

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Brunno Augusto Salvatti

**ESTUDOS TEÓRICO E EXPERIMENTAL DA REATIVIDADE DE
COMPOSTOS CARBONÍLICOS FRENTE A REAÇÃO DE
PICTET-SPENGLER CATALISADA PELA ENZIMA *Tf*NCS**

Belo Horizonte

2020

UFMG/ICEx/DQ. 1422^a

D. 770^a

Brunno Augusto Salvatti

**ESTUDOS TEÓRICO E EXPERIMENTAL DA REATIVIDADE DE
COMPOSTOS CARBONÍLICOS FRENTE A REAÇÃO DE
PICTET-SPENGLER CATALISADA PELA ENZIMA *Tf*NCS**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química – Química Orgânica

Orientador: Prof^o Adolfo Henrique de Moraes Silva

Coorientador: Profa^o Amanda Silva de Miranda

Belo Horizonte

2020

Ficha Catalográfica

S182e Salvatti, Bruno Augusto
2020 Estudos teórico e experimental da reatividade de
D compostos carbonílicos frente a reação de Pictet-
Spengler catalisada pela enzima TfNCS [manuscrito] /
Bruno Augusto Salvatti. 2020.
122 f. : il.

Orientador: Adolfo Henrique de Moraes Silva.
Coorientadora: Amanda Silva de Miranda.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses. 2. Aldeídos - Teses. 3.
Alcaloides - Teses. 4. Compostos carbonílicos - Teses.
5. Moléculas - Modelos - Teses. I. Silva, Adolfo
Henrique de Moraes, Orientador. II. Miranda, Amanda
Silva de, Coorientadora. III. Título.

CDU 043

Elaborada por Sérgio Ferreira da Silva - CRB6-2719.



"Estudos Teórico e Experimental da Reatividade de Compostos Carbonílicos Frente A Reação de Pictet-Spengler Catalisada Pela Enzima TfNCS"

Brunno Augusto Salvatti

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Adolfo Henrique de Moraes Silva - Orientador
UFMG

Profa. Denize Cristina Favaro
UNICAMP

Prof. Ângelo de Fátima
UFMG

Belo Horizonte, 26 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Angelo de Fatima, Professor do Magistério Superior**, em 26/11/2020, às 13:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adolfo Henrique de Moraes Silva, Professor do Magistério Superior**, em 26/11/2020, às 13:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Denize Cristina Favaro, Usuário Externo**, em 11/12/2020, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0434595** e o código CRC **7AB90D33**.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois se não fosse por Ele, não haveria nada para se investigar nesse trabalho, muito menos eu teria as condições de conduzi-lo. Também gostaria de agradecer a todos os instrumentos e todas as providências que Deus colocou ao longo do meu caminho:

A minha família, que sempre esteve comigo desde o ventre, me criando, proporcionando um lar seguro, nunca faltando nada, e sempre me animando nos momentos em que eu estava desanimado.

As agências de fomento: CAPES e CNPq, pois, se não fosse por elas, eu não teria motivação para a realização desse trabalho, nem teria como usar toda a infraestrutura laboratorial, fornecida diretamente ou indiretamente por elas.

Aos meus orientadores: Adolfo Henrique de Moraes Silva e Amanda Silva de Miranda, por me instruírem com muita paciência, de revisão em revisão, sempre propondo novas alternativas para os obstáculos que surgiam ao longo do caminho, me fazendo tomar gosto pela ciência e o questionamento sistemático, as marcas de todo grande cientista.

Aos colaboradores: Ivana Silva Lula, por todo o zelo, auxílio, e as ideias, com relação aos experimentos de RMN, Vinícius Gonçalves Maltarollo, pela instrução e supervisão na construção do modelo de QSAR, Marcelo Andrade Chagas, pela execução, e instrução em relação a da dinâmica molecular, e ao professor William Ricardo Rocha, por ter disponibilizado a infraestrutura do laboratório de modelagem.

E a todos os meus colegas do grupo MacroMol, que foram testemunhas do desenvolvimento desse trabalho, agradeço especialmente a Verônica Silva Valadares, Philipe de Oliveira Fernandes e Yan Ferraz Ximenes Ladeira, por todas as sugestões, instruções e todo o companheirismo de laboratório.

“Grande é o nosso Soberano e tremendo é o seu poder; é impossível medir o seu entendimento.”

Salmos 147, 5

RESUMO

A enzima (S)-NCS, proveniente do organismo *Thalictrum flavum* (TfNCS), tem sido muito estudada nos últimos anos, revelando um grande potencial para diferentes aplicações, tais como: produção de intermediários presentes em rotas biossintéticas e produção de novas tetrahydroisoquinolinas. A atuação dessa enzima está associada a uma catálise enantiosseletiva de uma reação de Pictet-Spengler, entre a dopamina e um composto carbonílico. Buscando explorar melhor o potencial das enzimas do tipo (S)-NCS, visto que a área de biocatálise é uma área muito promissora, a proposta do trabalho foi: a partir dos dados presentes na literatura, da modelagem molecular e das técnicas computacionais, realizar investigações para entender quais os parâmetros poderiam estar associados à reatividade do composto carbonílico na reação biocatalisada.

Para esse estudo, a enzima TfNCS foi expressa e a partir dela, estabeleceu-se um protocolo para determinação da reatividade de compostos carbonílicos via espectroscopia de ¹H de ressonância magnética nuclear (RMN). Então, a partir de uma busca na literatura de compostos que já haviam sido testados para em reações de Pictet-Spengler catalisada por TfNCS, foram encontrados 49 compostos carbonílicos com atividade conhecida. Essa biblioteca foi somada às atividades experimentais encontradas no trabalho, e foram modeladas. Essa biblioteca foi usada na construção de um modelo de QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) para encontrar parâmetros que poderiam estar associados à reatividade do composto carbonílico.

