



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA - CCET**  
**DEPARTAMENTO DE FÍSICA/CCET**

Maria Luiza de Araujo Dorneles

**Zika Vírus (ZIKV): Uma Nova Perspectiva à Respeito das Propriedades  
Nanomecânicas e Estruturais Através da Microscopia de Força Atômica.**

São Luís

2022



Maria Luiza de Araujo Dorneles

**Zika Vírus (ZIKV): Uma Nova Perspectiva à Respeito das Propriedades Nanomecânicas e Estruturais Através da Microscopia de Força Atômica.**



Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Física do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do grau de Licenciatura em Física.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Magalhães Rebêlo Alencar.

São Luís

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Dorneles, Maria Luiza de Araujo.

Zika Vírus (ZIKV): Uma Nova Perspectiva à Respeito das Propriedades Nanomecânicas e Estruturais Através da Microscopia de Força Atômica. / Maria Luiza de Araujo Dorneles. – 2022.

Orientadora: Luciana Magalhães Rebêlo Alencar.

Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Física.

Texto a ser informado pela biblioteca

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta monografia, desde que citada a fonte.

*Maria Luiza de Araujo Dorneles*

Assinatura

04 de julho de 2022

Data

Maria Luiza de Araujo Dorneles

**ZIKA VÍRUS (ZIKV): UMA NOVA PERSPECTIVA A RESPEITO DAS  
PROPRIEDADES NANOMECÂNICAS E ESTRUTURAIS ATRAVÉS DA  
MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Física do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do grau de Licenciatura em Física.

Aprovado em: 04 de julho de 2022

Banca Examinadora:

---

Profª. Dra. Luciana Magalhães Rebêlo Alencar (Orientadora)  
Universidade Federal do Maranhão - Campus São Luís

---

Prof. Dr. Alan Silva de Menezes  
Universidade Federal do Maranhão - Campus São Luís

---

Me. Maria do Socorro do Nascimento Amorim  
Universidade Federal do Maranhão - Campus São Luís

São Luís

2022



## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha mãe, Angela, pela liberdade que me deu para cometer meus próprios erros, e por ser o meu maior exemplo de dedicação. À minha doce Carmem, por ser o meu coração fora do peito, e por me ensinar que armaduras também se constroem com amor. Dedico também ao meus avós Sani e Santa (in memoriam), cuja sabedoria encheria livros e livros.*





*“A Humanidade não pode obter algo sem primeiro dar algo em troca. Para obter, algo de valor igual deve ser perdido. Essa é a primeira lei da Alquimia, a Troca Equivalente. Naquela época, nós realmente acreditávamos que esta era a primeira e única verdade no mundo.”*

Fullmetal Alchemist

## AGRADECIMENTO

A Deus, que nunca me desassistiu em meio à todo caos, e as formas mais singulares da natureza.

Agradeço, ao milagre da natureza, que com toda a probabilidade do universo, me escolherá como filha da dona Angela, tu és meu maior espelho de dedicação, amor, cuidado, proteção e disciplina, és a mulher que me ensinou a voar, mesmo quando todos diziam que ainda não era a hora. Sua garra e coragem são como uma espécie de tatuagem em minha alma, a forma com que me colocastes sempre à frente de seus sonhos demonstra o quanto em um universo aleatório e caótico a sua chama precisava se encontrar com a minha, espero um dia poder recompensar tudo que fizestes por mim.

Em segundo lugar, agradeço à minha Carmem, cujo nome deriva do latim e significa *canto ou poesia*, que combina perfeitamente com a anunciação de seu ser, visto que não existe explicação para a sua bondade, nenhum argumento teológico pode explicar a essência de todo o seu amor e pureza. Aos meus avôs, Sani e Santa, devo todo o meu sangue de bruxa, e toda a minha personalidade. Em especial à minha vó, que custe quantas vidas custar sei que vamos nos reencontrar um dia para nos entretermos entre pimentas, ervas e flores.

Agradeço ao meu pai por toda dor que me causou - só me edificou -, e por me ensinar que a maldade está intrínseca em cada um de nós, só que alguns deixam transparecer mais.

Agradeço aos meus féis cúmplices de jornada que estão comigo desde 2018.1, Rômulo, Rhuan, Gabriel, Tony, Josiel, Góis, em especial aos meus melhores amigos Alefe, Danilo, Thiago, Claudivon, PF e Bebel, por todos os dias de luta, por todas as palavras motivadoras durante minhas fases mais obscuras, e, por fim, por não me deixaram desistir.

Agradeço à tudo que aprendi no Laboratório de Biofísica e Nanossistemas, guiada por cada um dos meus companheiros, Alefe, Erick, Socorro, Joel, Bia e Andrezza, fazendo uma ressalva ao menino Deyvisson, por cada risada entre rodada de café e outra. O conhecimento de vocês orientou inúmeras ideias presentes neste trabalho, em especial à uma de minhas maiores inspirações, Ruana, que estava presente em cada etapa, surtando tanto quanto eu.

Agradeço também a todos que compõem a Atlética Neutrinos, que em meio à todo o caos trouxeram muitas alegrias aos meus dias, treinar e jogar com vocês foi incrível, sentirei falta.

Agradeço a minha amiga "Thaís da Inglaterra", por ter sido minha colega de quarto por

tanto tempo e mesmo assim ainda ter continuado sendo minha amiga, sinto saudades suas.

Agradeço aos professores Alan e Emre por terem sido meus primeiros orientadores em toda a minha jornada científica até aqui, com vocês aprendi que não somente de inteligência um pesquisador é formado, seus ensinamentos sobre paciência e cuidado estão comigo até hoje, meu muito obrigada.

Agradeço imensamente à minha orientadora Luciana, a mulher com o maior coração que já conheci, por sempre acreditar e confiar em minhas ideias. Em meio à tantos problemas longe de casa, sua companhia e suporte foram como se uma mãe estivesse me zelando, nunca me senti desamparada ao seu lado. Você é minha melhor inspiração, espero um dia conseguir transpôr tudo que aprendi com cada vez mais pessoas.

Agradeço às minhas amigas de infância, Helen e Nicole, por toda a amizade construída durante todos esses anos, aproveito para pedir desculpas pela ausência de sempre, espero melhorar um dia. Tenho certeza que nossos caminhos não se esbarraram pelo total acaso. Vocês fazem parte da minha família.

Agradeço a todos os meus professores da Física-UFMA, que, foram como verdadeiros guias em minha caminhada. Para todo sempre estarão marcados em meu coração.

Agradeço à FAPEMA pelo financiamento fornecido para a elaboração dessa pesquisa.



## RESUMO

O vírus Zika é um arbovírus com aproximadamente 50 nm de diâmetro, da mesma classe dos vírus que causam Dengue, Febre Amarela e Chikungunya. Em 2007, havia apenas 14 casos humanos documentados da doença do vírus Zika sem quaisquer manifestações. Em 2015, o Brasil e outros países da América Latina registraram os primeiros casos de Zika em humanos. Desde então, mais de 532 mil casos suspeitos foram registrados. Apesar da aparente benignidade da doença, em vários países, inclusive no Brasil, consequências como a síndrome de Guillain-Barré têm sido associadas à doença do vírus Zika. Este fato demonstra o potencial de disseminação do vírus Zika com uma possível epidemia futura, principalmente em territórios com muitas outras arboviroses. A dificuldade no diagnóstico diferencial de cada flavivírus e a sobrecarga dos serviços de saúde é preocupante, mostrando o pouco que sabemos sobre essa doença. A virologia física é uma área da física em que métodos baseados em física são direcionados à virologia, visando entender melhor o funcionamento desses sistemas nanoestruturados. Portanto, é essencial entender as características desse vírus e esclarecer dúvidas sobre sua infectividade e patogenicidade viral. Nesse cenário, a Microscopia de Força Atômica (AFM) surge como uma importante ferramenta para caracterizar as propriedades físicas e estruturais das partículas virais. Neste trabalho, investigamos propriedades de adsorção, estrutura de membrana e resistência do vírus Zika. Este estudo traz uma nova perspectiva sobre as partículas de ZIKV, buscando entender os processos de automontagem da partícula viral e trazendo mais informações que podem contribuir para o desenvolvimento de biomoléculas específicas para combater esse patógeno.

Palavras-chave: Zika. AFM. Nanotecnologia. Biomecânica. Virologia Física.



## ABSTRACT

Zika virus is an arbovirus with 50 nm in diameter, in the same class as the viruses that cause Dengue, Yellow Fever, and Chikungunya. As of 2007, there were only 14 documented human cases of Zika virus disease without any manifestations. In 2015, Brazil and other Latin American countries recorded the first cases of Zika in humans. Since then, more than 532,000 suspected cases have been registered. Despite the apparent benignity of the disease, in several countries, including Brazil, consequences such as Guillain-Barré syndrome have been associated with Zika virus disease. This fact demonstrates the Zika virus's potential for dissemination with a possible future epidemic, especially in territories with many other arboviruses. The difficulty in the differential diagnosis of each flavivirus and the overload of health services is worrying, showing how little we know about this disease. Physical virology is a field of physics in which physics-based methods are addressed to virological, aiming to better understand these nanostructured systems' functioning. Therefore, it is essential to understand the characteristics of this virus and answer questions about its viral infectivity and pathogenicity. In this scenario, Atomic Force Microscopy (AFM) emerges as an important tool for characterizing viral particles' physical and structural properties. In this work, we investigate adsorption properties, membrane structure, and resistance of the Zika virus. This study provides a new perspective on ZIKV particles, seeking to understand the self-assembly processes of the viral particle and bringing further information that can contribute to the development of specific biomolecules to fight this pathogen.

Keywords: Zika. AFM. Nanotechnology. Biomechanics. Physical Virology.





## LISTA DE FIGURAS

- 2.1 Representação esquemática da interação hospedeiro-vírus, demonstrando como o ciclo de vida se inicia, desde a entrada na célula, sua replicação, processo de montagem e liberação do vírus recém-formado, pronto para infectar novas células. 8
- 2.2 Esquematização de um vírus simples, constituído de Genoma Viral, Capsídeo, Envelope, e Proteínas envelope. . . . . 9
- 2.3 Representação gráfica de um vírus envelopado típico (centro) mostrando o arranjo do capsídeo e genoma viral junto com os diagramas típicos de vírus humanos (círculo externo). . . . . 10
- 2.4 Representação esquemática de capsídeos icosaédricos. Em (A) Um modelo Clug de montagem do capsídeo icosaédrico; (B) Formação de capsídeos icosaédricos  $T = 1$  (subunidade  $A$ ),  $T = 3$  (subunidades  $A, B, C$ ) e  $T = 4$  (subunidades  $A, B, C, D$ ). . . . . 11
- 2.5 Representação da estrutura do vírus da Dengue (DEN2) feita por crio-microscopia. Em (A) Superfície relativamente lisa do vírus DEN2; (B) Ajuste do mapa de densidade eletrônica dos domínios da proteína E, representando o formato do vírus, do tipo icosaédrico; (C) Rearranjo dos dímeros da proteína E quando em estado fusogênico. A geometria triangular do capsídeo viral,  $T=3$  é ilustrada. As setas indicam o sentido de rotação para a formação da figura do icosaédrico assimétrico formado pelo arranjo de proteínas E. . . . . 15
- 2.6 Estrutura do do vírus Zika (ZIKV) e organização do genoma. . . . . 17
- 2.7 Uma imagem crio-EM representativa do ZIKV hidratado congelado, mostrando a distribuição dos fenótipos do virion, e a divisão da proteína E em 3 domínios funcionais. Estrutura crio-EM do vírus Zika imaturo. Vista de superfície (a,c) e seção transversal (b,d) de ZIKV maduro (superior) 8 e imaturo (inferior), colorido radialmente de acordo com as teclas. Setas pretas grossas indicam as densidades entre o núcleo de RNA interno e a membrana viral (seta de duas pontas indica as camadas interna e externa da membrana) em ZIKV. As finas setas pretas numeradas em b e d dão o icosaédrico eixos de simetria. A unidade assimétrica é mostrada como um triângulo preto em a e c. Barra de escala, 100 Å. 19

- 2.8 Esquema de funcionamento do Microscópio de Força Atômica. A medida que o cantiléver *varre* a amostra que se encontra firmada à cerâmica piezelétrica um laser incide sobre sua extremidade livre, de forma que seja refletido para um espelho no fotodetector, que mede as deflexões do cantiléver, o qual armazena os dados e transmite-as até a controladora, que por sua vez reenvia para o computador, que possui um software específico que lê o algoritmo e o releva como imagem. . . . . 21
- 2.9 Esquemática de uma curva de força, idealizada que descreve um ciclo de retração e de aproximação da ponta do AFM, que é continuamente repetido durante a varredura da superfície. A ponta do AFM está se aproximando da superfície da amostra, mas ainda não existe nenhuma interação (I). Agora, a sonda está se aproximando da amostra, o contato inicial entre a ponta e a superfície é mediado pelas forças atrativas de van der Waals (contato) que levam a uma atração da ponta em direção à superfície (II). A ponta exerce uma força constante na superfície que leva a uma indentação da amostra e a uma deflexão positiva do cantiléver (III), devido a existência de forças repulsivas. Será nesse ponto que propriedades elásticas podem ser medidas. A ponta tenta retrair-se e soltar-se da superfície, o que gera um deflexão negativa do cantiléver devido à adesão entre a ponta e a amostra (IV). O contato é quebrado quando a força restauradora supera a de adesão. . . . . 24
- 2.10 Curva teórica do potencial de Lennard-Jones, e onde atuam os modos de operação do AFM (*contato, não-contato e tapping*). Região em roxo corresponde ao domínio de forças repulsivas. A região em verde corresponde ao domínio de forças atrativas. Região em amarelo corresponde a área de interação entre as forças. . . . . 25
- 2.11 Representação da interação da força menisco à medida que acontece a interação sonda-amostra. . . . . 30
- 2.12 Mapas de vírus obtidos por AFM. (a) vírus do mosaico bromo (BMV); (b) Vírus do mosaico do tabaco (TMV); (c) Bacteriófagos; (d) Vírus Típula iridescente; (e) Vírus da leucemia murina Moloney; (f) Vírus vaccínia; (g) Bacteriófago; (h) Mimivírus. . . . . 36

- 2.13 Imagens de AFM de um capsídeo viral antes e depois da nanoindentação. A) e B) Imagens de topografia tridimensionais de uma partícula HSV-1 antes (A) e após (B) a indentação, respectivamente. C) O perfil de altura, obtido ao longo das setas brancas em A e B. D) e E) A numeração dos capsômeros antes e depois da indentação mostrando a remoção de capsômeros centrais (indicados em vermelho). 37
- 3.1 Esquema da interface do AFM em medidas em líquido. . . . . 41
- 3.2 Principais componentes para aquisição de medidas em líquido. Em (A) tip-holder de acrílico específico para este tipo de medida, o qual possui uma concavidade que encaixa-se o o-ring (B), que é uma espécie de borracha de vedação. Em (C) observa-se uma caixa de pontas utilizadas para medidas em líquido. As seringas são divididas em duas, a de injeção do líquido e a que retira o líquido e atuam como o meio pelo qual o líquido será colocado dentro do o-ring, por sua vez o fluido usado é o *Phosphate-buffered saline* PBS (G), que estará preenchendo um dos beakers representados por (E). Por fim, para manipulação da célula líquida temos as pinças próprias para experimentos em AFM (F). . . . . 42
- 3.3 Composição de uma célula líquida para medidas de AFM após a manipulação dos materiais (A), com: tip-holder de acrílico, o-ring e sonda. Em (B) um zoom da região, depois que já houve estabelecimento da ligação das seringas para a entrada do líquido, tendo em vista que a concavidade presente no tip-holder já possui o líquido, a força de menisco pode ser facilmente percebida a medida que ao virar a célula líquida todo o fluido permanece isolado no compartimento característico vedado pelo o-ring. . . . . 43
- 4.1 Mapa topográfico de AFM revelando a estrutura viral e o formato da partícula de ZIKV: em A) observa-se a imagem topográfica ampliada de inúmeras partículas virais dispersas no substrato, com diâmetro variando entre 50-60 nm. B) Zoom da superfície de uma única partícula viral mostrando os detalhes da estrutura do vírus. A linha tracejada azul indica a região onde a seção transversal mostrada em C) foi tirada. C) Corte transversal de uma partícula de ZIKV adsorvida em um substrato de vidro. . . . . 46

- 4.2 Em A) temos o mapa de altura para duas partículas virais de de ZIKV. Observando a imagem em B) temos as mesmas partículas com contraste de escala de altura diferente, evidenciando, dessa maneira, o arranjo do tipo icosaédrico, a qual o vírus faz parte, demonstrando todo seu padrão de adsorção. Em C) um resultado promissor é encontrado, visto que observa-se o Módulo de Young, o qual exibe informações de elasticidade do vírus, e possivelmente sua disposição de genoma D) Representação pictográfica da montagem interna do ZIKV<sup>[1]</sup>. . . 47
- 4.3 A) e B) caracterizam mapas topográficos de AFM revelando a ultraestrutura viral e a forma das partículas do ZIKV; C) e D) seus respectivos mapas de adesão. E) Mapa de adesão aproximado, mostrando a correlação entre a estrutura triangular observada e o modelo baseado nos resultados de crio-EM em F) <sup>[2]</sup>. As setas azuis nos mapas C) e D) indicam as saliências típicas da partícula madura de ZIKV. A seta verde (D) aponta para a conformação triangular das estruturas da proteína E bem ajustadas<sup>[3]</sup>. . . . . 49
- 4.4 Curvas de indentação de partículas virais de Zika. (A) curva de referência obtida durante os ciclos de aproximação e retração, demonstrando que à medida que os ciclos aumentam, a curva também tende a se alongar. (B) Gráfico da Força x Separação efetuada por um único estímulo (ciclo) mostra que o traço azul representa a curva de aproximação, enquanto o vermelho indica a curva de retração. As faixas amarela, verde e azul estão relacionadas aos três tipos diferentes de materiais da partícula viral. As setas azuis em detalhe da rampa de contato na curva de aproximação destacam o platô de ruptura. (C) A imagem na inserção representa a região rompida da estrutura da membrana do vírus, onde o círculo azul sugere um buraco formado pelas proteínas da camada externa. (D) e (E), relacionados à quebra da casca viral, representada pela faixa amarela. (F) Os eventos de *tethering* são observados na curva de retração (vermelho), o que coincide com o fato de que o ZIKV possui sua camada mais externa apenas de proteínas <sup>[2]</sup> . . . . . 50

## LISTA DE TABELAS



<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica</b>	<b>5</b>
2.1	Virologia Física . . . . .	5
2.1.1	Composição estrutural dos vírus . . . . .	7
2.1.2	Família Flavivírus . . . . .	12
2.1.3	Aspectos Ultraestruturais dos Flavivírus . . . . .	13
2.1.4	O Zika Vírus . . . . .	16
2.1.5	Arranjo estrutural e proteico do ZIKV . . . . .	17
2.2	Princípios operacionais da Microscopia de Força Atômica . . . . .	19
2.2.1	Modos de Operação . . . . .	21
2.2.2	Espectroscopia de Força . . . . .	22
2.2.3	Forças de Interação Sonda-Amostra . . . . .	24
2.2.4	Reologia . . . . .	32
2.3	Uma visão geral sobre AFM em partículas virais . . . . .	35
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>39</b>
3.1	Inativação do vírus Zika . . . . .	39
3.2	Medidas de Microscopia de Força Atômica em ZIKV . . . . .	39
3.2.1	Medidas de AFM em Líquido . . . . .	40
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussões</b>	<b>45</b>
4.1	Caracterização das partículas virais de ZIKV . . . . .	45
4.1.1	Experimentos de Nanoindentação . . . . .	49
<b>5</b>	<b>Conclusões e Perspectivas</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>55</b>
<b>A</b>	<b>ANEXO</b>	<b>63</b>

# 1. Introdução

O zika vírus (ZIKV) é um membro da família dos Flavivirus, que agrupa mais de 70 tipos de vírus, cujo arranjo estrutural é semelhante aos vírus da dengue, febre amarela e chikungunya. Foi isolado pela primeira vez em 1947, na floresta de Zica em Uganda, mas só foi considerado como um patógeno emergente quando surtos foram reportados em 2007, nas ilhas do Pacífico Sul <sup>[4]</sup>. Fazendo jus ao seu nome que significa, na língua Luganda, “*invadido*”, a principal via de transmissão desse vírus, predominantemente se dá em áreas tropicais, durante o processo de hematofagia do mosquito *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* fêmea infectada, e, replica-se rapidamente quando em contato com o corpo humano, espalhando a carga viral para os órgãos, músculos e cérebro. Em contrapartida, apesar das semelhanças entre os vírus Zika e Dengue, por exemplo, relatórios recentes sugeriram que o ZIKV pode se sustentar em condições adversas, visto que atualmente casos de transmissão por contato sexual, transfusão de sangue e até mesmo transplantes foram reportados <sup>[5]</sup>, o que contrasta com outros vírus relacionados.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) decretou cerca de quatro vezes, desde que os primeiros casos reportados, Estado de Emergência em Saúde Pública Internacional <sup>[4]</sup>, onde em áreas tropicais, a Zika é endêmica. Até o momento, no âmbito global surtos e casos esporádicos da doença foram notificados desde então em mais de 59 países <sup>[4]</sup>, sendo crescente o número de infectados, o que demonstra o grande potencial de disseminação, e capacidade do vírus de causar surtos em larga escala.

O ZIKV possui uma replicação que envolve a introdução de ácidos nucleicos virais e proteínas virais no interior do retículo endoplasmático bruto (RER), que são anexados para a maturação e a liberação celular <sup>[5]</sup>, apresentando uma característica individual a todos os arbovírus, sendo o único, até então, Flavivirus neurotrópico, ou seja, o vírus possui uma predileção de infecção das células neurológicas, associado com a microcefalia em crianças e a síndrome Guillain-Barré em adultos <sup>[6]</sup>. Cerca de 70 anos depois, a robustez de como a infecção ocorre pela exposição ao vírus retrata o pouco que ainda se sabe sobre a estrutura e suas interações, res-



saltando que apenas uma mutação poderia desencadear uma disseminação global incoercível.

Sendo assim, a dispersão do vírus coincidiu com diversos outros tipos de doenças associadas, o que ressalta o importante cenário atual de pesquisa, pois apesar da ampla morbidade e contágio desacerbado, atualmente não existem tratamentos ou vacinas antivirais específicos <sup>[1]</sup>, e as lacunas existentes estão relacionadas com as diversas divergências na literatura, que nada se conclui especificamente, e métodos mais robustos para avaliar essas relações de causalidade se fazem necessários.

Neste cenário, O microscópio de força atômica (AFM) é um membro da ampla família de microscópios de sonda e, sem dúvida, tornou-se a varredura por sonda mais usada mundo à fora. A alta resolução de imagem aliada a uma nova classe de ferramentas espectroscópicas permitiram que os AFM's também realizassem estudos dinâmicos em tempo real como nanomanipulação controlada, resultando em avanços significativos em muitos domínios distintos da ciência e da engenharia, permitindo o estudo de propriedades de superfícies a nível molecular, se tornando um equipamento dominante quando o assunto é caracterização dos mais diversos tipos de estruturas, e, com o avanço da nanotecnologia seu aperfeiçoamento fora viabilizado, possibilitando ainda o bônus de conseguir ser operado em diversos tipos de meio - líquido, ar ou vácuo - <sup>[7]</sup>.

Seu princípio fundamental de funcionamento deriva do fato que os microscópios de Força Atômica operam com base na detecção de superfície, que se deve, justamente ao fato de que existe uma ponta em nanoescala que é anexada a um pequeno cantilever que atua como um sensor mecânico, como uma espécie de mola. À medida que a ponta entra em contato com a superfície, o cantilever se curva e, por sua vez, essa deflexão é detectada usando um diodo laser e um fotodetector dividido. Esta deflexão é indicativa da força de interação ponta-amostra. A força sentida pela sonda após sua aproximação e retração a partir de um ponto sobre a superfície da amostra, apresenta-se em curvas força-distância <sup>[8]</sup>.

Em virtude de tamanho esforço, a raiz desse trabalho se perpetua em uma área que ascende exponencialmente: a física da matéria condensada, em particular estudos voltados para uma ramificação que ascende globalmente, à qual os vírus fazem parte, a "*soft matter*". A caracterização por Microscopia de Força Atômica surge como ferramenta capaz de "invadir" a redoma à qual esse pequeno agente infeccioso se encontra, com cerca 50 nm de diâmetro, suas, até então, intangíveis camadas virais serão caracterizadas neste trabalho. Propriedades mecânicas como elasticidade, fragilidade ou pontos de fadiga do arbovírus Zika foram exploradas. O

AFM fornece informações sobre a estrutura e interações biológicas, propriedades de adsorção, estrutura de membrana e resistência do Zika Virus (ZIKV), trazendo uma nova perspectiva sobre as partículas virais, buscando entender os processos de agrupamento celular, e automontagem da partícula viral. trazendo mais informações que podem contribuir para o desenvolvimento de futuros candidatos à tratamento, bem como circunscrever a magnitude da transmissão viral.

No presente trabalho exploraremos a técnica do AFM, buscando homogeneizar a teoria presente nos modos de operação dinâmica do equipamento. Pelo fato de que essa ferramenta extremamente versátil não se limitar a medições topográficas e aplicações de imagem, avaliaremos propriedades mecânicas e elétricas da amostra inativada de ZIKV medindo a topografia das superfícies da amostra com resolução nanométrica, além de mapear propriedades físicas diversas, forças eletrostáticas <sup>[9]</sup>, elasticidade<sup>[9]</sup>, adesão <sup>[10]</sup>, dureza <sup>[10]</sup>, módulo de Young <sup>[11]</sup>, dentre outros, ajudando a desenvolver maneiras mais eficazes de lidar com as mais diferentes situações da amostra, dinamizando o uso do equipamento.

Esse trabalho de monografia estrutura-se com: uma Introdução; Revisão Bibliográfica, aqui uma revisão sobre os conceitos de virologia física, sobre o ZIKV, os princípios básicos de AFM e suas aplicações no estudo de partículas virais serão abordados; os Materiais e Métodos empregados para investigação das amostras; os Resultados e Discussões; as Conclusões e Perspectivas para esta pesquisa e as Referências Bibliográficas.



## 2. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo, apresentamos a revisão bibliográfica sobre o sistema em estudo e as técnicas empregadas para desenvolvimento da pesquisa.

### 2.1 Virologia Física

O campo da virologia, em particular a virologia física, segue uma linha enigmática e, inevitavelmente restrita de considerações da interação íntima entre vírus e seus hospedeiros. Com o avanço da nanotecnologia, é uma área que vibra com estudos que abrangem perspectivas que correspondem à resultados inéditos sobre as características dessa classe de ancestrais mais antigos. Em consonância com a realidade a qual o mundo se deparou no ano de 2019, com a pandemia da Covid-19, estudos associados às doenças virais configurou um desafio a ser enfrentado, evidenciando uma chaga biológica que refletia um cenário apocalíptico para possíveis mutações da doença, já que os olhos de todo o mundo se voltavam para uma espécie de arma biológica, em muitos casos, letal, que podia ser transmitida pelo ar.

