 9,86%.

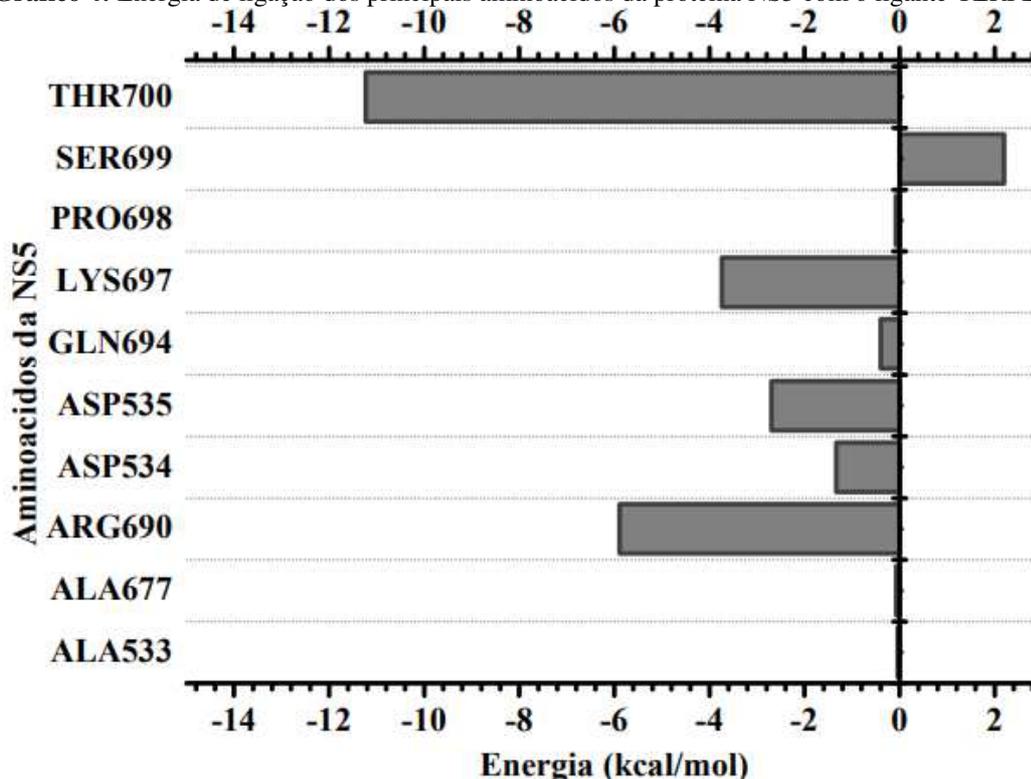
5.2.4 MFCC PARA O COMPOSTO TERPENNO (2)

Os aminoácidos da NS5 de maior interação energética com o TERPENNO (2) foram ALA 533, ALA 677, ARG 690, ASP 534, ASP 535, GLN 694, LYS 697, PRO 698, SER 699, THR 700 e THR 700 e os resultados estão explícitos no gráfico 4 a seguir.

Todos os aminoácidos demonstraram atratividade exceto a SER 699, apesar de sua distância do centroide ser de apenas 4,40 Å de distância, a mesma indicou um valor energético de 2,20 Kcal/mol de energia. Os demais apresentaram energias individuais com um alto nível de negatividade para o complexo, os valores de energia e distância foram respectivamente: a ALA 533 (-0,04 Kcal/mol e 7,87 Å), ALA 677 (-0,07 Kcal/mol e 8,77 Å), PRO 698 (-0,08 Kcal/mol e 8,01 Å), GLN 694 (-0,40 Kcal/mol e 8,68 Å), ASP 534 (-1,33 Kcal/mol e 5,49 Å), ASP 535 (-2,70 Kcal/mol e 8,00 Å), LYS 697 (-3,74 Kcal/mol e 7,39 Å), ARG 690 (-5,89 Kcal/mol e 5,53

Å) e por último o aminoácido de maior energia atrativa no complexo NS5 mais TERPENO (2) foi o THR 700 apresentando -11,23 Kcal/mol e distância de 5,12 Å do centro de massa da NS5 para o centro de massa do aminoácido.

Gráfico 4: Energia de ligação dos principais aminoácidos da proteína NS5 com o ligante TERPENO (2).



Fonte: Autoria própria.

