



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

IL FLAVONOIDE QUERCITINA COME INIBITORE DELLE PROTEASI VIRALI

THE FLAVONOID QUERCITIN AS INHIBITOR OF VIRAL PROTEASES

Tipo di tesi: compilativa

Studente:
Antonio Papini

Relatore:
Dott. Michele Cianci

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

SOMMARIO

ELENCO DELLE FIGURE.....	4
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	6
SCOPO DELLA TESI.....	7
CAPITOLO 1: LA QUERCITINA.....	8
1.1 Introduzione.....	8
1.2 Attività antiossidante dei flavonoidi.....	11
1.3 Altre attività dei flavonoidi.....	12
1.4 La quercitina.....	14
CAPITOLO 2: LE PROTEASI.....	16
2.1 Introduzione.....	16
2.2 Classificazione delle proteasi.....	17
2.3 Meccanismo di azione delle proteasi appartenenti alla famiglia serin proteasi..	18
2.4 Altre famiglie di proteasi.....	21
CAPITOLO 3: RICERCA BIBLIOGRAFICA SULLA QUERCITINA E GLI ENZIMI PROTEASI.....	24
3.1 Criteri di ricerca utilizzati.....	24
3.2 Classificazione risultati 2000-2020.....	25
3.3 Classificazione e descrizione dei risultati riguardanti l'area tematica 'agricoltura e scienze biologiche' 2004-2020.....	29
3.4 Classificazione e descrizione dei risultati riguardanti l'area tematica 'agricoltura e scienze biologiche' 2020.....	32
3.5 Classificazione e descrizione dei risultati riguardanti l'area tematica 'agricoltura e scienze biologiche' 2017.....	34
3.6 Classificazione e descrizione dei risultati riguardanti l'area tematica 'agricoltura e scienze biologiche' 2014.....	35

CAPITOLO 4: DESCRIZIONE DEL MECCANISMO DI INIBIZIONE DELLE PROTEASI VIRALI DA PARTE DEI FLAVONOIDI.....	36
4.1 Virus HCV.....	36
4.2 Sars-CoV-2.....	38
4.3 Studio e analisi dei punti chiave per l'inibizione dei coronavirus.....	39
4.4 Potenziale dei flavonoidi contro i coronavirus.....	41
4.5 Meccanismi di inibizione quercitina.....	43
4.6 Quercitina come inibitore di altre proteine virali.....	44
4.7 Altri meccanismi antivirali della quercetina nel virus dell'influenza.....	46
CONCLUSIONI.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	48

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Quercitina struttura chimica.....	8
Figura 2: Struttura chimica Flavonoide.....	9
Figura 3: Principali classi di flavonoidi.....	10
Figura 4: Formazione di coaguli nel sangue.....	12
Figura 5: Acido Ascorbico (vitamina C).....	13
Figura 6: Tocoferolo (vitamina E).....	13
Figura 7: Cibi ricchi in quercitina.....	14
Figura 8: Meccanismo generale di proteolisi.....	16
Figura 9: Struttura tridimensionale chimotripsina.....	18
Figura 10: Cinetica enzimatica della chimotripsina.....	19
Figura 11: Chimotripsina, tripsina, elastasi.....	20
Figura 12: Meccanismo azione cistein proteasi.....	22
Figura 13: Meccanismo di azione Aspartil Proteasi.....	22
Figura 14: Meccanismo di azione metalloproteasi.....	23
Figura 15: Intersezione di ricerca usando le parole chiave ‘quercetin’ e ‘protease’.....	24
Figura 16: Articoli per anno pubblicati contenti le parole chiave “quercetin” e “protease”.....	25
Figura 17: Tipologia di documenti.....	26
Figura 18: Paese di provenienza dei documenti.....	26
Figura 19: Principali dieci aree tematiche riscontrate nei documenti nell’arco temporale 2000- 2020.....	27
Figura 20: Argomenti trattati nei risultati del 2020.....	28
Figura 21: Divisione degli articoli in base all’anno di pubblicazione.....	29
Figura 22: Tipologia di documenti.....	30
Figura 23: Argomenti trattati nei documenti.....	31

Figura 24: Ricostruzione della capsula virale del SARS-CoV2.....	33
Figura 25: Baccello e semi di pisello verde (pisum sativum).....	34
Figura 26 Quercetina, apigenina e luteolina inibiscono proteina NS5B dell'HVC.....	36
Figura 27 Confronto delle strutture genomiche di MERS, SARS-CoV e SARS-CoV-2...40	
Figura 28 Strutture chimiche di Quercitina, Herbacetina e Isobavacalcone.....	42
Figura 29 Ciclo di vita virale dei virus influenzali.....	46

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

LDL=lipoproteine a bassa densità

HCV=Virus Epatite C

EGCG=epigallocatechina-3-gallato

NS3 = proteina non strutturale dell'HCV

NS5B= proteina non strutturale dell'HCV

NTCP=polipeptide co-trasportatore di taurocolato di sodio del recettore del virus dell'epatite

3CLpro=enzima 3-chimotripsina-like proteasi

PLpro=enzima papaina-like proteasi

SCOPO DELLA TESI

Visto il rinnovato interesse per il flavonoide quercitina come potenziale inibitore della proteasi MPro della SARS-CoV-2, con la presente tesi si sono volute ricercare le relazioni tra proteasi e il flavonoide quercitina riportate nella letteratura scientifica recente.

Nei primi due capitoli vengono spiegate le principali classi di flavonoidi, per poi concentrarsi sulla quercitina, ed in seguito vengono descritte le varie tipologie di proteasi e il rispettivo meccanismo di azione.

Nel terzo capitolo vengono presentati i risultati ottenuti dalla ricerca bibliografica attraverso il motore di ricerca 'Scopus', dove utilizzando le parole chiave 'quercetina' e 'protease' questi risultati vengono catalogati e discussi.

Nel quarto capitolo vengono riportati nello specifico articoli che trattano l'inibizione delle proteasi virali da parte della quercitina nei confronti di virus come l'HVC e il virus dell'influenza, e un articolo sugli studi sperimentali che sono stati svolti sulle potenzialità della quercetina di inibire proteasi fondamentali per la replicazione del coronavirus SARS-CoV-2.

CAPITOLO 1:

LA QUERCITINA

1.1 Introduzione

La quercitina (Fig1) è un composto fenolico appartenente alla classe dei flavonoidi (Fig2). I flavonoidi possono presentarsi come glicosidi, classe di composti chimici ottenuti per reazione di un carboidrato in forma emiacetale e caratterizzati dalla formazione di un legame glicosidico, come agliconi (parte non zuccherina dei glicosidi, come nel caso della quercitina) o come parte di altre strutture che contengono flavonoidi, come i flavolignani. I flavonoidi sono costituiti da uno scheletro centrale composto da 15 atomi di carboni (C-15) e più precisamente, da tre anelli: due anelli benzilici (denominati A e B) e un anello eterociclico (denominato C).

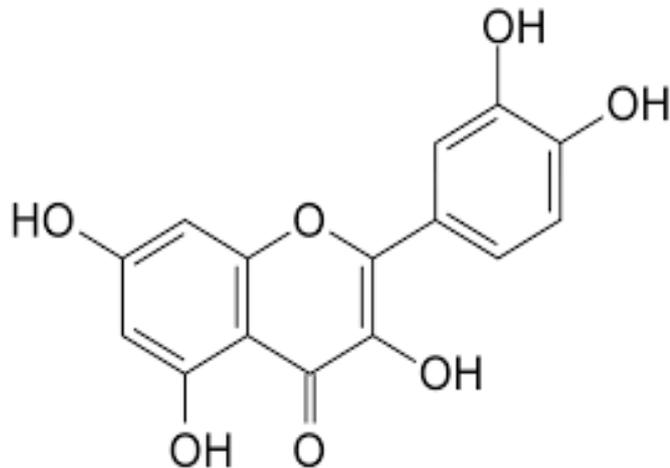


Figura 1: Quercitina struttura chimica, la quercitina ha sostituenti -OH nelle posizioni: 3,5,7,3',4'

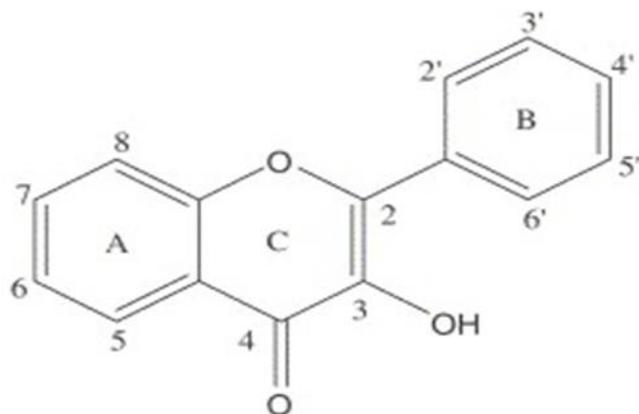


Figura 2: Struttura chimica Flavonoide

Nei flavonoidi (Fig. 3) a seconda del carbonio dell'anello C cui è legato l'anello B è possibile distinguere:

- Flavonoidi o bioflavonoidi nei quali l'anello B è legato sul carbonio numero 2 dell'anello C.
- Isoflavonoidi, nei quali l'anello B è legato al carbonio numero 3 dell'anello C (posizione 3).
- Neoflavonoidi, nei quali l'anello B è legato al carbonio numero 4 dell'anello C (posizione 4).

In funzione del grado d'insaturazione e ossidazione dell'anello C e in funzione delle diverse sostituzioni su tutti gli anelli, inoltre, è possibile distinguere diversi sottogruppi:

Flavonoidi o bioflavonoidi in cui l'anello B è legato in posizione 2 possono essere ulteriormente suddivisi in:

- Flavoni (apigenina)
- Flavonoli (quercitina e rutina)
- Flavanoni
- Flavanoli, meglio noti come catechine
- Flavani;
- Antocianine (ad esempio, la cianidina).

Gli isoflavonoidi, invece, possono essere ulteriormente suddivisi in:

- Isoflavoni;
- Isoflavonoli;
- Isoflavani;
- Isoflavanoli;
- Isoflavanoni.

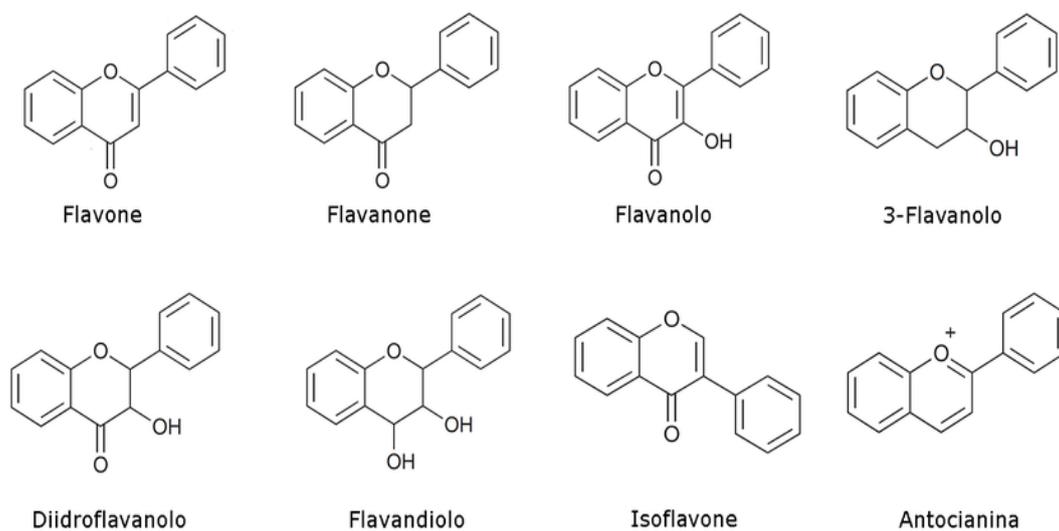


Figura 3: Principali classi di flavonoidi

I flavonoidi sono componenti importanti della dieta umana, sebbene siano generalmente considerati non nutrienti, cioè sostanze prive di valore nutritivo. Sono consumati quotidianamente dalle persone, ma una quantificazione più accurata del totale dei flavonoidi ingeriti diventa difficile, a causa della mancanza di tabelle con dati sulla loro distribuzione negli alimenti.

1.2 Attività antiossidante dei flavonoidi

I flavonoidi sono antiossidanti efficaci per le loro proprietà di rimozione dei radicali liberi e per chelare gli ioni metallici, proteggendo così i tessuti dai radicali liberi e dalla perossidazione lipidica. La proprietà antiossidante è diretta sul radicale idrossile (OH^\cdot) e sull'anione superossido (O_2^-), che sono specie altamente reattive coinvolte nell'inizio della perossidazione lipidica.