Essa terrível surpresa mobilizou inúmeros laboratórios mundo a fora, que buscavam entender as entrelinhas da evolução viral, rodeados por uma incerteza a respeito de novas variantes, revelando quão pouco sabe-se verdadeiramente sobre as mudanças genéticas que podem acontecer, especialmente quando os hospedeiros são humanos. Questões até então adormecidas, serviram de inspiração, pois, inegavelmente, vírus existem, mas só podem ser detectados indiretamente, e, embora se relacionem com as mais diversas doenças, a maioria dos vírus pode coexistir pacificamente com seus hospedeiros, já que apesar de possuírem a capacidade de se replicar de forma exponencial, os vírus, sem o maquinário enzimático suficiente, não conseguem iniciar seu ciclo de vida, ou seja, seu período de replicação só se inicia quando ele se torna, obrigatoriamente, um parasita intracelular <sup>[12]</sup>.

Ao analisar a etimologia da palavra *vírus*, temos que ela deriva do latim, e significa

“veneno” ou “toxina”<sup>[13]</sup>. Por esse prisma, durante o século XX a virologia como vertente se expandiu, quando em 1898 o botânico e microbiólogo holandês Martinus Beijerinck identificou uma doença infecciosa de natureza desconhecida, que atingia as folhas do tabaco, criando manchas que celeremente se espalhavam para outras partes da planta<sup>[14]</sup>. Através de seus estudos e do biólogo russo-ucraniano Dimitry Ivanovsky, constatou que a doença silenciosa que causava prejuízo à colheitas do tabaco da época não era algum tipo de bactéria, pois esse agente infinitamente microscópico era capaz de penetrar filtros de porcelana, algo que bactérias e fungos não poderiam fazer. Estava então documentado, o possível primeiro vírus da história, o qual ficou conhecido como sendo, em português, o vírus do mosaico-do-tabaco<sup>[15]</sup>. A descoberta deturpou o cenário à respeito do que seria um “vírion”<sup>1</sup>, à medida que os cientistas continuavam catalogando um número crescente de doenças vegetais, animais e até humanas, causadas por vírus.<sup>[16]</sup>

A evolução viral refere-se às mudanças genéticas hereditárias que um vírus acumula durante sua vida, que podem surgir de adaptações em resposta a mudanças ambientais ou da resposta autoimune do hospedeiro em questão. Os vírus podem evoluir rapidamente, sendo o produto de um complexo emaranhado de mudanças estocásticas<sup>2</sup>. Embora sejam relativamente simples, o estudo da genética molecular dos vírus só se fez possível com a invenção do microscópio eletrônico em 1931<sup>[17]</sup>, que confirmou informações sobre a biologia dos vírus e suas estruturas, definindo-os como recipientes de proteínas nanométricos, carregados de genoma. Mais tarde, suas propriedades termodinâmicas e mecânicas foram notadas, e seu exclusivo processo evolutivo reportado.

Os vírus do ponto de vista físico podem ser discutidos em nível mais fundamental, considerando suas características intrínsecas. Dessa forma, o estudo experimental dos vírus revelaram, essa nova abordagem está rapidamente começando a se fundir com o uso de técnicas de Microscopia de Força Atômica, e de outras ferramentas, tais como Microscopia Eletrônica, Cristalografia de Raios-X<sup>[18]</sup>, que dão margem para quantificar os efeitos mecânicos, biofísicos, e físico-químicos do que acontece após o processo de montagem viral<sup>[18]</sup>.

A aplicação de testes físicos levou à determinação da alta resolução molecular das estruturas de muitos vírus, com nanoindentações por Microscopia de Força Atômica, foi possível a realização de testes de força, tal como o teste de *fadiga* sobre o material da estrutura viral<sup>[19]</sup>,

---

<sup>1</sup>Nome que se dá a uma partícula viral completa, que ainda não possui atividade metabólica.

<sup>2</sup>Termo usado em teorias probabilísticas, ou seja, padrão estocástico é aquele cujo estado é indeterminado, com origem em eventos aleatórios.

testando a sua elasticidade, comparando com possíveis mutações por meio da rápida produção de diversidade genética, característica exclusiva de certas linhagens virais, que possuem notáveis consequências epidemiológicas e até mesmo pandêmicas, conferindo grande valor sobre vírus como sistemas-modelo para a compreensão do próprio processo evolutivo humano.

Estudos ainda ressaltam que, existem, individualmente dez nonilhões de vírus no planeta Terra, ou seja, um percentual cem milhões de vezes maior que o número de estrelas no universo observável <sup>[20]</sup>. Embora muitos deles acabem sendo inofensivos aos seres humanos, algumas mudanças genéticas podem torná-los compatíveis com as células humanas, diversificando sua adaptação biológica, o que reflete a importância do estudo da virologia que possui, como uma das mais importantes vertentes, a virologia física.

Desta forma, a virologia física inspira o desenvolvimento de estratégias para agentes antivirais mais efetivos e menos nocivos à saúde humana através da determinação morfológica da dinâmica estrutural de sua forma, que pode contribuir para entender os ciclos dos vírus e facilitar a manipulação racional de partículas virais para desenvolver novas vacinas e seus possíveis aprimoramento, além de contribuir com terapias gênicas ou possíveis candidatos de usos biomédicos em medicamentos.

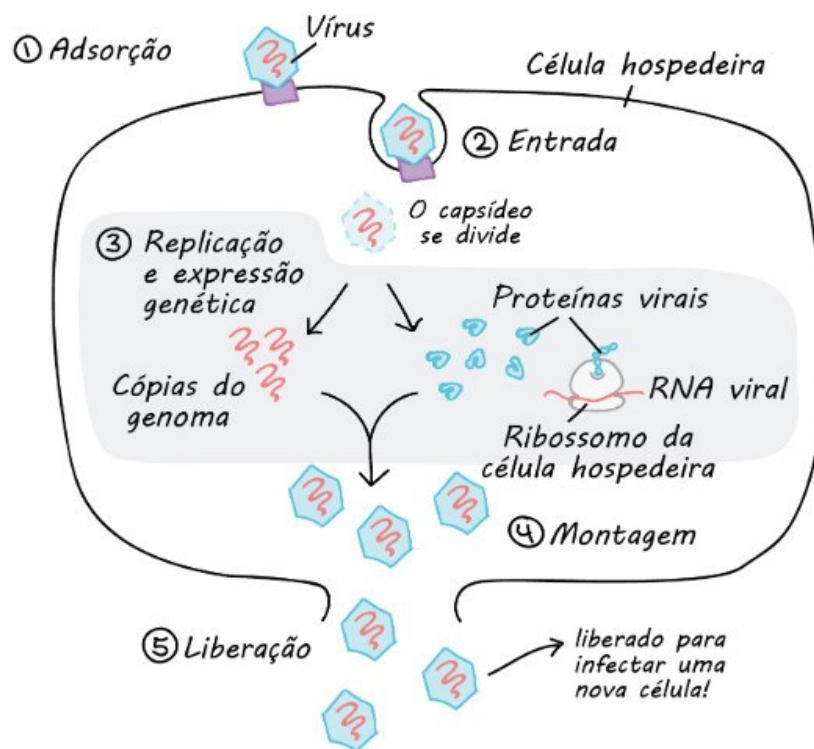
### **2.1.1 Composição estrutural dos vírus**

Biologicamente, os seres vivos se diferem dos seres não vivos pelo fato de serem organismos constituídos por células, que, por sua vez, são estruturas que se dividem em três partes: a membrana celular (fina película lipoproteica presente na parte mais externa), o citoplasma (região interna da célula), e núcleo (cérebro da célula), onde se encontram os cromossomos. As instruções genéticas, que arquivam e fornecem informações para que as células desempenhem suas respectivas funções dentro do corpo e estão intrinsecamente ligada aos genes, que são compostos por um sequência específica de ácido desoxirribonucleico (DNA). Por meio da molécula de DNA, o ácido ribonucleico (RNA) é produzido no núcleo, atuando como principal responsável na produção das proteínas <sup>[21]</sup>

Uma célula pode sofrer alterações da molécula de DNA, o que entende-se por mutações. Vírus são partículas submicroscópicas que possuem o seu material genético encapsulado, seja contendo DNA ou RNA, e, dessa forma dependem exclusivamente de um hospedeiro para sobreviver, visto que antes de se disseminar dentro da célula são considerados seres não vivos. Ao penetrar a célula do hospedeiro inicia-se o processo de automontagem espontânea dentro do ci-

toplasma das células infectadas, onde alvorecem os seus estágios de crescimento e disseminação [13,22], que são, respectivamente, *adsorção*, *entrada*, *replicação*, *montagem* e *liberação*. Dessa forma, as células “infectadas” passam a receber instruções errôneas, e é neste momento que o parasita já está no comando da maquinaria humana, tal como representado na Figura 2.1, a qual trás o momento de interação do vírus com o sistema hospedeiro, e por sua vez, exemplifica o ciclo de vida do vírus.

Figura 2.1: Representação esquemática da interação hospedeiro-vírus, demonstrando como o ciclo de vida se inicia, desde a entrada na célula, sua replicação, processo de montagem e liberação do vírus recém-formado, pronto para infectar novas células.



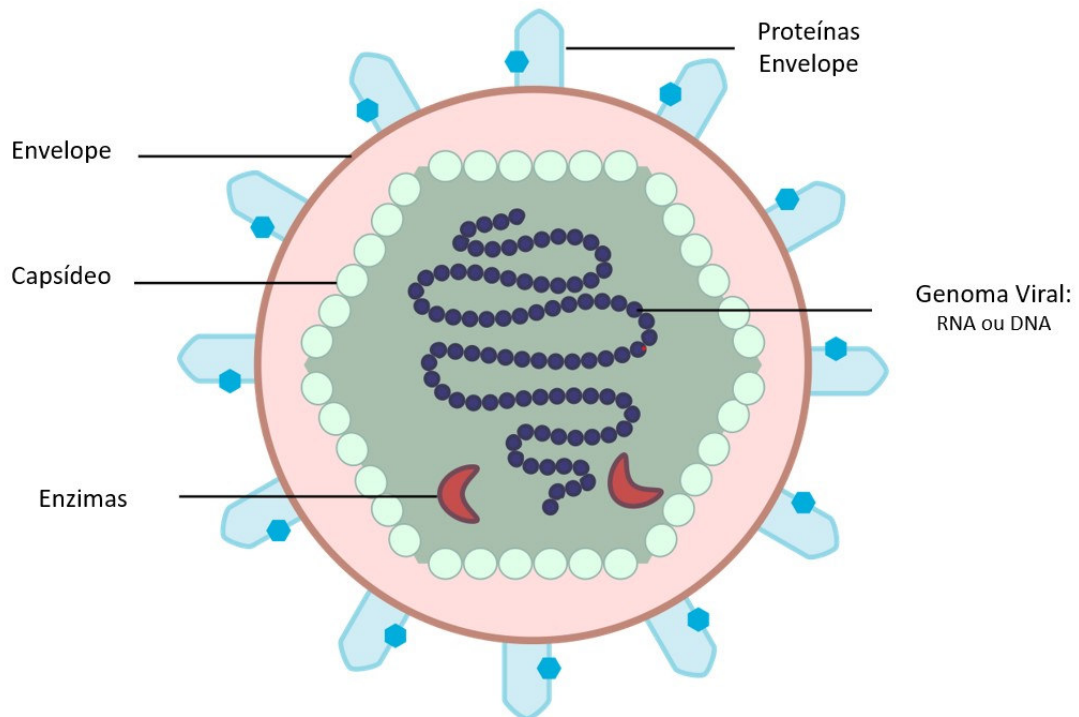
Fonte: Retirado do site Khan Academy.

Posteriormente à esse processo parasitológico, uma redoma surge, como uma espécie de concha viral, chamada de *capsídeo*, que o protege contra os anticorpos, que são os mecanismos de defesa do hospedeiro contra infecções, composto por *capsômeros*, que são estruturas montadas a partir de quantidades distintas de subunidades de proteínas [23,24]. Após o processo de auto-montagem, inicia-se o período de maturação, momento em que os virions recém-sintetizados alteram suas propriedades físicas afim de se tornarem estruturas realmente nocivas [22].

A estrutura viral se torna mais complexa, especificamente quando acontece o fortalecimento do capsídeo, no qual em alguns vírus, essa estrutura recebe uma espécie de camada externa de lipídeos ou proteínas, chamada de “envelope viral”, que protege o vírus em situações

mais amenas dentro do corpo infectado, ajudando nas interações célula-receptor, visto que essa camada externa é feita, basicamente da própria célula hospedeira-mãe, a qual o vírus se ligou no processo de Adsorção (Fig.2.1). A estrutura viral completa está presente na figura 2.2.

Figura 2.2: Esquemática de um vírus simples, constituído de Genoma Viral, Capsídeo, Envelope, e Proteínas envelope.



Fonte: Adaptado para o português de Originaldatei.

As características virais por si só não são suficientes para prever pandemias, pois cada partícula viral consiste em um trecho de instruções genéticas, escritas como fragmentos de DNA ou RNA celular que se deslocaram de cromossomos celulares e vieram a evoluir através do contato com genes presentes nos genomas de seus hospedeiros <sup>[25]</sup>, e estruturalmente apresentam limites de formação diferentes, em seus tamanhos (variando entre 20-400nm)<sup>[24]</sup>, composições e até mesmo formas, que assumem formatos geométricos distintos: bastonetes, esféricas, poliédricas e pleomórficas. Sabe-se que patógenos que infectaram a população humana e fomentaram surtos nas últimas décadas, a maioria são vírus de RNA, incluindo o Zika, vários do tipo influenza e o tão temido SARS-CoV-2, pelo fato de que vírus desse tipo podem sofrer mutações ou evoluir rapidamente sob estresses antivirais, como resposta imune do hospedeiro e a tratamento de drogas antivirais <sup>[26]</sup>.

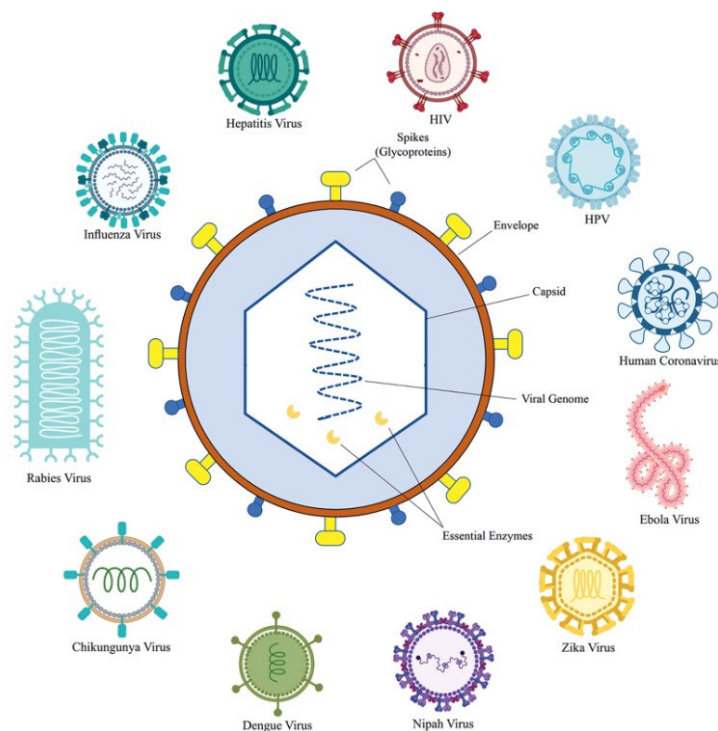
Ao se desenvolver os primeiros estudos a cerca desses invasores, inúmeras controvérsias científicas à respeito das suas raízes estruturais surgiram. Suas particularidades foram reporta-



das, e sob essa perspectiva, Dimitry Ivnovsky modelou uma hipótese aceita até a atualidade a qual afirmava que os vírus possuíam algumas características principais, sendo elas, a sua dimensão submicroscópica e a sua alta infecciosidade [27], além de que não podiam ser cultivados na ausência de células, e seriam capazes de infectar seres vivos de todos os domínios. Por esse motivo, vírus são capazes de se subdividirem em dois grupos, os *envelopados* e os *não-envelopados* [28].

Os vírus não-envelopados são estruturalmente mais simples, pois sua composição restringe-se a apenas o revestimento criado pelo capsídeo viral que armazena o ácido nucleico viral, composto de um ou mais segmentos de DNA ou RNA, de fita simples ou dupla. [13]. Em contrapartida, vírus do tipo envelopados possuem o capsídeo envolto por uma camada (envelope), que pode ser lipídica ou proteica. Dessa forma, essa circunvizinhança do capsídeo faz com que o vírus se torne mais complexo [29]. Na determinação da estrutura do virion, a simetria do capsídeo é um fator que deve ser levado em consideração, pois é, inerentemente, a condição física necessária para a qual a estrutura do genoma consiga permanecer estável.

Figura 2.3: Representação gráfica de um vírus envelopado típico (centro) mostrando o arranjo do capsídeo e genoma viral junto com os diagramas típicos de vírus humanos (círculo externo).



Fonte: Retirado de Naqvi et. al. [30]

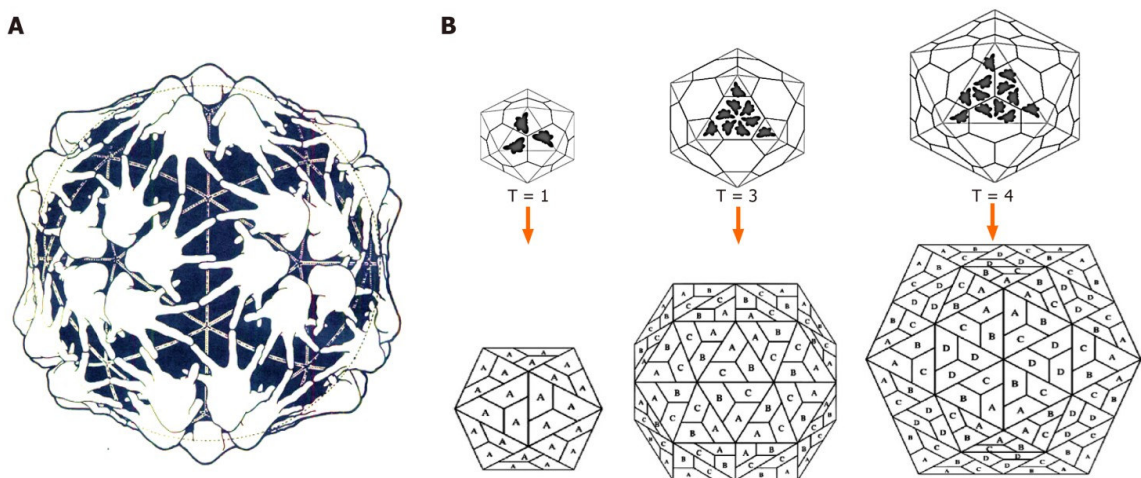
Inferir relações evolutivas entre grupos de vírus é um desafio, devido às rápidas divergências das taxas de mutação observadas em genomas virais. A arquitetura dos vírus adquirida

no processo de automontagem influencia até mesmo como essa partícula viral atinge o seu hospedeiro, pois existem mecanismos específicos empregado para completar os diferentes estágios do ciclo viral, e a simetria do capsídeo retoma os ensaios sobre o equilíbrio entre o material genético encapsulado e o envelope que o protege, trazendo uma diversidade em termos de formas, tamanhos e tipo de genoma [28,29].

Vírus envelopados do tipo helicoidais ou icosaédricos são mais comuns em animais, tendem a adotar uma forma relativamente flexível [31], possuindo um grande capsídeo icosaédrico, frequentemente esférico que pode diferir em tamanho entre partículas individuais, como o herpesvírus HSV-1. Em contraste, a maioria dos vírus encontrados em plantas são do tipo não envelopados com um capsídeo helicoidal ou um capsídeo icosaédrico relativamente pequeno, que se traduz em um virion em forma de vara ou filamentoso [15], como, por exemplo, o vírus do mosaico do tabaco (Figura 2.3).

A organização dos capsídeos se estabelece entre as subunidades das proteínas que os formam, ou seja, um capsídeo de estrutura icosaédrica, extremamente comum entre os vírus, consiste em 20 faces triangulares delimitadas por 12 vértices quádruplos com 60 subunidades de proteínas deixando um orifício central onde está situado o genoma viral. Esse fato demonstra que os capsídeos icosaédricos são definidos pelo número de triangulação ( $T = 1, 3, 4, 13, \text{etc.}$ ) (Figura 2.4), ou seja, os triângulos equiláteros idênticos formados por subunidades [28].

Figura 2.4: Representação esquemática de capsídeos icosaédricos. Em (A) Um modelo Clug de montagem do capsídeo icosaédrico; (B) Formação de capsídeos icosaédricos  $T = 1$  (subunidade  $A$ ),  $T = 3$  (subunidades  $A, B, C$ ) e  $T = 4$  (subunidades  $A, B, C, D$ ).



Fonte: Retirado de Parvez (2020) [28].

Em retrospecto, as conquistas feitas na pesquisa de vírus são verdadeiramente notáveis.

Durante o ano de 1971, a fim de correlacionar as características do ácido nucleico com o esquema de replicação viral, o microbiologista David Baltimore conseguiu classificar os vírus com precisão, tomando os traços do genoma em vez de se apegar as doenças que eles podem causar [32].

A classificação de Baltimore baseia-se no fato de que todos os organismos vivos na Terra empregam o DNA como genoma. Em oposição, os vírus empregam DNA ou RNA como genoma. Sendo assim, o cientista Baltimore se aprofundou nos estudos das diferentes características do ácido nucleico. Dessa maneira, os vírus podem ser constituídos por fita simples (ss) ou dupla (ds), linear ou circular, de polaridade positiva ou negativa [32].

Com base nessas diferenças de natureza é possível prever o mecanismo de replicação do genoma de um novo vírus imediatamente após a disponibilidade da sequência de nucleotídeos, e, nas próximas seções uma invasão à classe dos vírus de fita dupla positiva de RNA (+ssRNA) será feita, abordando, em particular a família dos Flavivírus, e suas principais individualidades.

### 2.1.2 Família Flavivírus

O táxon *Flaviviridae* é uma grande família de patógenos que infectam animais e humanos, composta por três gêneros distintos - *Flavivírus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus* -. que compartilham entre si similaridades morfológicas [33], mas se manifestam clinicamente por vários estímulos, desde febre, doenças encefálicas, e, até mesmo hemorragias. A palavra Flavivírus origina-se no latim *flavus*, e significa *amarelo*, que, por sua vez, deriva do fato da doença causar icterícia<sup>3</sup> nos pacientes afetados.

A transmissão acontece por meio do contato do ser humano com áreas que a fêmea do gênero *Aedes Aegypti* ou *Aedes Albopictus* inicia seu processo de fecundação. A necessidade de sangue para o amadurecimento dos ovos é o que inclui os seres humanos no ciclo de vida do mosquito, que além de serem transmissores são os reservatórios do vírus, pois uma vez infectados assim permanecem por toda a sua vida, que dura, em média, 45 dias [34]. Nesse ciclo, o mosquito consegue atuar quase como uma espécie de arma biológica, já que a infecção humana ocorre de forma acidental, ao entrar ou se aproximar de uma área infectada os indivíduos podem contrair a infecção através de picadas da fêmea, que é voraz, e consegue picar uma pessoa a cada 20 ou 30 minutos [34].

---

<sup>3</sup>Coloração amarelada da pele e/ou olhos, causada por um aumento da bilirrubina (substância produzida pelo fígado) na corrente sanguínea.

Por um contexto estritamente histórico, na Guerra Hispano-Americana, cerca de 100 anos atrás, a febre amarela matou milhares de soldados americanos em Cuba<sup>[35]</sup>, e forçou cerca de 20.000 pessoas à evacuar a cidade. A população que fora infectada tinha sintomas como falência de órgãos, febre alta e caracteristicamente, suas mucosas dos olhos e pele ficavam amareladas. Essa terrível praga ficou conhecida como sendo o primeiro vírus trazido para o hemisfério ocidental durante a era do tráfico de escravos, se espalhando pelas regiões tropicais e subtropicais desde então.

A fascinação dos epidemiologistas, virologistas e imunologistas à respeito da família dos flavivírus, e de suas particularidades se deve ao fato de que, dentre as arboviroses<sup>4</sup>, as causadas por Flavivírus são as mais vultosas protagonistas de surtos ou epidemias, atualmente, até mesmo em regiões que perpassam a América do Sul<sup>[36]</sup>. Curiosamente, os primeiros vírus a serem identificados incluíam quatro vírus transmitidos por vetores de artrópodes<sup>[36]</sup>, três dos quais faziam parte da família Flavivírus, os quais eram: o vírus Louping Ill, o Vírus da Dengue (DENV), e o primeiro vírus documentado dessa família, o da Febre Amarela. Outros flavivírus importantes patógenos humanos são o vírus do Nilo Ocidental (WNV) e vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV).

A classificação dos flavivírus em diferentes espécies é baseada no conceito polifilético de espécies de vírus<sup>[37]</sup>, no qual uma série de características, como a morfologia dos vírus, a organização do genoma, a identidade das sequências nucleotídicas, as associações com vetor e ecologia do vírus são levados em consideração para a definição de uma espécie.

A próxima pandemia que assolaria o mundo já poderia estar entre essa família de vírus, que contém 67 espécies de vírus identificadas, e poderia ser muito pior que a do Sars-Cov-2, já que a mutação de um Flavivírus poderia causar uma variedade de doenças em humanos, que vão desde doenças febris leves a doenças graves com manifestações hemorrágicas, ocasionando uma crise sanitária que provocaria efeitos mais relevantes, devido à sua letalidade e sobretudo por sua inexistência de tratamento até o momento.

### 2.1.3 Aspectos Ultraestruturais dos Flavivírus

Dos patógenos que infectaram a população humana nas últimas décadas, os membros do gênero flavivírus - Zika, Chikungunya, Dengue e febre amarela, são os responsáveis a cada

---

<sup>4</sup>São doenças causadas por vírus, transmitidas, principalmente, por mosquitos do gênero *Aedes aegypti*. As arboviroses mais comuns em ambientes urbanos são: Dengue, Zika e Chikungunya.

ano por mais de 50 milhões de infecções humanas em todo o mundo. Dividindo-se, os flavivírus podem ser considerados como “patógenos perfeitos”, visto que compartilham um tamanho entre  $\sim 40\text{-}100\text{nm}$  <sup>[38]</sup>, pertencente a classe dos vírus de fita positiva de RNA e de polaridade positiva (+), com aproximadamente  $\sim 11\text{kb}$ , possuindo a seus genomas dispostos em uma configuração linear não segmentada.

Como para todos os vírus de RNA de fita positiva, o RNA genômico de flavivírus é infeccioso <sup>[38]</sup>. Após o processo de divisão celular, comparados aos vírus e células que dependem do DNA, os vírus de RNA tendem a ser mais “desleixados” ao copiarem seu código genético, deixando o processo mais propenso a erros, criando uma enorme diversidade nas populações de vírus de RNA, permitindo que eles se adaptem mais facilmente a novos ambientes — incluindo novas espécies hospedeira, e por consequência introduzam uma alta taxa de mutações, como, por exemplo, o fato de que existem quatro sorotipos de DENV já identificadas, que variam sua sequência de aminoácidos em cerca de 25 a 40% <sup>[39]</sup>.