Em termos de porcentagem, os três aminoácidos mais importantes para a ligação entre a NS5 e o TERPENO (2) é o THR (treonina) com 48,23%, seguido da ARG (arginina) 25,30% e LYS (lisina) com 16,06% de energia.

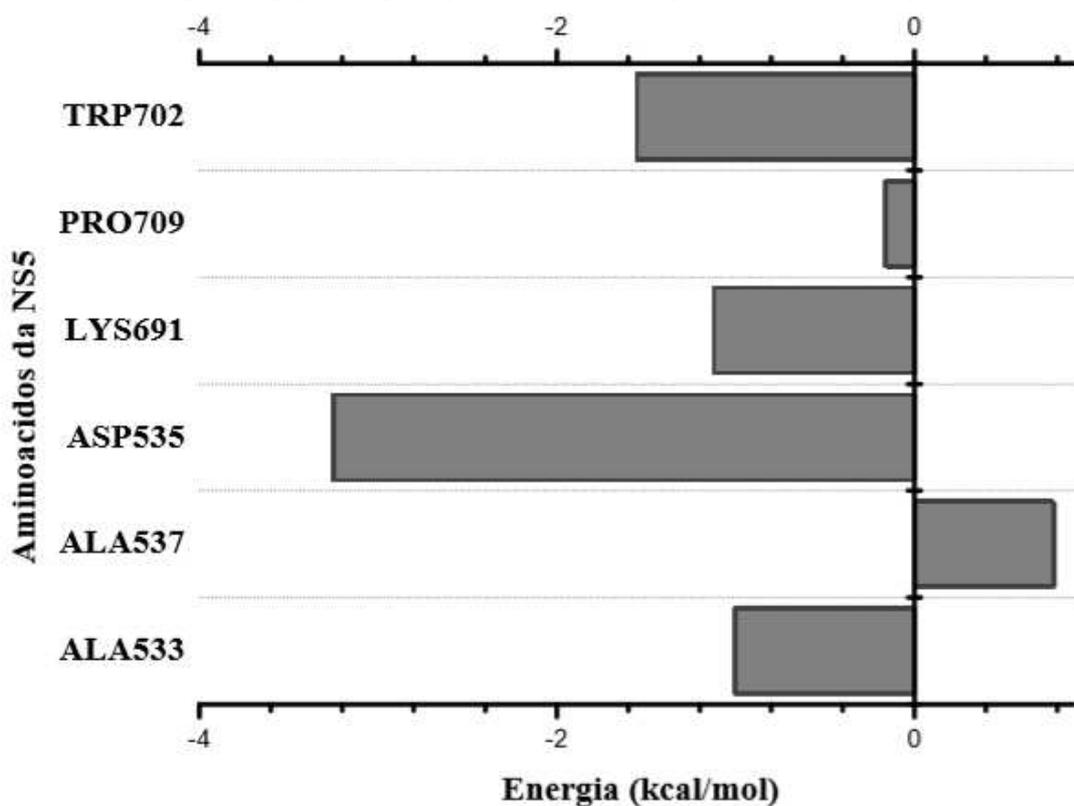
5.2.5 MFCC PARA O COMPOSTO TERPENO (3)

As energias evidenciadas no gráfico 5 demonstram que os aminoácidos em destaque na ligação participam de forma atrativa no complexo de interação entre a NS5 e o ligante TERPENO (3), isto, tendo em vista as fortes energias negativas entre os seis aminoácidos (ALA 533, ALA 537, ASP 535, LYS 691, PRO 709, TRP 702) do receptor (NS5) com o ligante em questão.

A ALA obteve valor energético de 0,78 Kcal/mol, demonstrando uma leve repulsa pelo Terpeno (3), e sua distância do centro de massa do mesmo foi de 9,57 Å de distância, o PRO 709 apresentou -0,16 Kcal/mol de energia e 9,26 Å de distância, a ALA 533 indicou -1,00 Kcal /mol

de energia e 6,19 Å de distância, a LYS 691 obteve -1,12 Kcal/mol de energia e 6,09 Å de distância, o TRP 702 apresentou -1,55 Kcal/mol de energia e 9,12 Å de distância, e o aminoácido com maior participação nesta interação foi o ASP 535 com -3,24 Kcal/mol de energia e distância de 5,44 Å do centro de massa do ligante.