I flavonoidi esercitano più meccanismi antiossidanti, e tali meccanismi comprendono:

- a) l'oppressione della formazione di specie reattive dell'ossigeno inibendo il sistema enzimatico responsabile della generazione dei radicali liberi;
- b) chelazione di ioni metallici che può avviare la produzione di radicali idrossilici.
- c) sequestro dei radicali liberi;
- d) regolazione positiva o protezione delle difese antiossidanti inducendo la fase II di enzimi come il glutathione transferasi che aumenta l'escrezione di specie ossidate;
- e) induzione di enzimi antiossidanti come la metallothioneina, che è una proteina chelante del metallo, con proprietà antiossidanti.

L'attività ossidante dei flavonoidi è direttamente proporzionale al numero totale di gruppi idrossilici legati, la presenza di più gruppi idrossilici, specialmente se presenti nell'anello B, aumentano infatti significativamente la produzione di radicali idrossilici. In uno studio dove sono stati presi in considerazione una serie di flavonoidi mono e diidrossilici, questi non hanno dimostrato alcuna attività pro-ossidante rilevabile, mentre composti con più gruppi idrossilici, specialmente presenti nell'anello B, hanno aumentato significativamente la produzione di radicali idrossilici nel sistema (Hanasaki et al. 1994).

I flavonoidi hanno proprietà stabilizzanti di membrana, che possono influenzare alcuni processi del metabolismo intermedio. In particolare, la quercetina sequestrando i radicali dell'ossigeno come (OH^\cdot e O_2^-) inibisce la xantina ossidasi e la perossidasi lipidica, importante perché il radicale idrossile e gli anioni superossido sono coinvolti nel danno tissutale avviando la perossidazione lipidica e la rottura della matrice interstiziale. (Kandaswami et al. 1994).

1.3 Altre attività dei flavonoidi

I flavonoidi possono avere le seguenti proprietà riparatorie:

ATTIVITA' ANTIVIRALE:

Nei confronti di molteplici virus come spiegato nelle pagine successive.

EFFETTO ANTIOSSIDANTE:

Hanno la capacità di inibire l'ossidazione delle proteine a bassa densità (LDL). Studi in vitro con costituenti fenolici contenuti nel vino rosso hanno dimostrato che questi inibivano l'ossidazione catalizzata dal rame delle LDL, riuscendo quindi a bloccare i radicali liberi e a ridurre i loro effetti dannosi.

EFFETTO ANTITROMBOTICO:

Inibiscono l'aggregazione piastrinica, prevenendo quindi la formazione di coaguli che potrebbero causare ischemie cardiache, cerebrali e intestinali. (Nijveldt et al. 2001.)

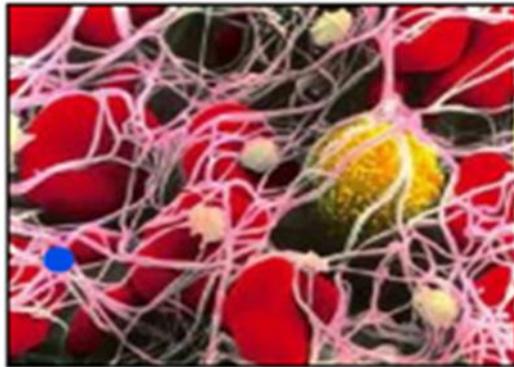


Figura 4: Formazione di coaguli nel sangue

(https://www.unipi.it/index.php/offerta/item/download/2717_a4f9aae54849c338027b5adb0d541cd1)

PROMUOVONO LA VASODILATAZIONE:

Ovvero l'aumento del calibro dei vasi sanguigni. Effetto ipotensivo e antiaritmico, permette l'aumento del flusso sanguigno nel corpo verso i tessuti che ne hanno più bisogno in maniera naturale. (Nijveldt et al. 2001.)

MODIFICANO LA SINTESI DEGLI ECOSANOIDI:

I flavonoidi vanno ad agire sugli eicosanoidi modificandone la sintesi, ed esercitando quindi un'azione antinfiammatoria e antipertensiva. Gli eicosanoidi sono derivati dell'acido arachidonico, un ac. Grasso polinsaturo con quattro doppi legami. (NIJVELDT et al. 2001.)

I flavonoidi sono anche in grado di rigenerare l'acido ascorbico (vitamina C, Fig 5) il quale a sua volta rigenera il tocoferolo (vitamina E, Fig6). Entrambe con funzioni antiossidanti, combattono i radicali liberi e favoriscono il rinnovo cellulare.

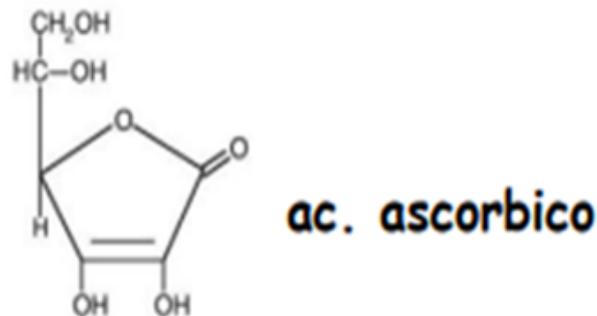


Figura 5: Acido Ascorbico (vitamina C)

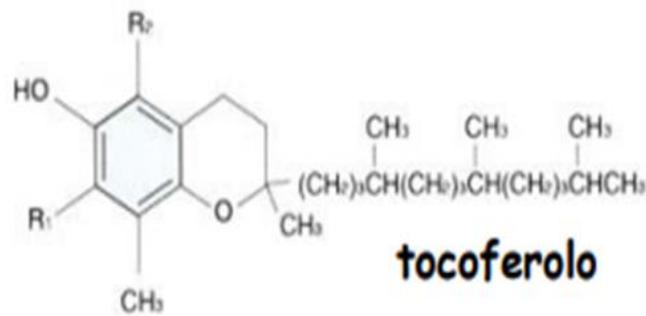


Figura 6: Tocoferolo (vitamina E)

(https://www.unipi.it/index.php/offerta/item/download/2717_a4f9aae54849c338027b5adb0d541cd1)

1.4 La quercetina

La quercetina è un antiossidante generalmente presente negli alimenti in forma glicosilata, la quercetina glicosilata viene assorbita più facilmente dagli esseri umani, indipendentemente dalla posizione del glucosio.

La quercetina può inibire il processo di formazione dei radicali liberi in tre fasi differenti:

- Nell'iniziazione per interazione con ioni superossido;
- Nella formazione di radicali idrossilici (chelando gli ioni di ferro);
- Nella perossidazione lipidica (reagendo con i radicali perossidici lipidici).

La quercetina è il flavonoide più abbondante presente nella dieta umana, rappresenta circa il 95% del totale dei flavonoidi ingeriti. La quercetina è presente in una grande varietà di frutti, tra questi troviamo; mela, uva, olive, melograno, frutti di bosco e agrumi, ma anche in molte verdure come capperi, broccoli, pomodori, cipolle, lattuga, sedano e asparagi. (Fig 7) La quercetina abbonda inoltre in numerosi estratti fitoterapici, come quelli di ippocastano, ginkgo biloba, calendula, biancospino, camomilla, levistico ed iperico, ed infine in bevande come tè verde e vino. (Note di lezione del Dr. Damiano Galimberti.) Una dieta ricca di questi alimenti e derivati di questi alimenti risulta essere benefica grazie alle proprietà antiossidanti della quercitrina sopra riportate. Le quote di assunzione giornaliere stimate variano dai 50 mg ai 500mg. (Deschner et al. 1991).



Figura 7: Cibi ricchi in quercitina

Composto	Alimenti
enina	uva nera, vino rosso
rutina	cipolla, mela, uva, broccoli, tè
miricetina	uva
resveratrolo	uva nera, vino
cianidina	Uva, lamponi, fragole
delfinidina	melanzane
quercitina	cipolla, mela, uva, broccoli, tè
kemferolo	Indivia, broccoli, tè

Tabella 1

Composto	Alimenti
epicatechina	uva nera, vino rosso
naringenina	buccia di agrumi
taxifolina	agrumi
tangeretina	agrumi
tirosolo	olivo
epigallocatechina	tè
apigenina	Sedano, prezzemolo
letolina	limone, olive, sedano
crisina	buccia della frutta

Tabella 2

CAPITOLO 2:

LE PROTEASI

2.1 Introduzione

Le proteasi sono enzimi che legano polipeptidi e proteine promuovendone la digestione e il turnover (le proteine che hanno svolto il loro compito vengono demolite per il riciclo degli amminoacidi) con un meccanismo idrolitico (Fig8). Termodinamicamente è favorita l'idrolisi, quindi questo processo dovrebbe essere spontaneo, tuttavia, la reazione non avviene con tempi compatibili con il metabolismo degli organismi viventi e per questo dev'essere catalizzata.

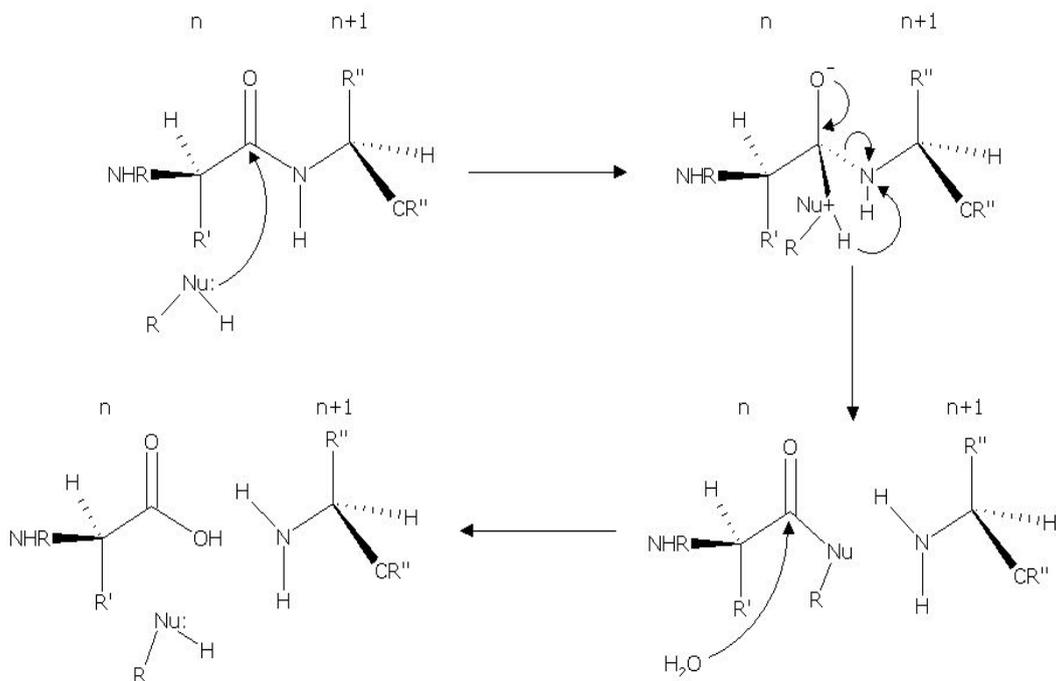


Figura 8: Meccanismo generale di proteolisi

2.2 Classificazione delle proteasi

La classe delle proteasi possono essere suddivise in due grandi sottoclassi sulla base delle proprietà strutturali del substrato attaccato:

- **Esopeptidasi:** accorciano la catena polipeptidica rimuovendo un residuo alla volta partendo da un'estremità. Se questo avviene dall'N-terminale si parla di aminopeptidasi, se invece la rimozione avviene in corrispondenza dell'estremità C-terminale, si parla di carbossipeptidasi.
- **Endopeptidasi:** agiscono frammentando la catena polipeptidica al suo interno e non alle estremità. Le proteasi vengono inoltre classificate in sei gruppi in base all'aminoacido catalitico:

- Proteasi a serina (cap 2.4)
- Proteasi a treonina (cap2.4)
- Proteasi a cisteina (cap2.4)
- Proteasi ad aspartato (acido aspartatico) (2.4)
- Proteasi a glutammato (acido glutammico) (2.4)
- Metalloproteasi - Le metalloproteasi utilizzano un metallo, spesso lo zinco od il cobalto. (cap2.4)

Ed infine vengono suddivise in base al pH dove sono più attive:

- Proteasi acide
- Proteasi neutre
- Proteasi alcaline

2.3 Meccanismo di azione delle proteasi appartenenti alla famiglia delle serin proteasi.

La chimotripsina (Fig.9) appartenente alla famiglia delle serin proteasi è il classico esempio di un enzima endoproteolitico, ossia idrolizza il legame peptidico vicino a residui idrofobici aventi grandi dimensioni (Trp, Phe, Tyr e Met) che si trovano all'interno della proteina (non alle sue estremità) ma sul lato carbossilico degli amminoacidi (Blow et al 1976).