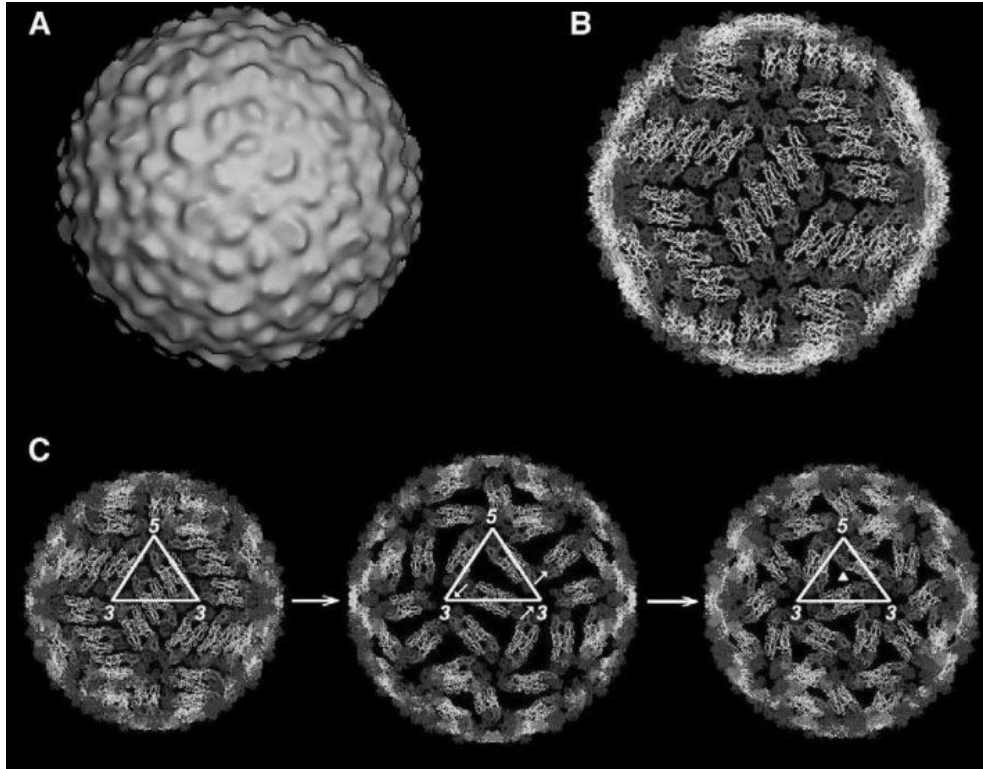
A entrada de flavivírus nas células é coordenada pelas atividades das proteínas, que são introduzidas no citoplasma, tornando possível a produção de genomas recombinantes, que iniciam a replicação e a produção de vírus em células hospedeiras. O genoma desses vírus tem em média 11.000 nucleotídeos de comprimento e codifica cerca de 10 genes <sup>[40]</sup>. Assim, o ciclo de vida do vírus surgiu de estudos estruturais e bioquímicos da proteína presente na camada mais externa desses vírus (E), a qual promove a ligação às células-alvo no processo de fusão celular.

Dessa forma, um vírus dessa classe possui sua configuração baseada, previamente na atividade de três proteínas funcionalmente distintas. Resumidamente, os vírus do gênero flavivírus são constituídos por duas estruturas: *genoma viral e capsídeo*, sendo que existem em alguns casos a presença da proteína envelope.

A casca do capsídeo é, portanto, visto como um cristal bidimensional de tamanho limitado e, na maioria dos casos, fechado (Figura 2.5), sendo que essa proteína do capsídeo (C) tem formato icosaédrico com apenas um espaço para a carga genética em seu interior. Embora usem princípios básicos de crescimento de cristais, vírus requerem mecanismos adicionais para controlar suas dimensões, visto que no processo de maturação do virion geram mudanças estruturais a fim de melhor controlar a estabilidade da partícula viral já maturada <sup>[24]</sup>.

Essa nova feição molecular da patogênese, predominantemente, nos virions maduros se tornam suscetíveis a sinais do sistema imunológico do hospedeiro, que tenta, a todo custo, defender o corpo dessas células previamente infectadas. Por consequência, o desenvolvimento

Figura 2.5: Representação da estrutura do vírus da Dengue (DEN2) feita por crio-microscopia. Em (A) Superfície relativamente lisa do vírus DEN2; (B) Ajuste do mapa de densidade eletrônica dos domínios da proteína E, representando o formato do vírus, do tipo icosaédrico; (C) Rearranjo dos dímeros da proteína E quando em estado fusogênico. A geometria triangular do capsídeo viral, T=3 é ilustrada. As setas indicam o sentido de rotação para a formação da figura do icosaédrico assimétrico formado pelo arranjo de proteínas E.



Fonte: Retirado de Dr. R. J. Kuhn. [40]

e distribuição da estrutura do virion é importante, pois é o que desencadeia a "reprogramação" do hospedeiro, desde a sua entrada na célula, iniciando imediatamente uma cascata de eventos que permitem: a fusão das membranas no processo de reprodução, logo após a tradução instantânea do genoma original do virion, onde seus genes são expressos para produzir novas proteínas virais, que durante esse processo de montagem, novas cópias do genoma e de proteínas virais, usando os recursos do próprio hospedeiro para produzir mais vírus [40].

As proteínas presentes na superfície do virion se agrupam em uma cápsula esférica proteica chamada de envelope (E), que assume a maior região da superfície viral, responsável por mediar os processos de ligação e de fusão da membrana. A proteína (C) possui uma espécie de "âncora" hidrofóbica que serve como um peptídeo<sup>5</sup> sinalizador para a translocação do retículo endoplasmático da proteína (M), que é também chamada de pré-membrana (prM) em alguns vírus, a qual é produzida durante o processo de maturação. Esse domínio hidrofóbico é finalmente clivado da proteína (C) madura pelo vírus no processo de protease. A proteína (C) madura se

<sup>5</sup>São moléculas formadas pela ligação de dois ou mais aminoácidos que compõem as proteínas.

dobra em um dímero compacto com cada monômero contendo quatro alfa-hélices [40].

Dessa forma, entende-se que a proteína do capsídeo desempenha um papel central no processo de montagem de flavivírus [41,42], e, nas próximas seções, nos aprofundaremos, em especial, no Zika Vírus, o qual toda essa pesquisa se baseou, abordando suas principais características, e como suas peculiaridades podem ser vistas em nível atômico.

#### 2.1.4 O Zika Vírus

O ano de 1947 marcou a primeira vez que o vírus da Zika (ZIKV) chegou a ser isolado [43,44], do soro de um macaco *rhesus pyrexial*, na floresta de mesmo nome, em Uganda, que conta com a agricultura como sendo a principal fonte de sustento. Desde então, o alerta vermelho fora instaurado em toda a comunidade científica, quando estudos relacionados com a transmissão da conhecida e temida febre amarela foram feitos na mesma floresta, e a segunda isolação do vírus, agora, encontrado no mosquito *Aedes (Stegomyia) africanus*, que causava esporádicas infecções em humanos por toda África e Ásia.

O ZIKV apresenta três grandes linhagens filogenéticas da África Oriental, da África Ocidental e da Ásia/Americana [45], constituindo um único sorotipo [46]. Acredita-se que essas linhagens de ZIKV tenham surgido de África Oriental no final de 1800 ou início de 1900 [45], sendo a linhagem asiática responsável para todos os surtos de ZIKV no Pacífico e nas Américas.

No entanto, somente em 2015, o elevado potencial de propagação do ZIKV se evidencia, de maneira alarmante, quando o ministério de Saúde confirmou no Brasil os primeiros surtos da doença, e ainda relacionou-se pela primeira vez o fato de que à enfermidade foi dada após o nascimento de várias crianças acometidas pela doença fetal, a microcefalia [3].

Sob um prima epidêmico, estudos mais atuais mostram que existem mais formas de transmissão do vírus, não sendo somente a picada dos mosquitos já citados. A difusão da doença pode acontecer também da mãe infectada para o feto durante a gestação, por transfusão sanguínea, e ainda pode ser considerada como uma doença sexualmente transmissível, já que a presença do vírus no sêmen masculino fora caracterizada [47]. O ZIKV também pode infectar olhos [48,49] e ainda ser associado à doenças mais graves, como trombocitopenia, púrpura trombocitopênica, e, em casos mais graves, pode levar a uma infecção generalizada em múltiplos órgãos [3], ocasionando até a falência desses.

No entanto, O ZIKV se tornou um dos grandes agentes problemáticos quando casos de infecção congênita, que causava um ataque as células neurológicas durante a gestação, chamada

de Microcefalia <sup>[3]</sup>. Outra doença que pode atingir paciente reféns do vírus, é a Síndrome de Guillain-Barré, que é uma doença autoimune grave que causa paralisia muscular. Nesse caso, o que acontece é o ataque reprogramado do sistema imunológico, que passa a atacar as células nervosas <sup>[50]</sup>.

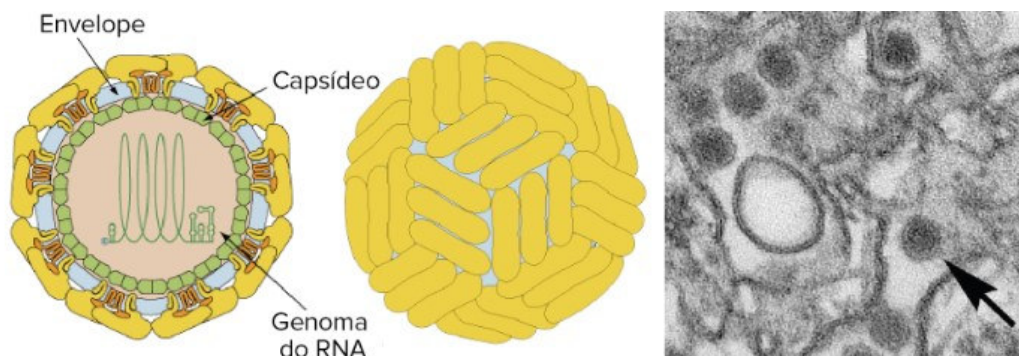
Por não ser uma patogênese nova, é assustador que um vírus com inúmeras conexões causais ainda origine tantos surtos, e que não exista tratamento adequado. A doença acaba sendo negligenciada pelo fato de assolar áreas menos desenvolvidas, retratando um cenário muito mais doloroso, que restringe-se a uma população imunologicamente ingênua, muitas vezes, abandonada.

### 2.1.5 Arranjo estrutural e proteico do ZIKV

Um vírus é composto por uma série de proteínas, que determinam e codificam a estrutura básica da partícula viral. A literatura relata que a partícula do ZIKV é formada por três estruturas principais <sup>[2,33,51]</sup>. As propriedades estruturais desse flavivírus são separadas em capsídeo (C), proteína precursora de membrana (PrM), glicoproteína de membrana (M) e proteína do envelope (E).

O virion ou nucleocapsídeo desse pequeno agente mede  $\sim 25\text{-}40\text{nm}$  de diâmetro <sup>[2]</sup>, e está envolvido por uma espécie de envelope <sup>[52]</sup>, o qual é originário da célula hospedeira que primariamente a infectou. A partícula íntegra (virion e envelope) mede cerca de  $40\text{-}50\text{nm}$ . Por outro lado, as proteínas não estruturais são responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão do vírus incluindo replicação, virulência e patogenicidade <sup>[53]</sup>.

Figura 2.6: Estrutura do do vírus Zika (ZIKV) e organização do genoma.



Fonte: esquerda, imagem modificada de "Zika virus: Virion," por ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics (CC BY-NC 4.0); direita, "Zika virus," por C. Goldsmith, CDC Public Health Image Library (domínio público). Na direita uma imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), a seta preta indica uma única partícula viral de Zika com  $40\text{nm}$  de diâmetro, com um envelope externo e um núcleo interno denso, por Hernaiz, Bruno, et al <sup>[2]</sup>



A proteína (E) é formada pela glicoproteína E empacotada, seguida pela membrana com a proteína M, que é responsável por determinar a estrutura do envelope do vírus e é uma espécie de envoltório bilaminar de natureza lipoproteica responsável por dar origem ao envelope. O RNA se encontra encerrado em um capsídeo (C) formado por um conjunto icosaédrico de proteínas, que protege o material genético e facilita a invasão ao corpo celular.

O ZIKV ainda apresenta uma interface com potencial eletrostático divergente dos demais flavivírus, e, pelas proteínas sofrerem mudanças nas suas estruturas com muita facilidade, existem propriedades de ligação alteradas em resposta do contato com o hospedeiro e a fatores protetores (anticorpos) nesse capsídeo [53,54]. A relação de novas cepas epidêmicas surgem em parte por mutações no capsídeo viral, que se deve ao encaixe da estrutura do anticorpo no complexo do virion, o que também responderia a maior dificuldade na obtenção de uma vacina eficaz contra o ZIKV. [54]

A proteína E é uma glicoproteína organizada em dímeros no envelope viral que possui relevância na produção e maturação do vírus. Pode ser dividida em três domínios funcionais (Figura 2.7): I domínio ou central; II domínio, que é o domínio de dimerização e apresenta o peptídeo de fusão e o domínio III, que funciona como anti-receptor viral. Dessa forma, se encontra majoritariamente localizada no tráfego intracelular, onde participa da montagem e replicação do vírus.

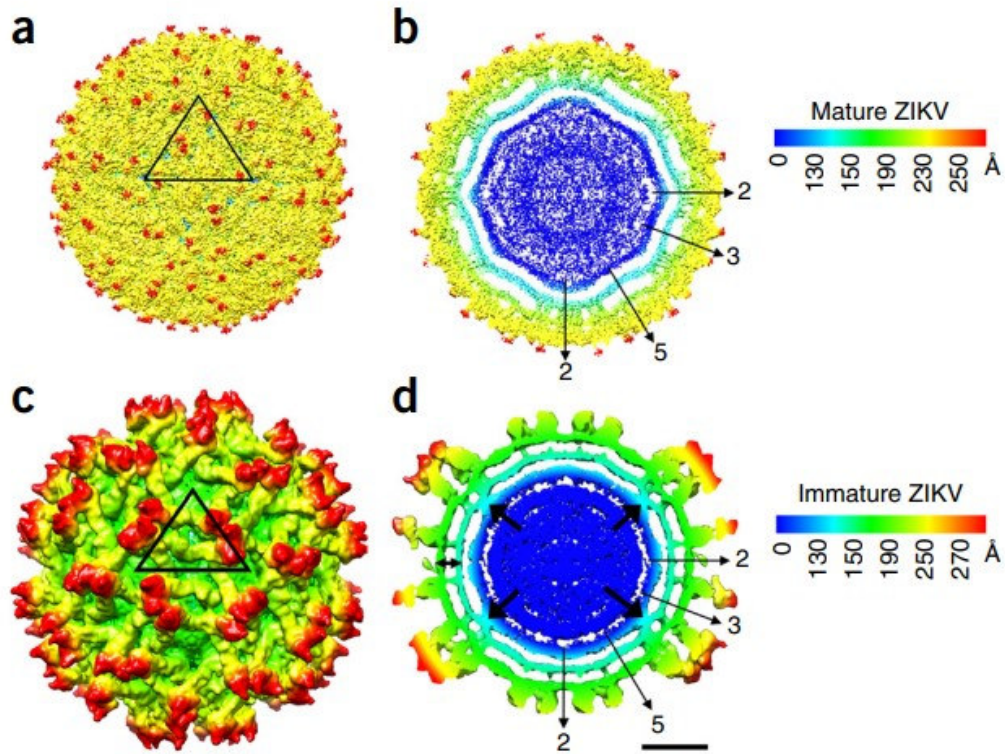
Com o advento da Microscopia crioelétrica (crio-EM) estruturas de vários vírus foram determinadas, e a classe dos flavivírus não passou despercebida. O ciclo do ZIKV é iniciado com a interação do domínio III da proteína E aos receptores celulares [55,56]. Ao adentrar o sistema que infectou, as partículas do ZIKV se inserem em uma molécula receptora da membrana celular saudável do hospedeiro. É importante salientar que isso só se faz possível pelo fato de que toda proteína possui um ponto neutro eletricamente, e é neste ponto que a interação eletrostática vírus-hospedeiro acontece [57].

Durante a infecção viral as partículas se difundem ao longo da célula por meio do processo de endocitose mediada por clatrina<sup>6</sup>, a qual regula a montagem e a desmontagem do revestimento celular, agora infectado pelo vírus. A principal diferença observada em relação a outros vírus semelhantes, da família flavivírus, está na região das glicoproteínas do envelope externo do vírus [55]. Seria essa proteína que esse tipo de vírus utiliza para se ligar às células humanas. A abundância de surtos de Zika [3,4], e o surgimento de variantes são impulsionados em parte

---

<sup>6</sup>Proteína do citoplasma que desempenha um papel no processo de formação de vesículas membranares no interior das células eucariontes.

Figura 2.7: Uma imagem crio-EM representativa do ZIKV hidratado congelado, mostrando a distribuição dos fenótipos do virion, e a divisão da proteína E em 3 domínios funcionais. Estrutura crio-EM do vírus Zika imaturo. Vista de superfície (a,c) e seção transversal (b,d) de ZIKV maduro (superior) e imaturo (inferior), colorido radialmente de acordo com as teclas. Setas pretas grossas indicam as densidades entre o núcleo de RNA interno e a membrana viral (seta de duas pontas indica as camadas interna e externa da membrana) em ZIKV. As finas setas pretas numeradas em b e d dão o icosaédrico eixos de simetria. A unidade assimétrica é mostrada como um triângulo preto em a e c. Barra de escala, 100 Å.



Fonte: Retirado de Kuhn et. al. [55].

por mutações principalmente na proteína do capsídeo que pode mediar a fuga e a neutralização de anticorpos [58].

Nas próximas seções, serão abordados os princípios físicos da técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM), a qual fora utilizada neste estudo para investigação das propriedades estruturais e mecânicas do ZIKV.

## 2.2 Princípios operacionais da Microscopia de Força Atômica

A observação de superfícies utilizando instrumentos óticos possuem inúmeras limitações, e delimitam uma área muito restrita de manipulação das características a nível molecular e atômico das mais diversas amostras. Por esse viés, e com o avanço de teorias a respeito de forças de interação moleculares, comparações de resolução, e é claro, com o aperfeiçoamento

da Nanotecnologia o impossível se torna tangível de análise.

A família de microscópios de Varredura por Sonda ou SPM (derivação do inglês *Scanning Probe Microscope*) possuem como componente essencial uma sonda ou ponta que "varre" a superfície da amostra, possibilitando observar e manipular características de nível molecular e atômico, além de ter uma resolução de imagens mais alta que outras técnicas mais antigas.

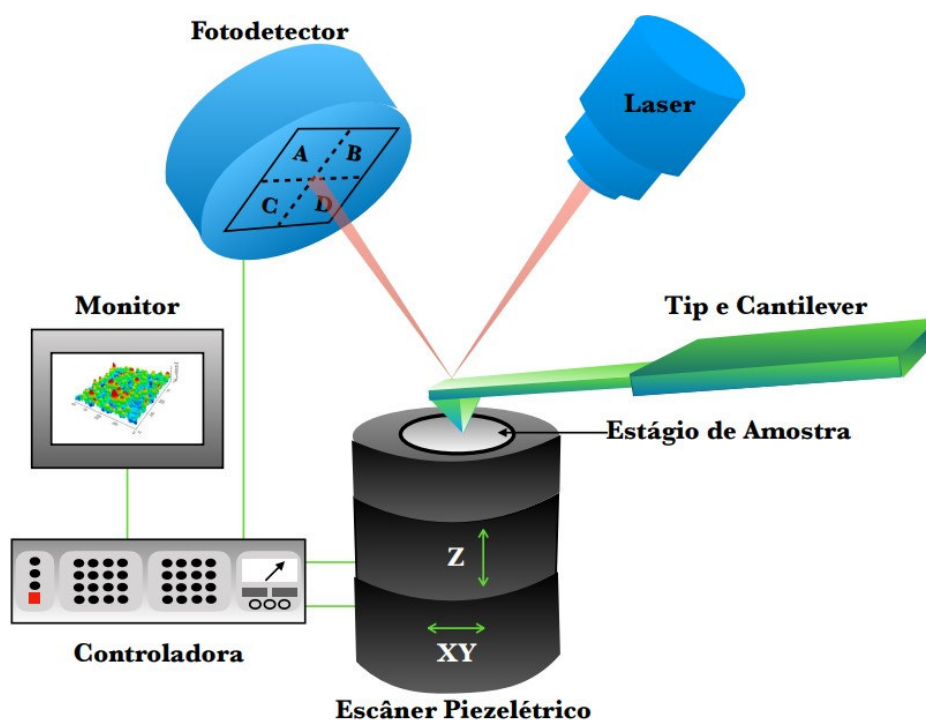
Sob esse prisma, o princípio de funcionamento do AFM está baseado na interação que ocorre, ao longo da varredura, entre os átomos que compõem a ponta e os átomos que compõem a superfície da amostra, e dessa forma ao comparar o STM com o AFM é fácil perceber que ambos possuem suas peculiaridades, no entanto, o AFM possui uma maior facilidade de fazer imagens tanto de superfícies condutoras quanto isolantes, que, por sua vez, é um processo mais demorado no STM.

Por consequência, é importante salientar que o AFM possui muitos modelos distintos, mas existe uma semelhança entre eles, os quais são constituídos, basicamente, por quatro partes que interagem entre si como um mecanismo interligado e único. São elas: sonda (cantiléver + ponta); escâner piezoelétrico, que posiciona a amostra em relação à ponta; laser de diodo; fotodetector e computador para controle do sistema, armazenamento dos dados produzidos pelo fotodetector e conversão desses dados em mapas topográficos tridimensionais, mapas de propriedades mecânicas, elétricas e magnéticas. A Figura 2.8 ilustra o equipamento e seus respectivos componentes.

A habilidade de interagir, por meio de forças interatômicas, com moléculas e átomos representa um marco na história da microscopia, visto que conforme a ponta varre a superfície das amostras, as interações entre as forças que regem toda a teoria do eletromagnetismo e os diferentes pontos das amostras atuam como uma espécie de combinação heterogênea, o que faz com que o AFM se torne uma ferramenta tão interessante para análise de diferentes tipos de amostras.

O que acontece no momento em que a ponta do AFM interage com as características da superfície da amostra é medida através do deslocamento do cantiléver, onde o piezo efetua essa ação, posicionando e controlando a força aplicada sobre a amostra, de forma que passe nas três dimensões ortogonais ( $x,y,z$ ). Esse deslocamento pode ser medido através da deflexão de um feixe de laser, gerado pelo diodo emissor de laser, que é refletido na parte de trás do cantiléver com o detector de fotodiodo. O AFM então descodifica esse deslocamento em imagens topográficas da amostra, traçando a deflexão do feixe de laser à medida que sua ponta interage com

Figura 2.8: Esquema de funcionamento do Microscópio de Força Atômica. A medida que o cantiléver *varre* a amostra que se encontra firmada à cerâmica piezelétrica um laser incide sobre sua extremidade livre, de forma que seja refletido para um espelho no fotodetector, que mede as deflexões do cantiléver, o qual armazena os dados e transmite-as até a controladora, que por sua vez reenvia para o computador, que possui um software específico que lê o algoritmo e o releva como imagem.



Fonte: Imagem cedida pela Prof<sup>a</sup> Luciana Alencar <sup>[59]</sup>.

a amostra <sup>[11]</sup>, e além de produzir imagens topográficas, o AFM também investiga propriedades mecânicas, tais como: adesão, elasticidade, interações de forças magnéticas e eletrostáticas.

As interações interatômicas entre objetos pontuais ou átomos podem ser de natureza atrativa ou repulsiva, por sua vez, o microscópio de força atômica possui diferentes modos de operação, os quais se resumem em: contato, não contato, e contato intermitente.

### 2.2.1 Modos de Operação

Cada modo de operação revela abaixo da escala nanométrica uma forma diferente e particular de obter as imagens de superfície. Eventualmente, regimes são impostos em cada modo de varredura, nesta seção trataremos de cada um.

Durante a varredura no modo contato, existe um regime atrativo entre a sonda e a amostra, ou seja, a força atuante sobre o cantiléver é de caráter repulsivo, do tipo repulsão íon-íon, que decaem a medida que ocorra a separação da sonda-amostra. Para que as imagens formadas tenham alta resolução é necessário que o cantiléver seja em formato de "V", mole (constante

elástica mais baixa) e, por sua vez, que este possua uma flexão ideal para que não haja danificação da amostra estudada, e muito menos ruídos durante a análise. Sob esse prisma, as medidas em modo contato são feitas para que o cantiléver se flexione ao perceber possíveis mudanças de topografia da amostra <sup>[59]</sup>. Por sua vez, é um modo empregado majoritariamente em amostras mais rígidas, no entanto, pode ser usado em amostras sensíveis, basta que haja um cuidado em controlar a força normal aplicada, que tende a criar uma força de atrito substancial enquanto a sonda varre a superfície em questão.

O modo não-contato surgiu com o intuito de reduzir as forças de contato e proteger a amostra de possíveis deformações a partir da tensão provocada por forças que atuam entre a ponta e a superfície, que são em grande parte devido às forças de Van der Waals, que serão abordadas ainda neste capítulo. Nesse caso, essas mudanças de força induzem alterações no comportamento ressonante do cantiléver, que acaba ocasionando uma calibração mais difícil e, pelo cantiléver oscilar a uma distância (geralmente de 5 a 15 nm) acima da superfície da amostra, a força de natureza atrativa entre a ponta e a superfície gera mudanças de força que induzem alterações no comportamento ressonante do cantiléver, e, em alguns casos, foi descoberto que estruturas moles nas superfícies ainda podem ser deformadas pela ponta do AFM <sup>[60,61]</sup>.

No modo de contato intermitente (*tapping mode*), o cantiléver oscila em uma frequência que se assemelha à sua frequência de ressonância a medida que varre a amostra. Dessa forma, quando a sonda chega até a superfície da amostra inicia-se um movimento que pode ser entendido como uma sequência de pequenas batidas. Esse contato intermitente elimina forças que interferem nas medidas, tal como de arraste lateral, o que facilita a análise de amostras mais macias, pois, nesse caso a sonda oscila muitas vezes tocando levemente a superfície. Dessa forma, a amplitude de oscilação da sonda é fixa e suficientemente calibrada no decorrer da varredura, fornecendo uma desenvoltura maior para que o cantiléver que atua em prol da força restauradora, que é sempre direcionada para a posição de equilíbrio do sistema, e assim impede que a sonda fique presa na camada de contaminação pelas forças eletrostáticas ou de menisco.

### **2.2.2 Espectroscopia de Força**

Historicamente, o AFM pode ser entendido como sinônimo de uma caixa de pandora para os físicos. Não é atoa que mundo à fora imagens de AFM dos mais diversos tipos de materiais sejam respeitadas nas academias, visto que medidas de AFM extraem informações de extrema relevância à respeito das propriedades físicas das amostras catalogadas. Por sua vez, tamanha

revolução possui um algoritmo atribuído à cada imagem, que se baseia no modelo elaborado por Hertz. Nesta seção detalharemos o estudo de uma curva de força, dissecando a relação força *versus* distância.