A partir da biblioteca de 53 compostos, algumas estruturas representativas foram selecionadas e separadas em 6 grupos. Esses grupos de estudo foram usados em *docking molecular*, dinâmica molecular e cálculo de funções de Fukui. A partir do *docking molecular*, investigou-se se os compostos carbonílicos conseguiam adentrar no sítio catalítico; a partir da dinâmica molecular, investigou-se o comportamento desses compostos no sítio catalítico da enzima; e pelo cálculo das funções de Fukui, investigou-se a estrutura eletrônica dos compostos.

Os resultados mostram que efeitos de conjugação, tamanho e a influência de diferentes substituintes, poderiam estar associados a atividade experimental de um composto carbonílico, explicando diferenças entre compostos reativos e não reativos. O protocolo de classificação proposto nesse trabalho poderia ajudar a prever compostos carbonílicos reativos para uma catálise de Pictet-Spengler usando a *Tf*NCS, e com algumas adaptações, poderia ser usado para estudar outras enzimas promíscuas.

Palavras-Chave: aldeídos; alcaloides; modelagem molecular; QSAR; RMN

ABSTRACT

The enzyme (S)-NCS, from the organism *Thalictrum Flavum* (*TfNCS*), has been studied in the last years, revealing the great potential for different applications, such as the production of intermediaries in biosynthetic paths and the production of tetrahydroisoquinoline. This enzyme is involved in the enantioselective catalysis of a reaction of Pictet-Spengler, between dopamine and carbonyl compounds. Searching to explore the potential of the enzymes of (S)-NCS, the work purpose was: by literature research, molecular modeling and computational chemistry techniques, make investigations to understand which parameters could be associated with reactivity of the carbonyl compound in the biocatalysis.

For this study, the enzyme *TfNCS* was expressed, and a protocol to determine the reactivity of the carbonyl compounds by nuclear magnetic resonance (NMR) was implemented. By a literature research of compounds tested on Pictet-Spengler reactions catalyzed by *TfNCS*, were founded 49 carbonyl compounds with activity known. This library was added to the experimental activities determined in this work and were modeled. This library was used in the construction of a QSAR model (Quantitative Structure-Activity Relationship) to find molecular parameters that could be associated with a carbonyl group activity.

From the library composed of 53 compounds, some representative compounds were selected and separated into six study groups. These study groups were used in molecular docking, molecular dynamics, and calculation of Fukui functions. From the molecular dockings, the carbonyl approximation to the catalytic site was evaluated; from molecular dynamics, the carbonyl's behavior on the enzyme's catalytic site was studied; and by calculating Fukui functions, the electronic nature of the carbonyl was studied.

The results showed that the effects of conjugation, size, and different substituents could be associated with the experimental activity of a carbonyl compounds, explaining the difference between reactive and non reactive compounds. The classification protocol proposed in this work could help predict

active compounds for *Tf*NCS catalysis of Pictet-Spengler reactions, and with some adaptations, could be used to study other promiscuous enzymes.

Keywords: aldehydes; alkaloids; molecular modeling; QSAR; NMR

Lista de Figuras

Figura 1 – Biossíntese da (S)–norcoclaurina.....	20
Figura 2 – Produção de (S)–tetrahydroisoquinolinas.....	20
Figura 3 – Produção de 1,1–tetrahydroisoquinolinas dissubstituídas	21
Figura 4 – Estruturas cristalográficas da enzima T _f NCS provenientes do código de acesso 5N8Q.....	22
Figura 5 – Sítio catalítico da enzima T _f NCS co-cristalizada com um composto análogo a um estado de transição, proveniente do código de acesso 5NON	23
Figura 6 – Proposta de Mecanismo via cálculo quântico.....	25
Figura 7 – Algumas classes de alcaloides e algumas subclasses de isoquinolinas.	27
Figura 8 – Rota biossintética para a produção de (S)–reticulina e de alcaloides benzilisoquinolínicos.	28
Figura 9 – Organograma simplificado de expressão enzimática.....	32
Figura 10 – Fluxograma de construção de um modelo QSAR.	39
Figura 11 – Construção, seleção e interpretação de modelo de Árvore de Decisão QSAR.	40
Figura 12 – Distância entre o cátion dopaminium e os compostos carbonílicos utilizada para avaliar os resultados das simulações de <i>docking</i> molecular.....	44
Figura 13 – Princípio da Dinâmica Molecular.	45
Figura 14 – Cromatograma de purificação da T _f NCS recombinante via cromatografia de afinidade a Ni ²⁺ , por coluna HisTrap HP.....	52
Figura 15 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%SDS das bandas cromatográficas observadas na primeira etapa de purificação via cromatografia de afinidade.....	53
Figura 16 – Cromatograma de purificação da T _f NCS recombinante via cromatografia por exclusão molecular.....	54
Figura 17 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%SDS das bandas cromatográficas observadas na segunda etapa de purificação via exclusão molecular.....	55
Figura 18 – Espectro de RMN de ¹ H de 50 mM de tampão HEPES.....	57
Figura 19 – Espectro de RMN de ¹ H de 5 mM de ácido ascórbico	58
Figura 20 – Espectro de RMN de ¹ H de 2,5 mM de dopamina	59
Figura 21 – Espectro de ¹ H de RMN de uma solução de hexanal	60
Figura 22 – Monitoramento da reação de Pictet–Spengler sem enzima (experimento controle)	62
Figura 23 – Monitoramento da reação de Pictet–Spengler catalisada pela enzima T _f NCS.....	63
Figura 24 – Estrutura molecular dos aldeídos avaliados e os resultados dos ensaios de atividade da T _f NCS.....	64
Figura 25 – Estruturas químicas de compostos identificados como não reativos em ensaios de atividade da enzima T _f NCS.....	65
Figura 26 – Estruturas químicas de compostos identificados como reativos em ensaios de atividade da enzima T _f NCS.....	67
Figura 27 – Organização dos grupos estruturais representativos.....	68
Figura 28 – Separação das 53 estruturas em 3 grupos (clusters) a partir da análise das propriedades físico-químicas.....	69
Figura 29 – Separação das 53 estruturas em 3 grupos (clusters) a partir da análise do fingerprint Pubchem.....	70