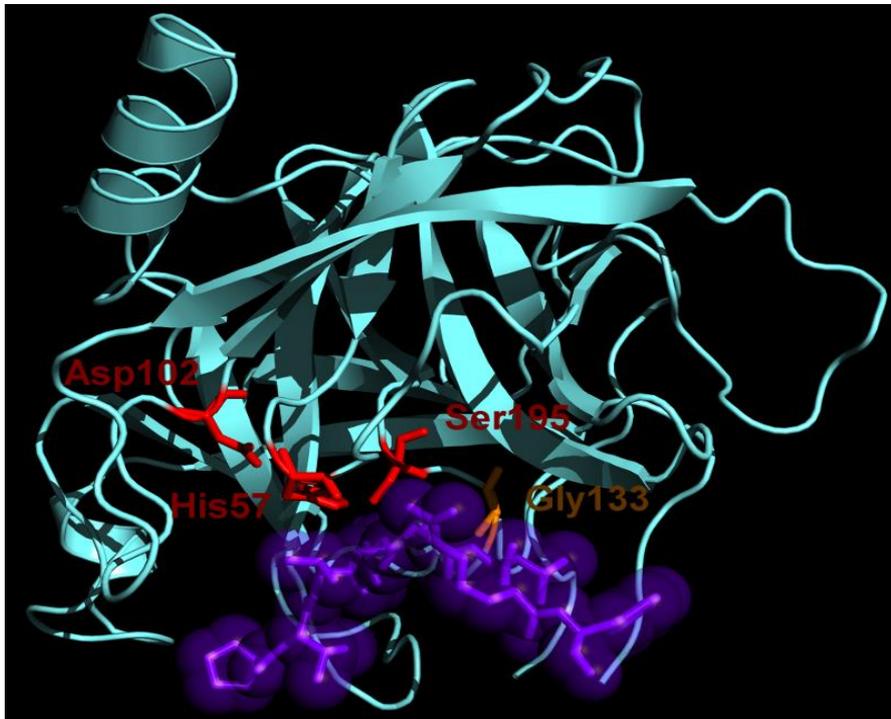


Figura 9: Struttura tridimensionale chimotripsina. Nell'immagine osserviamo il sito attivo costituito da tre residui amminoacidi (serina 195, istidina 57 e aspartato 102) caratteristica della famiglia delle serin proteasi.

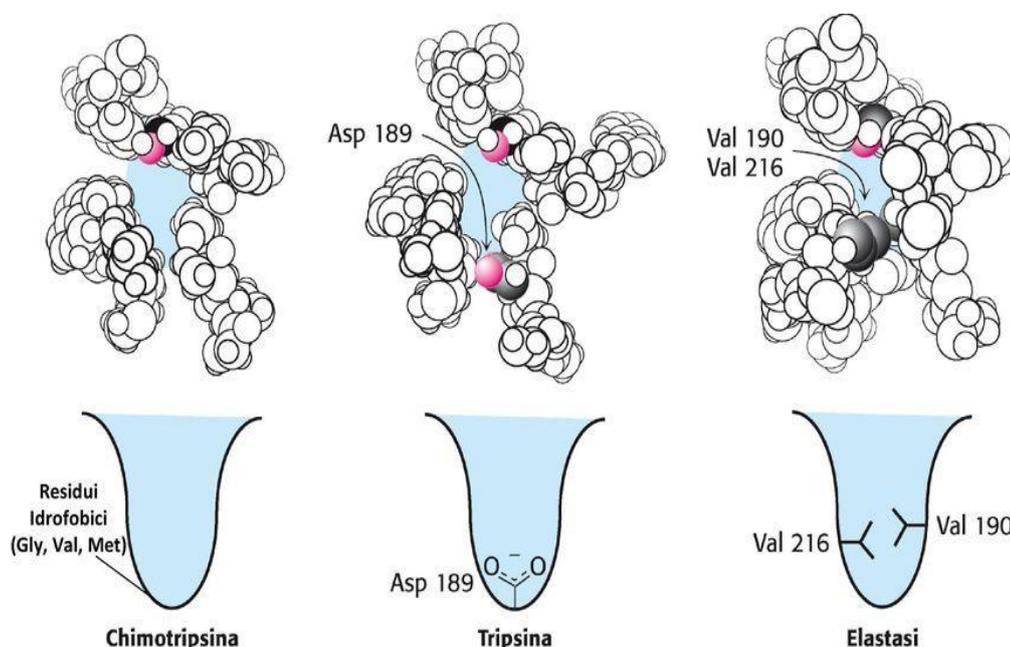
La serina 195 della Chimotripsina è un residuo particolarmente reattivo che funge da potente nucleofilo ed attacca il carbonio carbonilico dell'amminoacido (che di per sé è poco reattivo), perciò sfrutta un meccanismo di catalisi covalente (Fig8). La cinetica enzimatica viene spesso studiata usando un analogo del substrato, che forma un prodotto colorato; in questo modo possiamo studiare la progressione della reazione tramite una misura dell'assorbimento della luce da parte del prodotto. Tramite questa tecnica è stato messo in evidenza che la reazione si svolge in due diverse fasi: una fase iniziale "esplosiva" dove si ha una rapidissima formazione del prodotto colorato ed una fase di "stato stazionario" in cui la reazione raggiunge, per l'appunto, lo stato stazionario (Wilcox et al. 1970) (Fig10).



Figura 10: Cinetica enzimatica della chimotripsina

La serina è localizzata in una fessura sulla superficie dell'enzima (il suo sito attivo), inoltre, vicino a questo residuo troviamo un'istidina (His57) e un aspartato (Asp102) che modificano le sue caratteristiche. In particolare, la catena laterale della serina 195 interagisce con l'anello imidazolico dell'istidina 57 tramite un legame ad idrogeno e questo anello polarizza il gruppo ossidrilico della serina; inoltre, il gruppo -NH dell'anello imidazolico dell'istidina forma un legame idrogeno con il gruppo carbossilico dell'aspartato 102. Questa organizzazione, in cui i tre residui sono disposti in modo da formare i legami ad idrogeno, viene detta triade catalitica. Sono state trovate molte altre proteine contenenti una triade catalitica (Bauer et al 1980; Polgar et al 1987) (Fig 8).

Alcune di esse, come la tripsina e l'elastasi (Fig.11), sono evidenti omologhi della chimotripsina.



Chimotripsina, tripsina ed elastasi sono esempi di serina proteasi sintetizzati dal pancreas e secreti nel duodeno. Tutti tagliano il legame peptidico, ma su substrati diversi.

Figura 11: Chimotripsina, tripsina, elastasi.

La differenza tra la chimotripsina e i suoi omologhi sta nella specificità di substrato dovuta a piccole differenze strutturali. Nella tripsina, un residuo di aspartato (Asp189) è presente in fondo alla tasca, al posto del residuo di serina della chimotripsina. Il residuo di aspartato attrae e stabilizza i residui di arginina o di lisina carichi positivamente, presenti nel substrato.

Nell'elastasi, all'inizio della tasca, sono presenti due residui di valina (Val190 e Val216), che chiudono l'entrata della tasca, in modo da permettere l'ingresso solo a catene laterali di piccole dimensioni. (Polgar et al. 1987)

2.4 Altre famiglie di proteasi

Non tutte le proteasi utilizzano strategie basate sull'attivazione di residui di serina.

Altre classi di proteine per idrolizzare il legame peptidico utilizzano meccanismi alternativi. Comunque, la strategia è sempre la stessa: generare un forte nucleofilo per attaccare il carbonio carbonilico del legame peptidico.

1. Cistein proteasi:

In questo gruppo di enzimi un residuo di cisteina, attivato da un residuo di istidina, svolge il ruolo di nucleofilo, che attacca il legame peptidico con un meccanismo del tutto simile a quello del residuo di serina nelle serin proteasi. Essendo però l'atomo di zolfo della cisteina un nucleofilo migliore dell'atomo di ossigeno della serina, le cistein proteasi richiedono solo questo residuo di istidina oltre alla cisteina e non l'intera triade catalitica (Polgar et al. 1987; Blow et al. 1980) (Fig. 12).

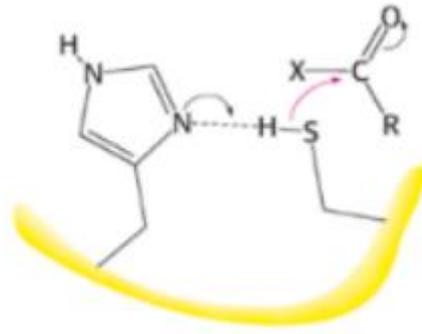


Figura 12: Meccanismo azione cistein proteasi

2. Aspartil proteasi:

La caratteristica principale dei loro diti attivi è la presenza di due residui di acido aspartico, che agiscono insieme, per permettere a una molecola di acqua di attaccare il legame peptidico. Un residuo di acido aspartico attiva la molecola di acqua che interverrà nella catalisi, preparandola ad essere deprotonata. L'altro residuo di acido aspartico, polarizza il gruppo carbonilico del legame peptidico, per renderlo più suscettibile all'attacco nucleofilo. (Polgar et al 1987; Blow et al. 1980) (Fig13)

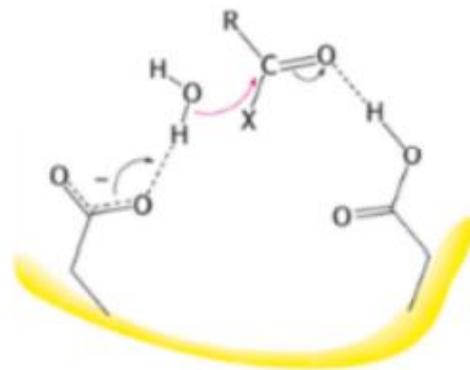


Figura 13: Meccanismo di azione Aspartil Proteasi

3. Metalloproteasi:

Il sito attivo delle metalloproteasi contiene uno ione metallico legato, quasi sempre uno ione zinco, che attiva una molecola di acqua per attivarla nella forma di un nucleofilo capace di attaccare un gruppo carbonilico del peptide. (Polgar et al. 1987; Blow et al. 1980) (Fig 14)

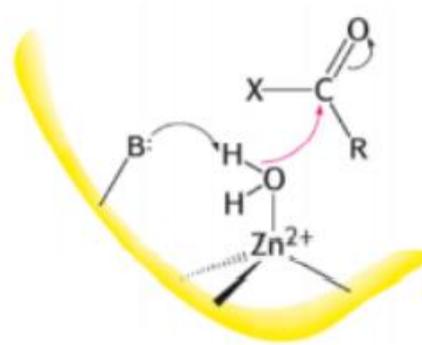


Figura 14: Meccanismo di azione metalloproteasi

CAPITOLO 3:

Ricerca bibliografica sulla quercitina e gli enzimi proteasi

3.1 Criteri di ricerca utilizzati

Per la ricerca bibliografica è stato utilizzato il database 'SCOPUS' (www.scopus.com) accessibile con le credenziali accademiche, ricercando le parole chiave di ricerca 'protease' e 'quercetin' selezionando dall'anno 2000 al 2020, e i titoli, gli astratti e le parole chiave. Gli articoli e le revisioni analizzati sono la risultante dell'intersezione dei risultati di ricerca usando le parole chiave 'Quercetin' e 'Protease' e quindi di tutte le tipologie di relazioni che queste due parole hanno tra di loro e che sviluppano (Fig 15).