Gráfico 5: Energia de ligação dos principais aminoácidos da proteína NS5 com o ligante TERPENO (3).



Fonte: Autoria própria.

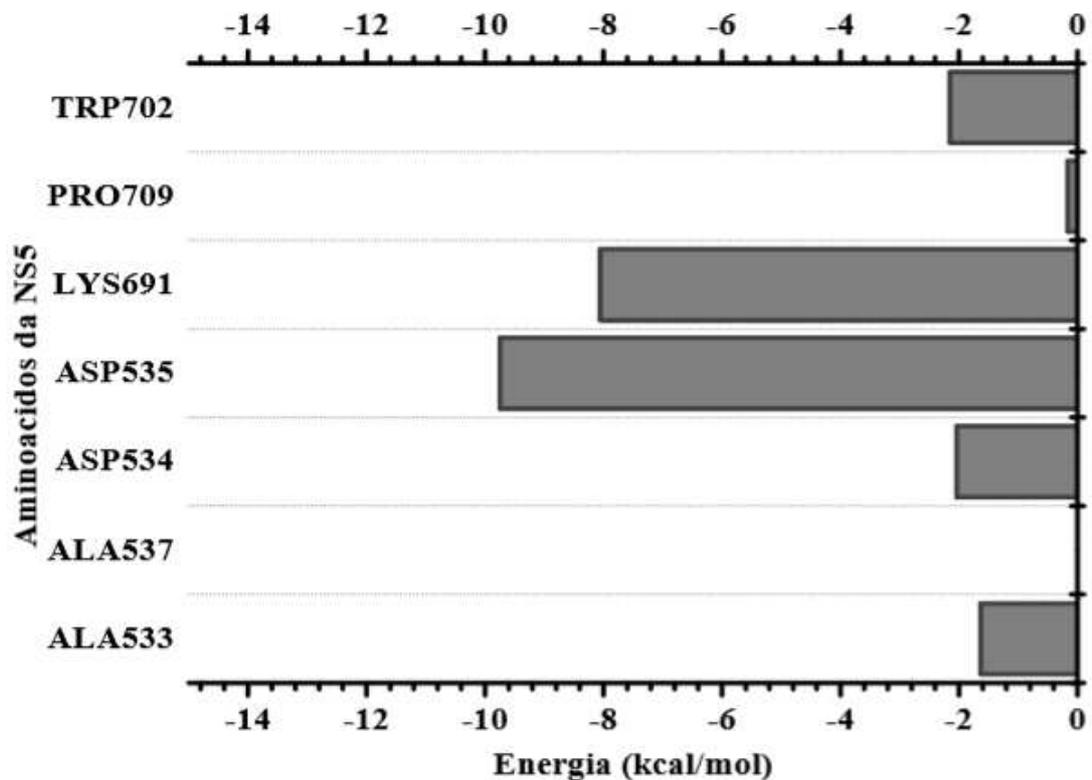
Como foi visto, o ASP (ácido aspártico) foi o aminoácido com maior participação efetiva na atratividade entre o complexo formado pela NS5 e o composto TERPENO (3), representando 51,58% da energia do sistema, os outros dois aminoácidos de maior interação foram o TRP (triptofano) com 24,60% e a LYS (lisina) com 17,77%.

5.2.6 MFCC PARA O COMPOSTO TERPENO (4)

No gráfico 6 a seguir entram em destaque os oito aminoácidos de maior interação no ancoramento entre a NS5 e o composto TERPENO (4), foram: ALA 533, ALA 537, ASP 534, ASP 535, LYS 691, PRO 709, TRP 702 E TYR 532.

O aminoácido ALA 533, apresentou uma energia de 0,15 Kcal/mol, o que demonstra uma leve repulsão ao ligante, a seguir é evidenciado da menor interação para a maior com suas energia e respectivas distâncias. TYR 532 (-0,23 Kcal/mol e 9,45 Å), a ALA 533 (-1,63 Kcal/mol e 5,70 Å), o ASP 534 (-2,04 Kcal/mol e 4,25 Å), o TRP 702 (-2,15 Kcal/mol e 8,87 Å), a LYS 691 (-8,05 Kcal/mol e 6,15 Å) e o aminoácido de maior atividade atrativa nesse sistema foi o ASP 535 com -9,75 Kcal/mol e 5,08 Å de distância do centro de massa da NS5 para o centro de massa do ligante TERPENNO (4).