Figura 30 - Separação das 53 estruturas em 2 grupos (clusters) com base na atividade ou inatividade enzimática.....	70
Figura 31 – Valores médios da métrica cvMCC calculados a partir dos diferentes valores de minNrec para cada fingerprint.....	71
Figura 32 – Análise dos resultados da modelagem QSAR via árvore de decisão	73
Figura 33 - Mapa representando os coeficientes de Tanimoto para cada comparação estrutura – estrutura.....	74
Figura 34 – Resultados de dinâmica molecular para o grupo 1.	77
Figura 35 – Resultados de dinâmica molecular para o grupo 2	79
Figura 36 – Resultados de dinâmica molecular para o grupo 3	80
Figura 37 – Resultados de dinâmica molecular para o grupo 4	81
Figura 38 – Resultados de dinâmica molecular para o grupo 5	82
Figura 39 – Resultados de dinâmica molecular para o grupo 6	83
Figura 40 – Distribuição de f+ (eixo X) em relação ao descritor dual (eixo Y) para cada uma das estruturas contidas nos grupos 2,4 e 5	87
Figura 41 – Propostas de retrossínteses.....	89

Lista de Tabelas

Tabela 1- Resultados de Métricas	72
Tabela 2 - Distância C – N calculada para cada uma das estruturas dos grupos a partir dos resultados das simulações de docking molecula.....	76
Tabela 3 - Valores dos descritores f+ e dual para cada estrutura de cada um dos 6 grupos separados.....	85
Tabela 4- Tetrahydroisoquinolinas bioativas potencialmente passíveis de obtenção por biocatálise com a <i>TfNCS</i>	88

Lista de Abreviaturas e Siglas:

¹ H	Hidrogênio
2D	Duas dimensões
5N8Q	Código para estrutura cristalográfica <i>apo</i> no PDB
5NON	Código para estrutura cristalográfica <i>holo</i> no PDB
1 – A	Hexanal, composto ativo do grupo 1
1 – I	Etanal, composto inativo do grupo 1
2 – A	Fenilacetaldeído, composto ativo do grupo 2
2 – I	Benzaldeído, composto inativo do grupo 2
3 – A	2-(Naftalen-1-il)acetaldeído, composto ativo do grupo 3
3 – I	2-(Naftalen-1-il)propanal, composto inativo do grupo 3
4 – A	Fenilacetona, composto ativo do grupo 4
4 – I	Acetofenona, composto inativo do grupo 4
5 – A	Ciclohexanona, composto ativo do grupo 5
5 – I	Ciclohexenona, composto inativo do grupo 5
6 – A	Ciclohexanona, composto ativo do grupo 6
6 – I	2-Metilciclohexanona, composto inativo do grupo 6
Asp	Ácido aspártico/aspartato
C _J NCS	(S) - Norcoclaurina sintase oriunda da espécie <i>Coptis japonica</i>
cv	Validação cruzada (<i>cross validation</i>)
cvMCC	Validação cruzada usando coeficiente de correlação de Mathews (<i>cross validation – Matthews Correlation Coeficient</i>)
C – C	Ligação carbono - carbono
C – N	Ligação carbono - nitrogênio
DFT	<i>Density functional theory</i>

DM	Dinâmica molecular
DO	Densidade ótica
DSS	Trimetilsililpropanosulfonato de sódio
DTT	Ditiotreitol
E.T	Estado de transição
Glu	Ácido glutâmico/glutamato
HCA	Análise de <i>cluster</i> hierárquico (<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>)
HIV -1	Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1
HOMO	<i>Highest occupied molecular orbital</i>
Int	Intermediário
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
LB	Luria Bertani
LUMO	<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>
Lys	Lisina
MCC	<i>Matthews correlation coefficient</i>
<i>minNrec</i>	<i>Minimum N records</i>
PDB	<i>Protein data bank</i> (https://www.rcsb.org/)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil (<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
QSAR	<i>Quantitative structure – activity relationship</i>
(S) – NCS	Enzimas (S) - norcoclaurina sintase
(S) – THIQS	(S) - Tetrahydroisoquinolina
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
SMILES	<i>Simplified molecular input line entry specification</i>
TNCS	(S) - Norcoclaurina sintase oriunda da espécie <i>Thalictrum flavum</i>
THIQs	Tetrahydroisoquinolinas

Tyr

Tirosina

UFF

Universal force field

UV – Vis

Ultravioleta – Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. ENZIMAS E SUAS APLICAÇÕES	18
1.2. A FAMÍLIA (S) - NORCOCLAURINA SINTASE	19
1.3. ALCALÓIDES E TETRAHIDROISOQUINOLINAS	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. OBJETIVOS PRINCIPAIS	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA	32
3.1.2. ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR RMN	35
3.2. PARTE TEÓRICA	37
3.2.1. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE COMPOSTOS ATIVOS E INATIVOS E MODELAGEM DOS COMPOSTOS	37
3.2.2. MODELAGEM DO ALVO	38
3.2.3. CONSTRUÇÃO DE MODELO QSAR	38
3.2.4. DOCKING MOLECULAR	42
3.2.5. DINÂMICA MOLECULAR	44
3.2.6. CÁLCULO DE ORBITAIS DE FRONTEIRA	47
3.2.7. BUSCA POR SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS	50
4. RESULTADOS	51
4.1 PARTE EXPERIMENTAL	51
4.1.1 EXPRESSÃO ENZIMÁTICA	51
4.1.2. ENSAIO DE ATIVIDADE POR RMN	56
4.2 PARTE TEÓRICA	65
4.2.1 CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA	65
4.2.3. DOCKING MOLECULAR	75
4.2.4. DINÂMICA MOLECULAR	77
4.2.5. CÁLCULO DE ORBITAL DE FRONTEIRAS	84
4.2.6 BUSCA POR SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS	87
5. CONCLUSÃO	91
6. REFERÊNCIAS	92
7. APÊNDICE	99
7.1. BIBLIOTECA DE DADOS	99
7.2. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	101