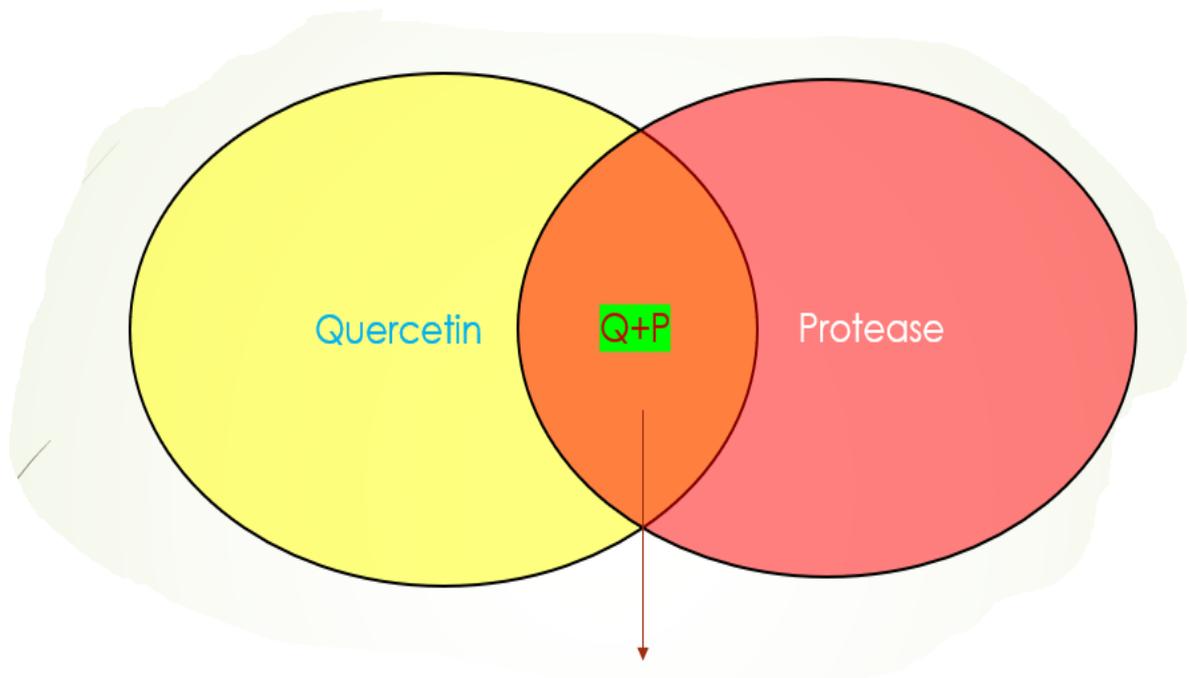


Figura 15: Intersezione di ricerca usando le parole chiave 'quercetin' e 'protease'

3.2: Classificazione risultati 2000-2020

La ricerca in base a questi settaggi ha prodotto 266 risultati tenendo in considerazione un arco di tempo che va dal 2000 al 2020, seguentemente così divisi:

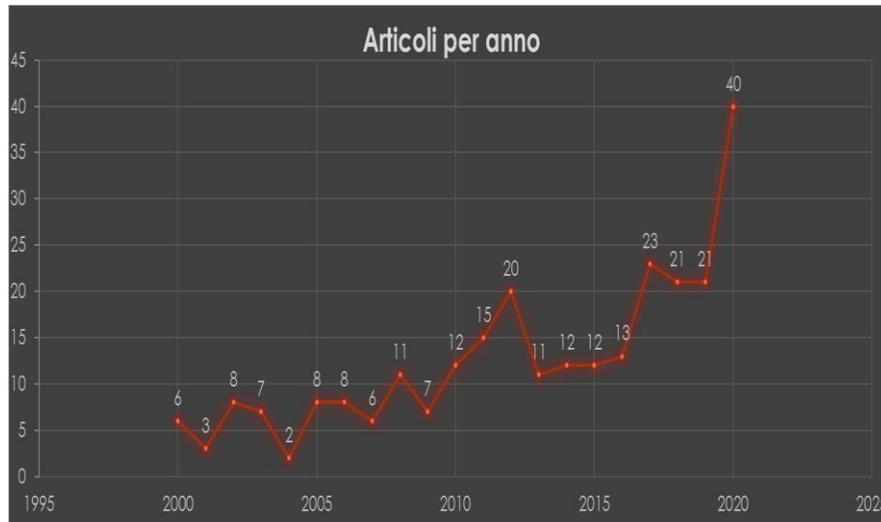


Figura 16: Articoli per anno pubblicati contenti le parole chiave “quercetin” e “protease”.

Il grafico qui di sopra rappresenta il trend di articoli pubblicati negli ultimi venti anni, l’anno con maggiori pubblicazioni è stato il 2020 con ben 40 articoli, segue poi il 2017 con 23 articoli pubblicati.

Dei 266 risultati presi in considerazione nella ricerca questi vengono suddivisi in base alla tipologia di documento. La maggioranza dei risultati comprende la tipologia Articolo con 231 risultati su 266 (Fig. 17). Fig 18 Riporta la suddivisione dei risultati in base al paese di provenienza, andando a considerare i dieci maggiori esponenti su tutti gli anni 2000-2020.

La Cina e l’India sono al primo posto con 44 documenti pubblicati, l’Italia si trova invece al quinto posto con 19 documenti. Per quanto riguarda la suddivisione dei documenti in base all’argomento trattato nell’arco 2000-2020, (Fig. 19) prende in considerazione le principali dieci aree tematiche riscontrate.

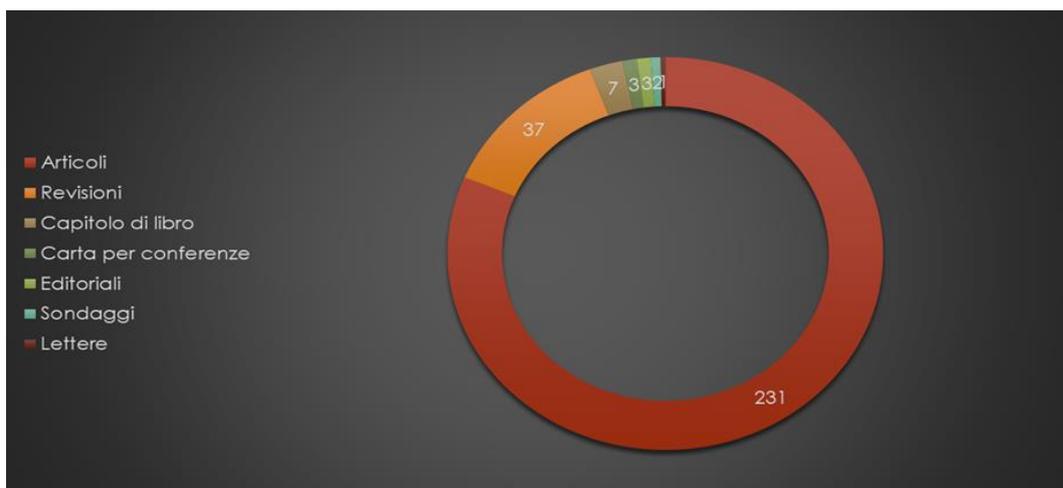


Figura 17: Tipologia di documenti.

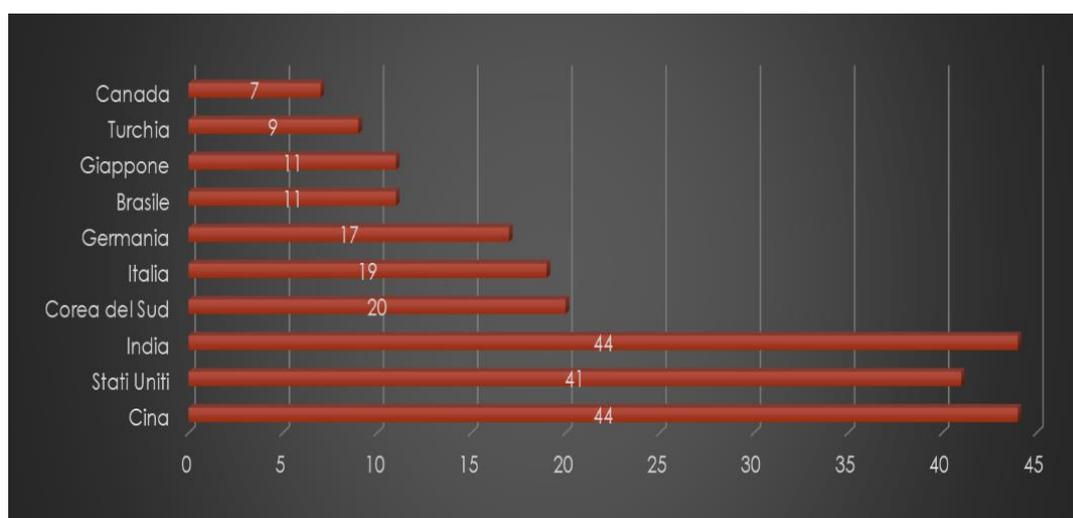


Figura 18: Paese di provenienza dei documenti.

Per quanto riguarda la suddivisione dei documenti in base all'argomento trattato nell'arco 2000-2020, il seguente grafico prende in considerazione le principali dieci aree tematiche riscontrate.

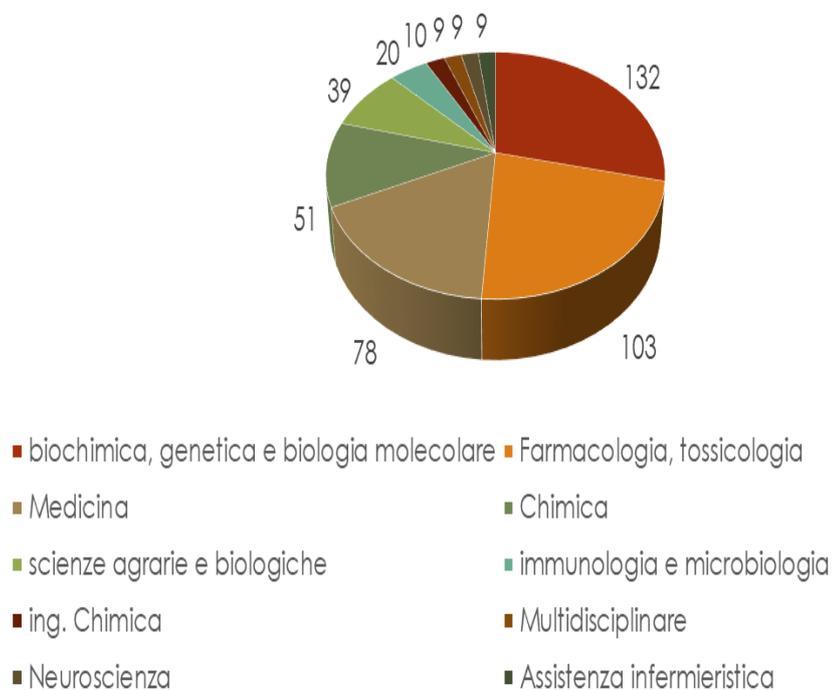


Figura 19: Principali dieci aree tematiche riscontrate nei documenti nell'arco temporale 2000-2020

Considerando il 2020 l'anno con più documenti pubblicati, nel seguente grafico (Fig 20) troviamo i vari campi d'interesse che vengono coinvolti nella stesura dei documenti.

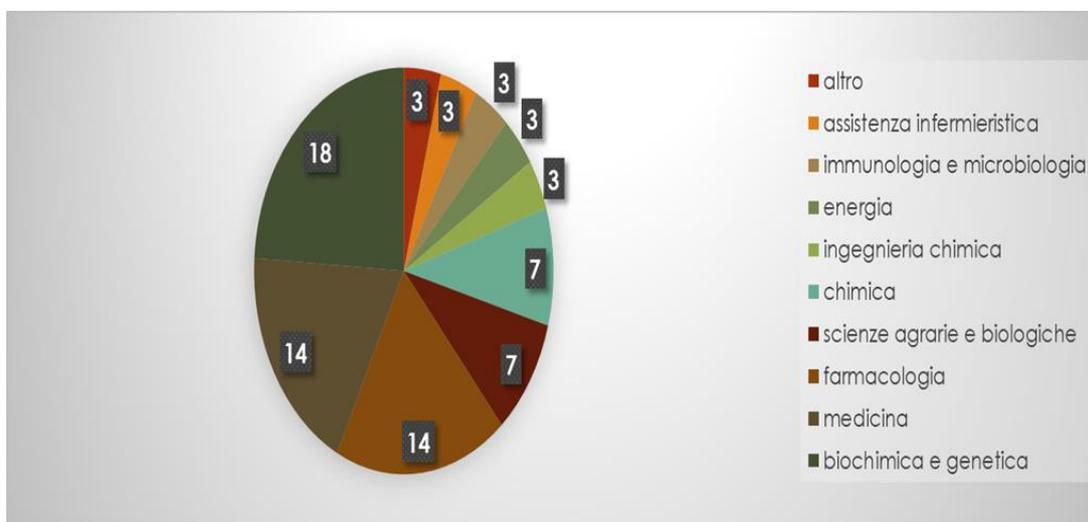


Figura 20: Argomenti trattati nei risultati del 2020.

L'argomento di testo più ricorrente risulta essere la biochimica e la genetica (18), ed in particolar modo si fa riferimento al potenziale dei flavonoidi come inibitori di proteasi virali, alla base dello sviluppo di molti virus come SARs-Cov2. Di questi articoli quattro sono stati pubblicati da studi italiani:

- Structural stability of SARS-CoV-2 3CLpro and identification of quercetin as an inhibitor by experimental screening. (Abian, O., Ortega-Alarcon, D., Jimenez-Alesanco, A., (...), Rizzuti, B., Velazquez-Campoy, A. International Journal of Biological Macromolecules)
- Antiviral properties of flavonoids and delivery strategies. (Ninfali, P., Antonelli, A., Magnani, M., Scarpa, E.S. Nutrients)
- Naturally occurring PCSK9 inhibitors. (Adorni, M.P., Zimetti, F., Lupo, M.G., Ruscica, M., Ferri, N. Nutrients)
- A role for quercetin in coronavirus disease 2019 (COVID-19). (Derosa, G., Maffioli, P., D'Angelo, A., Di Pierro, F. Phytotherapy Research)

3.3 Classificazione e descrizione dei risultati riguardanti l'area tematica 'agricoltura e scienze biologiche' 2004-2020

Nella ricerca prendendo in considerazione i 266 risultati e inserendo nei settaggi l'area tematica 'Agricultural e Biological sciences' otteniamo 42 riscontri, così seguentemente divisi in base all'anno di pubblicazione, partendo dall'anno 2004 fino al 2020 (Fig.21). I risultati che rientrano nella categoria 'capitoli di libri' non verranno tenuti in considerazione per la ricerca. Dei 42 risultati ottenuti osserviamo la divisione per tipologia di documento (Fig.22).