Gráfico 6: Energia de ligação dos principais aminoácidos da proteína NS5 com o ligante TERPENNO (4).



Fonte: Autoria própria.

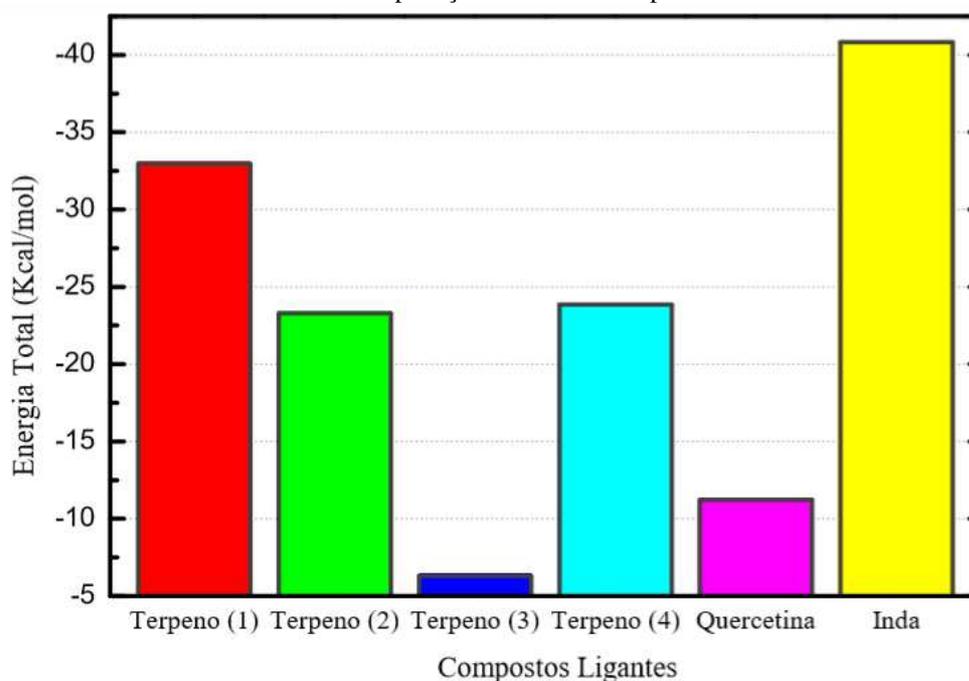
Baseando-se nesta evidência, podemos salientar que o ASP (ácido aspártico) mais uma vez foi o aminoácido com maior energia de atratividade com o ligante, sua representação foi de 40,88% na ligação entre a proteína NS5 e o TERPENNO (4), o segundo aminoácido de maior participação foi a LYS (lisina) com 33,75% e o TRP (triptofano) com 9,01%.

5.3 ENERGIA TOTAL OBTIDA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FRACIONAMENTO DE CAPS E CONJUGADOS (MFCC)

Os cálculos ab initio descreve propriedades de transporte eletrônico de junções moleculares (ALBUQUERQUE et al., 2014). A disposição do balanço de energia final $(E_i(L - R^i) = E(L + C^{1-i} R^i C^{i+1}) - E(C^{1-i} R^i C^{i+1}) - E(L + C^{1-i} C^{i+1}) + E(C^{1-i} C^{i+1}))$ está em evidência no gráfico 7, e refletem a contribuição individual de cada aminoácido na interação entre a o receptor (Proteína NS5) e os ligantes (INDA, QUECERTINA, TERPENOS (1), TERPENOS (2), TERPENOS (3) e TERPENOS (4)).

Como pode ser visto no gráfico 7, todos os ligantes mostraram-se eficientes na ligação com o receptor, tendo em vista valores altamente negativos em sua energia quântica de ligação. De acordo com os cálculos realizados o balanço energético total o TERPENOS (3) obteve -6,30 Kcal/mol, a QUECERTINA apresentou -11,22 Kcal/mol, o TERPENOS (2) demonstrou -23,28 Kcal/mol, o TERPENOS (4) indicou -23,85 Kcal/mol, o TERPENOS (1) - 32,95 Kcal/mol e o último composto INDA, apresentou impressionantes -51,61 Kcal/mol de energia final.

Gráfico 7: Representação da Energia total (Kcal/mol) de todos os ligantes ancorados com a proteína de replicação viral NS5 RdRp.