### A curva de Força

Com a técnica do AFM, manipulações sobre as amostras em uma escala nanométrica se tornaram possíveis. Sob esse prisma, além da produção de imagens de alta resolução, essa ferramenta poderosa possui uma forma de medir parâmetros de adesividade, entre superfícies ou moléculas individuais, medidas de resistência mecânica (módulo de Young, deformações plásticas, rigidez, entre outras), por meio de um gráfico que, por sua vez, integra o estudo de forças intra e intermoleculares. Esses dados quantificam-se nas chamadas curvas de força.

O resultado de uma medida de força é uma medida da corrente de fotodiodo  $I_{PSD}$  versus a posição de altura do piezoelétrico  $Z$ , que faz a aproximação do cantiléver à superfície da amostra. Quando a ponta toca a amostra há a realização de uma força (controlada) sobre ela, que depois é cessada quando a ponta retorna a sua posição inicial. Esse contato é o que gera uma curva de força, que pode ser dividida em diversas regiões.

No momento da obtenção desse gráfico, a ponta é aproximada ao longo do eixo vertical (eixo  $Z$ ) e a deflexão de cantiléver é relatada. A força de interação entre a ponta e a amostra é dada pela lei de Hooke:

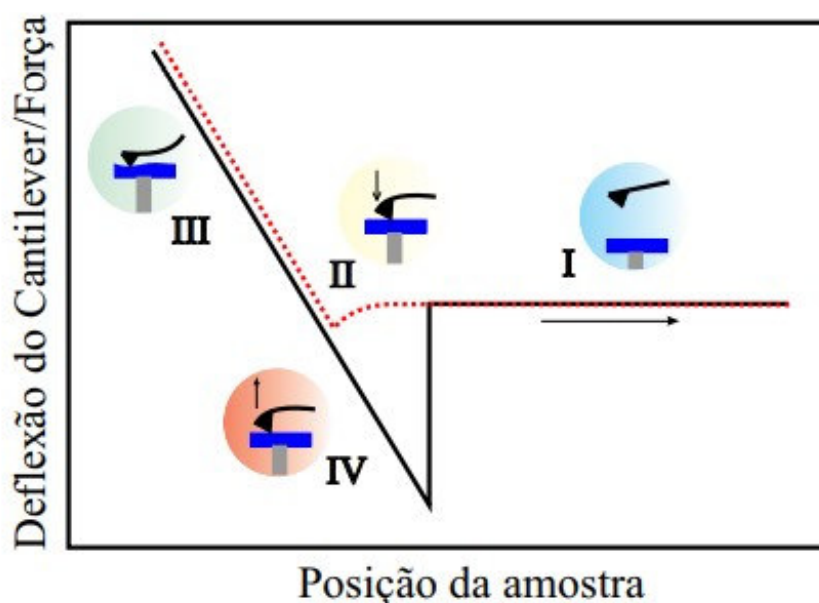
$$F = -k_c \cdot d, \quad (2.1)$$

onde  $F$  corresponde à força,  $k_c$  é a constante de mola do cantiléver e  $d$  é a deflexão do cantiléver. A constante de mola é dependente das propriedades físicas do cantiléver, e equaciona-se da seguinte forma:

$$k = \frac{Et^3w}{4l^3}, \quad (2.2)$$

onde  $E$  é o módulo de Young (referente à elasticidade),  $t$ ,  $w$  e  $l$  são parâmetros que correspondem, respectivamente a espessura, largura e comprimento do cantiléver. Devido ao fato de que podem existir possíveis deformações no processo de fabricação do cantiléver, a equação acima está aproximada para um valor de rigidez de um cantiléver do tipo retangular.

Figura 2.9: Esquemática de uma curva de força, idealizada que descreve um ciclo de retração e de aproximação da ponta do AFM, que é continuamente repetido durante a varredura da superfície. A ponta do AFM está se aproximando da superfície da amostra, mas ainda não existe nenhuma interação (I). Agora, a sonda está se aproximando da amostra, o contato inicial entre a ponta e a superfície é mediado pelas forças atrativas de van der Waals (contato) que levam a uma atração da ponta em direção à superfície (II). A ponta exerce uma força constante na superfície que leva a uma indentação da amostra e a uma deflexão positiva do cantiléver (III), devido a existência de forças repulsivas. Será nesse ponto que propriedades elásticas podem ser medidas. A ponta tenta retrair-se e soltar-se da superfície, o que gera um deflexão negativa do cantiléver devido à adesão entre a ponta e a amostra (IV). O contato é quebrado quando a força restauradora supera a de adesão.



Fonte: Imagem cedida pela Prof<sup>a</sup> Luciana Alencar <sup>[59]</sup>.

### 2.2.3 Forças de Interação Sonda-Amostra

O AFM opera medindo as forças entre o par sonda-amostra, e se baseiam em diversos princípios físicos, os quais regem a teoria do eletromagnetismo, e suas forças, as quais são interações que envolvem diretamente prótons e elétrons. As interações atômicas se baseiam nessas forças eletromagnéticas, sendo assim, para entender o funcionamento de um AFM é necessário conhecer as forças que atuam entre sistemas microscópicos em distâncias muito pequenas. Essa interação rege o princípio de funcionamento do AFM.

Essas forças dependem da natureza desse par sonda-amostra, da distância entre eles, da geometria da ponta e de qualquer contaminação que houver sobre a superfície da amostra. Durante o processo de varredura, os átomos localizados na extremidade da ponta interagem com os átomos da superfície da amostra que estão imediatamente abaixo dela ou nas vizinhanças<sup>[62,63]</sup>.

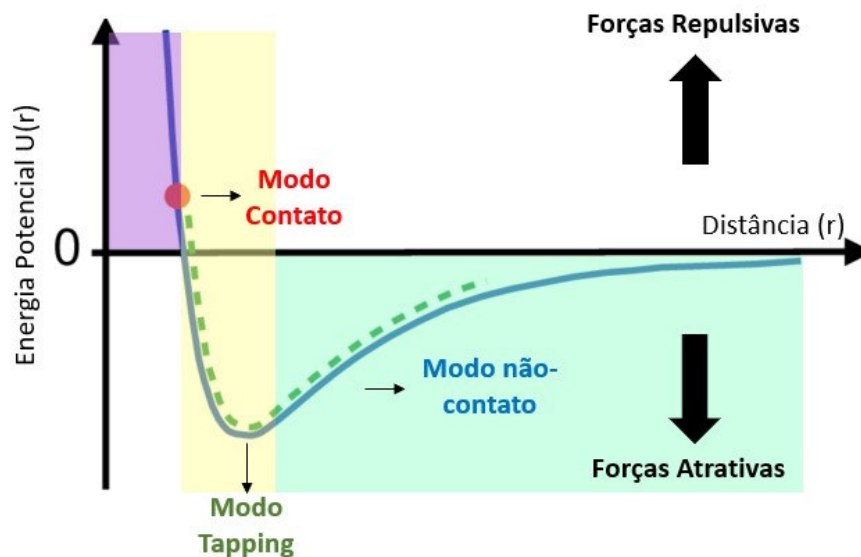
As interações interatômicas entre objetos pontuais ou átomos podem ser repulsivas ou atrativas. As forças de interação entre a ponta e a amostra, em função da distância entre elas,

estão associadas por um potencial do tipo Lennard-Jones <sup>[64]</sup>. Esse potencial é um modelo matemático proposto para descrever a interação entre duas moléculas ou dois átomos neutros separados por uma distância maior que o raio desses dois átomos. O potencial de Lennard-Jones pode ser definido como um modelo empírico fenomenológico, caracterizando a repulsividade atômica, de maneira que pode ser descrito pela equação 2.3, escrita abaixo:

$$U(r) = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] = \left[ \left( \frac{A}{r} \right)^{12} - \left( \frac{B}{r} \right)^6 \right], \quad (2.3)$$

sendo  $A = 4\epsilon\sigma^{12}$  e  $B = 4\epsilon\sigma^6$  componentes das interações repulsivas e atrativas, respectivamente.

Figura 2.10: Curva teórica do potencial de Lennard-Jones, e onde atuam os modos de operação do AFM (*contato*, *não-contato* e *tapping*). Região em roxo corresponde ao domínio de forças repulsivas. A região em verde corresponde ao domínio de forças atrativas. Região em amarelo corresponde a área de interação entre as forças.



Fonte: Próprio autor.

A distância entre a ponta e a superfície da amostra é representada por  $r$ ,  $\epsilon$  representa a energia mínima do sistema e  $\sigma$  a distância na qual o potencial é nulo <sup>[65]</sup>. O termo  $\left(\frac{A}{r}\right)^{12}$  corresponde a origem de uma força repulsiva eletrostática, dominante na região de curtas distâncias, devido a proximidade de cargas de mesmo sinal, que ocorrem devido ao princípio de exclusão de Pauli. O termo  $\left(\frac{B}{r}\right)^6$  corresponde às forças atrativas, dominantes nas regiões de longo alcance, geralmente originadas pelas forças de Van der Waals, pois, apesar dos átomos apresentarem um momento dipolar local não nulo devido ao movimento dos elétrons ao redor do núcleo acaba gerando esse tipo de força. Na Figura 2.10, temos a curva teórica que representa a energia



potencial entre duas moléculas, descrita pelo potencial de Lennard-Jones.

A seguir, falaremos individualmente de algumas dessas forças.

### Forças de Van der Waals

Em físico-química, uma força de Van der Waals (ou interação de Van der Waals), é a soma de todas as forças atrativas ou repulsivas, possuindo uma natureza elétrica, que se diferencia das ligações de hidrogênio e das interações dipolo-dipolo por serem mais fracas em comparação a estas, o que significa dizer que surge em prol da polarização das moléculas, onde existe uma compreensão de como suas moléculas interagem (forças intermoleculares) umas com as outras devido à campos elétricos de cargas vizinhas ou dipolos permanentes. Estas forças são, na verdade, uma combinação de três forças: i) forças de orientação; ii) forças de indução e iii) forças de dispersão<sup>[63,66]</sup>.

As forças de orientação (i) ou força dipolo permanente, também chamadas de Forças de Keesom em homenagem ao físico Willem Hendrik Keesom, quem primeiro descreveu matematicamente a força em 1921<sup>[67,68]</sup>, se formam através do resultado da interação entre dois dipolos permanentes e depende da orientação relativa dos dipolos. Na molécula polar, na parte mais eletronegativa forma-se um dipolo elétrico permanente. Com a diferença de eletronegatividade, uma concentração de carga negativa começa a existir no átomo mais eletronegativo deixando o átomo menos eletronegativo no lado "positivo" da molécula. Assim, a extremidade positiva de uma molécula atrai a extremidade negativa da outra molécula, e assim por diante, dando a interação. Analisando a interação entre diversos dipolos, mensuramos a atração e repulsão entre os mesmos. Se todas as orientações fossem realizadas com igual frequência, a média da polarização seria nula<sup>[69]</sup>.

Sob essas condições, as Forças de Keesom deriva-se da na estatística de Boltzman, que consolida-se no fato de que o sistema deve se organizar, buscando as orientações dos dipolos, utilizando para isso a menor energia possível, de tal modo que, quanto menor a energia para orientar os dipolos menor a temperatura do sistema<sup>[70]</sup>. Keesom ainda firmou a energia potencial média  $U_K$  de todas as posições de interação dipolo-dipolo de forma muito inteligente: (Equação 2.4):

$$U_K = -\frac{C_K}{r^6} = -\frac{2}{3} \frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{r^6} \frac{1}{k_B T}, \quad (2.4)$$

onde  $r$  é a distância entre as moléculas e  $C_K$  é uma constante definida pelos parâmetros:  $\mu_1$  e

$\mu_2$ , que são os momentos de dipolos das moléculas.  $k_B$ , é a constante de Boltzmann e T vem de temperatura.

Para pequenas distâncias e/ou baixas temperaturas ( $k_B T \leq \frac{\mu_1 \mu_2}{r^3}$ ), a equação 2.4 não é válida. Nessas condições, as moléculas se orientariam de forma paralela, ao longo da linha que as une, resultando em uma energia potencial da forma (Equação 2.5):

$$U_K = -2 \frac{\mu_1 \mu_2}{r^3}. \quad (2.5)$$

As equações 2.4 e 2.5 representam uma força atrativa, conhecida como *Efeito de Orientação*<sup>[66,70]</sup>.

As forças de indução (ii), também chamadas de Forças de Debye, em homenagem ao físico e químico Peter Debye descendem da interação entre uma molécula polar e uma molécula apolar. Ao estudar a equação 2.4, Debye verificou que essas forças não deveriam ser únicas, uma vez que, para altas temperaturas, a interação de atração entre as moléculas é zero. De acordo com os experimentos de Van der Waals, entretanto, a interação atrativa não se anula em altas temperaturas<sup>[70]</sup>.

O campo elétrico da molécula polar distorce a distribuição de cargas da nuvem eletrônica da molécula apolar, induzindo a formação de um dipolo e resultando em uma atração entre eles. Esse fenômeno pode ser descrito introduzindo uma constante  $\alpha$ , chamada de polarização, na energia potencial média  $U_D$ . Considerando um campo elétrico externo de força  $F$ , a molécula de polarização  $\alpha$  possui um momento de dipolo induzido  $M$ , definido como  $M = \alpha F$ . A sua energia média  $U_D$  será dada por (Equação 2.6):

$$U_D = -\frac{1}{2} M F = -\frac{1}{2} \alpha F^2. \quad (2.6)$$

Quando as duas moléculas estiverem próximas uma da outra (molécula 1 e molécula 2), será gerada uma força do tipo (Equação 2.7):

$$F = \frac{\mu_1}{r^3} \sqrt{1 + 3 \cos^2 \theta_1}, \quad (2.7)$$

onde  $\mu_1$  é o momento de dipolo da molécula 1 e  $\theta_1$  é o ângulo formado entre o eixo do dipolo e a orientação da força do campo elétrico. Esse campo polariza a molécula 2, dando origem à uma energia potencial de Debye  $U_{D_1}$ , dada por (Equação 2.8):

$$U_{D_1} = -\frac{\alpha_2 \mu_1^2}{2 r^6} (1 + 3 \cos^2 \theta_1), \quad (2.8)$$

que possuirá sempre uma natureza atrativa, até para temperaturas infinitamente altas. Tomando a média de todos os ângulos  $\cos^2 \theta = \frac{1}{3}$ , temos que (Equação 2.9):

$$U_{D_1} = -\alpha_2 \frac{\mu_1^2}{r^6}. \quad (2.9)$$

A ação da molécula 2 sobre a molécula 1 gera uma quantidade correspondente. Portanto, a interação total das duas moléculas é obtida como (Equação 2.10):

$$U_D = U_{D_1} + U_{D_2} = -\frac{\alpha_2 \mu_1^2 + \alpha_1 \mu_2^2}{r^6} = -\frac{C_D}{r^6}. \quad (2.10)$$

Caso essas moléculas sejam do mesmo tipo, isto é,  $\mu_1 = \mu_2 = \mu$  e  $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha$ , tem então que (Equação 2.11):

$$U_D = -\frac{C_D}{r^6} = -\frac{\alpha \mu^2}{r^6}, \quad (2.11)$$

onde  $C_D$  é uma constante definida por  $\alpha \mu^2$ . Essa equação representa o efeito de indução. As forças de dispersão (iii) foram descobertas pelo físico teórico alemão Fritz London, durante seus estudos sobre atração entre átomos de gases nobres<sup>[70]</sup>; por esse motivo, também são chamadas de Forças de London. A força de dispersão é de natureza da mecânica quântica e atua em todas as moléculas, independente de ser polar ou apolar<sup>[66]</sup>.

Podemos considerar o elétron como um oscilador, em que sua posição em torno do núcleo do átomo não é fixa. Desta forma, existe uma probabilidade dos elétrons estarem distribuídos de forma assimétrica na nuvem eletrônica, criando zonas com densidades de cargas mais acentuadas que em outras. Esse fato dá origem a dipolos induzidos instantâneos. O campo gerado interage com as moléculas vizinhas, induzindo momentos de dipolos instantâneos, cujas interações são sempre atrativas<sup>[63,66,69,70]</sup>. O potencial que corresponde à essas forças é dado por (Equação 2.12):

$$U_L = -\frac{3h\alpha_1\alpha_2}{2r^6} \frac{\nu_1\nu_2}{\nu_1 + \nu_2}, \quad (2.12)$$

onde  $h\nu_1$  e  $h\nu_2$  são os primeiros potenciais de ionização das moléculas e  $h$  refere-se a constante de Planck. As forças de dispersão são de extrema relevância já que atuam em todos os materiais,

uma vez que todos os átomos possuem flutuações de elétrons<sup>[69]</sup>.

Por fim, define-se o potencial de Van der Walls como sendo a soma das três contribuições: (Equação 2.13):

$$U_{vdw} = - \left( \frac{C_K}{r^6} + \frac{C_D}{r^6} + \frac{C_L}{r^6} \right). \quad (2.13)$$

Os dois primeiros termos da equação 2.13 contém as energias Keesom e Debye. Estes termos atuam apenas entre moléculas polares e são chamados de contribuição polar. O terceiro termo é chamado de contribuição de dispersão, atuando entre todas as moléculas.

### **Força de Capilaridade**

A força de capilaridade atua durante a varredura da amostra, no momento em que, em uma determinada altura a sonda entra em contato com a superfície e acontece um processo chamado de atração capilar, ou seja, a sonda é rapidamente puxada para dentro da camada de umidade superficial que existe sobre a amostra, a medida que a distância entre os átomos diminui. Essa camada existe mesmo em condições ambientes, e vai depender da umidade relativa do ar. Pode conter contaminantes do próprio ar, vestígios que ficaram durante a preparação da amostra, entre outras coisas.

Esta interação atrativa depende da umidade relativa e da hidroflicidade da ponta e da amostra, sendo esse efeito notável durante o processo de retração da ponta, no qual a atração de capilaridade agarra a sonda na superfície da amostra<sup>[64]</sup>. Durante a varredura em ar essa força de capilaridade, devido a diferença de pressão entre o líquido e a força de vapor circundante<sup>[71, 72]</sup>, forma uma espécie de menisco<sup>7</sup> que interage entre a sonda e a amostra (Figura 2.11). Varreduras feitas em meio líquido cancelam a formação de meniscos, pelo fato de que a amostra está em um vácuo regido pelo líquido.

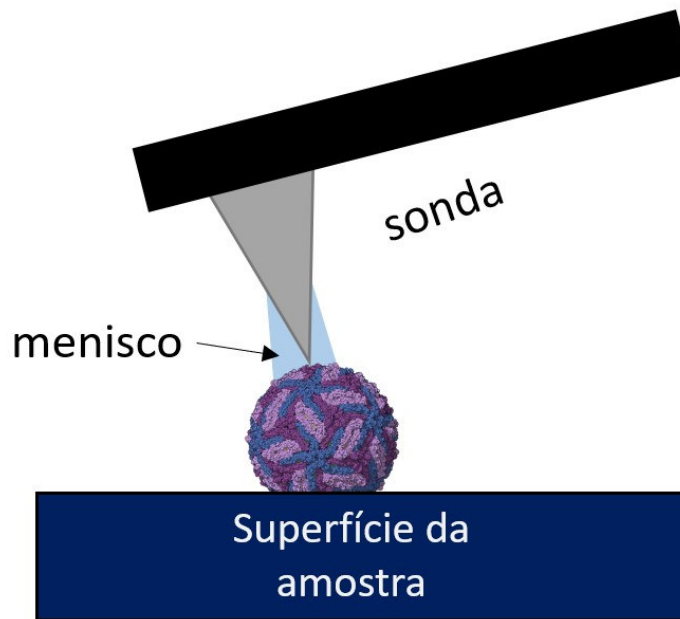
### **Forças de Adesão**

As forças de adesão em medidas de AFM são de extrema importância, visto que se relacionam com a mecânica de contato. Quando a ponta da superfície da amostra sofre a retração, a ponta permanece em contato com a superfície até que a força exercida pelo cantilêver supere a interação adesiva ponta-amostra<sup>[73]</sup>.

---

<sup>7</sup>Menisco é a curvatura apresentada na parte superior de um líquido, em resposta à interação estabelecida com o amostra.

Figura 2.11: Representação da interação da força menisco à medida que acontece a interação sonda-amostra.



Fonte: Próprio autor.

Pela lei de Hooke temos o princípio de operação de um cantiléver (Equação 2.1). Fazendo uma comparação rápida, a lei de Hooke é aplicada de forma satisfatória para amostras que apresentam superfície mais rígida, e portanto sem tantas sinuosidades. Por outro lado, amostras de natureza viscoelásticas possuem variáveis a mais, sendo o caso da grande maioria das amostras biológicas. Sendo assim, a lei de Hooke não tangencia totalmente seu comportamento, já que a forma com que esse tipo de material se deforma é único, e durante um ciclo de indentações pode variar. Relaciona-se, para esse caso, a seguinte equação <sup>[74]</sup>:

$$F \propto \delta^n, \quad (2.14)$$

sendo  $F$  igual a força externa,  $\delta$  a deformação do sistema e  $n$  um expoente que está ligado à geometria do indentador. A constante de proporcionalidade é importante para descrever, além de fatores geométricos, as propriedades elásticas do material. Teoricamente, tem-se o que chamouse de *stress* de contato mecânico entre duas superfícies.

Na literatura, o pioneiro pesquisador que buscou elucidar esse problema fora Heinrich Hertz<sup>[75]</sup>. Ele estudou e posteriormente criou uma relação matemática que determinava a tensão entre duas peças em contato, ou seja, ao pressionar uma superfície plana e uma esfera. Como resultado, a pressão entre duas superfícies curvas deve ser infinita, o que causará o escoamento imediato de ambas as superfícies. No entanto, uma pequena área de contato é criada através

da deformação elástica dos corpos, limitando assim as tensões consideravelmente<sup>[76]</sup> de acordo com a Equação 2.15:

$$a = \left( \frac{PR}{K} \right)^{\frac{1}{3}}, \quad (2.15)$$

onde  $R$  é o raio da esfera e  $K$  é uma constante que relaciona os módulos de Young da esfera e da superfície ( $E_1$ ,  $E_2$ ), considerando a razão de Poisson da esfera e da superfície ( $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ), respectivamente. O parâmetro  $K$  é descrito por (Equação 2.16):

$$K = \frac{4}{3} \left( \frac{1 - \nu_1^2}{E_1} + \frac{1 - \nu_2^2}{E_2} \right). \quad (2.16)$$

O modelo hertziano é copiosamente usado em análises de força de AFM, visto que atrela-se ao estudo das propriedades mecânicas de superfícies mais viscoelásticas. De maneira rica, essa teoria é propensa à descrever contatos macroscópico suaves, cuja aplicação se dá em materiais elásticos, lineares, homogêneos, isotrópicos e que não possuam forças de superfície atrativas (adesão). A teoria de Hertz também presume que o raio de contato é muito menor que o raio da esfera, de modo que a esfera pode ser aproximada como um parabolóide<sup>[76]</sup>.

Mais tarde, com os ensaios de Hertz, outros pesquisadores da época, tal como Johnson, Kendall e Roberts, propuseram expandir em 1971 esses estudos por meio de uma nova teoria denominada de modelo de contato Johnson-Kendall-Roberts (JKR)<sup>[77]</sup>, que explicava a adesão entre dois corpos, mas, dessa vez, elásticos. O modelo JKR considera experimentos cujas áreas de contato são maiores do que as previstas pela teoria de Hertz. A Equação 2.17 descreve o raio de contato entre uma esfera e uma superfície, considerando a ação da força de adesão entre elas:

$$a = \left( \frac{R}{K} \left( P + 3\gamma\pi R + \sqrt{6\gamma\pi RP + (3\gamma\pi R)^2} \right) \right)^{\frac{1}{3}} \quad (2.17)$$

onde  $\gamma$  é o trabalho das forças de adesão, que será realizado para separar completamente o indentador da superfície. Essa teoria inclui a tensão de tração na área de contato, com carga normal mínima e com uma área de contato diferente de zero. Essa carga mínima pode ser chamada de força de *pull-off* ou força de adesão, dada por (Equação 2.18):

$$F_{ad}^{(JKR)} = -\frac{3}{2}\pi\gamma R. \quad (2.18)$$

Novamente, baseando-se na teoria de contato de Hertz, surgiu o modelo proposto de

adesão proposto por Derjaguin, Muller e Toporov, conhecido como DMT [78]. A teoria DMT considera a contribuição das forças adesivas no contato entre corpos elásticos. Para este modelo, considera-se que o perfil de contato permanece o mesmo considerado no modelo hertziano, mas considera-se uma carga total maior devido à força de adesão. Esse fato equivale à interações atrativas que atuam em todas separações entre a esfera e a superfície. Para este modelo, o raio de contato  $a$  é dado por (Equação 2.19):

$$a = \left( \frac{R}{K} (P + 2\pi\gamma R) \right)^{\frac{1}{3}}. \quad (2.19)$$

Agora, a força de adesão é descrita por (Equação 2.20):

$$F_{ad}^{(DMT)} = -2\pi\gamma R. \quad (2.20)$$

De forma mais geral, as forças de adesão  $F_{ad}$  podem ser descritas como o somatório de forças eletrostáticas  $F_{el}$ , de van der Waals  $F_{vdW}$ , de capilaridade  $F_{cap}$  e de forças devido a ligações químicas  $F_{quim}$  [79]. A equação abaixo ilustra essa combinação: 2.21:

$$F_{ad} = F_{el} + F_{vdW} + F_{cap} + F_{quim}. \quad (2.21)$$

## 2.2.4 Reologia

A compreensão biofísica da estrutura básica de diversas amostras, tem se apresentado ao longo do tempo como um desafio aos pesquisadores, visto que a partir do momento em que se compreende a estrutura básica desse material biológico, pode-se entender suas peculiaridades, e assim, levar a uma mudança da visão labiríntica à qual fazia referência à biologia celular e molecular.

De acordo com a Reologia<sup>8</sup>, materiais sofrem deformações a medida que forças diferentes vão sendo aplicadas. Por exemplo, uma força de natureza compressiva, compacta, de tração, tende a alonga-lo, ou de cisalhamento, torce o material. O que acontece com o material fisicamente após a influência de uma dessas determinadas forças é que ou ele retorna à sua forma original, ou se deforma [72,80].

Esses dois regimes estão ligados as propriedades de cada amostra [81], sendo assim, as que não sofrem alterações são conhecidas como *elásticas*, e as que sofrem algum tipo de mudança

---

<sup>8</sup>Ciência que estuda a deformação e o fluxo de matéria, tendo em vista as propriedades mecânicas de materiais.

estrutural são conhecidas como parcialmente ou totalmente *plásticas*. Existe ainda mais uma variável, que atinge grande maioria das amostras, que são que sofrem a chamada *deformação plástica*. Nesse caso, à medida que uma força inicialmente pequena é aplicada sobre o material ele tende a permanecer da mesma forma, mas ao elevar efetivamente essa força, pode haver uma contribuição para uma deformação, que aumenta de forma proporcional à força em questão.