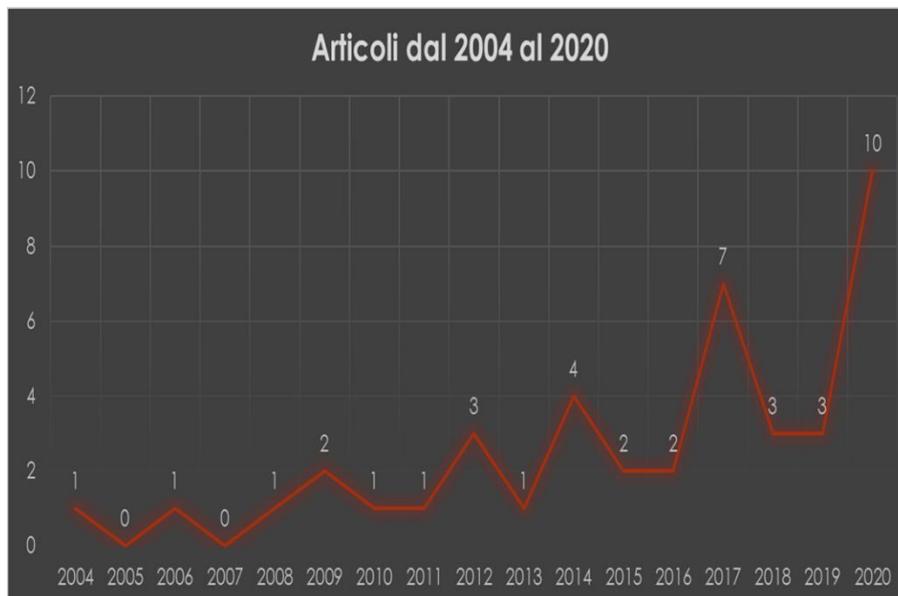


Figura 21: Divisione degli articoli in base all'anno di pubblicazione.

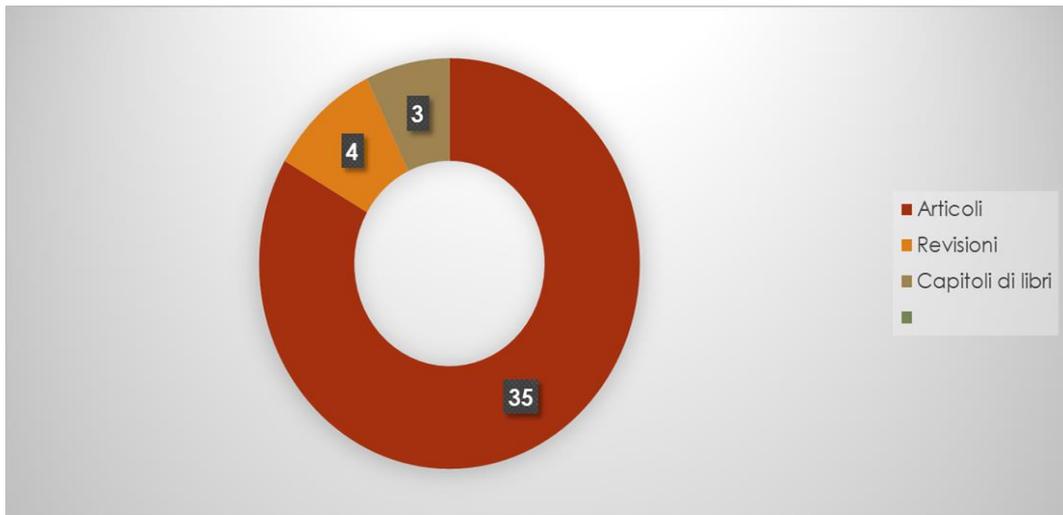


Figura 22: Tipologia di documenti.

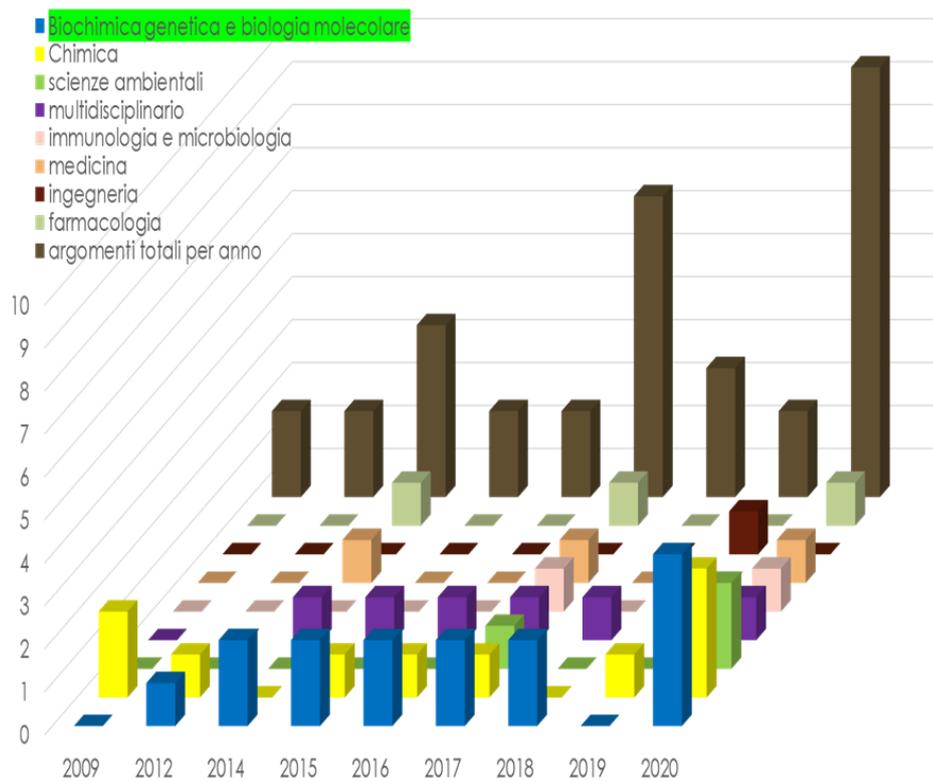


Figura 23: Argomenti trattati nei documenti.

Andiamo poi ad analizzare in questo grafico i 42 risultati che si trovano nell'area tematica 'agricultural and biological sciences' (Fig 23).

I risultati del grafico mettono in evidenza come la **biochimica, la genetica e la biologia molecolare** siano temi ricorrenti nei documenti rispetto ad altre tematiche.

3.4: Classificazione e descrizione dei risultati riguardanti l'area tematica 'agricoltura e scienze biologiche' 2020

I risultati sono stati presi singolarmente e in base all'anno in cui sono stati pubblicati menzionando solo gli anni con maggiori pubblicazioni e tenendo conto solo di articoli e revisioni. Considerando solo il 2020 l'anno con più documenti pubblicati andiamo a distinguere i vari campi d'interesse che vengono coinvolti nella stesura dei documenti.

Al primo posto per pubblicazioni troviamo il 2020 con 10 risultati, rispettivamente:

- Cutaneous mucosal immune-parameters and intestinal immune-relevant genes expression in streptococcal-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A comparative study with the administration of florfenicol and olive leaf extract. (Shiry, N., Khoshnoodifar, K., Alavinia, S.J. *Fish and Shellfish Immunology*, 107, pp. 403-410) 2020.
- Discovery of sulforaphane as a potent bace1 inhibitor based on kinetics and computational studies. (Youn, K., Yoon, J.-H., Lee, N, Ho, C.-T., Jun, M. *Nutrients* 12(10),3026, pp. 1-8) 2020
- Potential bioactive glycosylated flavonoids as SARS-CoV-2 main protease inhibitors: A molecular docking and simulation studies. (Cherrak, S.A., Merzouk, H., Mokhtari-Soulimane, N. *PLoS ONE* 15(10 October),e0240653) 2020.
- Antiviral properties of flavonoids and delivery strategies. (Ninfali, P., Antonelli, A., Magnani, M., Scarpa, E.S. *Nutrients* 12(9),2534, pp. 1-19)
- Naturally occurring PCSK9 inhibitors. (Adorni, M.P., Zimetti, F., Lupo, M.G., Ruscica, M., Ferri, N. *Nutrients*12(5),1440). 2020
- Changes in Allergenicity of Ovalbumin in Vitro and in Vivo on Conjugation with Quercetin. (Zhang, T., Hu, Z., Cheng, Y., Liu, Z., Wu, X. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68(13), pp. 4027-4035). 2020
- Metabolomics analysis and biological investigation of three Malvaceae plants. (Abdelhafez, O.H., Othman, E.M., Fahim, J.R, Tawfike, A., Abdelmohsen, U.R. *Phytochemical Analysis* 31(2), pp. 204-214) 2020.
- Potential of *Ficus microcarpa* metabolites against SARS-CoV-2 main protease supported by docking studies. (Hassan, H.A., Abdelmohsen, U.R., Aly, O.M, Mohamed, K.M., Kamel, M.S. *Natural Product Research*)

- Phenolic extract of *Eugenia uniflora* L. and furanone reduce biofilm formation by *Serratia liquefaciens* and increase its susceptibility to antimicrobials. (Rodrigues, A.C., Almeida, F.A.D., André, C, Vieira, É.N.R., Andrade, N.J.D. *Biofouling* 36(9), pp. 1031-1048) 2020.

- Flavonoids: A complementary approach to conventional therapy of COVID-19? (Solnier, J., Fladerer, J.-P. *Phytochemistry Reviews*)2020.

Qui una buona parte dei documenti analizzati sono volti a mettere in evidenza le proprietà di inibizione delle proteasi virali di molti flavonoidi ed in particolare della quercitina, e prendono in considerazione come partenza studi passati su questa attività di inibizione, ponendoli a confronto e sperimentando una potenziale compatibilità con le proteasi virali del virus Sars-Cov-2 per limitarne lo sviluppo, attraverso l'elaborazione di un farmaco.

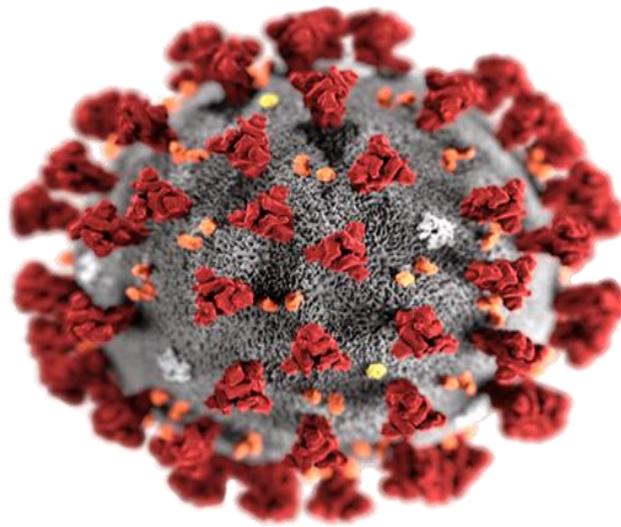


Figura 24: Ricostruzione della capsula virale del Sars-Cov2

I virus hanno infatti bisogno dell'ausilio di proteasi per replicarsi in maniera corretta. Nel particolare questi avendo bisogno di una cellula ospite per riprodursi, necessitano di proteasi adibite alla scissione dell'involucro proteico che li circonda, rivestimento ricco di proteine di membrana e proteine a uncino dette spike, che ha il compito di agganciare le cellule ospite da infettare. Ancora più importante però è il ruolo delle proteasi una volta che il virus è penetrato nella cellula ospite ed ha replicato il suo rna e le componenti proteiche, qui le proteasi avranno il compito di assemblare le componenti del virus, in modo da formare la cellula virale finita, a questo punto questo potrà uscire dalla cellula ed infettarne di nuove. (Brock. *Biologia dei microrganismi. Microbiologia generale, ambientale e industriale*. Ediz. mylab.