1. INTRODUÇÃO

1.1. ENZIMAS E SUAS APLICAÇÕES

A catálise, é um processo onde consegue-se aumentar a velocidade de uma reação química por meio do uso de um catalisador¹. O catalisador atua reduzindo a energia de ativação, possibilitando assim, o aumento da velocidade de uma reação sem que o próprio catalisador seja consumido no processo^{1,2}. Assim, a catálise é uma técnica muito associada ao ganho de produtividade em processos químicos. Estima-se que mais de 80% dos processos químicos industriais envolvam no mínimo a utilização de um catalisador em pelo menos uma das etapas do processo de produção². A busca por novos catalisadores é um dos objetivos da química verde, sendo também um tópico de muito impacto no cenário competitivo industrial internacional, pois a catálise está associada à economia atômica, à economia energética e na criação de rotas sintéticas mais curtas².

A catálise também está presente na química da vida, recebendo a nomenclatura de biocatálise, na qual as enzimas atuam como catalisadores³. As enzimas atuam em uma série de reações químicas, tais como: formação de ligações, quebra de ligações, transferências de grupos, oxidações, reduções, dentre outras, podendo estar associadas a cofatores. É por meio de toda essa cadeia complexa que a vida se conserva³.

O uso de enzimas pela humanidade é antigo. No início, o uso de enzimas era feito de forma empírica, e estava associado a produção de alimentos como cerveja, pão, vinho e queijo. Com o avanço do estudo da bioquímica, começou-se entender mais sobre a natureza enzimática. A indústria encontrou importantes e variadas aplicações, tais como: melhoramento de massas, produção de xaropes, clarificação de bebidas alcoólicas, fabricação de papel, dentre muitas outras⁴. O mercado global envolvendo enzimas possui uma taxa de crescimento anual sólida de 4,5%. Em 2020, estima-se para esse setor uma receita de 7,2 bilhões de dólares⁵.

Uma grande vantagem das enzimas em relação a catalisadores convencionais é a segurança, uma vez que a atividade enzimática normalmente ocorre em condições amenas de temperatura, pressão e pH, e na maioria das vezes em meio aquoso. Além disso os biocatalisadores são renováveis, biodegradáveis e não são tóxicos, embora possam levar ao surgimento de alergias⁶.

As enzimas podem ser empregadas como catalisadores na produção de novos produtos e intermediários químicos de interesse, principalmente na indústria farmacêutica, uma vez que a catálise enzimática pode ser um processo quimiosseletivo, enantiosseletivo ou estereosseletivo⁶. Embora a biocatálise possa ser um processo de alta especificidade, esse tipo de catálise também possui suas limitações, como por exemplo a limitação ao uso de solvente e a certas faixas de temperaturas.

Em uma enzima, o sítio catalítico, é definido como uma região onde os resíduos de aminoácidos, em conformações específicas exercem influência estérica e/ou eletrônica direta sobre reações químicas, criando condições próprias para que a catálise ocorra³. A partir do conhecimento de enzimas e dos seus mecanismos de atuação, é possível por meio da engenharia de proteínas, modificar certos resíduos, tornando as enzimas mais resistentes a condições de temperaturas e presença de solventes orgânicos, podendo até viabilizar a biocatálise com novos substratos^{6,7}.

1.2. A FAMÍLIA (S) - NORCOCLAURINA SINTASE

As enzimas (S)-Norcoclaurina sintases, ou (S)-NCS, constituem uma família de enzimas, presentes em algumas angiospermas. São exemplos de espécies nas quais essas enzimas foram identificadas: a *Thalictrum flavum* (TfNCS)⁸, *Coptis japonica* (CjNCS)⁹ e *Papaver somniferum* (PsNCS)¹⁰, essa família de enzimas são Pictet-Spenglerases, assim são responsáveis pela catálise de uma reação de Pictet-Spengler, uma reação que pode ser usada para a síntese de compostos heterocíclicos¹¹.

As enzimas (S)-NCS, são as responsáveis pela biossíntese da (S)-norcoclaurina, a partir da dopamina e do 4-hidroxifenilacetaldeído¹², através da catálise enantiosseletiva da reação de Pictet-Spengler¹³ como apresentado na Figura 1.

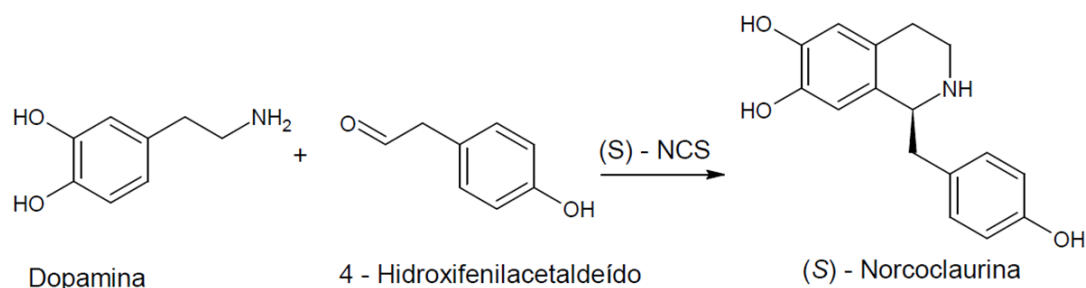


Figura 1 – Biossíntese da (S)-norcoclaurina catalisada pela enzima (S)-NCS, a partir da dopamina e do 4-hidroxifenilacetaldeído.