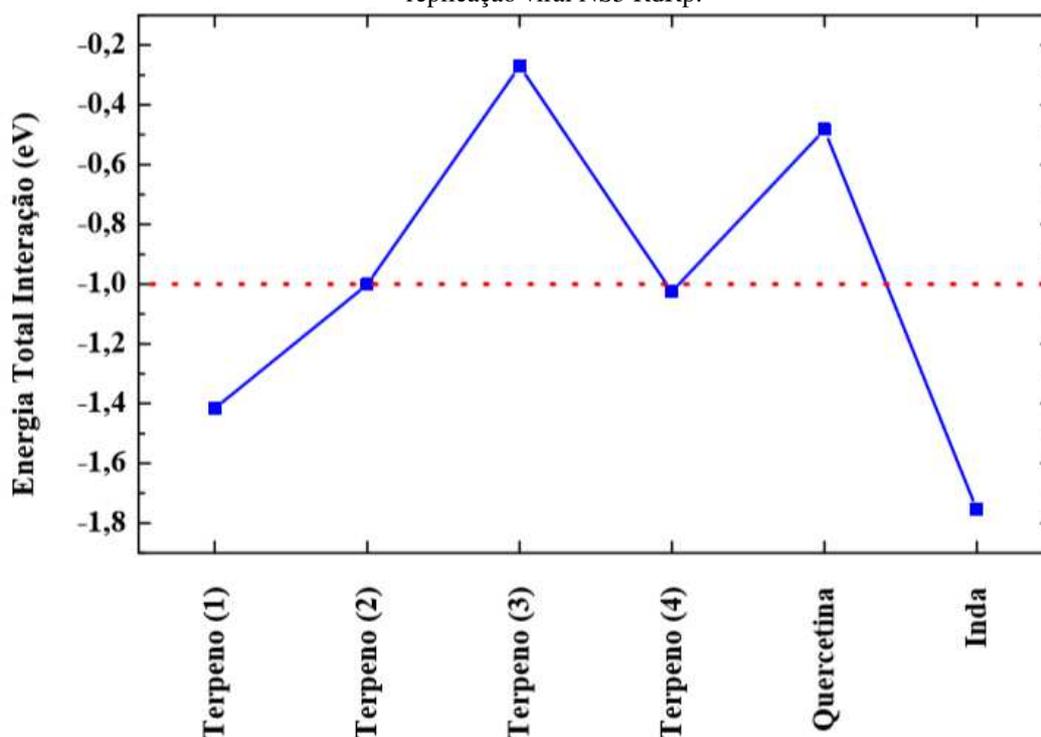
Fonte: Autoria própria.

Outra forma interessante para interpretação destes resultados, é a transformação da unidade Kcal/mol para eV (eletrovolts), o gráfico 8 a seguir demonstra os mesmos resultados do gráfico 7,

com o diferencial de que o balanço final de energia total (BFE) está sendo dado em eV, para a química a partir de -1eV a ligação entre as moléculas pode ser considerada do tipo covalente (JAURIS et. Al, 2015).

O composto INDA obteve o melhor resultado, com $-1,8\text{eV}$, seguido do TERPENO (1) com $-1,41\text{eV}$, o composto TERPENO (2) e TERPENO (4) indicaram respectivamente $-1,00\text{eV}$ e $-1,02\text{eV}$, os dois últimos foram os o TERPENO (3) com $-0,27\text{eV}$ e a QUECERTINA que obteve em seu balanço quântico de energia final de $-0,48\text{eV}$. Com isto, é possível afirmar que todos os seis compostos se mostraram negativamente expressivos, sendo demonstrado quanticamente que os ligantes tem alta afinidade pela proteína (MOTA, 2016), e quatro destes, com evidência de formação de ligação covalente no sítio ativo da NS5 RdRp, o que caracteriza, *stricto sensu*, como uma inibição irreversível (BARREIRO & FRAGA, 2014).

Gráfico 8: Representação da Energia total (eV) de todos os ligantes ancorados com a proteína de replicação viral NS5 RdRp.



Fonte: Autoria própria.