3.5 Classificazione e descrizione dei risultati riguardanti l'area tematica 'agricoltura e scienze biologiche' 2017

Al secondo posto per pubblicazioni troviamo il 2017 con 7 risultati dove gli argomenti trattati vengono incentrati sulle proprietà riparatorie e di inibizione di proteasi della quercitina e altri flavonoidi, citando anche da quali alimenti essi vengano estratti come ad esempio il pisello verde (*Pisum sativum*) ed altre verdure. Rispettivamente:

- Welsh onion extract inhibits PCSK9 expression contributing to the maintenance of the LDLR level under lipid depletion conditions of HepG2 cells. (Choi, H.-K., Hwang, J.-T., Nam, T.-G, Park, S.W., Chung, M.-Y. Food and Function 8(12), pp. 4582-4591) 2017.
- Growth, hydrolases and ultrastructure of *Fusarium oxysporum* as affected by phenolic rich extracts from several xerophytic plants. (Mohamed, M.S.M., Saleh, A.M., Abdel-Farid, I.B., El-Naggar, S.A. Pesticide Biochemistry and Physiology 141, pp. 57-64) 2017.
- In vitro anti-inflammatory activities of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) in RAW 264.7 macrophages. (Suleria, H.A.R., Addepalli, R., Masci, P., Gobe, G., Osborne, S.A. Food and Agricultural Immunology 28(4), pp. 711-724) 2017.
- A structural mechanism of flavonoids in inhibiting serine proteases. (Xue, G., Gong, L., Yuan, C, Jiang, L., Huang, M. Food and Function 8(7), pp. 2437-2443) 2017.
- Solution conformations of Zika NS2B-NS3pro and its inhibition by natural products from edible plants. (Roy, A., Lim, L, Srivastava, S., Lu, Y., Song, J. PLoS ONE 12(7), e0180632).
- Activity of compounds from *Taxillus sutchuenensis* as inhibitors of HCV NS3 serine protease. (Yang, L., Lin, J., Zhou, B., Liu, Y., Zhu, B. Natural Product Research 31(4), pp. 487-491) 2017
- Pea, *Pisum sativum*, and its anticancer activity. (Rungruangmaitree, R., Jiraungkoorskul, W. Pharmacognosy Reviews 11(21), pp. 39-42) 2017.



Figura 25: Baccello e semi di pisello verde (*Pisum sativum*).

3.6 Classificazione e descrizione dei risultati riguardanti l'area tematica 'agricoltura e scienze biologiche' 2014

Al terzo posto per pubblicazioni troviamo il 2014 con 4 articoli, in particolare 2 di questi si concentrano sulle attività della quercitina (i primi due citati), dove vengono trattate le attività di inibizione della quercitina sulle elicasi virali NS3 fondamentali per la replicazione del virus dell'HVC, e le attività benefiche della quercitina sugli enzimi digestivi e sul potenziale antiossidante. Rispettivamente:

-Docking studies of Pakistani HCV NS3 helicase: A possible antiviral drug target, Fatima, K., Mathew, S., Suhail, M., (...), Azhar, E., Qadri, I. PLoS ONE 9(9),e106339. 2014

-Effects of dietary quercetin on the growth performance, digestive enzymes and antioxidant potential in the hepatopancreas of tilapia (*Oreochromis niloticus*) Zhai, S.-W., Liu, S.-L. Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh 66. 2014

-Effects of copper overload in P19 neurons: Impairment of glutathione redox homeostasis and crosstalk between caspase and calpain protease systems in ROS-induced apoptosis, Jazvinščak Jembrek, M., Vlainić, J., Radovanović, V., Erhardt, J., Oršolic, N. BioMetals 27(6), pp. 1303-1322. 2014

-Chemical constituents of *tilia taquetii* leaves and their inhibition of MMP-1 expression and elastase activities, Kim, S.Y., Kim, J.E., Bu, H.J., Hyun, C.-G., Lee, N.H. Natural Product Communications 9(12), pp. 1683-1685. 2014

Capitolo 4

Descrizione del meccanismo di inibizione delle proteasi virali da parte dei flavonoidi

La ricerca bibliografica ha evidenziato che l'azione inibitoria della quercetina per le proteasi è di interesse nello sviluppo di nuove classi di flavonoidi.

4.1 Virus HCV

Anche gli enzimi coinvolti nella replicazione del virus HCV (virus epatite c), come la proteasi NS3 e la polimerasi NS5B, possono essere efficacemente inibiti o modulati da sostanze fitochimiche. NS3 è una proteina non strutturale dell'HCV, che agisce come una serina proteasi. Il suo dominio N-terminale può interagire con la proteina virale non strutturale (NS2), mentre il dominio C-terminale agisce sia come elicasi che come nucleoside trifosfatasi.

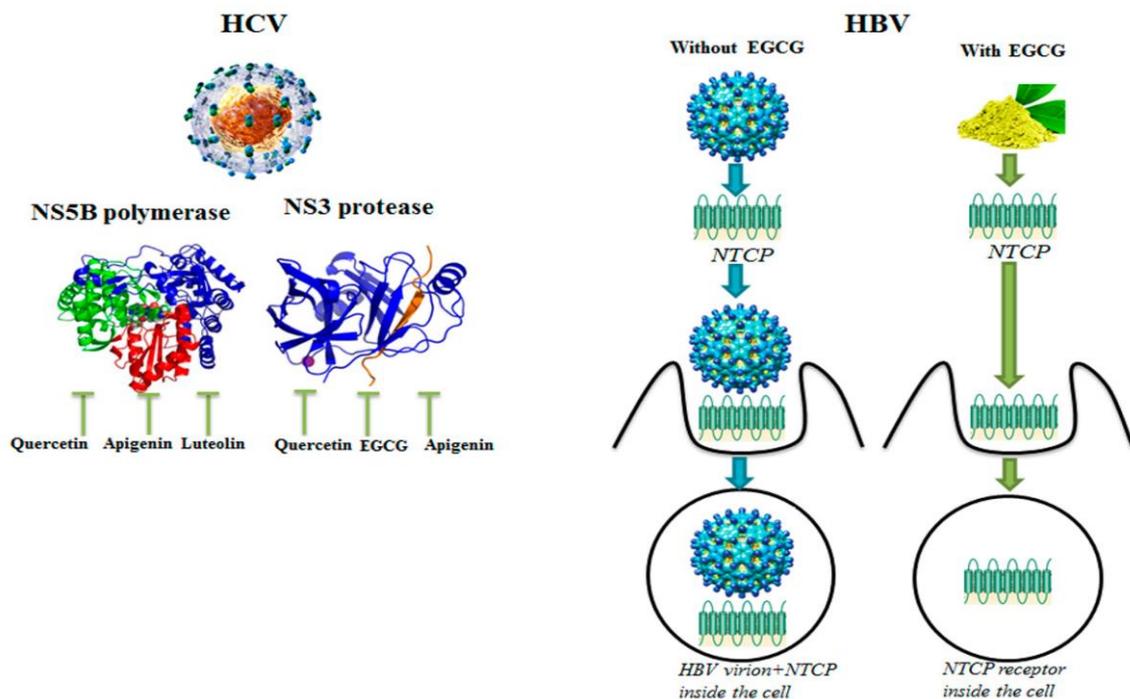


Figura 26 A sinistra, i fitochimici quercetina, apigenina e luteolina possono inibire l'attività catalitica della proteina non strutturale 5B (NS5B) del virus dell'epatite C (HCV), mentre i fitochimici quercetina, epigallocatechina-3-gallato (EGCG) e apigenina sono in grado di inibire l'attività della proteasi NS3 dell'HCV. A destra, EGCG induce l'internalizzazione del polipeptide co-trasportatore di taurocolato di sodio (NTCP) del recettore del virus dell'epatite B (HBV), inibendo l'ingresso del virus HBV negli epatociti umani.

<https://www.mdpi.com/2072-6643/12/9/2534/htm#B49-nutrients-12-02534>

<https://www.mdpi.com/2072-6643/12/9/2534/htm#B50-nutrients-12-02534>

La proteina NS5B ha un ruolo fondamentale nella replicazione dell'RNA virale dell'HCV utilizzando ssRNA virale come modello per catalizzare la polimerizzazione dei trifosfati ribonucleosidici durante la replicazione del genoma virale.

La quercetina, l'apigenina e la luteolina inibiscono efficacemente l'attività della polimerasi NS5B. (Lee et al. 2019)

Questi combinati tra loro e con i farmaci antivirali hanno dato luogo a effetti terapeutici sinergici, dovuti dal fatto che le diverse molecole mirano a diversi passaggi nei meccanismi molecolari dell'infezione virale.

La naringenina è un flavanone, che mostra attività anti-HCV bloccando l'assemblaggio delle particelle di HCV. (Khachatoorian, et al. 2012)

La quercitrina esercita attività anti-HCV riducendo la traduzione mediata dal sito di ingresso del ribosoma interno e inibendo anche la proteina virale non strutturale NS5A e la proteasi NS3. (Khachatoorian, et al. 2012)

La proteasi NS3 risulta molto importante per la replicazione del virus poiché oltre a partecipare all'attività delle proteasi NS3A/NS4B, questa forma un complesso con NS4A (una piccola proteina che funziona come cofattore di serina proteasi). Queste quando coespresse, sono localizzate sul reticolo e insieme sono responsabili del clivaggio delle proteine non strutturali localizzate a valle di NS3, nella direzione del terminale carbossilico della poliproteina. Dove NS4A aiuta a proteggere l'NS3/NS4A dalla degradazione proteolitica e partecipa anche nel bloccare elementi della risposta immune innata dell'epatocita. (Poordad F, et Al. 2011)

Quando naringenina e quercetina sono state usate insieme hanno soppresso la replicazione dell'RNA dell'HCV e inibito la replicazione virale in misura maggiore rispetto ai fitochimici usati individualmente, dimostrando così un effetto sinergico. (Khachatoorian, et al. 2012).

Gli estratti naturali di *Nymphaea alba* L. (Nymphaeaceae), contenente iso-quercetina, iperoside, quercetina, reynoutrin, apigenina e isokaempferide, ha mostrato attività anti-HCV, sopprimendo l'espressione del gene NS3 di HCV nella linea cellulare Huh-7 trasfettata e inibendo la replicazione del genotipo virale 1°A.

Inoltre, la combinazione dell'estratto di *Nymphaea alba* L. con il farmaco convenzionale boceprevir ha mostrato effetti sinergici per l'inibizione della replicazione dell'HCV. (Rehman et al.2018)

Un ruolo antivirale dei fitochimici è stato anche legato ai recettori riconosciuti dai virus per la loro endocitosi, come il recettore di membrana NTCP (polipeptide cotrasportatore di sodio taurocolato). Questa proteina ha una massa di 56 KDa (kilodalton) ed è coinvolta nel trasporto di molecole di sali biliari, ormoni steroidei, ormoni tiroidei e xenobiotici. NTCP è richiesto per l'ingresso negli epatociti sia dell'HBV che del virus dell'epatite D umano (HDV). Infatti, l'interazione virus-recettore porta all'endocitosi dipendente dalla clatrina dei virioni dell'HBV, che può replicarsi all'interno delle cellule ospiti. (Huang et al. 2014)

Alcuni fitochimici come l'EGCG inducono l'endocitosi dell'NTCP dipendente dalla clatrina dalla membrana plasmatica, determinando la sua degradazione e inibendo l'ingresso del virus HBV negli epatociti primari umani immortalati. (Fig 26)

4.2 SARS-CoV-2

COVID-19, la nuova malattia altamente contagiosa causata da SARS-CoV-2, è diventata una delle principali preoccupazioni internazionali poiché si è diffusa rapidamente in tutto il mondo.

Le conoscenze scientifiche e le opzioni di trattamento terapeutico per questo nuovo coronavirus sono limitate, ad oggi non sono disponibili terapie antivirali che prendono di mira specificamente questi tipi di virus. I composti naturali con una grande diversità di strutture chimiche possono fornire un approccio alternativo per la scoperta di nuovi farmaci antivirali.

E' stato scoperto che numerosi flavonoidi hanno effetti antivirali contro SARS e MERS-CoV inibendo principalmente gli enzimi 3-chimotripsina-like proteasi (3CLpro) e la papaina-like proteasi (PLpro). Composti come la quercetina, l'erbacetina e l'isobavacalcone sono tra i flavonoidi più promettenti con potenziale anti-CoV.

Negli ultimi 50 anni, si è registrato un notevole aumento dell'emergenza di diversi nuovi coronavirus responsabili di un'ampia gamma di malattie umane e veterinarie. (ferh et al, 2015)

I coronavirus (CoV) sono virus a RNA a filamento singolo (+ ssRNA) altamente diversi, a senso positivo, (Ferh et al, 2015) che costituiscono il più grande gruppo di virus all'interno dell'ordine dei Nidovirales, contenenti i più grandi genomi per i virus a RNA. (Ferh et al 2015)

I nucleocapsidi dei CoV, che racchiudono l'RNA genomico, sono simmetrici elicoidali. Questo è insolito per i virus a RNA a senso positivo ma molto più comune per i virus a RNA a senso negativo. (Ferh et al. 2015)

4.3 Studio e analisi dei punti chiave per l'inibizione dei coronavirus

Finora è stato osservato che il nuovo coronavirus SARS-CoV-2 si comporta in modo molto simile alla SARS utilizzando lo stesso meccanismo di ingresso nelle cellule umane (Rabi et al, 2020) e condividendo un'identità di sequenza del genoma del 79,5% con SARS-CoV. (Yang et al. 2020; Zhou et al.2020)

L'interazione tra la proteina S- e il recettore è il determinante primario per coronavirus di infettare una specie ospite. (Lim et al. 2016) I dati genetici hanno dimostrato che SARS-CoV-2 possiede frame di lettura aperti sovrapposti (ORF1a e ORF1b) simili a quelli di SARS- e MERS-CoV, tradotti negli enzimi virali 3CLpro e PLpro. SARS e SARS-CoV-2 condividono un 3CLpro con una sequenza simile del 96%, e un PLpro simile di sequenza del 83%. (McKee et al. 2020)

I due frame di lettura aperti sovrapposti (ORF1a e ORF1b) della SARS, tradotti negli enzimi virali 3C-like proteasi (3CLpro) e papaina-like proteasi (PLpro) sono vitali per la moltiplicazione del virus e compongono circa due terzi del genoma virale. L'altro un terzo del genoma codifica per proteine strutturali del virus, come il picco, l'envelope, la membrana e le proteine del nucleocapside. (Adedeji et al. 2012).