A partir de estudos mais recentes, descobriu-se que poderiam ser feitas mutações em resíduos específicos, melhorando ou diminuindo a atividade catalítica de forma específica para alguns substratos^{14,15}. Descobriu-se também que essa família de enzimas poderia aceitar uma grande variedade de aldeídos^{14,16,17} como substratos, produzindo assim, (S)-tetrahydroisoquinolinas (Figura 2). Além de aldeídos, foi também demonstrado a capacidade da T_NC_S de catalisar reações de Pictet-Spengler a partir de cetonas, produzindo (S)-tetrahydroisoquinolinas 1,1-dissubstituídas¹⁵ (Figura 3).

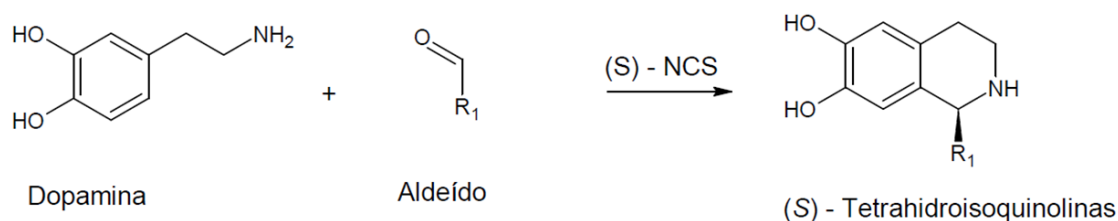


Figura 2 – Produção de (S)-tetrahydroisoquinolinas catalisada pela enzima (S)-NCS, a partir de dopamina e de aldeídos diversos.

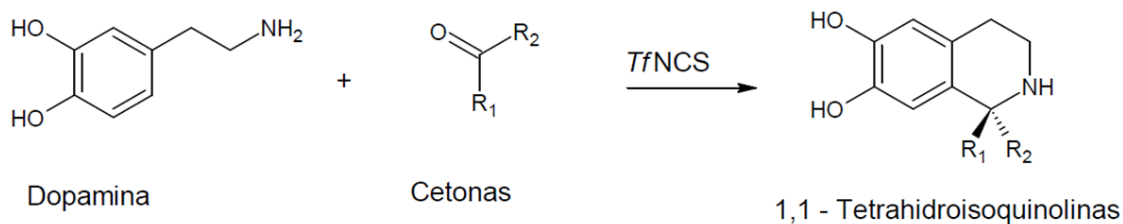


Figura 3 – Produção de 1,1-tetrahydroisoquinolinas dissustituídas catalisada pela enzima TfNCS a partir de dopamina e cetonas.

A catálise da reação de Pictet–Spengler também pode ser obtida pelo emprego de fosfato^{18,19}, no entanto a catálise pela (S)–NCS é enantiosseletiva, podendo vir a ser um processo muito mais vantajoso. Embora o uso da (S)–NCS não seja a única forma de catálise enantiosseletiva²⁰, o emprego de (S)–NCS possui as vantagens associadas ao uso de enzimas.

A enzima TfNCS tem sido bastante estudada, em função da sua alta promiscuidade aos substratos carbonílicos. Diferentes estruturas cristalográficas da TfNCS já foram obtidas por meio da difração de raios X^{8,17,21} e são disponibilizadas no PDB (*Protein Data Bank*). Alguns dos códigos referentes a essas estruturas, são:

- 5N8Q⁸ - Estrutura referente a enzima *apo* (enzima livre), com uma sequência primária composta pelos resíduos de aminoácido 36 – 195;
- 5NON⁸ - Estrutura referente a enzima *holo* (enzima complexada com um ligante, análogo ao estado de transição), com a mesma sequência primária da estrutura 5N8Q, no entanto, composta pelos resíduos de aminoácido 40 – 194.

Estruturalmente, a TfNCS apresenta homologia com as proteínas da família Bet v1, sendo majoritariamente monomérica e apresentando uma massa molecular de aproximadamente 24 kDa²¹. A TfNCS é composta por sete fitas beta, quatro alfa hélices e uma hélice 3/10 que, quando arranjadas

tridimensionalmente, formam uma cavidade anfipática, na qual está localizado o sítio catalítico⁸.

Na *TfNCS*, os resíduos de aminoácidos: Glu103, Tyr108, Tyr131, Tyr139 são responsáveis por regular a abertura da cavidade²¹. Na Figura 4, pode-se observar a estrutura da *TfNCS* proveniente do código 5N8Q (A), além disso, também é exibida a sua cavidade interior, junto aos resíduos que regulam a sua abertura (B) e a sequência primária da enzima (C).