A Microscopia de Força Atômica é usada com frequência em estudos reológicos de materiais predominantemente elásticos<sup>[81]</sup>. Há dois casos: no mais simples, a deflexão de cantiléver descreverá a superfície da amostra de maneira simples e qualitativa. Para um material rígido, essencialmente indeformável, a deflexão do cantiléver será equivalente ao deslocamento para baixo da cerâmica piezoelétrica, enquanto que, para materiais mais macios, a deflexão executada pelo cantiléver é menor, já que o trabalho realizado pela sonda no processo de indentar e recuar é proporcional à essa deflexão.

Sucessivas indentações podem resultar em deformações plásticas da superfície se o *stress* (pressão) aplicado for além do considerado ponto de máxima carga do material. No entanto, o modelo de Oliver e Pharr<sup>[82]</sup> considera que durante o processo de retração da sonda apenas a parte elástica da deformação retorna ao seu estado inicial, enquanto a parte plástica permanece inalterada. Portanto, de maneira distinta ao modelo de Hertz, esta abordagem considera apenas o processo de alívio da carga de força sobre a superfície.

Como já comentado anteriormente, um parâmetro definido nesta abordagem é a rigidez da superfície  $S$  cujo valor é dado por (Equação 2.22):

$$S = \frac{dF}{dh}, \quad (2.22)$$

onde  $\frac{dF}{dh}$  é a derivada da força aplicada à superfície em relação à distância percorrida pela sonda  $h$  durante a retração e aproximação da sonda. De posse do valor de  $S$  para vários pontos da superfície da amostra. Interações sonda-superfície assumindo interações elásticas ideais são frequentemente usadas para determinar o módulo de Young do material.

### **Módulo de Young**

O módulo de Young é uma constante numérica, nomeada pelo médico inglês do século XVIII Thomas Young, que descreve a resistência de um objeto em ser deformado elasticamente enquanto uma força externa é aplicada a ele<sup>[83,84]</sup>. O módulo de Young representa o fator de proporcionalidade na lei de Hooke, que relaciona o estresse e a tensão. No entanto, a lei de



Hooke só é válida sob a hipótese de uma resposta elástica e linear.

O cálculo do módulo de Young de um material deriva da relação dos dados uma curva de distância de força obtida na amostra mole, que será subtraída de outra que foi registrada em um substrato rígido. Dessa forma, a resultante dessas curvas recebe o nome de curva de indentação [19,80,84], que transcreve a força necessária para empurrar a ponta até uma certa profundidade na amostra, e é isso que entende-se por coeficiente de proporcionalidade, que é o módulo de Young. Quanto mais alto o módulo, mais estresse é necessário para criar a mesma quantidade de deformação. A forma desta curva depende do formato da ponta do AFM (geometria), e, é claro, das propriedades elásticas da amostra. Por exemplo, um corpo rígido idealizado possuiria um módulo de Young infinito.

Para se obter o valor numérico do módulo de Young usa-se duas funções, o modelo de Hertz [75], que exemplifica a deformação elástica de duas esferas, e o modelo feito por Sneddon [85], que considerava diferentes geometrias contra uma amostra plana. Sendo assim, ele se interliga ao quão rígida uma amostra é, através de variações dos modelos já mencionados.

A equação que determina a força  $F$  requerida para indentar a ponta a uma dada profundidade ( $\delta$ ) para geometria cônica é

$$F(\delta) = \frac{2 \tan(\alpha)}{\pi} E' \delta^2, \quad (2.23)$$

e para paraboloidal é

$$F(\delta) = \frac{4\sqrt{R}}{3} E' \delta^{1.5}, \quad (2.24)$$

em que  $\alpha$  é o ângulo de abertura da ponta e  $R$  seu raio de curvatura.  $E'$  corresponde ao módulo de Young reduzido que está relacionado ao módulo de Young da amostra  $E$  por:

$$\frac{1}{E'} = \frac{1 - \nu^2}{E}, \quad (2.25)$$

se for possível supor que o valor numérico de  $E$  da amostra é muito menor que o  $E$  da ponta do AFM [86,87]. Modelos alternativos, como o modelo JKR que considera forças adesivas ou, ainda, o modelo de Tataru [88], também são usados, este segundo simula o caso de uma amostra esférica comprimida que se encontra entre duas placas paralelas.

O coeficiente  $\nu$  na equação é o que se entende por razão de Poisson, e mede a razão entre a deformação transversal e a deformação axial em um material elástico submetido a um estresse

uniaxial<sup>9</sup> [86].

O efeito de Poisson é, basicamente, a reação de um material ao expandir ou encolher em uma direção perpendicular à direção de uma força aplicada [89]. A razão de Poisson é encontrada em expressões que envolvem a lei de Hooke.

Materiais convencionais têm coeficiente de Poisson positivo, pois contraem-se transversalmente quando esticados longitudinalmente e se expandem transversalmente quando comprimidos longitudinalmente [90]. O valor dessa propriedade material, que pode ser medida por métodos estáticos ou dinâmicos, varia dentro de um intervalo estreito. Aqueles materiais que possuem coeficiente de Poisson negativo (casos especiais), expandem-se transversalmente quando tracionados e são denominados auxéticos, também conhecidos como *antiborrachas*, pois resistem à forças de cisalhamento, no entanto, tendem a se modificar volumetricamente [90].

## 2.3 Uma visão geral sobre AFM em partículas virais

As primeiras imagens de vírus foram obtidas após a invenção do microscópio eletrônico em 1931 pelos engenheiros Ernst Ruska e Max Knoll. Em 1935, o bioquímico e virologista Wendell Meredith Stanley examinou o vírus do mosaico do tabaco e descobriu que o mesmo era constituído principalmente por proteínas [15,31]. As primeiras imagens de difração de raios-X do vírus cristalizado foram obtidas por Bernal e Fankuchen em 1941. [91] Com base nos seus quadros, Rosalind Franklin descobriu a estrutura completa do vírus em 1955 [92]. No mesmo ano, Heinz Fraenkel-Conrat e Robley Williams demonstraram que o RNA do vírus do mosaico do tabaco e o seu revestimento de proteína purificada (capsídeo) podiam montar-se por si só para formar vírus funcionais, sugerindo que este mecanismo simples foi, provavelmente, o meio pelo qual os vírus foram replicados dentro das células hospedeiras [27].

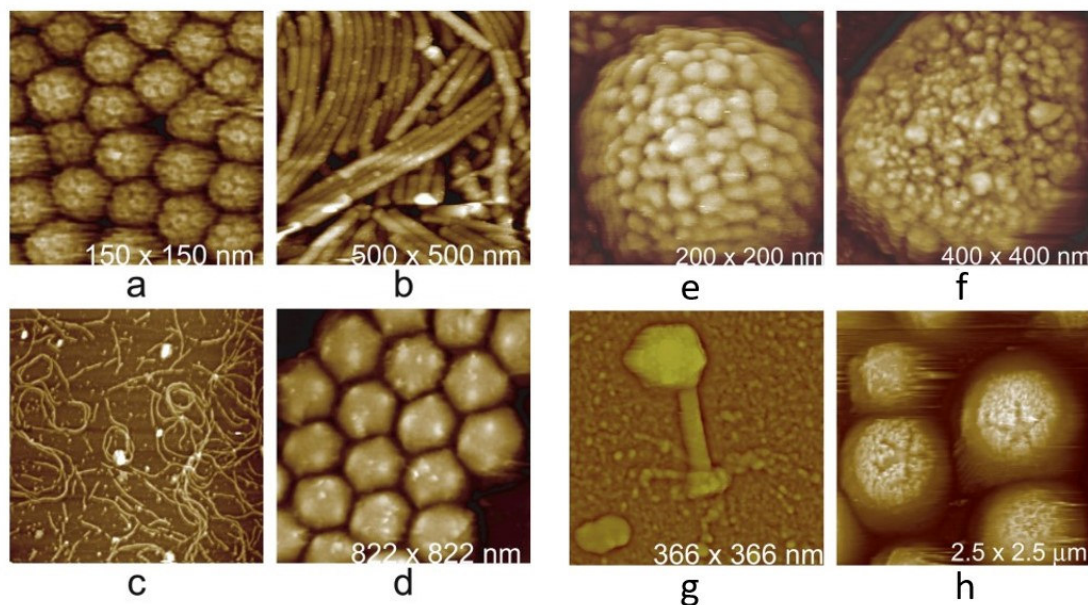
A técnica de AFM pode ser usada como uma ferramenta importante quanto à análises de estruturas virais (Fig.2.12) [83]. Em particular, suas características mecânicas, como rigidez das partículas, o módulo de Young do revestimento do material do capsídeo (como medida de sua rigidez intrínseca), além de possuir a grande vantagem de acompanhar as mudanças estruturais nas partículas virais em tempo real (com as limitações temporais impostas pelo tempo necessário para adquirir cada varredura de imagem).

As propriedades químicas e mecânicas que estão presentes nos capsídeos são cuidado-

---

<sup>9</sup>Tensão de tração ou compressão em uma direção e nenhum estresse nas outras direções.

Figura 2.12: Mapas de vírus obtidos por AFM. (a) vírus do mosaico bromo (BMV); (b) Vírus do mosaico do tabaco (TMV); (c) Bacteriófagos; (d) Vírus Típula iridescente; (e) Vírus da leucemia murina Moloney; (f) Vírus vaccínia; (g) Bacteriófago; (h) Mimivírus.



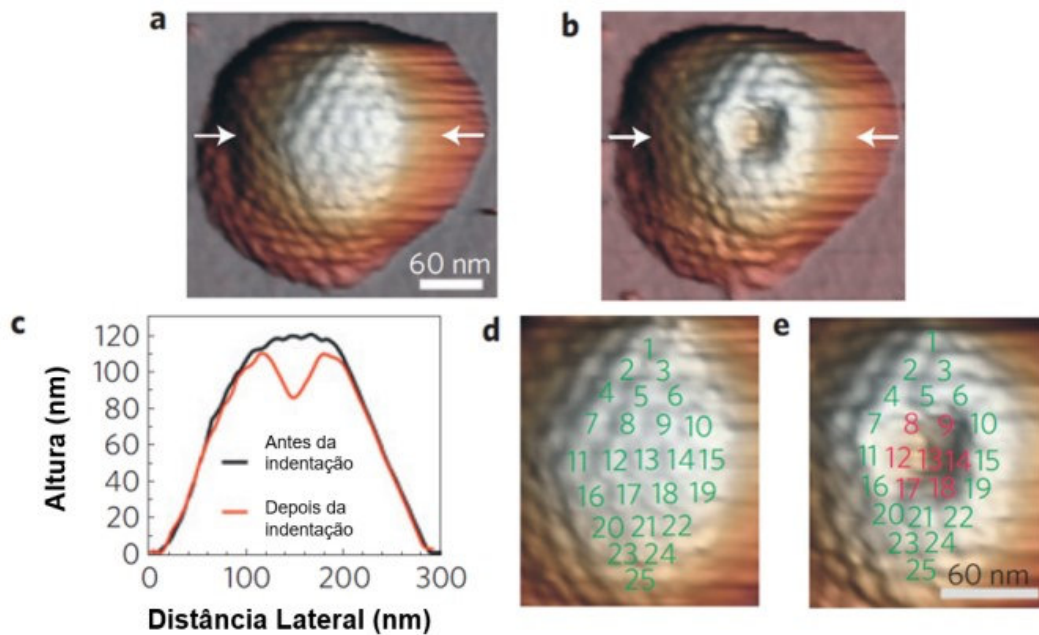
Fonte: Reproduzido de Kuznetsov, Y. G., & McPherson, A. (2011).<sup>[93]</sup>

samente ajustadas para atender a restrições virais, tal como ao tempo de liberação do material genético, já que se feito de forma prematura, ele perderá sua capacidade infecciosa<sup>[24]</sup>. Esse fato ressalta a importância em conhecer as propriedades desse universo tão único, ajudando a elucidar a via infecciosa viral, facilitando o uso de vírus em nanotecnologias, além de contribuir com desenvolvimento de terapias e vacinas eficientes.

Além disso, um prestigiado método também é muito usado para realização de estudos à cerca da mecânica do vírus, que envolve a indentação de virions e/ou de seus capsídeos através de sucessivos ciclos de indentações, que vão “apertando” pontos pré-definidos da superfície da partícula viral, dessa forma em algum ponto pode ocorrer uma espécie de falha da casca viral, a qual sofre uma perturbação do sistema com a ponta do AFM, e assim obtém-se valores de ruptura<sup>[94,95]</sup>, resistência à tração ou resistência à fadiga mecânica.

A Figura 2.13 ilustra perfeitamente o que fora anteriormente relatado. Em (a) a superfície viral de HSV-1 está como prevista na literatura, com 60nm de diâmetro, sem nenhum dano em sua superfície. Em (b) o cenário se torna diferente, visto que após um ciclo de indentações sob a casca do capsídeo do vírus um buraco se formou, devido à interação sofrida pela sonda de AFM na amostra. Outros aspecto importante que Roos e seus colaboradores puderam fornecer está presente na Figura 2.13C, a qual o gráfico de altura (nm) em relação á distância lateral (nm)

Figura 2.13: Imagens de AFM de um capsídeo viral antes e depois da nanoindentação. A) e B) Imagens de topografia tridimensionais de uma partícula HSV-1 antes (A) e após (B) a indentação, respectivamente. C) O perfil de altura, obtido ao longo das setas brancas em A e B. D) e E) A numeração dos capsômeros antes e depois da indentação mostrando a remoção de capsômeros centrais (indicados em vermelho).



Fonte: Reproduzido de W. Roos (2010). [19,42]

em questão demonstra o perfil antes e após a indentação. As imagens (d) e (e) se correlacionam entre si pelo fato de que representam em verde os capsômeros virais antes do processo de indentação e depois desse processo (números em vermelho), configurando uma deformação desses capsômeros centrais.



## 3. Materiais e Métodos

Aqui nos concentramos nas propriedades nanomecânicas do Zika vírus, principalmente com base em dados obtidos pela manipulação mecânica de partículas virais únicas isoladas, tal como cada procedimento usado para aquisição dos resultados, onde cada procedimento será explicado. Este é um estudo de natureza experimental de cooperação multidisciplinar entre o Departamento de Física do Maranhão (DEFIS-UFMA), Laboratório de Nanorradiofarmácia da Universidade Estadual da Zona Oeste do Rio de Janeiro, Instituto de Engenharia Nuclear e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

### 3.1 Inativação do vírus Zika

O protocolo de inativação usado para a amostra de Zika virus (*Brazilian isolate, ZIKVBR*) foi feita seguindo a mesma metodologia adotada por Moser<sup>[96]</sup>. O vírus foi cultivado em células Vero E6 (ATCC, C1008), e titulado em células Vero (ATCC, CCL81)

A inativação do vírus se deu por aquecimento, à uma temperatura de 56°C durante 60 minutos. Sob tais condições o Zika vírus não é mais capaz de infectar seres humanos, já que seu processo replicativo cessa totalmente.

### 3.2 Medidas de Microscopia de Força Atômica em ZIKV

#### Análise e Instrumentação das partículas virais de ZIKV

A principal ferramenta usada neste estudo fora o microscópio de força atômica (AFM) e a base experimental dessas medidas se deu através de amostras preparadas previamente com 10 µL de solução do meio de cultura com suspensões de partículas virais foram depositados em lâminas apropriadas para AFM (13mm de diâmetro), as quais já tinham sob sua superfície lamínulas de vidro ou mica, tratadas com poli-l-lisina 1% (Sigma, St. Louis, MO, EUA), a fim

de garantir a adsorção das partículas virais, pois em mica recém-clivada ou lamínulas de vidro a ligação não acontece, e pelo fenômeno da interação entre partículas virais de carga negativa e entre polímeros de carga positiva presentes na poli-l-lisina melhora a fixação das partículas ao substrato utilizado não alterando a morfologia do vírus.

As lâminas foram analisadas em Multimode 8 (Bruker, Santa Barbara, CA, EUA) usando sondas com constante de mola nominal de 0,06 N/m e de raio igual a 2nm no modo *Peak Force Quantitative Nanomechanics* (QNM).

A análise estrutural foi realizada em ar (temperatura de 23°C e 44% de umidade) com resolução dos mapas 256 pixels e frequência de varredura de 0,5 Hz. Os parâmetros estruturais das partículas virais foram calculados usando o software Gwyddion 2.57, aplicando a detecção de grãos de contorno às imagens topográficas (área de varredura de  $2\mu m^2$ ). A partir dessas regiões, foram calculadas informações estatísticas sobre a altura e o diâmetro de 107 partículas.

### 3.2.1 Medidas de AFM em Líquido

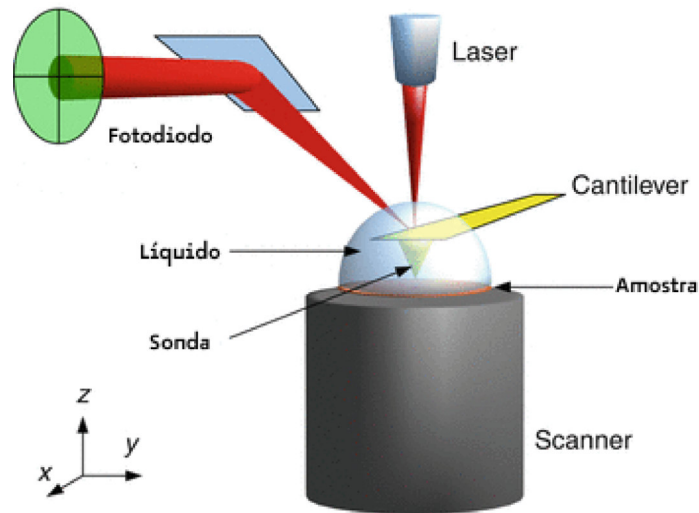
O Microscópio de Força Atômica é uma técnica que possui um diferencial fértil se tratando do campo de pesquisa em virologia, e, apesar de ser um campo de estudo recente e muito amplo, algumas estruturas observadas nos vírus através dessa ferramenta podem ser mais aprofundadas. Uma vez que a morfologia microscópica dos vírus varia consideravelmente devido às suas distintas constituições, o diferencial dessa ferramenta está pautado no fato de que o AFM consegue operar com uma *célula líquida*, a qual mimetiza, por exemplo, um ambiente familiar aos vírus, e assim permite realizar testes nanomecânicos, com nanoindentações afim de adentrar de forma sagaz o interior de um vírion, e, por sua vez ajudar na descrição de modelos estruturais, entendendo a verdadeira morfologia dos vírus.

Neste capítulo discutiremos à montagem de uma célula líquida, entendendo a dinâmica que o cantilever executa neste modo de operação até chegar a fase de aquisição das imagens.

#### Análise de Medidas em Líquido

Medidas em líquido possuem uma maior resolução de imagem, já que evitam a formação de forças de adesão e capilaridade causadas pela camada de umidade que se instaura em medidas em ar<sup>[97]</sup>. Portanto, ao contrário de imagens em ar, onde as forças capilares desempenham um papel central na interação ponta-superfície, em imagens líquidas, as interações eletrostáticas são as mais relevantes.

Figura 3.1: Esquema da interface do AFM em medidas em líquido.



Fonte: Adaptado de Hoogenboom, B. W.<sup>[98]</sup>

Para que a natureza intrínseca dos vírus sejam analisadas, suas manifestações são obtidas de forma mais detalhada da resposta do cantilever à viscosidade do meio que o circunda (Fig. 3.1). A ilustração parametriza os principais componentes presentes em uma medida em líquido, a qual possui o mesmo aparato experimental de medidas em ar, possuindo então um mecanismo construído em: *escâner piezoelétrico, laser de diodo; fotodetector e sonda*.

O movimento do cantilever é impulsionado por uma força oscilatória, visto que uma vez que o cantilever está em contato com a superfície, a deflexão segue o movimento do piezo. Portanto, o cantilever vibra sobre a amostra com uma determinada frequência e amplitude de oscilação, que pode ser entendida como um *oscilador harmônico forçado com amortecimento*<sup>[99]</sup>, pois, indica que mover o cantilêver do ar para um fluido mais denso terá um efeito imediato na sua frequência de ressonância. Da equação:

$$F(t) = F_0 \cos(\omega t) \quad (3.1)$$

Segue que:

$$m\ddot{z} + k\dot{z} + F_0 \cos(\omega t) \quad (3.2)$$

Aqui,  $z$  pode ser entendido como o movimento vertical do cantilever,  $m$  é a sua massa. É trivial que a equação (3.1) descreve a resposta mecânica do cantilever como descrito na equação a viscosidade do meio circundante, onde  $F_0$  é a amplitude da força oscilatória em um tempo ( $t$ ).



A frequência de ressonância é reduzida porque o mesmo precisa mover uma massa extra <sup>[100]</sup>, já que a viscosidade do líquido é muito superior à viscosidade do próprio ar, o que afeta sua resposta como percebido matematicamente.

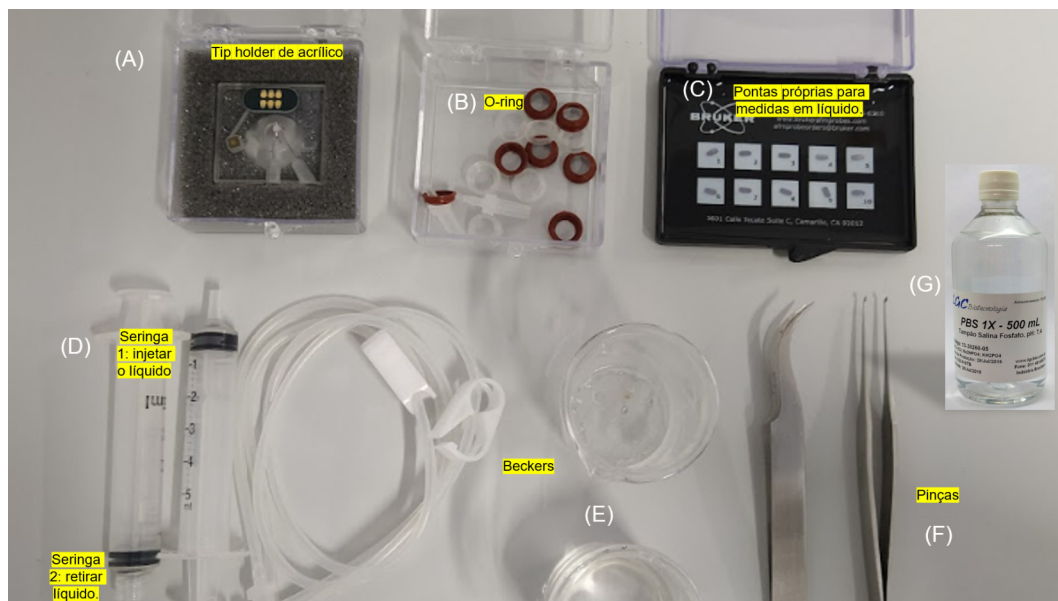
$$\gamma = \frac{m\omega_0}{Q} \quad (3.3)$$

$$\omega_r = \omega_0 \sqrt{1 - \frac{1}{2Q^2}} \quad (3.4)$$

Em adição,  $\omega_0$  descreve a frequência de ressonância livre (vácuo),  $\omega_r$  é a frequência de ressonância do cantilever no líquido.  $Q$  é o fator de qualidade,  $\gamma$  é o coeficiente de amortecimento.

### Detecção de imagens em Líquidos

Figura 3.2: Principais componentes para aquisição de medidas em líquido. Em (A) tip-holder de acrílico específico para este tipo de medida, o qual possui uma concavidade que encaixa-se o o-ring (B), que é uma espécie de borracha de vedação. Em (C) observa-se uma caixa de pontas utilizadas para medidas em líquido. As seringas são divididas em duas, a de injeção do líquido e a que retira o líquido e atuam como o meio pelo qual o líquido será colocado dentro do o-ring, por sua vez o fluido usado é o *Phosphate-buffered saline* PBS (G), que estará preenchendo um dos beakers representados por (E). Por fim, para manipulação da célula líquida temos as pinças próprias para experimentos em AFM (F).



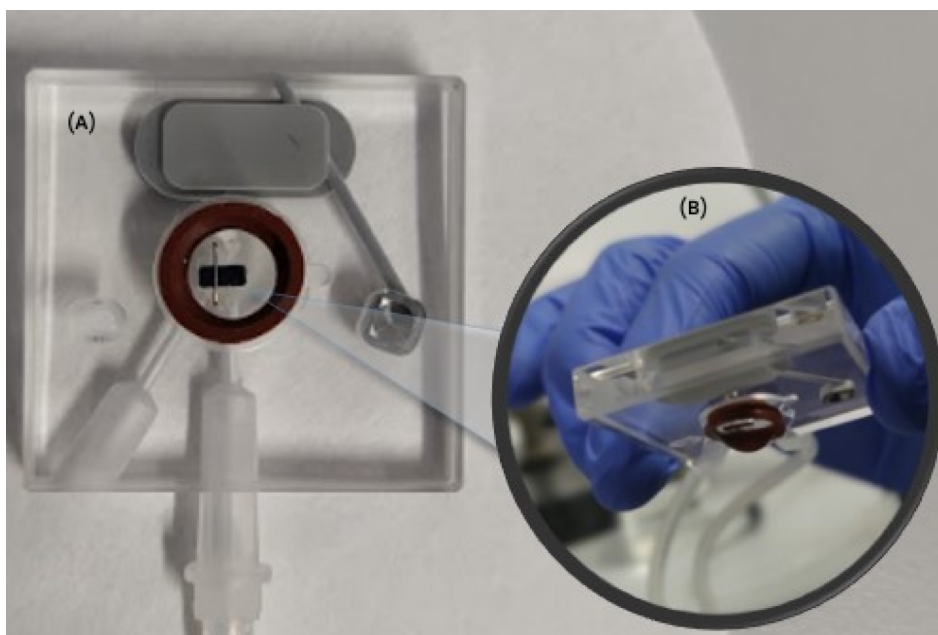
Fonte: Autoria própria.

A figura 3.2 exemplifica todos os componentes usados para as análises em meio líquido. A diferença desse modo se encontra na sonda (cantiléver + ponta), e na peça do tip-holder, o qual agora, possui uma configuração diferente. Como exemplificado em (A), na figura

3.2, para esse tipo de medida, um tip-holder transparente de acrílico é utilizado, a fim de que a transparência crie uma interface bem definida para que o laser não espalhe e dificulte à aquisição dos dados. Nesse tip-holder, ou também chamado de "célula líquida" existe uma concavidade à qual se encaixa uma espécie de borracha, chamada de o-ring (B-3.2), que veda e não deixa o líquido escapar desse pequeno orifício para o tubo piezoelétrico. As pontas (C-3.2) usadas também se diferem das usadas em ar, já que possuem características próprias para medidas em meio líquido.

Nesse modo de varredura, a célula líquida é preenchida através das seringas (D-3.2) que são conectadas à célula e aos beakers (E-3.2), os quais se dividem em um cheio da solução usada, no caso, das análises de ZIKV fora a solução tampão *Phosphate-buffered saline* (PBS), que se assemelha ao fluido corporal (F-3.2). É importante salientar que o *O-ring*, estabelece uma vedação para que o PBS não vaze, além de criar uma força líquida de atração exercida sobre as moléculas do líquido a fim de estabelecer maior firmeza durante a varredura, formando uma espécie de concavidade, chamada menisco<sup>1</sup> [96], que nasce da tensão superficial sobre o líquido (Fig.3.3).