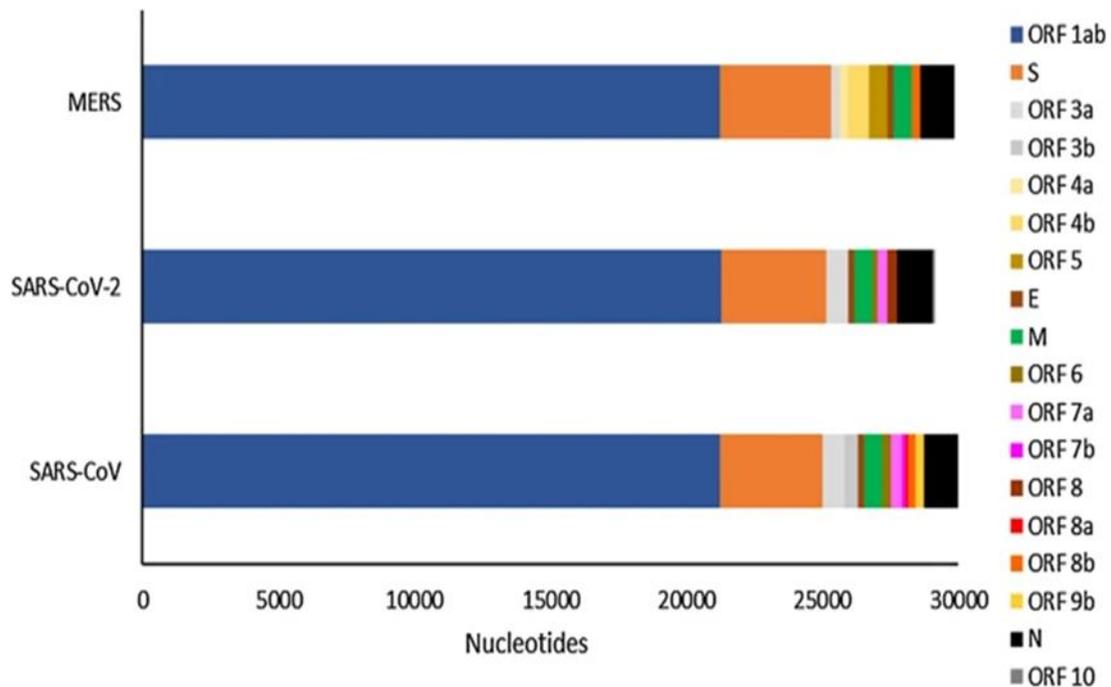


Figura 27 Confronto delle strutture genomiche di MERS, SARS-Cov e SARS-CoV-2

Pertanto 3CLpro e PLpro rappresentano due obiettivi chiave per lo sviluppo di terapie anti-SARS-CoV-2 poiché entrambi sono cruciali per la replicazione virale; e condividono una significativa omologia con le proteasi di molti altri coronavirus correlati. (Goetz et al. 2007) Soprattutto SARS-CoV e SARS-CoV-2 mostrano un'elevata somiglianza. ORF = open-reading-frame; proteine spike (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapside (N).

Ad oggi vengono proposti alcuni farmaci come: cloroquina, lopinavir / ritonavir, remdesivir, umifenovir, per la terapia nei confronti del Covid-19, sebbene la loro efficacia clinica non sia stata ancora confermata del tutto. (Lai et al. 2020; McKee et al. 2020)

4.4 Potenziale dei flavonoidi contro i coronavirus

I composti naturali con una grande diversità di strutture chimiche possono fornire un approccio alternativo per la scoperta di nuovi farmaci antivirali.

Pertanto prodotti naturali come i flavonoidi possono avere un ruolo fondamentale nei trattamenti di supporto e profilassi e presentare un approccio alternativo per la gestione del CoV. (Panche et al. 2016)

E' stato scoperto che numerosi flavonoidi hanno effetti antivirali contro SARS e MERS-CoV inibendo principalmente gli enzimi 3-chimotripsina-like proteasi (3CLpro) e la papaina-like proteasi (PLpro). Composti come la quercetina, l'erbacetina e l'isobavacalcone sono tra i flavonoidi più promettenti con potenziale anti-CoV.

Ancora più importante, vari flavonoidi sono stati trovati per inibire diversi target di coronavirus SARS e MERS, (Yang et al. 2020) come il blocco delle attività enzimatiche di proteasi virali come 3-chimotripsina-like proteasi (3CLpro), papaina-like proteasi (PLpro) ed elicasi, o interferenti con le proteine spike (S).

I vari studi si sono quindi concentrati principalmente sull'interferenza dei flavonoidi con alcune proteasi virali come 3CL e PL di SARS e MERS-CoV utilizzando metodi enzimatici, fluorogenici comuni e studi di docking molecolare. (McKee et al.2020)

Le analisi di 17 studi basati sui flavonoidi come agenti anti-CoV hanno rivelato 47 composti come possibili agenti contro SARS-CoV-2. Tra questi, 16 composti sono stati esaminati in almeno due studi indipendenti. Quattro di questi composti, quercetina, erbacetina, isobavacalcone e kaempferol, mostrano attività contro almeno due bersagli virali. (Park et al.2016; Jo et al 2019; Chen et al. 2006).

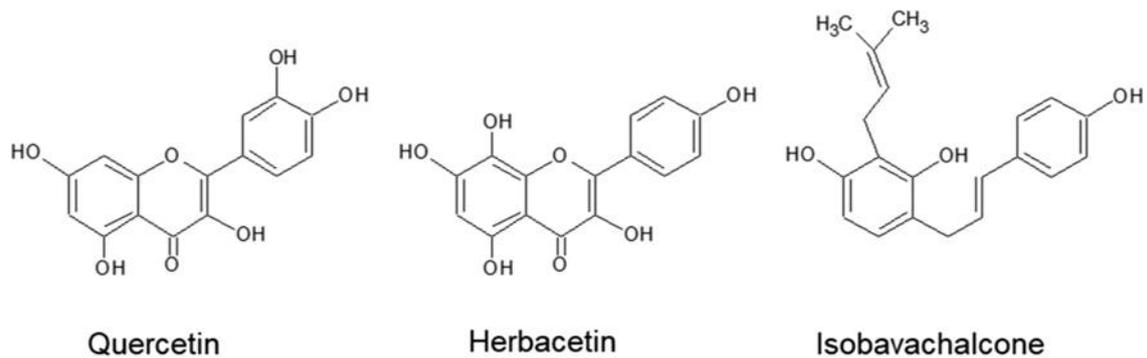


Figura 28 Strutture chimiche di Quercitina, Herbacetina e Isobavacalcone, tre dei flavonoidi più promettenti per l'inibizione di Sars-cov2.

Secondo i valori elevati di IC 50 di kaempferol non consideriamo questo composto un candidato promettente per il trattamento di SARS-CoV-2. (IC50 è la concentrazione inibitoria del composto richiesta per causare il 50% di inibizione del virus)

Pertanto, i flavonoli, l'erbacetina e la quercetina, insieme all'isobavacalcone, sono stati identificati come le proposte antivirali più promettenti contro SARS-CoV-2. (Park et al.2016; Jo et al 2019; Chen et al. 2006)

A causa della loro IC 50 positiva e all'attività ad ampio spettro contro le proteasi di SARS e MERS-CoV, nonché alla loro disponibilità da diverse fonti vegetali.

4.5 Meccanismi di inibizione quercetina

Più in particolare la quercetina può essere considerata un candidato molto potente per il trattamento della SARS-CoV-2, poiché ha affinità con una varietà di bersagli farmacologici anti-CoV. Il flavonolo interferisce con la replicazione virale di SARS-CoV, bloccando le attività enzimatiche di 3CLpro, PLpro e elicasi (IC 50 = 8.1 micron) (Lee et al. 2009), ma anche riduce anche l'attività di scissione di SARS PLpro di ubiquitina e interferone (Park et al. 2017), che può essere importante sia per la replicazione virale e la risposta immunitaria al virus (Cho et al. 2013). Inoltre, la quercetina ha interagito con SARS-CoV a livello di ingresso della cellula ospite legandosi alla glicoproteina S (EC 50 = 83,4 μ M) che si aggancia al recettore dell'ospite ACE2 (Zhou et al. 2020). La quercetina ha anche dimostrato attività proteolitica contro MERS-CoV 3CLpro.

Andando a prendere in considerazione specificatamente l'azione della quercetina confrontandola con i suoi β -glicosidi, le frazioni zuccherine come quella della quercetina-3- β -galattoside e la quercetina 3- β -d-glucoside non hanno potenziato l'attività inibitoria contro le proteasi SARS e MERS-CoV.

Negli studi di docking molecolare, la quercetina-3- β -galattoside ha creato interazioni idrofobiche con i residui Asn142, Glu166, Leu141 e Met165 di SARS 3CLpro. In particolare, il residuo Q189 ha rappresentato un fattore principale nel legame tra quercetina-3- β -galattoside e SARS 3CLpro (Chen et al. 2006).

Le analisi delle relazioni struttura-attività dei derivati della quercetina 3- β -galattoside hanno suggerito che i gruppi idrossilici sulla parte quercetina sono cruciali per l'attività inibitoria, che consente l'interazione composto-bersaglio attraverso il legame idrogeno (Chen et al. 2006).

La quercetina e la quercetina 3- β -glucoside hanno esercitato l'inibizione quando testate contro MERS 3CLpro con i rispettivi valori IC 50 di 34,8 e 37,03 μ M (Jo et al.2019). In un successivo studio sull'attracco, Jo et al. ha dimostrato che una sostituzione ramnosio invece di glucosio (in quercetina 3- β -glucoside), determina un forte legame con MERS-CoV 3CLpro (Jo et al. 2019).

Cap 4.6 Quercetina come inibitore di altre proteine virali

Considerando invece l'inibizione della RNA polimerasi RNA-dipendente e dell'elicasi uno studio che ha valutato 24 derivati della 7-O-aril-metilquercetina per la loro attività antivirale contro SARS-CoV, tre derivati con sostituenti aromatici 3'-Cl, 3'-CN e 4'-Cl hanno mostrato un'inibizione selettiva della SARS -Attività CoV NTPasi / elicasi mediante l'esecuzione di un saggio di svolgimento del dsDNA basato su FRET (Park et al. 2012). L'introduzione di un sostituito arilmetile, come 3-CIPhCH₂, 3-CNPhCH₂ e 4-CIPhCH₂, nella posizione 7-OH della quercetina, ha portato a una maggiore inibizione contro SARS-CoV elicasi (valori IC₅₀ di 5,2, 2,7, 4,1 micron, rispettivamente) rispetto a quella di quercetina (IC₅₀ = 8,1 micron) (Park et al. 2012).

Per quanto riguarda la proteina spike (S) dei CoVs questa è responsabile dell'ingresso virale nelle cellule bersaglio, attraverso il legame al recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) sulle membrane delle cellule ospiti (Zhou et al.2020), e presenta quindi un altro importante bersaglio nell'anti -SARS-CoV-2 sviluppo di farmaci.

E' stato riscontrato che la quercetina blocca l'ingresso nella cellula ospite (EC₅₀ = 83,4 μM) quando testata nel test del virus pseudotipato HIV-luciferasi / SARS (Yi et al. 2004). È risaputo che l'uso di virus pseudotipizzati sia un metodo potente, rapido e altamente sensibile per studiare il processo di ingresso dei virus nelle cellule ospiti (Yi et al. 2004).

Poiché SARS-CoV e SARS-CoV-2 condividono un'elevata somiglianza di sequenza delle proteine S, ci si può anche aspettare che questi composti impediscano l'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule ospiti. Inoltre, è dimostrato che la proteina S di SARS-CoV-2 si lega con affinità 10-20 volte maggiore per ACE2 rispetto a quella di SARS-CoV (McKee et al.2020). Pertanto, l'inibizione di ACE2 tramite una sostanza concorrente sembra essere un approccio ragionevole per prevenire le infezioni da SARS-CoV-2. La quercetina ha avuto potenti effetti inibitori sulla ACE in vitro, e in vivo, quando testato in modelli di ratto (Actis Goretta-et al. 2006; Al Shukor et al. 2013; Guerrero et al. 2012; Nileeka Balasuriya e Vasantha Rupasinghe 2011). Tuttavia, gli ACE inibitori, che sono terapie standard per il trattamento dell'ipertensione (Actis-Goretta et al. 2006) e possono avere un ruolo vitale nelle infezioni virali e nella polmonite (Henry et al. 2018), non sono ancora stati dimostrati per inibire ACE2.