5.4 EVIDÊNCIA DE POTENCIAIS AMINOÁCIDOS ÂNCORA NO SÍTIO ATIVO DA PROTEÍNA

Na tabela 7 a seguir, é possível observar os aminoácidos que interagiram diretamente no balanço energético final com todos os ligantes. Estes foram: TYR 532, ALA 533, ASP 534, ASP

535, ALA 537, ARG 690, LYS 691, ASP 692, THR 693, LYS 697, PRO 698, SER 699, THR 700 e GLY 701.

Com o levantamento feito de aminoácidos da NS5 que interagiram com os ligantes INDA, QUECERTINA, TERPENOS (1), TERPENOS (2), TERPENOS (3) e TERPENOS (4) através do *software Discovery Studio* para a evidência energética feita através do *Software Materials Studio* foi relevante observar quais destes tiveram uma participação mais assídua em todos os complexos (NS5 + Ligantes), Godoy (2017) destaca os aminoácidos ASP 535 e ASP 665 como resíduos âncora de grande importância para a ativação do sítio ativo da NS5. Neste trabalho comprovou-se que o ASP 535 realmente participa como um dos aminoácidos responsáveis mais fortemente pela interação entre todos os compostos (como está em destaque na tabela 7), entretanto, o ASP 665 não foi evidenciado com interação direta com os ligantes (potenciais antivirais). Nessa perspectiva, é prudente salientar que a LYS 691 e a SER 699 curiosamente intervieram negativamente em praticamente todas as ancoragens entre a NS5 e os ligantes, podendo assim, surgir a evidência de novos aminoácidos âncora, que são essenciais para a boa interação com a NS5.

Tabela 7: Evidência dos aminoácidos da NS5 de maior interação com os 6 ligantes testados, em destaque os aminoácidos que mais apareceram nas análises computacionais.

Terpeno (1)	Terpeno (2)	Terpeno (3)	Terpeno (4)	Quecertina	Inda
			TYR532	TYR532	TYR532
ALA533	ALA533	ALA533	ALA533		
ASP534	ASP534		ASP534	ASP534	ASP534
ASP535	ASP535	ASP535	ASP535	ASP535	ASP535
ALA537		ALA537	ALA537		
ARG690	ARG690			ARG690	ARG690
LYS691		LYS691	LYS691	LYS691	LYS691
ASP692				THR693	
LYS697	LYS697			LYS697	
	PRO698				
SER699	SER699			SER699	SER699
	THR700			THR700	THR700
				GLY701	GLY701

Fonte: Autoria própria.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho de conclusão de curso mostraram-se altamente promissores, indicando estes seis compostos com potencial antiviral para inibição da proteína NS5 RdRd, tendo em vista, as várias evidências de excelente e confortável interação demonstradas através das técnicas de *Docking Molecular* e *Fracionamento de Caps Conjugados*. Logo, estes compostos podem auxiliar no desenvolvimento de uma futura vacina que possa intervir na efetividade do vírus da Zika.

É sabido que durante muito tempo a farmacologia esteve presa apenas as análises experimentais para a viabilização de novos fármacos, isto, demandava alto custo e maior quantidade de tempo. Hoje por meio de técnicas computacionais se tornou possível o avanço em diversas etapas para a indústria farmacêutica, desde a predição de novas moléculas até a elucidação de seu comportamento para com o alvo proposto. O conhecimento de interações específicas entre a proteína e o ligante (candidato a fármaco) são fundamentais para o estudo do comportamento de seu sítio ativo e funcionamento. Através desta metodologia, foi possível caracterizar as interações no sítio de ligação, podendo-se a partir disto, identificar grupos de aminoácidos funcionais que foram responsáveis pela criação das ligações favoráveis e por meio desta informação, é possível pensar em ajustes na estrutura do ligante (fármaco) para a potencialização de seu efeito.

A partir da análise dos dados obtidos, considerando os aspectos da metodologia utilizada e do sistema em estudo, pode ser concluído:

Docking molecular

- A metodologia aplicada foi capaz de selecionar e testar compostos para a elucidação de possíveis moléculas com potencial antiviral.
- Todos os seis compostos testados apresentaram altas constantes de inibição (K_i) a proteína, a energia livre de ligações e a energia intermolecular de todos os complexos foram altamente negativas, podendo-se afirmar que são termodinamicamente favoráveis, ou seja, a existência destas moléculas em um complexo é preferível (em quesitos de gasto energético) do que a proteína sozinha.
- O aminoácido âncora Asp535 foi o responsável por praticamente todas as interações evidenciadas no Docking, estabelecendo ligação de hidrogênio em 4/6 complexos.
- É perceptível a influência do resíduo Asp534, que aparece com fortes interações com todos os ligantes em todos os docking, podendo ser considerado também um aminoácido âncora.