Figura 3.3: Composição de uma célula líquida para medidas de AFM após a manipulação dos materiais (A), com: tip-holder de acrílico, o-ring e sonda. Em (B) um zoom da região, depois que já houve estabelecimento da ligação das seringas para a entrada do líquido, tendo em vista que a concavidade presente no tip-holder já possui o líquido, a força de menisco pode ser facilmente percebida a medida que ao virar a célula líquida todo o fluido permanece isolado no compartimento característico vedado pelo o-ring.



Fonte: Autoria própria.

<sup>1</sup>Curva que se forma na superfície de um líquido, causada pela tensão superficial. Pode ser côncavo ou convexo, dependendo do líquido e da superfície sobre a qual se formará.

A força de menisco obedece à equação:

$$F_{menisco} = -\pi b^2 \Delta p + 2\pi b \Delta \gamma \cos(\alpha - \theta) \quad (3.5)$$

Neste caso, na força resultante de menisco, temos que  $\Delta p$  diferença de pressão entre a parte interna e externa do menisco,  $\Delta \gamma$  significa tensão superficial do líquido,  $\alpha$  o meio-ângulo de abertura da sonda cônica,  $b$  o raio formado pelo menisco e  $\theta$  prioriza-se pelo ângulo de contato.

### Ensaio de Nanoindentação

Para a análise de indentação, as medidas foram feitas no Modo de Rampa (QNM). Em contraste com outros vírus as partículas de ZIKV possuem uma limitação muito específica em suas medidas, que se refere ao tamanho de sua partícula viral <sup>[19]</sup>. Combinando o tamanho reduzido à uma varredura mais controlada, o modo rampa de operação surge como sinônimo de vantagem, pois permite a investigação de possíveis danos causados na superfície do vírus, tal como sua reorganização estrutural a medida que sucessivos ciclos de indentação são feitos.

Experimentos de indentação de partículas virais foram realizados em nove partículas virais diferentes, e cada uma passou por 30 a 70 ciclos de indentação. Os mapas de adesão foram analisados em seis partículas virais. Para a análise da indentação, as medidas foram feitas no Modo de Rampa QNM em fluido seguindo o mesmo procedimento utilizado por Cardoso-Lima et al<sup>[101]</sup>. Aplicamos um ponto de ajuste de força de 6 nN e uma velocidade de ponta de 100 nm/s. Os dados do AFM foram analisados e os mapas foram obtidos usando o software Mountains SPIP8 e Nanoscope Analysis.

As curvas de força foram obtidas no centro superior de nove virion analisado com um *setpoint* de força de até 6 nN e velocidade de ponta de 100 nm/s. Esse modo de varredura possui várias vantagens, porque os parâmetros dependentes da força podem ser medidos com precisão com a força aplicada sendo controlada durante todo o experimento, permitindo a aquisição de curvas de força individuais sobre as partículas virais posteriormente tratadas e analisadas com o software *NanoScope Analysis 2.0*. Os mapas foram gerados com o auxílio do software *Mountains SPIP8®* (Digital Surf), de acordo com os modelos apresentados no capítulo anterior.

No próximo capítulo, serão apresentados os resultados obtidos a partir dessa metodologia descrita e as discussões acerca desses resultados.

## 4. Resultados e Discussões

Neste capítulo, apresentam-se os resultados obtidos para os parâmetros físicos analisados.

### 4.1 Caracterização das partículas virais de ZIKV

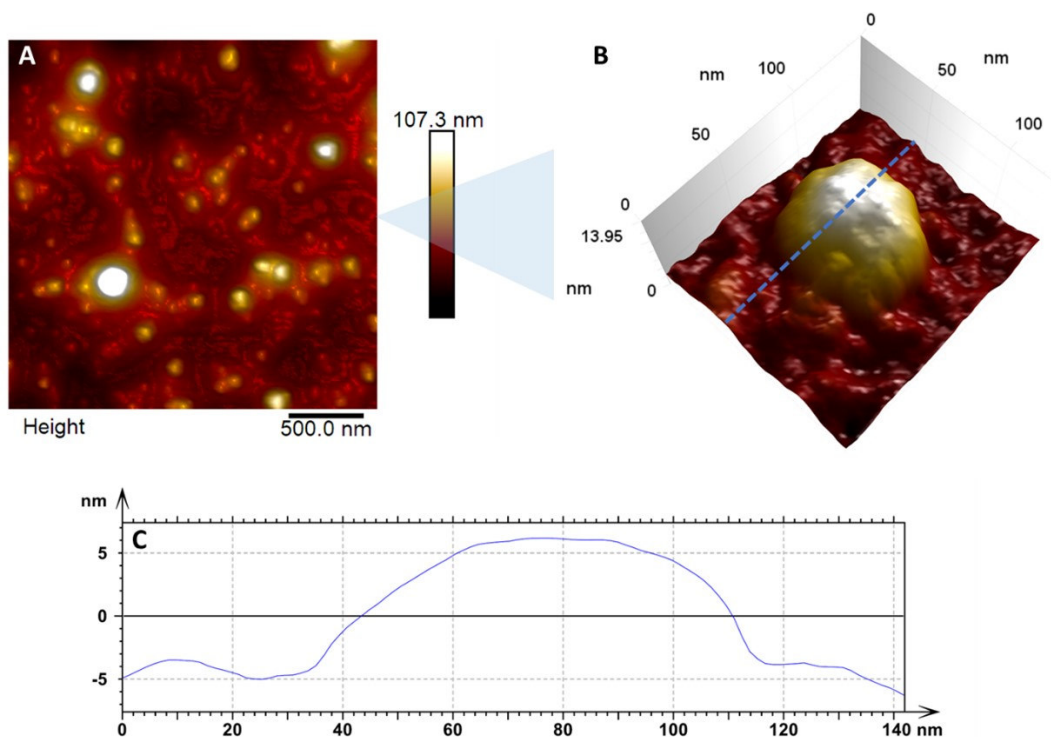
Os primeiros resultados vêm dos mapas topográficos (Figura 4.1), onde é possível observar os detalhes da superfície mais externa do vírus, evidenciando sua camada superficial mais alta, que, por sua vez possui uma estrutura geral que se assemelha à flavivírus anteriormente reportados na literatura <sup>[102]</sup>.

Na Figura 4.1A, determina-se uma área de varredura maior, que exemplifica a densidade de partículas na amostra estudada. A partir de uma população com cerca de 57 partículas virais, medimos que cada uma possui um tamanho de aproximadamente 54,53 nm com um desvio padrão (SD) de 6,9 nm. Para o mapa da Figura 4.1B, observamos de perto uma única partícula viral, e seus respectivos detalhes de arranjo proteico em sua superfície. Percebe-se que a partícula não possui estruturas sobressalentes, e sua membrana comporta-se, geralmente, como plana e lisa, possuindo apenas algumas pequenas regiões irregulares, cuja organização proteica se forma em uma conformação muito bem ajustada. Essa característica é esperada para o ZIKV, como já afirmado por Hasan et al. <sup>[33]</sup> para flavivírus em geral.

Também é possível notar na Figura 4.1C a representação de uma seção transversal dessa única partícula viral, a qual evidencia-se características importantes, como altura e seu perfil quando adsorvidas em um substrato de vidro, enfatizando as unidades de proteína na superfície com medidas de diâmetro compatíveis com a proteína E, responsável pela ligação às células-alvo durante o processo de fusão celular <sup>[23]</sup>. O mapa no detalhe mostra a direção em que a seção transversal foi medida, sendo sua altura igual a 10,8 nm.

A Figura 4.2 mostra uma análise de como assume-se a forma da partícula viral adsorvida

Figura 4.1: Mapa topográfico de AFM revelando a estrutura viral e o formato da partícula de ZIKV: em A) observa-se a imagem topográfica ampliada de inúmeras partículas virais dispersas no substrato, com diâmetro variando entre 50-60 nm. B) Zoom da superfície de uma única partícula viral mostrando os detalhes da estrutura do vírus. A linha tracejada azul indica a região onde a seção transversal mostrada em C) foi tirada. C) Corte transversal de uma partícula de ZIKV adsorvida em um substrato de vidro.

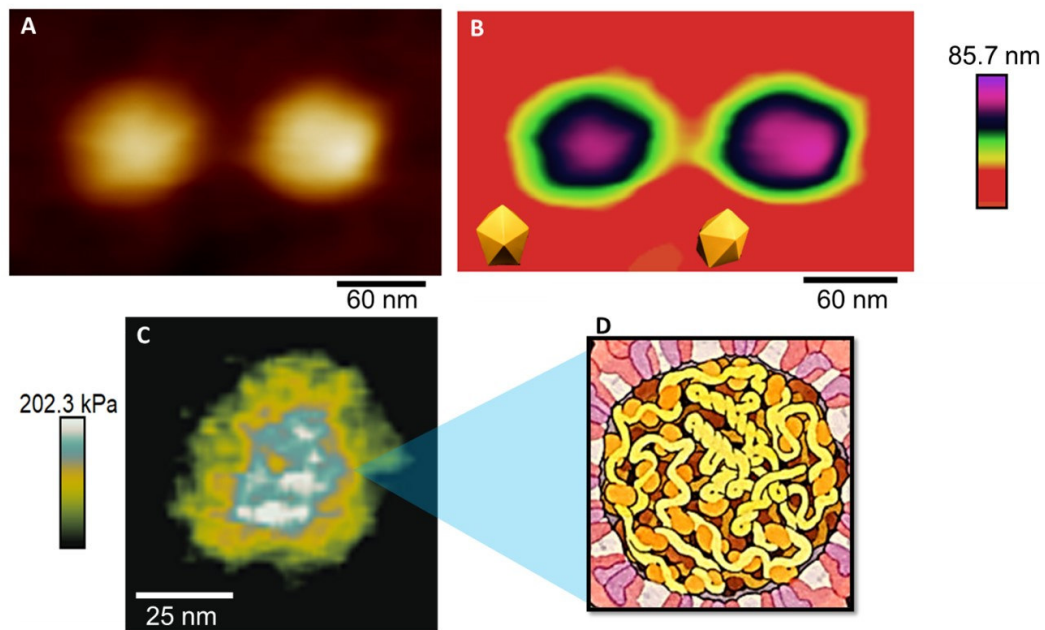


em um substrato de vidro. De acordo com dados já previstos na literatura, a partícula viral de ZIKV conta com três estruturas que se arranjam entre si formando um emaranhado de proteínas e material genético. Por esse prisma, é relatado que o ZIKV possui uma estrutura externa proteica denominada de Envelope, que é formado pela glicoproteína E empacotada. Em seguida observa-se uma espécie de Membrana, formada pela proteína M, e o RNA encerrado em um capsídeo formado por um conjunto icosaédrico de proteínas do tipo C. <sup>[2,33]</sup>. As Figuras 4.2A e 4.2B representam, respectivamente mapas topográficos que evidenciam as formas assumidas por duas partículas virais, quando já adsorvida em um substrato de vidro. Além disso, a imagem 4.2C junto com a figura inserida 4.2D, trazem resultados do Módulo de Young, mostrando o arranjo da estrutura interna do vírus, que mecanicamente tendem a ser mais rígidos, e por sua vez sugere que O ZIKV é, de fato, um vírus icosaédrico, e dependendo da rotação da deposição das partículas, podemos observar diferentes orientações de face relacionadas a ele <sup>[25]</sup>.

Espera-se que o envelope do ZIKV seja mais macio e complacente porque é a porção dos flavivírus que sofre reorganização estrutural durante o processo de maturação <sup>[103,104]</sup>. Além disso, a proteína E está intrinsecamente relacionada ao processo que acontece durante a ligação

das proteínas mais externas do vírus aos receptores da superfície celular durante o processo de infecção celular, onde acontece uma modulação da expressão genética da célula hospedeira à favor do vírus. O processo de fusão resulta em uma conversão quantitativa de uma proteína E homodimérica metaestável em uma forma trimérica <sup>[33,104]</sup>.

Figura 4.2: Em A) temos o mapa de altura para duas partículas virais de de ZIKV. Observando a imagem em B) temos as mesmas partículas com contraste de escala de altura diferente, evidenciando, dessa maneira, o arranjo do tipo icosaédrico, a qual o vírus faz parte, demonstrando todo seu padrão de adsorção. Em C) um resultado promissor é encontrado, visto que observa-se o Módulo de Young, o qual exibe informações de elasticidade do vírus, e possivelmente sua disposição de genoma D) Representação pictográfica da montagem interna do ZIKV<sup>[1]</sup>.



O Módulo de Young (YM) é uma constante de proporcionalidade da relação tensão-deformação do material, e seus mapas fornecem informações sobre a natureza elástica do material. Diferentes materiais possuem diferentes contrastes no mapa. Materiais mais rígidos possuem maiores valores de YM, e materiais mais macios possuem menores valores de Módulo de Young <sup>[42,105]</sup>. No mapa da Figura 4.2C, é possível observar os diferentes contrastes na partícula viral, que mostra a composição de materiais diferentes. Além disso, podemos afirmar que a estrutura interna é mais rígida a partir dos contrastes azul e branco, que na escala são as cores para maiores valores de YM em kPa. Em contrapartida, temos um contraste verde-amarelo para as estruturas externas, representando os valores mais baixos do Módulo de Young, definindo uma estrutura mais suave para a estrutura externa.

Por outro lado, . Posteriormente apresentam a proteína M exibidas na membrana do vírus, sendo a última fase de proteção do genoma viral, após a maturação <sup>[106,107]</sup>.

Para os flavivírus, portanto, o capsídeo deve demonstrar maior resistência do que as

outras estruturas da partícula viral. Isso é o que o mapa do módulo de Young confirma na Figura 4.2C. Depois de passar por um stress contínuo (curvas de força de 256x256), a camada externa desse vírus em particular entrou em colapso, subjacente à configuração interna da partícula de ZIKV.

Os resultados a seguir são mapas de adesão, os quais revelam mais informações sobre o arranjo de proteínas na superfície do vírus resultantes da interação entre sonda-amostra. Nas Figuras 4.3A e 4.3B, temos mapas topográficos mais uma vez evidenciando a característica enrugada do arranjo proteico na superfície do vírus <sup>[33]</sup>.

A proteína do envelope E é a principal responsável por esse agrupamento viral, o que é, de certa forma, tendencioso, pois as cargas apresentadas nesta proteína tendem a formar estruturas de geometria triangular <sup>[2,40]</sup>, atuando como uma espécie de "escudo" contra a chegada de anticorpos, neutralizando seu foco <sup>[40,42,52]</sup>. Esse mecanismo de defesa pode ser entendido pelo fato de que o processo antecessor à ligação com a célula hospedeira o vírus precisa primeiro acessar o maquinário necessário para ativar seu mecanismo de replicação, nesse meio tempo qualquer perturbação de temperatura, ou de fluidos corporais pode acabar danificando ou até mesmo matando esse virion, por isso, sua estrutura de maneira muito auto-suficiente se ordena dessa forma <sup>[41,104]</sup>.

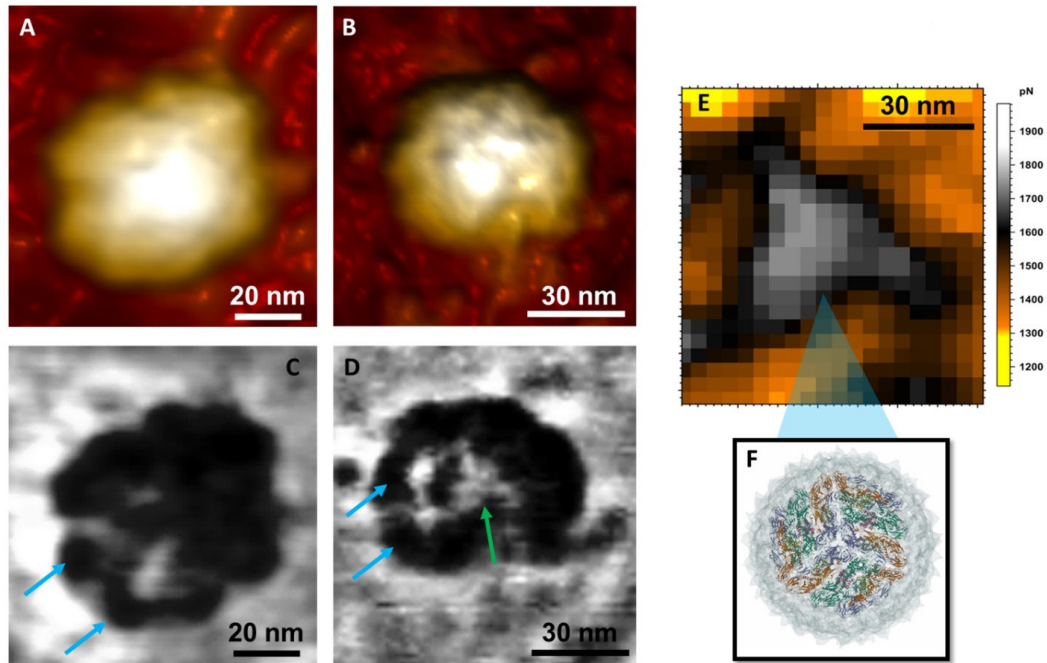
Nas Figuras 4.3C e 4.3D, temos seus respectivos mapas de adesão mostrando contrastes distintos na superfície, onde podemos observar a fusão de proteínas virais que, após o processo de maturação, agrupam-se e reorganizam-se esquematicamente, formando estruturas triangulares na superfície do vírus (Figura 4.3E e 4.3F). Diferenças nos contrastes dos mapas de adesão podem estar relacionadas à distribuição de carga superficial <sup>[101]</sup>. Para o ZIKV, essas diferentes distribuições podem ter dois fatores possíveis: (i) devido a alterações nas proteínas durante o processo de inativação, (ii) podem estar relacionadas a conformações de proteínas, ou seja, conformações monoméricas ou diméricas <sup>[108,109]</sup>.

As alterações conformacionais podem ser um efeito de diferentes agentes físico-químicos, semelhantes aos sinais recebidos quando o vírus penetra na célula hospedeira, que posteriormente enfraquece e, eventualmente, rompe ainda mais o virion afim de entregar o genoma à maquinaria celular <sup>[51,110]</sup>. Por exemplo, quando o poliovírus<sup>1</sup> se liga a um receptor na superfície celular (*in vivo*), ele tem a mesma resposta da exposição ao calor moderado (*in vitro*), que é o mecanismo viral responsável pela desmontagem, mesmo possuindo uma alta infectividade,

---

<sup>1</sup>Vírus responsável por transmitir a poliomielite.

Figura 4.3: A) e B) caracterizam mapas topográficos de AFM revelando a ultraestrutura viral e a forma das partículas do ZIKV; C) e D) seus respectivos mapas de adesão. E) Mapa de adesão aproximado, mostrando a correlação entre a estrutura triangular observada e o modelo baseado nos resultados de crio-EM em F) <sup>[2]</sup>. As setas azuis nos mapas C) e D) indicam as saliências típicas da partícula madura de ZIKV. A seta verde (D) aponta para a conformação triangular das estruturas da proteína E bem ajustadas <sup>[3]</sup>.



cuja capacidade de se alojar e multiplicar no hospedeiro é de 100% <sup>[110,111]</sup>.

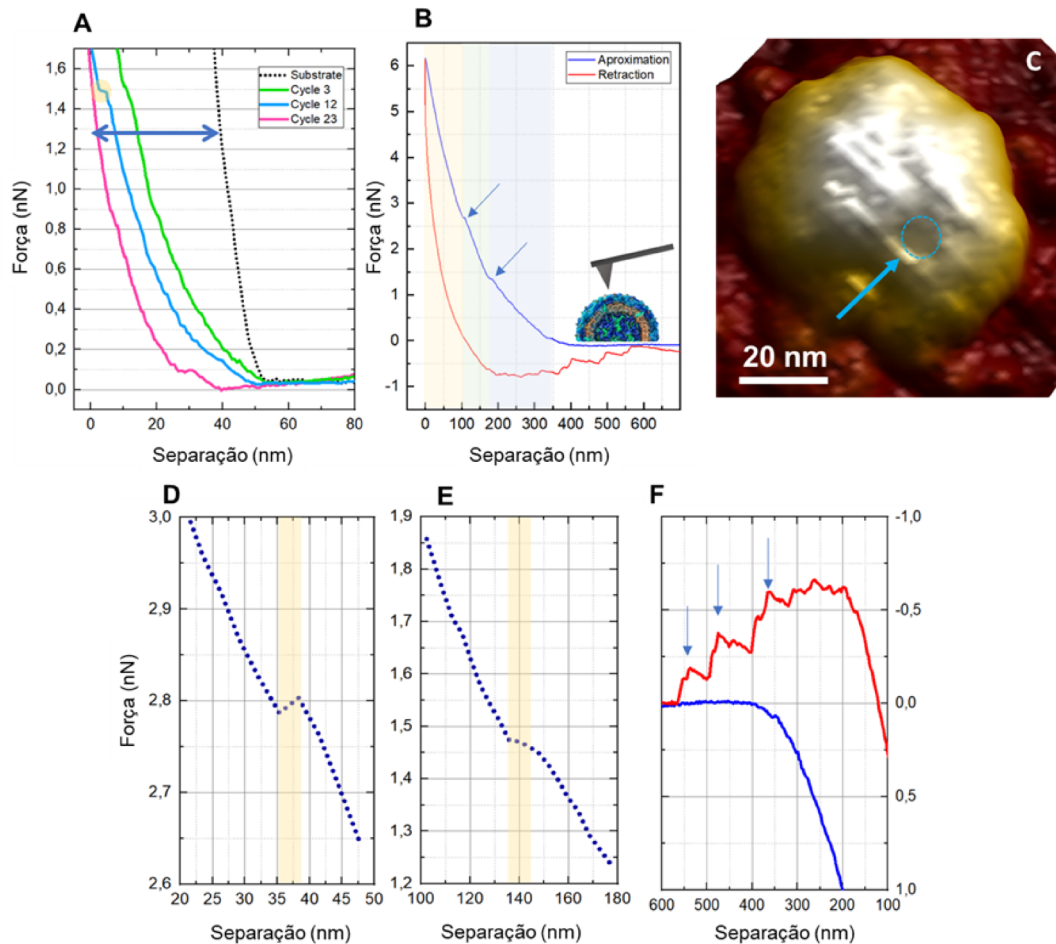
#### 4.1.1 Experimentos de Nanoindentação

As medições de indentação foram realizadas usando a ponta AFM como um indetador para testar a resistência da partícula viral ao estresse mecânico. Os resultados presentes na Figura 4.4 relatam que as partículas de ZIKV são mais resistentes ao estresse mecânico quando comparadas a outros vírus de RNA, por exemplo, o SARS-CoV-2 <sup>[101]</sup>. Na Figura 4.4A, as curvas de indentação representam o comportamento das partículas virais após ciclos de carga aplicados continuamente em comparação com a curva de força de referência realizada em um substrato de vidro (não indentável) (linha pontilhada preta).

Foram realizados vários ciclos de indentação, e após cada ciclo constata-se que existe um aumento na separação entre as curvas, a partir do qual é possível inferir a indentação da sonda na partícula viral. Há um degrau (círculo amarelo) na curva referente ao 12º ciclo, com valores de força de cerca de até 1,5 nN, relacionados à ruptura de uma camada estrutural <sup>[25,41]</sup>. Eventos de ruptura acontecem com forças de carregamento maiores em relação ao SARS-CoV-2 <sup>[101]</sup>.



Figura 4.4: Curvas de indentação de partículas virais de Zika. (A) curva de referência obtida durante os ciclos de aproximação e retração, demonstrando que à medida que os ciclos aumentam, a curva também tende a se alongar. (B) Gráfico da Força x Separação efetuada por um único estímulo (ciclo) mostra que o traço azul representa a curva de aproximação, enquanto o vermelho indica a curva de retração. As faixas amarela, verde e azul estão relacionadas aos três tipos diferentes de materiais da partícula viral. As setas azuis em detalhe da rampa de contato na curva de aproximação destacam o platô de ruptura. (C) A imagem na inserção representa a região rompida da estrutura da membrana do vírus, onde o círculo azul sugere um buraco formado pelas proteínas da camada externa. (D) e (E), relacionados à quebra da casca viral, representada pela faixa amarela. (F) Os eventos de *tethering* são observados na curva de retração (vermelho), o que coincide com o fato de que o ZIKV possui sua camada mais externa apenas de proteínas [2]



Isso possivelmente está relacionado intrinsecamente à estrutura do capsídeo do ZIKV, que atua como uma espécie de redoma sob o material genético, necessitando de inúmeras indentações sucessivas para que essa camada de proteína essencial chegue a se romper. Em contrapartida, vírus que possuem uma camada lipídica, tal como o SARS-CoV-2, possuem uma menor resistência aos estresse mecânico causado experimentalmente [101]. Esse fato configura um cenário interessante, visto que na Figura 4.4B, é possível observar pela curva de aproximação (azul) que a força de disparo para escanear o ZIKV pode chegar a 6 nN, e a casca aguenta quase 3 nN antes da quebra (seta azul). No entanto, apesar de apresentar maior resistência à forças aplicadas, testes de fadiga no topo da partícula demonstraram que a indentação continua

crescendo à medida que o número de ciclos aumenta, indicando uma deformação plástica. As varreduras após os testes de fadiga mostram deformações na superfície viral, confirmando que o ZIKV não possui a capacidades regenerativas (Figura 4.4C), pelo menos durante o período do experimento.

Outro resultado importante obtido durante os testes de fadiga se baseia no fato que, além dos platôs de força (primeiro em 1,5 nN e segundo em 2,8 nN) mostrados nas Figuras 4.4D e 4.4E, relacionados à quebra do capsídeo, existem dois eventos de mudança na inclinação das curvas de força, os quais indicam uma mudança na rigidez do material. Isso significa que foram medidos três tipos diferentes de materiais na partícula de ZIKV. A espessura das camadas rompidas é de 5,02 e 10,71 nm para os platôs de força mostrados nas Figuras 4.4D e 4.4E. Na Figura 4.4B, a seção azul compreende 5% a 25% da curva de aproximação e tem um módulo de Young medido de cerca de 234 kPa. A seção verde, no meio, refere-se a 25% a 45% da curva e tem um YM medido de 534 kPa. Para a seção amarela, representando 65% a 85% da curva, o YM medido foi de 894 kPa. A curva foi linearizada pelo modelo DMT <sup>[112]</sup>.

Este resultado está intimamente relacionado com o mapa do Modulo de Young na Figura 4.4C, onde as estruturas internas se mostram mais rígidas do que as estruturas externas. Juntamente com os eventos de ruptura, é seguro dizer que neste experimento foram provadas três diferentes estruturas de composição da partícula de ZIKV, com informações nanomecânicas sobre cada uma delas. Na Figura 4.4F, temos eventos de *tethering* na curva de retração (vermelho) que sugere-se à observação neste vírus, precisamente porque sua estrutura externa é inteiramente formada de proteínas. Quando a ponta inicia seu processo de retração da superfície da amostra, algumas porções de proteínas se fixam na sonda, e eventos semelhantes a dentes podem ser observados na curva de retração, que representa as forças de tração entre o que está preso à sonda e o que permanece na amostra <sup>[113,114]</sup>.