In generale, la quercetina provoca un'ampia gamma di attività contro le proteasi di SARS e MERS-CoV. Sulla base di ciò e del numero di fonti citate, come i valori di IC 50 riportati in diversi studi, la quercetina è tra gli agenti più promettenti per il trattamento della SARS-CoV-2. Oltre a rappresentare uno dei flavonoidi più abbondanti nella dieta che si trova naturalmente in una grande varietà di prodotti vegetali (erbe officinali, prodotti alimentari, bevande) (Anand David et al. 2016; Pandey e Rizvi 2009).

Cap 4.7 Altri meccanismi antivirali della quercetina nel virus dell'influenza

Prendendo come target il virus dell'influenza i principali meccanismi coinvolti negli effetti antivirali sono focalizzati sul targeting delle attività degli enzimi virali. Ogni flavonoide agisce su più fronti del processo infettivo virale, con un effetto pleiotropico. Composti come la quercetina, apigenina e naringenina agiscono sulla replicazione virale e sull'assemblaggio del virione una volta che è penetrato nella cellula ospite.

Ogni virus ha le proprie peculiarità, e nei casi specifici ci sono flavonoidi che sono più attivi di altri, l'azione inibitoria viene quindi svolta da 'cocktail' di flavonoidi, ovvero miscele calibrate che sfruttino l'azione sinergica delle singole molecole. (Kapoor, R et al. 2017)

Vari flavonoidi inibiscono l'attività delle sialidasi virali o neuraminidasi del virus dell'influenza, ostacolando il rilascio di nuovi virioni dalle cellule infette e prevenendo nuove infezioni. (Glanz, et al. 2018)

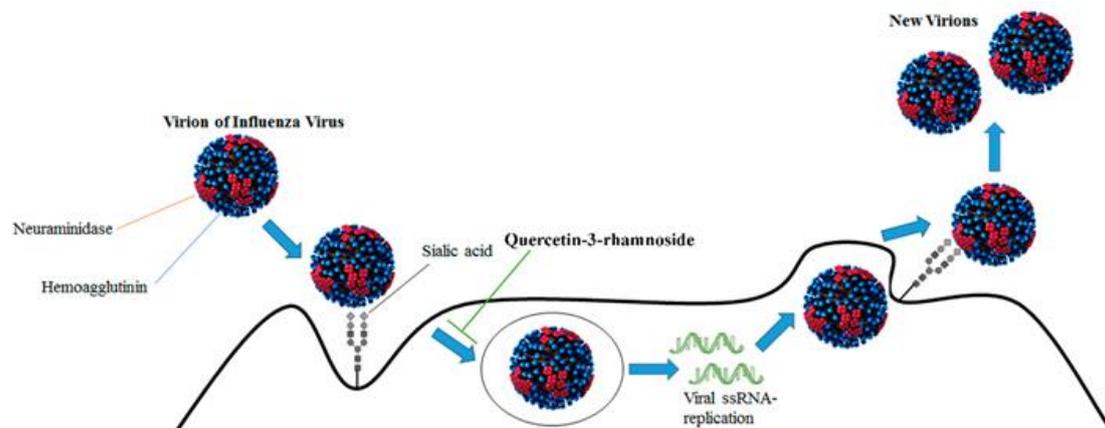


Figura 29 Ciclo di vita virale dei virus influenzali, e quercetina-3-ramnoside fitochimica utilizzata come inibitore del virus.

(<https://www.mdpi.com/2072-6643/12/9/2534/htm#B46-nutrients-12-02534>)

Capitolo 5: Conclusioni

Questa ricerca bibliografica ha evidenziato le aree tematiche comuni alle parole chiave “quercetin” e “protease. Negli ultimi anni è evidente il crescente interesse per la quercetina e i flavonoidi in generale, per un potenziale ruolo farmacologico, a causa delle loro molteplici proprietà risanatorie, precedentemente elencate, tenendo conto soprattutto dell’attività di inibizione delle proteasi e delle proteasi virali in particolare, questo giustifica la selezione temporale 2000-2020.

La quercetina e i flavonoidi in generale si trovano principalmente nelle verdure della nostra dieta. Lo studio continuo riguardo la biodisponibilità dei flavonoidi, sta portando alla creazione di nuove strategie per migliorarne la stabilità, la solubilità e la distribuzione. A causa della bassa biodisponibilità, del metabolismo veloce e dell’eliminazione dei flavonoidi, è probabile che le funzioni biologiche di questi polifenoli alimentari in vivo siano compromesse. (D’Archivio M et al. 2010)

Ogni tipologia di composto presenta diverse proprietà ed affinità, la combinazione quindi di diversi flavonoidi può essere la risposta a diverse tipologie di problematiche. Lo studio e la ricerca stanno perfezionando negli anni l’utilizzo di questi composti, prendendo in considerazione soprattutto gli effetti sinergici che questi composti hanno insieme ai farmaci, se utilizzati in combinazione tra di loro.

La quercetina, l’erbacetina e l’isobavacalcone rappresentano composti efficaci contro la SARS e / o MERS-CoV in vitro, questo non indica direttamente la loro efficienza in vivo o l’uso clinico come terapie anti-SARS-CoV-2. (Lee et al. 2009). Tutti i lavori esaminati suggeriscono ulteriori studi sperimentali in vivo per valutare la loro possibile efficacia preclinica e clinica per la prevenzione delle infezioni da SARS-CoV-2 e il trattamento di COVID-19.

Sebbene l’assunzione giornaliera di cibo vegetale possa sembrare una fonte facilmente accessibile di flavonoidi attivi, non ci sono prove scientifiche che un elevato consumo di alimenti e / o integratori ricchi di flavonoidi, come quello della quercetina, fornisca una protezione significativa contro le malattie virali negli esseri umani, ad esempio, contro SARS-CoV-2.

L’informazione nei confronti dei consumatori riguardo ai possibili benefici di questi alimenti è fondamentale per la salute degli stessi.

Bibliografia

--Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Fraga CG (2006) Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods.

--Adedeji AO, Marchand B, Te Velthuis AJW, Snijder EJ, Weiss S, Eoff RL, Singh K, Sarafianos SG (2012) Mechanism of nucleic acid unwinding by SARS-CoV helicase.

--Al Shukor N, van Camp J, Gonzales GB, Staljanssens D, Struijs K, Zotti MJ, Raes K, Smagghe G (2013) Angiotensin-converting enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: a study of structure activity relationships.

--Anand David AV, Arulmoli R, Parasuraman S (2016) Overviews of biological importance of quercetin: a bioactive flavonoid antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.*, New York, v. 16, p. 845-850, 1994.

--Bauer, C.-A. Active centers of α -chymotrypsin and of *Streptomyces griseus* proteases 1 and 3 *Eur. J. Biochem.* 105 (1980) 565–570.

--Blow, D.M. Structure and mechanism of chymotrypsin. *Acc. Chem. Res.* 9 (1976) 145–152.

--Brock. *Biologia dei microrganismi. Microbiologia generale, ambientale e industriale.* Ediz. mylab.

--Chen L, Li J, Luo C, Liu H, Xu W, Chen G, Liew OW, Zhu W, Puah CM, Shen X, Jiang H (2006) Binding interaction of quercetin-3-beta-galactoside and its synthetic derivatives with SARS-CoV 3CL (pro): structure-activity relationship studies reveal salient pharmacophore features.

--Cho JK, Curtis-Long MJ, Lee KH, Kim DW, Ryu HW, Yuk HJ, Park KH (2013) Geranylated flavonoids displaying SARS-CoV papain-like protease inhibition from the fruits of *Paulownia tomentosa*.

--D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences.* 2010; 11(4):1321-1342

--David L. Nelson, Michael M. Cox: *Introduzione alla biochimica di Lehninger;* (2015), Zanichelli editore S.p.a, Bologna.

--Deschner, E.E. et al. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, London, v. 7, p. 1193-1196, 1991.

- Fehr AR, Perlman S (2015) Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *M.D., Ph.D 1282*: 1–23.
- Glanz, V.Y.; Myasoedova, V.A.; Grechko, A.V.; Orekhov, A.N. Inhibition of sialidase activity as a therapeutic approach. *Drug Des. Dev. Ther.* 2018
- Goetz DH, Choe Y, Hansell E, Chen YT, McDowell M, Jonsson CB, Roush WR, McKerrow J, Craik CS (2007) Substrate specificity profiling and identification of a new class of inhibitor for the major protease of the SARS coronavirus. *Biochemistry* 2007, 46, 30, 8744–8752.
- Guerrero L, Castillo J, Quiñones M, Garcia-Vallvé S, Arola L, Pujadas G, Muguera B (2012) Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies.
- Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S. The correlation between active oxygen scavenging and
- Henry C, Zaizafoun M, Stock E, Ghamande S, Arroliga AC, White HD (2018) Impact of angiotensin-converting enzyme inhibitors and statins on viral pneumonia.
- Huang, H.C.; Tao, M.H.; Hung, T.M.; Chen, J.C.; Lin, Z.J.; Huang, C. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits entry of hepatitis B virus into hepatocytes. *Antivir. Res.* 2014 *BMC Complement Altern Med.* ; 18: 248.
- Kandaswami, C.; Middleton, E.JR. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.*, New York, v. 366, p. 351-376, 1994.
- Khachatoorian, R.; Arumugaswani, V.; Raychaudhuri, S.; Yeh, G.K.; Maloney, E.M.; Wang, J.; Dasgupta, A.; French, S.W. Divergent antiviral effects of bioflavonoids on the hepatitis C virus life cycle. *Virology* 2012,
- Lai C-C, Liu YH, Wang C-Y, Wang Y-H, Hsueh S-C, Yen M-Y, Ko W-C, Hsueh P-R (2020) Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)
- Lee, L.J.; Loe, M.W.; Lee, R.C.; Chu, J.J. Antiviral activity of pinocembrin against Zika virus replication. *Antivir. Res.* 2019
- Lim YX, Ng YL, TDiseases. 2016 Sep; 4(3): 26.am JP, Liu DX (2016) Human coronaviruses: a review of virus-host interactions.
- McKee DL, Sternberg A, Stange U, Laufer S, Naujokat C (2020) Candidate drugs against SARS-CoV-2 and COVID-19, *Pharmacol Res.* 2020 Jul; 157: 104859.

- Nijveldt, R.J et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 74, p. 418-425, 2001.
- Nileeka Balasuriya BW, Vasantha Rupasinghe HP (2011) Plant flavonoids as angiotensin converting enzyme inhibitors in regulation of hypertension.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016) Flavonoids: an overview
- Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease.
- Polgár, L. Structure and function of serine proteases. In: Neuberger, A. and Brocklehurst, K. (Eds), *New Comprehensive Biochemistry: Hydrolytic Enzymes*, vol. 16, Elsevier, Amsterdam, 1987, pp. 159–200.
- Poordad F, et Al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*, 2011; 364(13): 1195–1206.
- Rabi FA, Al Zoubi MS, Kasasbeh GA, Salameh DM, Al-Nasser AD (2020) SARS-CoV-2 and coronavirus disease 2019: what we know so far, *Pathogens* 2020, 9(3), 231.
- Rehman, S.; Ashfaq, U.A.; Ijaz, B.; Riazuddin, S. Anti-hepatitis C virus activity and synergistic effect of *Nymphaea alba* extracts and bioactive constituents in liver infected cells. *Microb. Pathog.* 2018
- Wilcox, P.E. Chymotrypsinogens - chymotrypsins. *Methods Enzymol.* 19 (1970) 64–108.
- Yang Y, Islam MS, Wang J, Li Y, Chen X (2020) Traditional chinese medicine in the treatment of patients infected with 2019-new coronavirus (SARS-CoV-2): a review and perspective. *Int J Biol Sci.* 2020; 16(10): 1708–1717.
- Yi L, Li Z, Yuan K, Qu X, Chen J, Wang G, Zhang H, Luo H, Zhu L, Jiang P, Chen L, Shen Y, Luo M, Zuo G, Hu J, Duan D, Nie Y, Shi X, Wang W, Han Y, Li T, Liu Y, Ding M, Deng H, Xu X (2004) Small molecules blocking the entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into host cells.
- Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si H-R, Zhu Y, Li B, Huang C-L, Chen H-D, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang R-D, Liu M-Q, Chen Y, Shen X-R, Wang X, Zheng X-S, Zhao K, Chen Q-J, Deng F, Liu L-L, Yan B, Zhan F-X, Wang Y-Y, Xiao G-F, Shi Z-L (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(7798): 270–273.