Fracionamento Molecular Com Caps Conjugados

- A técnica se mostrou altamente refinada e específica, através da mesma foi possível identificar a energia quântica de cada aminoácido do receptor em todas as simulações de ancoragem com os ligantes, estes, indicaram atratividade por basicamente todos os aminoácidos da NS5;
- O balanço energético demonstrou que quatro complexos (INDA, TERPENO (1), TERPENO (2), TERPENO (4) exibem evidência de regime de ligações covalentes, entretanto, mesmo sem alcançar a âmbito de ligação covalente os ligantes TERPENO (3) e QUECERTINA apresentam aminoácidos fortemente ligados apresentando energia total negativa;
- Os aminoácidos LYS 691 e SER 699 deram indícios de serem possivelmente regiões âncora da proteína NS5;

7. REFERÊNCIAS

- AYRES, C. F. J. *Identification of Zika virus vectors and implications for control*. The Lancet Infectious Diseases, Volume 16 , Issue 3 , 278 – 279. 2016.
- ALBUQUERQUE, E. L., FULCO, U. L., FREIRE, V. N., CAETANO, E. W. S., LYRA, M. L., & DE MOURA, F. A. B. F. DNA-based nanobiostructured devices: The role of quasiperiodicity and correlation effects. *PHysics Reports*, v. 535 p. 139-210, 2014.
- ASTANI, Akram; REICHLING, Jürgen; SCHNITZLER, Paul. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, v. 24, n. 5, p. 673-679, 2010.
- BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. *Química Medicinal-: As bases moleculares da ação dos fármacos*. Artmed Editora, 2014.
- BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER. 2014. Disponível em: <http://accelrys.com/products/datasheets/discovery-studio-visualizer.pdf>. Acesso em: jul de 2018.
- BRAZ, Luana Camilla Cordeiro. INVESTIGAÇÃO IN SILICO DA INTERAÇÃO DO MONOTERPENO 4-TERPINEOL COM O RECEPTOR GABAA; 2016; Trabalho de Conclusão de Curso; (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) - Universidade Federal de Campina Grande.
- CARDOSO, S. I. B. *Desenvolvimento e avaliação de adsorventes para purificação de DNA plasmidial por meio de cromatografia baseada em ligantes de arginina* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- CONSOLI, R. A. G. B.; Lourenço-de-Oliveira, R. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*. Editora Fiocruz. 1994. 224p.
- CARVALHO, C. D. S; SOUZA, Z.H. *Reflexão Acerca Da Incidência Dos Casos De Dengue, Chikungunya E Zika No Brasil*. I Colóquio Estadual De Pesquisa Multidisciplinar,2016, Unifimes – Centro Universitário De Mineiros – Goiás, 2016.
- CARVALHO, O. V. et al. Potencial antiviral da quercetina sobre o parvovírus canino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.65, n.2, p. 353358, Belo Horizonte, 2013.

COSTA, R. F.; FREIRE, V. N.; BEZERRA, E. M.; CAVADA, B. S.; CAETANO, E. W. S.; DE DE SOUZA, ANA PAULA MARTINS. SÍNTESE DE 2-ARILIDENO INDAN-1, 3-DIONAS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIVIRAL, CITOTÓXICA E LEISHMANICIDA. 2016. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

DILL, Ken A.; MACCALLUM, Justin L. The protein-folding problem, 50 years on. *science*, 2012, 338.6110: 1042-1046.

FORATTINI, O. P. *Culicidologia Médica*. Vol.2. Ed. USP. 2002. 864p.

GAROZZO, A. et al. Activity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: study on the mechanism of action. *Antiviral research*, v. 89, n. 1, p. 83-88, 2011.

GODOY, A. et al. Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase. *Nature Communications*. VL - 8, 2017.

GORDON, M. S; FEDOROV, D. G; PRUITT, S. R.; SLIPCHENKO, L. V. *Fragmentation methods: a route to accurate calculations on large systems*. Chem. Ver., 112, 632-672, 2011.