Estudos de nanoindentação com o objetivo de obter informações mecânicas de amostras possuem ampla aplicação na área de virologia física. Esse tipo de informação pode levar a uma melhor compreensão das conexões físico-químicas e biológicas entre os diferentes estágios do ciclo de vida de um vírus <sup>[91,115]</sup>. Além disso, informações sobre estabilidade térmica e química podem ser acessadas por meio de rigidez mecânica <sup>[92,111]</sup>. Esse resultado demonstra que a investigação de interações de proteínas e diferentes simetrias virais (no caso do vírus ZIKV, uma simetria icosaédrica) pode apresentar uma gama complexa de vias comportamentais, levando a uma variedade de aplicações nano-bio-orientadas <sup>[92,116]</sup>. Proteínas estruturais também podem

ser alvo de agentes antivirais porque, na maioria dos casos, são singulares ao patógeno e, em geral, não possuem semelhanças com outro alvo humano <sup>[117]</sup>.

## 5. Conclusões e Perspectivas

Neste estudo, usamos o AFM para avaliar a ultraestrutura e as propriedades nanomecânicas das partículas virais de ZIKV, medindo a resistência da membrana das partículas virais. Os resultados aqui apresentados agregam novos dados na caracterização das propriedades físicas e estruturais do ZIKV e dos modelos de reforço apresentados na literatura. Os mapas topográficos de alta resolução revelaram as estruturas da superfície do capsídeo da partícula viral e sua distribuição, com os eventos de ruptura. Neste experimento, três diferentes estruturas de composição da partícula de ZIKV foram mostradas. O que se percebe genuinamente é que de acordo com o que foi demonstrado através dos ciclos de indentação entre a ponta e a amostra, a lenta perturbação da indentação fornecia informações sobre as camadas que compõem a estrutura viral, sendo possível até mesmo a aquisição da medida de espessura dessas camadas, concordando com o que já se sabe na literatura. Outro resultado relevante fora analisado quanto ao tamanho estimado do vírus, sendo tão pequeno ( $\sim 50\text{nm}$ ), sua infecção celular realmente acontece muito rapidamente, o que pudemos relacionar as propriedades de agrupamento em formas icosaédricas e triangulares, que permitem que seja o mesmo se torne mais resistente durante o processo de infecção, já que possui essa camada mais externa proteica atua como um escudo contra anticorpos. A membrana proteica que protege o ZIKV é moldada de acordo com os estímulos, o que configura um cenário promissor quanto ao sequenciamento de uma vacina, pois ao enfraquecer a estrutura do ZIKV, não apresentou-se um comportamento auto-regenerativo em um curto período de tempo ( $\sim 1$  minuto), como já visto na literatura para outros tipos de vírus. As variações na rigidez do módulo de elasticidade devem-se ao tamanho do capsídeo viral - quanto menor, mais rígido - e à sua espessura externa, que novamente depende de como é constituído o arranjo proteico. O módulo de Young forneceu uma comparação muito detalhada, pois é um elemento intrínseco do material, que, como observamos, pode ser diferente dependendo de como a proteína "E" se remodela, o que constituiu uma análise desafiadora, pois não é uma mudança entre as interações intra-capsídeo, onde há uma mudança das forças de ligação, por exemplo, de Van der Waals, o

que basicamente explica o aumento da rigidez do capsídeo durante diferentes indentações. De forma geral, este ensaio pode ser expandido para outros tipos de vírus, mesmo que sejam de certa forma negligenciados, como o ZIKV, tais como outros arbovírus causadores da Dengue, e Chikungunya, e o vírus do HIV ainda não analisados sob a perspectiva abordada nesta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- [1] REGLA-NAVA, J. A. et al. A zika virus mutation enhances transmission potential and confers escape from protective dengue immunity. *Cell reports*, Elsevier, v. 39, n. 2, p. 110655, 2022.
- [2] SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-em structure of zika virus. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 352, n. 6284, p. 467–470, 2016.
- [3] MASMEJAN, S. et al. Zika virus. *Pathogens*, MDPI, v. 9, n. 11, p. 898, 2020.
- [4] EICKMANN, S. H. et al. Síndrome da infecção congênita pelo vírus zika. *Cadernos de Saúde Pública*, SciELO Public Health, v. 32, p. e00047716, 2016.
- [5] BARTH, O. M. et al. Ultrastructural aspects of virus replication in one fatal case and several other isolates from a dengue type 2 outbreak in rio de janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, SciELO Brasil, v. 89, n. 1, p. 21–24, 1994.
- [6] ALVES, I. M. D. S. Tratamento de crises epilépticas em pacientes com microcefalia causada pelo vírus zika: Uma revisão narrativa da literatura.
- [7] BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning tunneling microscopy. *Surface science*, Elsevier, v. 126, n. 1-3, p. 236–244, 1983.
- [8] RUGAR, D.; HANSMA, P. Atomic force microscopy. *Physics today*, v. 43, n. 10, p. 23–30, 1990.
- [9] EISENSCHITZ, R.; LONDON, F. Über das verhältnis der van der waalsschen kräfte zu den homöopolaren bindungskräften. *Zeitschrift für Physik*, Springer, v. 60, n. 7, p. 491–527, 1930.
- [10] ZAIN, M. et al. Applications of nanotechnology in biological systems and medicine. In: *nanotechnology for hematology, blood transfusion, and artificial blood*. [S.l.]: Elsevier, 2022. p. 215–235.
- [11] CHANG, K.-C. et al. Atomic force microscopy in biology and biomedicine. *Tzu Chi Medical Journal*, Elsevier, v. 24, n. 4, p. 162–169, 2012.
- [12] PAEZ-ESPINO, D. et al. Uncovering earth's virome. *Nature*, v. 536.
- [13] FIELDS, B. N. *Fields' virology*. [S.l.]: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 1.
- [14] KING-THOM, C. Martinus willem beijerinck. Nature Publishing Group, n. 7617, p. 425–430, 2016.
- [15] GERGERICH, R. C.; DOLJA, V. V. Introduction to plant viruses, the invisible foe. *The plant health instructor*, v. 478, 2006.
- [16] WOROBEY, M.; HOLMES, E. C. Evolutionary aspects of recombination in rna viruses. *Journal of General Virology*, Microbiology Society, v. 80, n. 10, p. 2535–2543, 1999.

- [17] SMITH, A. M. From sight to light. In: *From Sight to Light*. [S.l.]: University of Chicago Press, 2014.
- [18] MASTROBATTISTA, E. et al. Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. *Nature reviews Drug discovery*, Nature Publishing Group, v. 5, n. 2, p. 115–121, 2006.
- [19] ROOS, W. H.; WUITE, G. J. Nanoindentation studies reveal material properties of viruses. *Advanced Materials*, Wiley Online Library, v. 21, n. 10-11, p. 1187–1192, 2009.
- [20] ZOBELL, C.; RITTENBERG, S. Microbiology by numbers. *Nat. Rev. Microbiol*, v. 9, n. 628, p. 10–1038, 2011.
- [21] ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Histologia texto e atlas-em correlação com biologia celular e molecular. *Histologia: texto e atlas, em correlação com Biologia celular e molecular*, v. 6, p. 24, 2008.
- [22] CRUVINEL, W. d. M. et al. Sistema imunitário: Parte i. fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, SciELO Brasil, v. 50, p. 434–447, 2010.
- [23] GELDERBLUM, H. R. Structure and classification of viruses. *Medical Microbiology. 4th edition*, University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- [24] TWAROCK, R. Emerging topics in physical virology. World Scientific, 2010.
- [25] ROOS, W. et al. Viral capsids: mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms. *Cellular and molecular life sciences*, Springer, v. 64, n. 12, p. 1484–1497, 2007.
- [26] KANG, S. et al. Recent progress in understanding 2019 novel coronavirus (sars-cov-2) associated with human respiratory disease: detection, mechanisms and treatment. *International journal of antimicrobial agents*, Elsevier, v. 55, n. 5, p. 105950, 2020.
- [27] SIMMONDS, P.; AIEWSAKUN, P. Virus classification—where do you draw the line? *Archives of virology*, Springer, v. 163, n. 8, p. 2037–2046, 2018.
- [28] PARVEZ, M. K. Geometric architecture of viruses. *World journal of virology*, Baishideng Publishing Group Inc, v. 9, n. 2, p. 5, 2020.
- [29] CASTÓN, J. R.; CARRASCOSA, J. L. The basic architecture of viruses. *Structure and Physics of Viruses*, Springer, p. 53–75, 2013.
- [30] NAQVI, A. A. T. et al. Investigating host-virus interaction mechanism and phylogenetic analysis of viral proteins involved in the pathogenesis. *Plos one*, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 16, n. 12, p. e0261497, 2021.
- [31] JR, J. P. K. et al. Helical virus particles formed from morphological subunits of a membrane containing icosahedral virus. *Virology*, Elsevier, v. 385, n. 2, p. 285–293, 2009.
- [32] GORBALENYA, A. E. Increasing the number of available ranks in virus taxonomy from five to ten and adopting the baltimore classes as taxa at the basal rank. *Archives of virology*, Springer, v. 163, n. 10, p. 2933–2936, 2018.

- [33] HASAN, S. S. et al. Structural biology of zika virus and other flaviviruses. *Nature structural & molecular biology*, Nature Publishing Group, v. 25, n. 1, p. 13–20, 2018.
- [34] KRAEMER, M. U. et al. Past and future spread of the arbovirus vectors aedes aegypti and aedes albopictus. *Nature microbiology*, Nature Publishing Group, v. 4, n. 5, p. 854–863, 2019.
- [35] LECHUGA, R. I.; CASTRO, A. C. Dramatic effects of control measures on deaths from yellow fever in havana, cuba, in the early 1900s. *Journal of the Royal Society of Medicine*, Sage Publications Sage UK: London, England, v. 110, n. 3, p. 118–120, 2017.
- [36] MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of japanese encephalitis, west nile and dengue viruses. *Nature medicine*, Nature Publishing Group, v. 10, n. 12, p. S98–S109, 2004.
- [37] SCHMALJOHN, A. L.; MCCLAIN, D. Alphaviruses (togaviridae) and flaviviruses (flaviviridae). *Medical Microbiology. 4th edition*, University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- [38] BEKAL, S. et al. A novel flavivirus in the soybean cyst nematode. *Journal of General Virology*, Microbiology Society, v. 95, n. 6, p. 1272–1280, 2014.
- [39] YUNG, C.-F. et al. Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation, laboratory parameters and risk of severe disease in adults, singapore. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 92, n. 5, p. 999, 2015.
- [40] KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, Elsevier, v. 108, n. 5, p. 717–725, 2002.
- [41] TAN, T. Y. et al. Capsid protein structure in zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nature communications*, Nature Publishing Group, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2020.
- [42] ROOS, W.; BRUINSMA, R.; WUITE, G. Physical virology. *Nature physics*, Nature Publishing Group, v. 6, n. 10, p. 733–743, 2010.
- [43] SLAVOV, S. et al. Overview of zika virus (zikh) infection in regards to the brazilian epidemic. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, SciELO Brasil, v. 49, 2016.
- [44] MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. d. F. F. d. M. Zika virus in brazil and the danger of infestation by aedes (stegomyia) mosquitoes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, SciELO Brasil, v. 49, p. 4–10, 2015.
- [45] AUBRY, F. et al. Recent african strains of zika virus display higher transmissibility and fetal pathogenicity than asian strains. *Nature communications*, Nature Publishing Group, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2021.
- [46] BOSCH, I. et al. Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and zika virus in patient serum. *Science translational medicine*, American Association for the Advancement of Science, v. 9, n. 409, p. eaan1589, 2017.
- [47] AVELINO-SILVA, V. I. et al. Potential effect of zika virus infection on human male fertility? *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, SciELO Brasil, v. 60, 2018.



- [48] VENTURA, C. V.; VENTURA, L. O. Ophthalmologic manifestations associated with zika virus infection. *Pediatrics*, American Academy of Pediatrics Elk Grove Village, IL, USA, v. 141, n. Supplement\_2, p. S161–S166, 2018.
- [49] MINER, J. J. et al. Hsv-1 and zika virus but not sars-cov-2 replicate in the human cornea and are restricted by corneal type iii interferon. *Cell reports*, Elsevier, v. 33, n. 5, p. 108339, 2020.
- [50] SHAHRIZAILA, N.; LEHMANN, H. C.; KUWABARA, S. Guillain-barré syndrome. *The Lancet*, Elsevier, v. 397, n. 10280, p. 1214–1228, 2021.
- [51] VALENTE, A. P.; MORAES, A. H. Zika virus proteins at an atomic scale: how does structural biology help us to understand and develop vaccines and drugs against zika virus infection? *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, SciELO Brasil, v. 25, 2019.
- [52] DAI, L. et al. Zika virus envelope protein and antibody complexes. *Virus protein and nucleoprotein complexes*, Springer, p. 147–168, 2018.
- [53] BARBA-SPAETH, G. et al. Structural basis of potent zika–dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 536, n. 7614, p. 48–53, 2016.
- [54] KOLAWOLE, A. O. et al. Flexibility in surface-exposed loops in a virus capsid mediates escape from antibody neutralization. *Journal of virology*, Am Soc Microbiol, v. 88, n. 8, p. 4543–4557, 2014.
- [55] PRASAD, V. M. et al. Structure of the immature zika virus at 9 Å resolution. *Nature structural & molecular biology*, Nature Publishing Group, v. 24, n. 2, p. 184–186, 2017.
- [56] CHÁVEZ, J. H. et al. Domain iii peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals*, Elsevier, v. 38, n. 6, p. 613–618, 2010.
- [57] NYQVIST, I. *Biophysical characterization of protein-protein interactions involving intrinsically disordered proteins*. Tese (Doutorado) — Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University, 2021.
- [58] PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A literature review of zika virus. *Emerging infectious diseases*, Centers for Disease Control and Prevention, v. 22, n. 7, p. 1185, 2016.
- [59] ALENCAR, L. M. R. Estudo da viscoelasticidade de células de câncer renal por microscopia de força atômica. 2010.
- [60] PINTO, E. P.; RAMOS, G. Q.; FILHO, H. D. da F. O microscópio de força atômica (afm): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. *Estação Científica (UNIFAP)*, v. 3, n. 2, p. 41–50, 2015.
- [61] MEGE, J.-L. et al. Quantification of cell surface roughness; a method for studying cell mechanical and adhesive properties. *Journal of Theoretical Biology*, v. 119, n. 2, p. 147 – 160, 1986. ISSN 0022-5193.
- [62] GALEMBECK, F. et al. Microscopia de sondas : uma caixa de ferramentas da nanotecnologia. 1980.

- [63] PINTO, E. P. et al. O Microscópio de Força Atômica ( AFM ): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. 2013.
- [64] ZANETTE, S. Funcionamento de um microscópio de força atômica. *Notas do curso ministrado no CBPF*, 1997.
- [65] RODRIGUES, K. d. S. Caos e controle de microviga em balanço de um microscópio de força atômica, operando em modo intermitente, na ressonância. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2011.
- [66] BUTT, H.-J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface science reports*, Elsevier, v. 59, n. 1-6, p. 1–152, 2005.
- [67] KEESOM, W. Van der waals attractive force. *Physikalische Zeitschrift*, v. 22, p. 129–141, 1921.
- [68] DEBYE, P. Die van der waalsschen kohasion-skrafte. *Phys. Zs.*, v. 21, p. 178–187, 1920.
- [69] LEITE, F. d. L. *Caracterização de forças de adesão em materiais utilizando a microscopia de força atômica*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2002.
- [70] LONDON, F. The general theory of molecular forces. *Transactions of the Faraday Society*, The Royal Society of Chemistry, v. 33, p. 8b–26, 1937.
- [71] HUBER, G. et al. Evidence for capillarity contributions to gecko adhesion from single spatula nanomechanical measurements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 102, n. 45, p. 16293–16296, 2005.
- [72] MURATA, H. Rheology-theory and application to biomaterials. *Janeza Trdine*, v. 9, n. 51000, p. 403–426, 2012.
- [73] COSTA, E. *Estudo das propriedades mecânicas de ligantes asfálticos por Microscopia de Força Atômica*. Tese (Tese (Doutorado em Física)) — Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- [74] RADMACHER, M. *Methods in Cell Biology*. [S.l.]: Elsevier, 2007. v. 83.
- [75] HERTZ, H. J. Über die Berührung fester elastischer Körper. *J. Reine Angew. Math.*, v. 92, p. 155:171, 1881.
- [76] JOHNSON, K. L.; JOHNSON, K. L. *Contact mechanics*. [S.l.]: Cambridge university press, 1987.
- [77] JOHNSON, K. K. kendall and ad roberts. *Proc. Roy. Soc., London A*, v. 324, 1971.
- [78] DERJAGUIN, B. V.; MULLER, V. M.; TOPOROV, Y. P. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *Journal of Colloid and interface science*, Elsevier, v. 53, n. 2, p. 314–326, 1975.
- [79] BUTT, H. J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf. Sci. Rep.*, v. 59, n. 1-6, p. 1–152, 2005. ISSN 01675729.

- [80] HECHT, F. M. et al. Imaging viscoelastic properties of live cells by afm: power-law rheology on the nanoscale. *Soft matter*, Royal Society of Chemistry, v. 11, n. 23, p. 4584–4591, 2015.
- [81] SCHAPERY, R. A. On the characterization of nonlinear viscoelastic materials. *Polymer Engineering & Science*, Wiley Online Library, v. 9, n. 4, p. 295–310, 1969.
- [82] OLIVER, W. C.; PHARR, G. M. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. *J. Mater. Res.*, v. 19, p. 3:20, 2004.
- [83] DING, Y.; XU, G.-K.; WANG, G.-F. On the determination of elastic moduli of cells by afm based indentation. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.
- [84] BU, Y. et al. Measuring viscoelastic properties of living cells. *Acta Mechanica Solida Sinica*, Springer, v. 32, n. 5, p. 599–610, 2019.
- [85] ULVEN, O. I.; SUN, W. Capturing the two-way hydromechanical coupling effect on fluid-driven fracture in a dual-graph lattice beam model. *International Journal for Numerical and Analytical Methods in Geomechanics*, Wiley Online Library, v. 42, n. 5, p. 736–767, 2018.
- [86] KASAS, S.; STUPAR, P.; DIETLER, G. Afm contribution to unveil pro-and eukaryotic cell mechanical properties. In: ELSEVIER. *Seminars in cell & developmental biology*. [S.l.], 2018. v. 73, p. 177–187.
- [87] LOPES, G. A. de C.; FILHO, H. D. da F. < b> dissipated energy in tapping mode by the atomic force microscope. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 37, n. 4, p. 403–409, 2015.
- [88] BAZILCHUK, M. et al. Contact area measurement of micron-sized metal-coated polymer particles under compression. *International Journal of Mechanical Sciences*, Elsevier, v. 165, p. 105214, 2020.
- [89] LNG, F. A treatise on the mathematical theory of elasticity. *Nature*, v. 105, n. 2643, p. 511–512, 1920.
- [90] CALLISTER, W. D. An introduction: material science and engineering. *New York*, v. 106, p. 139, 2007.
- [91] ROOS, W. H. et al. Mechanics of bacteriophage maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 109, n. 7, p. 2342–2347, 2012.
- [92] USSELMAN, R. J. et al. Gadolinium-loaded viral capsids as magnetic resonance imaging contrast agents. *Applied magnetic resonance*, Springer, v. 46, n. 3, p. 349–355, 2015.
- [93] KUZNETSOV, Y. G.; MCPHERSON, A. Atomic force microscopy in imaging of viruses and virus-infected cells. *Microbiology and molecular biology reviews*, Am Soc Microbiol, v. 75, n. 2, p. 268–285, 2011.
- [94] IVANOVSKA, I. L. et al. Discrete fracture patterns of virus shells reveal mechanical building blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 108, n. 31, p. 12611–12616, 2011.

- [95] ROOS, W. H. et al. Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 106, n. 24, p. 9673–9678, 2009.
- [96] MOSER, L. A. et al. Growth and adaptation of zika virus in mammalian and mosquito cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 12, n. 11, p. e0006880, 2018.
- [97] BARÓ, A. M.; REIFENBERGER, R. G. *Atomic force microscopy in liquid: biological applications*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2012.
- [98] HOOGENBOOM, B. Afm in liquids. In: . [S.l.]: Springer Verlag, 2012.
- [99] LOPES, G.; COTTA, E.; FILHO, H. F. Equações diferenciais aplicadas à microscopia de força atômica: Uma estratégia para o ensino de mecânica clássica na graduação. *Latin-American Journal of Physics Education*, Instituto Politécnico Nacional, v. 9, n. 3, p. 8, 2015.
- [100] HÖLSCHER, H.; SCHWARZ, U. D. Theory of amplitude modulation atomic force microscopy with and without q-control. *International Journal of Non-linear mechanics*, Elsevier, v. 42, n. 4, p. 608–625, 2007.
- [101] CARDOSO-LIMA, R. et al. Sars-cov-2 unrevealed: ultrastructural and nanomechanical analysis. *Langmuir*, ACS Publications, v. 37, n. 36, p. 10762–10769, 2021.
- [102] MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 427, n. 6972, p. 313–319, 2004.
- [103] STADLER, K. et al. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of virology*, Am Soc Microbiol, v. 71, n. 11, p. 8475–8481, 1997.
- [104] ZHANG, X. et al. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 110, n. 17, p. 6795–6799, 2013.
- [105] ROOS, W. H. Afm nanoindentation of protein shells, expanding the approach beyond viruses. In: ELSEVIER. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. [S.l.], 2018. v. 73, p. 145–152.
- [106] MATEU, M. G. Mechanical properties of viruses analyzed by atomic force microscopy: a virological perspective. *Virus research*, Elsevier, v. 168, n. 1-2, p. 1–22, 2012.
- [107] SOTCHEFF, S.; ROUTH, A. Understanding flavivirus capsid protein functions: the tip of the iceberg. *Pathogens*, MDPI, v. 9, n. 1, p. 42, 2020.
- [108] BHELLA, D. The role of cellular adhesion molecules in virus attachment and entry. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, The Royal Society, v. 370, n. 1661, p. 20140035, 2015.
- [109] DAI, L. et al. Structures of the zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. *Cell host & microbe*, Elsevier, v. 19, n. 5, p. 696–704, 2016.

- [110] ORTEGA-ESTEBAN, A. et al. Monitoring dynamics of human adenovirus disassembly induced by mechanical fatigue. *Scientific reports*, Nature Publishing Group, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2013.
- [111] KANT, R. et al. Changes in the stability and biomechanics of p22 bacteriophage capsid during maturation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, Elsevier, v. 1862, n. 6, p. 1492–1504, 2018.
- [112] HELLWIG, J. et al. Measuring elasticity of wet cellulose beads with an afm colloidal probe using a linearized dmt model. *Analytical Methods*, Royal Society of Chemistry, v. 9, n. 27, p. 4019–4022, 2017.
- [113] GRZESZCZUK, Z. et al. Atomic force microscopy (afm) as a surface mapping tool in microorganisms resistant toward antimicrobials: a mini-review. *Frontiers in pharmacology*, Frontiers Media SA, v. 11, p. 517165, 2020.
- [114] AGUAYO, S.; BOZEC, L. Mechanics of bacterial cells and initial surface colonisation. *Biophysics of Infection*, Springer, p. 245–260, 2016.
- [115] CARRASCO, C. et al. Dna-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 103, n. 37, p. 13706–13711, 2006.
- [116] KANG, S. et al. Controlled assembly of bifunctional chimeric protein cages and composition analysis using noncovalent mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 130, n. 49, p. 16527–16529, 2008.
- [117] SCHLICKSUP, C. J.; ZLOTNICK, A. Viral structural proteins as targets for antivirals. *Current opinion in virology*, Elsevier, v. 45, p. 43–50, 2020.

## **A. ANEXO**

Artigo submetido à revista *Viruses* (Manuscript ID: viruses-1778804. Fator de impacto 5.048).

## **ZIKA VIRUS (ZIKV): A NEW PERSPECTIVE ON THE NANOMECHANICAL AND STRUCTURAL PROPERTIES**

Maria Luiza de Araujo Dorneles<sup>1</sup>, Ruana Cardoso-Lima<sup>1</sup>, Pedro Filho Noronha  
Souza<sup>2,3</sup>, Fabio Rocha Formiga<sup>4</sup>, Daniela Santoro Rosa<sup>5</sup>, Ralph Santos-  
Oliveira<sup>6,7</sup>, Luciana Magalhães Rebelo Alencar<sup>1</sup>

- 1- Federal University of Maranhão, Physics Department, Laboratory of Biophysics and Nanosystems, São Luís, MA
- 2- Department of Biochemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE
- 3- Drug Research and Development Center, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, CE
- 4- Instituto Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation, Department of Immunology, Recife, PE
- 5- Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil
- 6- Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Rio de Janeiro, RJ
- 7- Rio de Janeiro State University, Laboratory of Nanoradiopharmacy, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**All correspondence to:**

**Dr. Luciana Magalhães Rebelo Alencar**

Federal University of Maranhão, Physics Department, Laboratory of Biophysics and Nanosystems, São Luís, MA.

luciana.alencar@ufma.br

**ABSTRACT**

Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus (arbovirus) from Flavivirus. In 2015, Brazil and other Latin American countries experienced an outbreak of ZIKV infections associated with severe neurological disorders such as Guillain-Barre syndrome (GBS), encephalopathy, and encephalitis. Here, a complete mechanical and structural analysis of the ZIKV has been performed using Atomic Force Microscopy (AFM). AFM analysis corroborated the virus mean size (~50 nm) and icosahedral geometry and revealed high mechanical resistance of both: the viral surface particle (~ 200kPa) and its internal content (~ 800kPa). The analysis demonstrated the detailed organization of the nucleocapsid structure (like RNA strips). An interesting finding was the discovery that ZIKV has no surface self-assembling property. These results can contribute to the development of future treatment candidates and circumscribe the magnitude of viral transmission.

**Keywords:** ZIKV; Physical Virology; Ultrastructure; AFM; Arbovirus.



## INTRODUCTION

The Zika virus (ZIKV) is a member of the Flaviviridae family of the Flavivirus genus, which groups more than 70 viruses, whose structural arrangement is similar to the dengue, yellow fever, and chikungunya viruses<sup>1-3</sup>. It was first isolated in 1947 in the Zika forest in Uganda. However, just in 2007, after an outbreak in the South Pacific islands, it was considered an emerging pathogen. Epidemics at the global level and sporadic disease cases have been reported in more than 59 countries<sup>1</sup>, with an increasing number of infected people. The main transmission route of this virus occurs during the hematophagy process of the infected female *Aedes aegypti* mosquito<sup>4</sup>. This fact demonstrates the great potential for dissemination and the ability of the virus to propagate on a large scale. The virus replicates quickly when in contact with the human body, spreading the viral load to the organs, muscles, and brain<sup>5,6</sup>. In contrast, despite the symptomatic similarities between Zika and Dengue viruses, recent reports have suggested that ZIKV can sustain itself under adverse conditions. The reported current transmission cases through sexual contact, blood transfusion, and even transplants have been reported<sup>7</sup>.