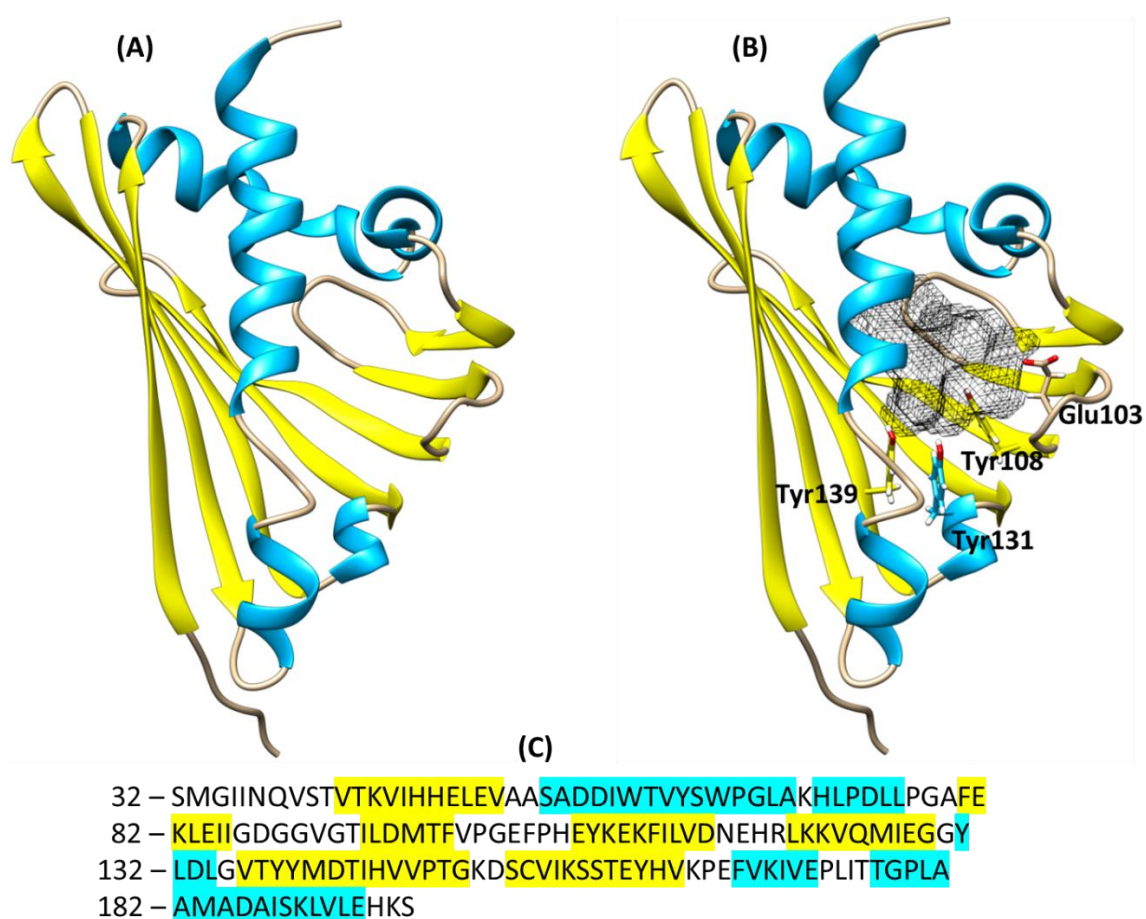


Figura 4 – Estruturas cristalográficas da enzima *TfNCS* provenientes do código de acesso 5N8Q: (A) – Estrutura apo; (B) – Cavidade interior e resíduos responsáveis pela abertura da cavidade; (C) sequência primária da enzima.

O sítio catalítico da enzima se encontra no interior da cavidade, estando associado aos resíduos Glu110, Lys122 e Asp141. As cadeias laterais desses resíduos estão destacadas na Figura 5, juntamente com a estrutura de um composto análogo ao estado de transição co-cristalizado com a enzima *TfNCS*.

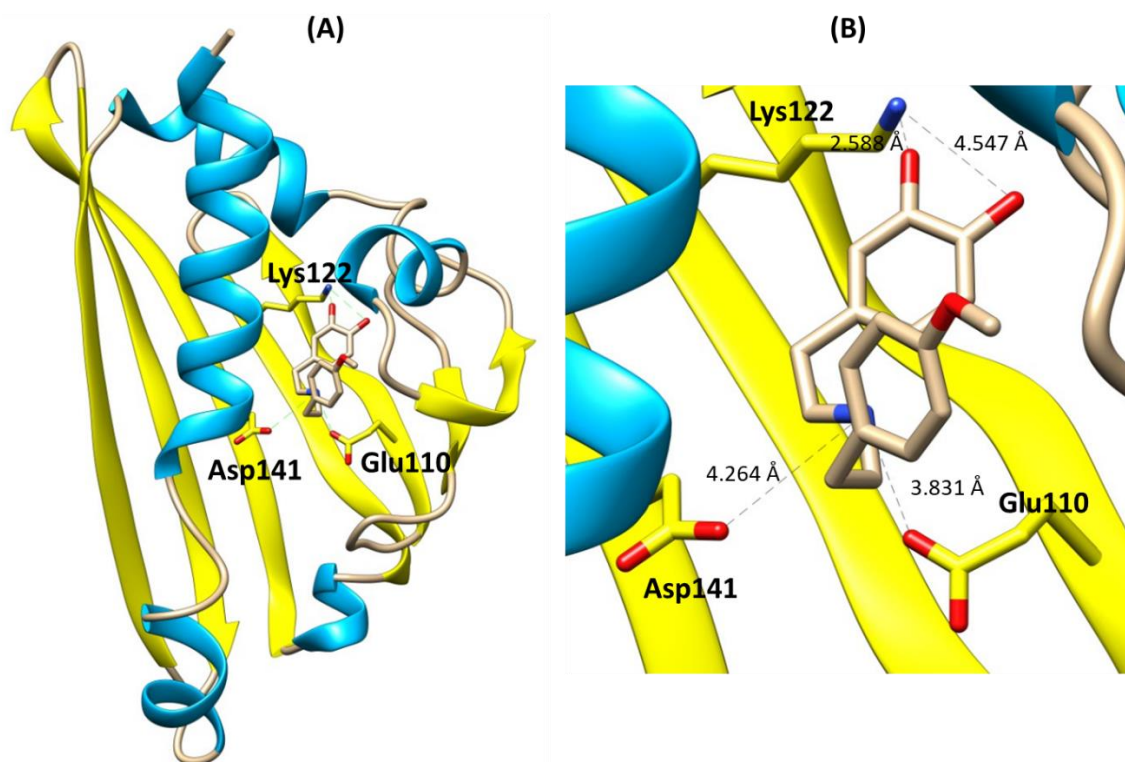


Figura 5 – Sítio catalítico da enzima *TfNCS* co-cristalizada com um composto análogo a um estado de transição, proveniente do código de acesso 5NON, com diferentes níveis de ampliações (A,B). As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos que formam o sítio catalítico da *TfNCS*: Glu110, Lys122, Asp141. As estruturas nos centros de A e B, são um composto análogo a um estado de transição do mecanismo de Pictet–Spengler. As linhas tracejadas em cinza, representam as distâncias entre átomos, calculadas usando software Chimera 1.2.