GORDON, M. S; FEDOROV, D. G; PRUITT, S. R.; SLIPCHENKO, L. V. *Fragmentation methods: a route to accurate calculations on large systems*. Chem. Ver., 112, 632-672, 2012.

HENNIG, J.; SATTLER M. *The dynamic duo: Combining NMR and small angle scattering in structural biology*. Protein Science, 23, 669-682, 2014.

HUMPHREY, W. et al. "VMD - Visual Molecular Dynamics". *J. Molec. Graphics*, vol. 14, p. 33-38. 1996.

JAURIS, Iuri Medeiros, et al. Adsorção do fármaco nimesulida em nanoestruturas de carbono. *Disciplinarum Scientia Naturalis e Tecnológicas*, 2015, 16.2: 245-256.

LEWARS, E. G. Computational Chemistry. 2^a. ed. Springer Netherlands, 2011.

LIMA FILHO, J. L.; ALBUQUERQUE, E. L.; *Explaining statin inhibition and effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations*. Phys. Chem. Chem. Phys., 14, 1389-1398, 2012.

LU, H., LU, T., ZHANG, H., QIU, Y., YIN, D., ZHU, Z. Enhanced adsorption performance of aspartic acid intercalated Mg-Zn-Fe-LDH materials for arsenite. *Dalton Transactions*, v. 47, n. 14, p. 4994-5004, 2018.

MADRID, M. C. F. S., et al. Identificação de interações proteína-proteína entre NS5 do vírus da febre amarela e proteínas celulares. 2007.

MAIA, Rafael Trindade. Análise in silico e polimorfismo genético das glutationa stransferases da classe epsilon de anopheles gambiae (diptera: culicidae): possíveis implicações na resistência a inseticidas químicos. 2013.

MATTA, C. F. *Quantum biochemistry*. Wiley, germany, 2010.

MORRIS, G. M. et al. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry* 2009, 16: 2785-91. 2009.

MOTA, K. B; LIMA NETO, J. X; LIMA COSTA, A. H; OLIVEIRA, J. I. N; BEZERRA, K. S; ALBUQUERQUE, E. L; CAETANO, E. W. S; FREIRE, V. N; FULCO, U, L. *A quantum biochemistry model of the interaction between the estrogen receptor and the two antagonists used in breast cancer treatment*. Comp. and Theor. Chem., 1089, 21-27, 2016.

MOTA, Kyvia Bezerra. Análise energética in silico das interações: ER α -Tamoxifeno, ER α -Raloxifeno e Integrina α V β 3-Cilengitide. 2016.

Natureza Terráquea. Zika vírus e a negligência em relação a pesquisa em saúde em países pobres. 2016. Disponível em: <https://naturezatteraquea.wordpress.com/2016/01/25/zika-virus-e-a-negligencia-em-relacao-a-pesquisa-em-saude-em-paises-pobres/>. Acesso em: 20/06/2017.

OLIVEIRA, ANA FLÁVIA COSTA DA SILVEIRA. AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE ANÁLOGOS DA INDAN-1, 3-DIONA CONTRA A PROTEASE DO VÍRUS WEST NILE

E ANTIVIRAL CONTRA OS VÍRUS DENGUE E ZIKA. 2017. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. *Generalized Gradient Approximation Made Simple*. Physical Review Letters, 77, 3865- 3868, 1996.

RABELO, K. Desdobramentos Dos Surtos De Infecção Pelo Vírus Zika. *Revista Saúde Física & Mental*. SFM v.5, n.1, 2017.

RIBEIRO, Amanda de Genova. Atividade anti-hRSV da quercetina penta-acetilada através da inibição da adesão viral à célula. 2018.

RIDPATH, J. F.; BAUERMANN, F. V.; FLORES, E. F. Flaviviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). *Virologia Veterinária*. 2a . ed. Santa Maria - RS: editoraufsm, 2012. p. 657– 89.

SILVA, Suely da. . 2018.

SILVA, Suely da. Atividade antiviral de compostos naturais e sintéticos na replicação do ZIKV in vitro. 2018.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. *Química Nova*, 28, 95-102, 2005.

WILLIS, R.C., (2002), “Surveying the binding site”, *Modern Drug Discovery*, September, pages 28-34

ZANLUCA C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110:569–72, 2015.

ZHANG, D. W.; ZHANG, J. Z. H. Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein-molecule interaction energy. *Journal of Chemical Physics*, 119, 3599-605, 2003.