ZIKV has a replication that involves the introduction of viral nucleic acids and viral proteins inside the crude endoplasmic reticulum (ER), which are attached for cell maturation and release<sup>8</sup>. This feature assures the virus the ability to infection of neurological cells (*neurotropic Flavivirus*). The zika disease has been associated with microcephaly, in which, when infecting pregnant women, the viral load crosses the placental barrier contaminating the baby<sup>9</sup>. Also, the Guillain-Barré syndrome has been associated with zika in adults<sup>10</sup>. Despite the wide morbidity, there are currently no specific antiviral treatments or vaccines<sup>11</sup>, making it difficult to control the

disease. To better understand the ZIKV, we have conducted a complete nanomechanical and ultrastructure analysis using Atomic Force Microscopy.

## **METHODOLOGY**

### *Virus culture and inactivation*

Zika virus (Brazilian isolate, ZIKV<sup>BR</sup>)<sup>11</sup> was cultured in Vero E6 cells (ATCC, C1008) and titrated in Vero cells (ATCC, CCL81) as described by Moser and coworkers<sup>12</sup>. The virus was inactivated by thermal treatment at 56 °C for 1 hour.

### *Atomic Force Microscopy (AFM)*

AFM measurements were performed according to the methodology employed by Cardoso-Lima et al.<sup>13</sup>, where 10 µL of solution with viral particle suspensions were deposited on glass slides (13 mm diameter), previously treated with poly-L-lysine 1% (Sigma, St. Louis, MO, USA). The slides were analyzed on Multimode 8 (Bruker, Santa Barbara, CA, USA) and the probes used were SNL (Bruker) with 0.06 N/m nominal spring constant in the peak force quantitative nanomechanics (QNM) mode. The structural parameters of the viral particles were calculated using the Gwyddion 2.57 software, applying the boundary grain detection to the topographic images (2 µm<sup>2</sup> scan area). From these regions, statistical information on the height and diameter of 107 particles was calculated. Viral particle indentation experiments were performed on nine different viral particles, and each one has undergone 30 to 70 indentation cycles. Adhesion maps were analyzed on six viral particles.

For the indentation analysis, the measurements were done on the QNM Ramp Mode in fluid following the same procedure used by Cardoso-Lima et al.<sup>13</sup>. We

applied a force setpoint of  $\sim 6$  nN and a tip velocity of 100 nm/s. AFM data were analyzed, and the maps were obtained using Mountains SPIP8 and Nanoscope Analysis software.

## RESULTS AND DISCUSSION

The first results come from the topographic maps (Figure 1), where it is possible to observe the details of the virus's outer surface. In Figure 1A, a larger scan area exemplifies the density of particles in the sample studied. From a population of about 107 viral particles, we measured that each has a mean size of 54.53 nm with a standard deviation (SD) of 6.9 nm.

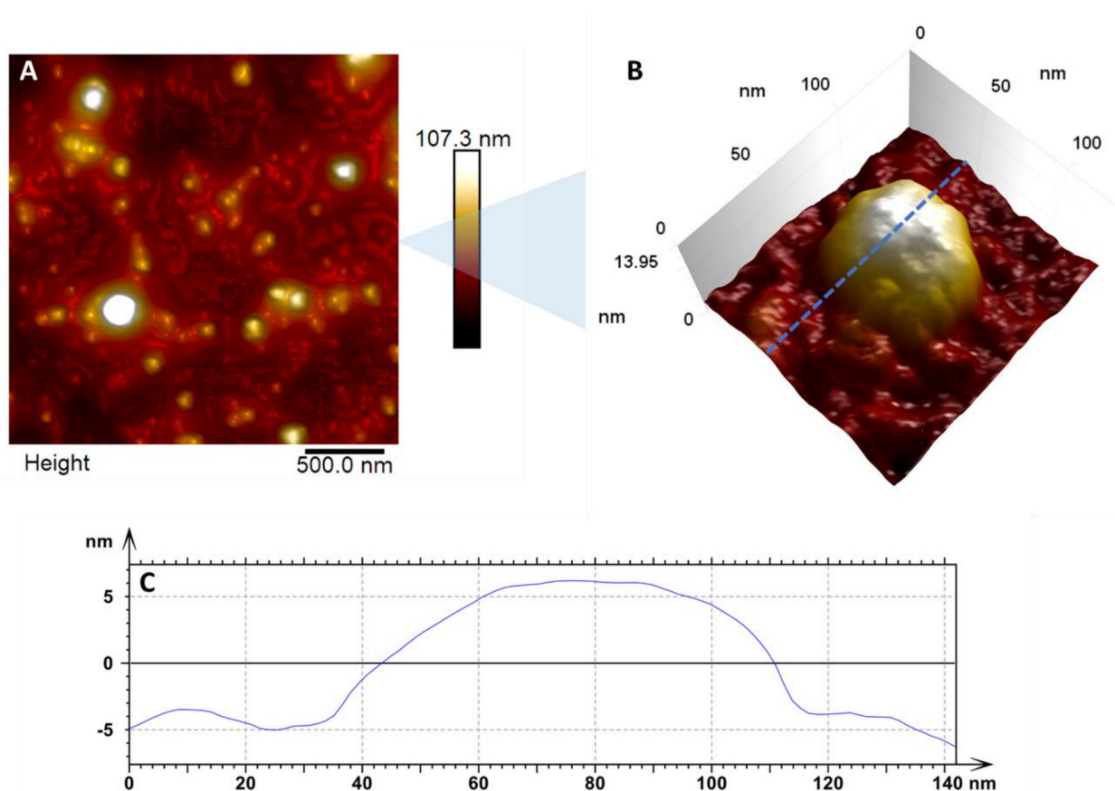


Fig. 1 – In A) we have the enlarged topographic image of countless viral particles dispersed in the substrate, with a diameter varying between 47-69 nm. B) Zoom of the surface of a single viral particle showing the details of the virus structure. The blue dashed line indicates the region

where the cross-section shown in C was taken. C) Cross-section of an adsorbed ZIKV particle in a glass substrate.

Although some reports have concluded that ZIKV has a size varying from 70-100nm<sup>14,15</sup>, our data demonstrated that the real size of the virus is 50nm as corroborated by Barreto-Vieira et al.<sup>16</sup>, Sexton et al.<sup>17</sup>, and Cui et al.<sup>18</sup>, information must be updated. For the map in Figure 1B, we have a close-up look at the arrangement details on the virus's surface. It is possible to observe small bumpy regions and well-organized proteins. This characteristic is expected for ZIKV<sup>19</sup>. In Figure 1C, we have a cross-section of a single viral particle, evidencing its height and profile. The diameter of the viral particle (width to half-height) is 65.4 nm and the height measured was 10.8 nm.

The results in Figures 2 (A and B) show the shape of the virus adsorbed on a glass substrate. It is possible to observe a spherical shape, which is very common for the virus<sup>20</sup>. In Figure 2B, it is possible to observe icosahedral faces, as followed by Zandi et al.<sup>21</sup>.

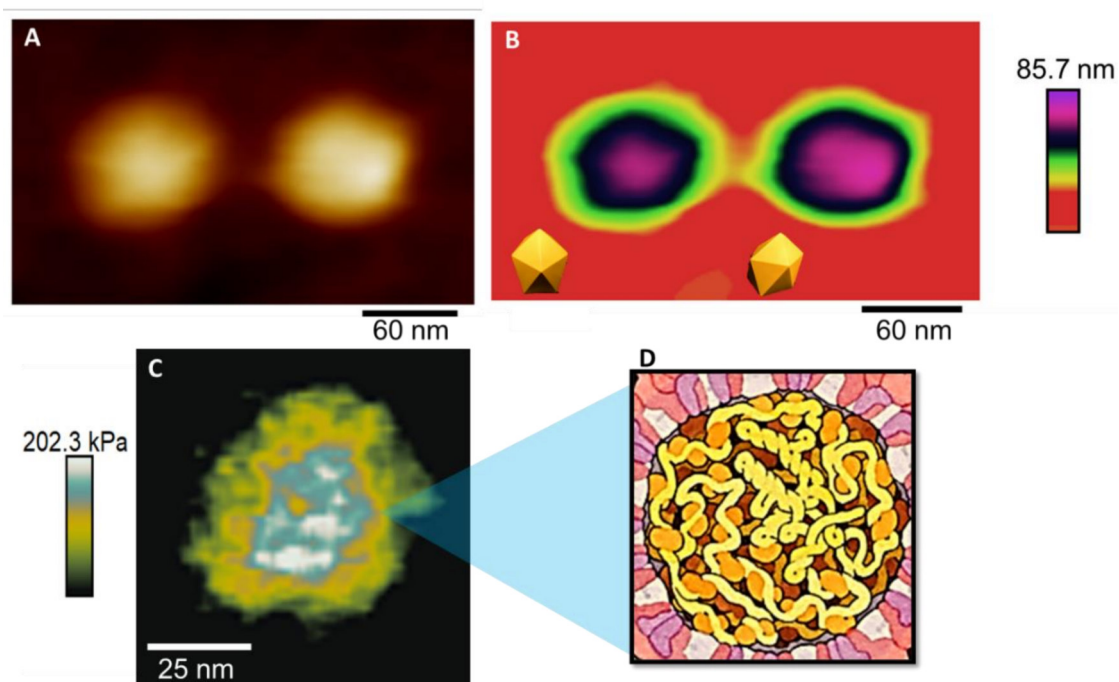


Fig. 2 – A) Heightmap of two ZIKV particles; B) The same particles with a different height scale contrast, evidencing the icosahedral type of the adsorption pattern. C) Young Modulus map showing internal structure arrangement. D) Pictographic representation of the internal assembly of the ZIKV<sup>22</sup>.

The Young Modulus (YM) map displayed in Figure 2C demonstrated that after being stressed multiple times (256x256 force curves), the outer layer of the virus collapsed, underlying the internal content of the ZIKV particle. It is also possible to observe the different contrasts in the viral particle, which shows the composition of different materials. In addition, we can state that the nucleocapsid is stiffer than the surface structure. This may be explained by the fact that capsid is reported to be one of the few viral proteins that have been shown to leave the replication compartments and enter the cell nucleus during infection<sup>23</sup>, so it should demonstrate greater endurance than the other structures of the viral particle.

The adhesion analysis maps revealed more information about the protein arrangement on the virus surface. Figures 3A and 3B show topographic maps evidencing the 'bumpy' characteristic of the protein arrangement on the virus surface<sup>19</sup>. The envelope protein E is responsible for this viral grouping, tending to form triangular structures, which act as a "shield" against antibodies<sup>24</sup>. In Figures 3C and 3D, distinct contrasts on the surface demonstrate the fusion of viral proteins that, after the maturation process, are grouped and organized in triangular structures on the virus's surface (Figures 3E and 3F). Differences in the adhesion maps contrasts may be related to surface charge distribution<sup>13</sup>. For the ZIKV, these distributions could have two possible factors: (i) due to changes in the proteins during the inactivation process, (ii) they can be related to protein conformations, i.e., monomeric or dimeric conformations<sup>25–27</sup>.

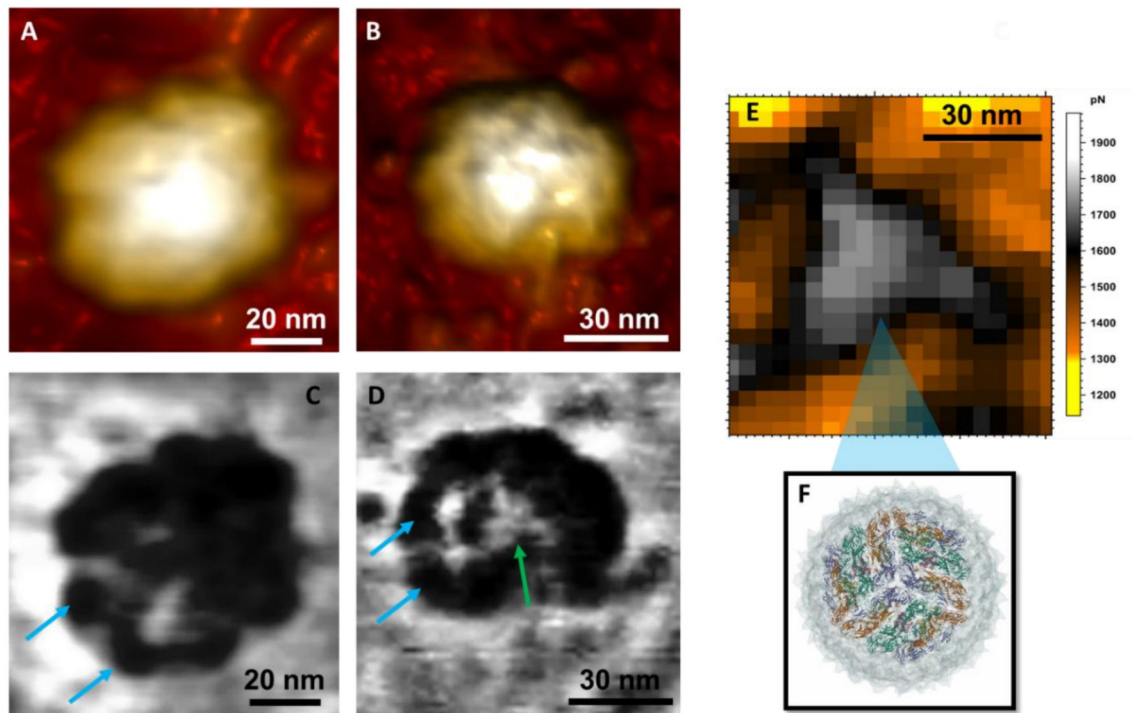


Fig. 3 – A) and B) Topographic maps of AFM revealing the viral ultrastructure and particle shape of ZIKV; C) and D) their respective adhesion maps. E) Close-up adhesion map, showing the correlation between the triangular-shaped structure observed and the model based on cryo-EM results in F)<sup>28</sup>. The blue arrows on both C) and D) maps indicate the typical bumps of the mature ZIKV particle. The green arrow (D) points to the triangular conformation of the closely fitted E protein structures.

Indentation measurements are demonstrated in Figure 4. It is possible to observe that ZIKV particles are more resistant to mechanical stress when compared to other viruses like SARS-CoV-2<sup>13</sup>. In Figure 4A, the indentation curves represent the behavior of the viral particles after continuously applied load cycles compared to the reference force curve performed on a glass (non-indentable) substrate (black dotted line). The step (yellow circle) on the curve is related to the 12<sup>th</sup> cycle, with force values of about 1.5 nN, associated with the rupture of a structural layer<sup>29</sup>. In Figure 4B, it is possible to observe from the approximation curve (blue) that the trigger force to scan the ZIKV can go up to 6 nN when a second plateau is observed at ~2.8nN. The blue section comprises

5% to 25% of the approach curve and has a measured Young Modulus of about 234 kPa. The green section, in the middle, refers to 25% to 45% of the curve and has a measured YM of 534 kPa. For the yellow section, representing 65% to 85% of the curve, the measured YM was 894 kPa. The curve was linearized by the DMT model<sup>30</sup>.

Scans after the fatigue tests showed deformations on the viral surface, confirming that the ZIKV does not have the self-assembly ability (Figure 4C). The plateaus are isolated in Figures 4D-E. The thickness of the ruptured layers is 5.02, and 10.71 nm for the force plateaus shown in Figures 4D and 4E, respectively. In Figure 4F, we have tethering events on the retraction curve (red) that can be observed in this virus precisely because its outer structure is entirely protein. When the tip is retracted, some portions of protein couple on the AFM probe, and the teeth-like events on the retraction curve represent the pulling forces between what is attached to the probe and what remains on the sample<sup>31,32</sup>.

Finally, this result demonstrates that investigation of protein interactions and different viral symmetries (in the case of ZIKV, an icosahedral symmetry) can display a complex range of pathways for viral behavior, leading to a variety of nano-bio-oriented applications<sup>33,34</sup>. Structural proteins can also be targeted by antiviral agents because, in most cases, they are singular to the pathogen and, in general, have no similarities with another human target<sup>35</sup>.

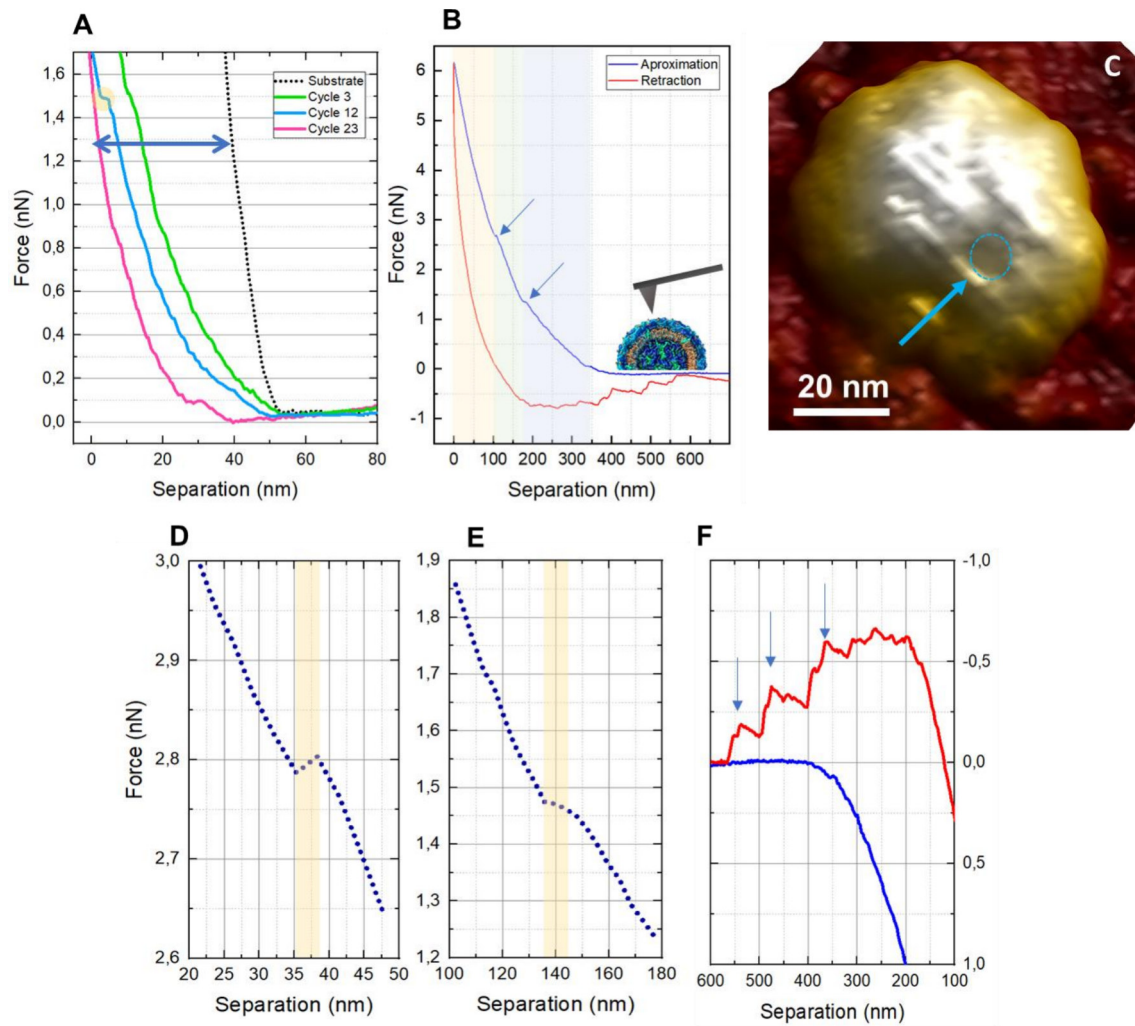


Fig. 4 – Zika viral particle indentation curves. (A) reference curve obtained during the cycles of approach and retraction, demonstrating that as the cycles increase, the curve also tends to lengthen. (B) Graph of the Force vs. Separation effected by a single stimulus (cycle) shows that the blue trace represents the approach curve, while the red indicates the retraction curve. The yellow, green, and blue tracks relate to the viral particle's three different types of materials. The blue arrows in detail of the contact ramp on the approach curve highlight the rupture plateau. (C) The image in the inset represents the ruptured region of the structure of the virus membrane, where the blue circle suggests a hole formed by the proteins of the outer layer. (D) and (E), related to the shell breakage, represented by the yellow band. (F) Tethering events (blue arrows) are observed in the retraction curve (red), matching that ZIKV has only its outermost layer of protein.



## CONCLUSION

In this study, we used AFM to evaluate the ultrastructure and nanomechanical properties of ZIKV viral particles. The high-resolution topographic maps revealed a viral particle with a mean size of  $54.53 \pm 6.9$  nm. Also, it demonstrated that a force of 1.5 nN is necessary to disrupt a first layer and 2.8nN for a second layer, corroborating the high mechanical resistance. Besides this, the thickness of these layers was measured. The protein that protects the ZIKV is molded according to the stimuli, which configures a promising scenario regarding the sequencing of a vaccine since by weakening the structure of ZIKV, it does not present a self-recovery in a short time experiment (~1 minute), as already seen in the literature for other types of the virus. The adhesion maps revealed details of the viral ultrastructure that were not seen in the height maps. Variations in elastic modulus are due to the size of the viral capsid - the smaller, the harder - and its external thickness, which again depends on how the protein arrangement is constituted. Young's module provides a very detailed comparison as it is an intrinsic element of the material, which, as we noted, can be different depending on how the protein "E" remodels, which constituted a challenging analysis since there is a change between intra-capsid interactions, where there is a change of binding forces, for example, by Van der Waals, which explains the increase in capsid rigidity during different indentations.

## REFERENCES

1. Pierson, T. C. & Diamond, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol* **5**, 796–812 (2020).

2. Paixão, E. S., Teixeira, M. G. & Rodrigues, L. C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *BMJ Glob Health* **3**, e000530 (2018).
3. Saiz, J.-C. *et al.* Zika Virus: the Latest Newcomer. *Frontiers in Microbiology* **7**, (2016).
4. da Encarnação Sá-Guimarães, T. *et al.* Route of Zika virus infection in *Aedes aegypti* by transmission electron microscopy. *BMC Microbiol* **21**, 300 (2021).
5. Gavino-Leopoldino, D. *et al.* Skeletal Muscle Is an Early Site of Zika Virus Replication and Injury, Which Impairs Myogenesis. *J Virol* **95**, e00904-21.
6. Figueiredo, C. P. *et al.* Zika virus replicates in adult human brain tissue and impairs synapses and memory in mice. *Nat Commun* **10**, 3890 (2019).
7. Allard, A., Althouse, B. M., Hébert-Dufresne, L. & Scarpino, S. V. The risk of sustained sexual transmission of Zika is underestimated. *PLoS Pathog* **13**, e1006633 (2017).
8. Leier, H. C. *et al.* A global lipid map defines a network essential for Zika virus replication. *Nat Commun* **11**, 3652 (2020).
9. Zanluca, C., de Noronha, L. & Duarte dos Santos, C. N. Maternal-fetal transmission of the zika virus: An intriguing interplay. *Tissue Barriers* **6**, e1402143 (2018).
10. Beattie, J. *et al.* Zika Virus–Associated Guillain-Barré Syndrome in a Returning US Traveler. *Infect Dis Clin Pract (Baltim Md)* **26**, e80–e84 (2018).
11. Cugola, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* **534**, 267–271 (2016).
12. Moser, L. A. *et al.* Growth and adaptation of Zika virus in mammalian and mosquito cells. *PLoS Negl Trop Dis* **12**, e0006880 (2018).

13. Cardoso-Lima, R., Souza, P. F. N., Guedes, M. I. F., Santos-Oliveira, R. & Alencar, L. M. R. SARS-CoV-2 Unrevealed: Ultrastructural and Nanomechanical Analysis. *Langmuir* acs.langmuir.1c01488 (2021)  
doi:10.1021/ACS.LANGMUIR.1C01488.
14. Hamel, R. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol* **89**, 8880–8896 (2015).
15. Cortese, M. *et al.* Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Rep* **18**, 2113–2123 (2017).
16. Barreto-Vieira, D. F. *et al.* Ultrastructure of Zika virus particles in cell cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **111**, 532–534 (2016).
17. Genome Number and Size Polymorphism in Zika Virus Infectious Units | Journal of Virology. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00787-20>.
18. Cui, Y., Grant, D. G., Lin, J., Yu, X. & Franz, A. W. E. Zika Virus Dissemination from the Midgut of *Aedes aegypti* is Facilitated by Bloodmeal-Mediated Structural Modification of the Midgut Basal Lamina. *Viruses* **11**, 1056 (2019).
19. Hasan, S. S., Sevvana, M., Kuhn, R. J. & Rossmann, M. G. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol* **25**, 13–20 (2018).
20. Louten, J. Virus Structure and Classification. *Essential Human Virology* 19–29 (2016) doi:10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8.
21. Zandi, R., Reguera, D., Bruinsma, R. F., Gelbart, W. M. & Rudnick, J. Origin of icosahedral symmetry in viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15556–15560 (2004).

22. PDB101: Molecule of the Month: Zika Virus. *RCSB: PDB-101*  
<http://pdb101.rcsb.org/motm/197>.
23. Sotcheff, S. & Routh, A. Understanding Flavivirus Capsid Protein Functions: The Tip of the Iceberg. *Pathogens* **9**, E42 (2020).
24. Dai, L., Wang, Q., Song, H. & Gao, G. F. Zika Virus Envelope Protein and Antibody Complexes. *Subcell Biochem* **88**, 147–168 (2018).
25. Bhella, D. The role of cellular adhesion molecules in virus attachment and entry. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **370**, 20140035 (2015).
26. Valente, A. P. & Moraes, A. H. Zika virus proteins at an atomic scale: how does structural biology help us to understand and develop vaccines and drugs against Zika virus infection? *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* **25**, (2019).
27. Dai, L. *et al.* Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host & Microbe* **19**, 696–704 (2016).
28. Sirohi, D. *et al.* The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* **352**, 467–470 (2016).
29. Roos, W. H., Bruinsma, R. & Wuite, G. J. L. Physical virology. *Nature Physics* **6**, 733–743 (2010).
30. Hellwig, J., Karlsson, R.-M. P., Wågberg, L. & Pettersson, T. Measuring elasticity of wet cellulose beads with an AFM colloidal probe using a linearized DMT model. *Anal. Methods* **9**, 4019–4022 (2017).
31. Aguayo, S. & Bozec, L. Mechanics of Bacterial Cells and Initial Surface Colonisation. in *Biophysics of Infection* (ed. Leake, M. C.) 245–260 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-32189-9\_15.

32. Grzeszczuk, Z., Rosillo, A., Owens, Ó. & Bhattacharjee, S. Atomic Force Microscopy (AFM) As a Surface Mapping Tool in Microorganisms Resistant Toward Antimicrobials: A Mini-Review. *Frontiers in Pharmacology* **11**, (2020).
33. Usselman, R. J. *et al.* Gadolinium-Loaded Viral Capsids as Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Appl Magn Reson* **46**, 349–355 (2015).
34. Kang, S. *et al.* Controlled Assembly of Bifunctional Chimeric Protein Cages and Composition Analysis Using Noncovalent Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16527–16529 (2008).
35. Schlicksup, C. J. & Zlotnick, A. Viral structural proteins as targets for antivirals. *Current Opinion in Virology* **45**, 43–50 (2020).