A partir da obtenção de estruturas cristalograficas^{8,13,15}, cálculos de *docking* molecular de intermediários¹⁴, mutação de resíduos específicos e seu impacto na catálise¹⁴, chegou-se a uma proposta de mecanismo conhecida por *Dopamine First*. Segundo essa proposta, a dopamina se ligaria primeiramente

ao sítio catalítico. Posteriormente, o composto carbonílico se ligaria ao sítio catalítico em uma conformação adequada para que a reação possa ocorrer¹⁴.

Além desses estudos, uma proposta de mecanismo para a *TINCS* foi elaborada, através da caracterização das etapas da reação catalisada via cálculos quânticos em *cluster*²², uma metodologia já usada para o estudo de outras enzimas^{23,24}. Os resultados dessa análise foram bem convergentes com os dados experimentais, explicando a estereosseletividade para o produto de configuração (S)²². Além disso, a proposta *Dopamine First* explicaria também a promiscuidade enzimática em relação aos compostos carbonílicos¹⁴. A proposta de mecanismo via cálculo quântico²² é descrita na Figura 6.

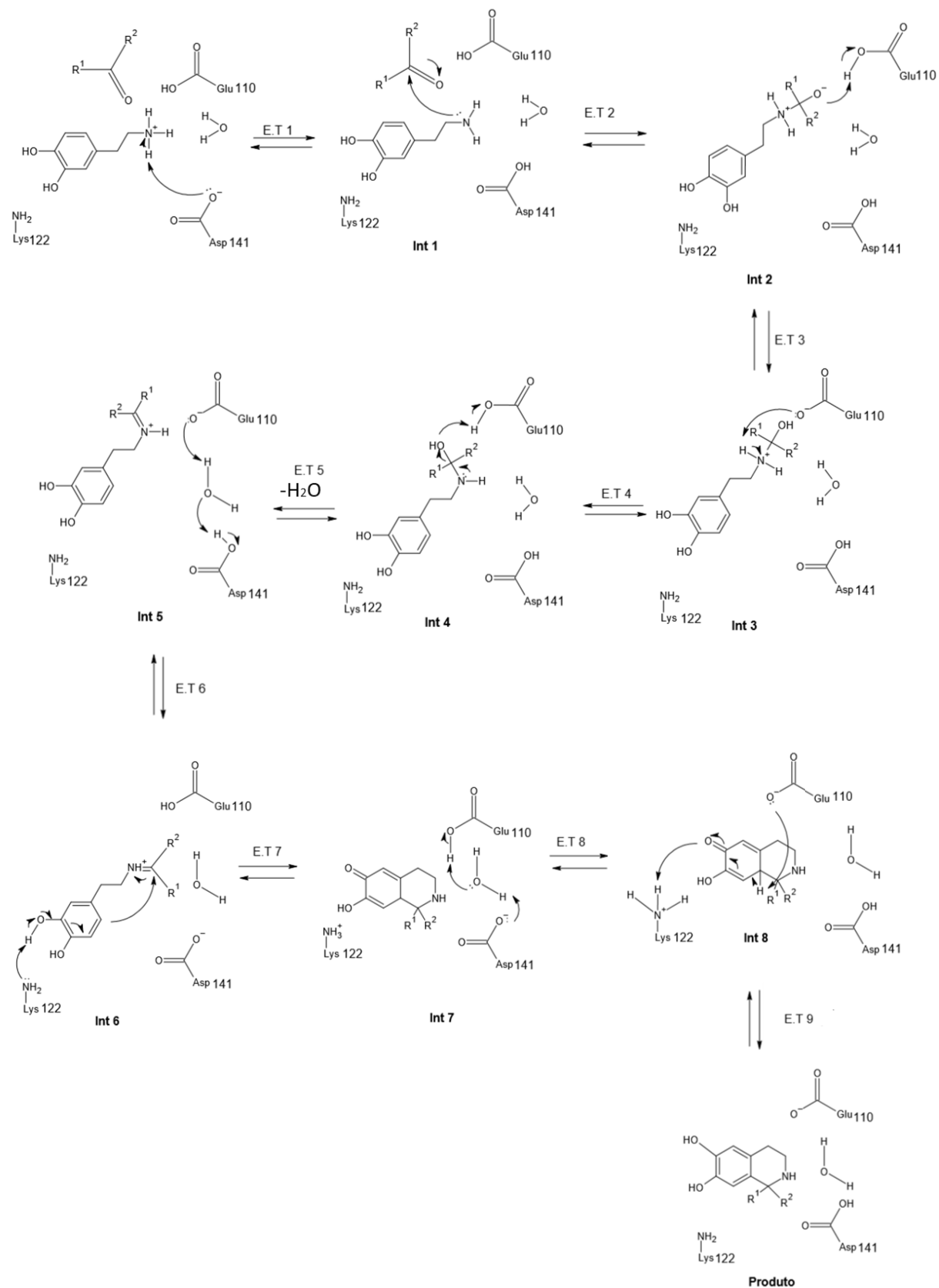


Figura 6 – Proposta de Mecanismo via cálculo quântico. As nomenclaturas “Int” estão relacionadas aos intermediários, e os “E.T” aos estados de transição.

No mecanismo proposto na Figura 6, o cátion dopaminium (dopamina protonada) é desprotonado pelo resíduo de aminoácido Asp141, levando a formação do Intermediário 1 (**Int 1**). No intermediário 1, o par não ligante do nitrogênio da dopamina realiza um ataque nucleofílico ao carbono da carbonila, formando uma ligação C – N, e dessa forma, gera um alcóxido, representado pelo Intermediário 2 (**Int 2**). O Intermediário 2 então interage com o resíduo de aminoácido Glu110 abstraindo o próton do resíduo, levando a formação do Intermediário 3 (**Int 3**). No Intermediário 3, o resíduo de aminoácido Glu110 abstrai um próton proveniente do nitrogênio, formando um aminol, representado como Intermediário 4 (**Int 4**).

O aminol (Intermediário 4) então sofre uma desidratação por ação do resíduo de aminoácido Glu110, que resulta na formação de um iminium de isomeria (*E*), representado pelo Intermediário 5 (**Int 5**). No Intermediário 5 ocorre uma transferência de prótons entre os resíduos de aminoácido de Glu110 e Asp141, por meio de uma molécula de água, levando a formação do Intermediário 6 (**Int 6**) que é menos estável.

O Iminium (*E*) do Intermediário 6 então interage com o resíduo de aminoácido Lys122. A Lys122, abstrai um próton do anel catecol. Esse processo ocorre concomitantemente a um ataque de um carbono sp^2 do anel aromático a um carbono sp^2 do iminium, formando uma ligação C – C, gerando uma ciclização, dando origem a uma quinona, representada pelo Intermediário 7 (**Int 7**). No Intermediário 7, assim como no Intermediário 5, ocorre uma transferência de prótons entre os resíduos de aminoácido de Glu110 e Asp141 por meio de uma molécula de água, levando a formação do Intermediário 8 (**Int 8**). No Intermediário 8, o resíduo de aminoácido Glu110 abstrai um próton da quinona, resultando na recuperação da aromaticidade e na abstração de um próton do resíduo de aminoácido Lys122, produzindo o produto.

1.3. ALCALÓIDES E TETRAHIDROISOQUINOLINAS

A classe dos alcaloides compreende em torno de 27000 produtos naturais²⁵, sendo uma macro classe muito associada a compostos com atividade farmacológica²⁶.

Alcaloides são compostos básicos nitrogenados, cuja maior parte dos compostos é de origem fitoquímica²⁷. Os alcaloides que possuem um nitrogênio associado a um anel heterocíclico são classificados como “alcaloides verdadeiros”. A classe dos “alcaloides verdadeiros” possui uma significativa atividade farmacológica²⁶, assim, percebe-se a grande importância da família (S)-NCS, uma vez que ela pode ser empregada na produção de alcaloides verdadeiros.

Embora a definição de alcaloides verdadeiros seja simples, essa classe ainda abrange uma série de famílias, classificadas de acordo com a estrutura principal do esqueleto carbono – nitrogênio²⁶, assim como sub famílias dessas classes²⁸, alguns exemplos são ilustrados na Figura 7.

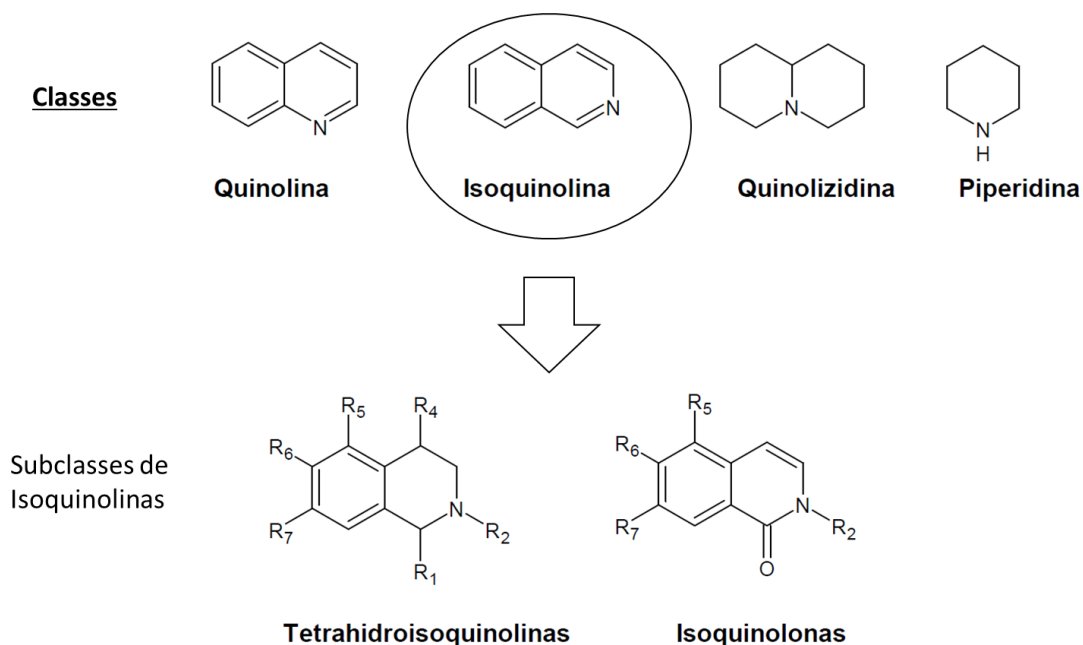


Figura 7 – Algumas classes de alcaloides e algumas subclasses de isoquinolinas.

As tetrahydroisoquinolinas são uma subclasse do grupo das isoquinolinas (Figura 7). As tetrahydroisoquinolinas podem ser obtidas a partir da reação de Pictet–Spengler catalisada por enzimas da família (S)–NCS, usando como substratos a dopamina e diferentes aldeídos. Um dos outros muitos exemplos do emprego da *Tf*NCS, foi o uso de aldeídos alfa-substituídos para a obtenção de tetrahydroisoquinolinas com atividade antimalárica e broncodilatadora¹⁷.

Outro exemplo de uma das aplicações da família (S)–NCS, é a produção *in vitro* de intermediário envolvidos em rotas metabólicas. Essa aplicação foi utilizada e desenvolvida na obtenção da (S)–reticulina. A (S)–reticulina é um intermediário importante no metabolismo fitoquímico, envolvido na produção de alcaloides benzilisoquinolínicos^{29–31}. A rota biossintética para a obtenção da (S)–reticulina e seus possíveis caminhos biossintéticos são descritos pela Figura 8.

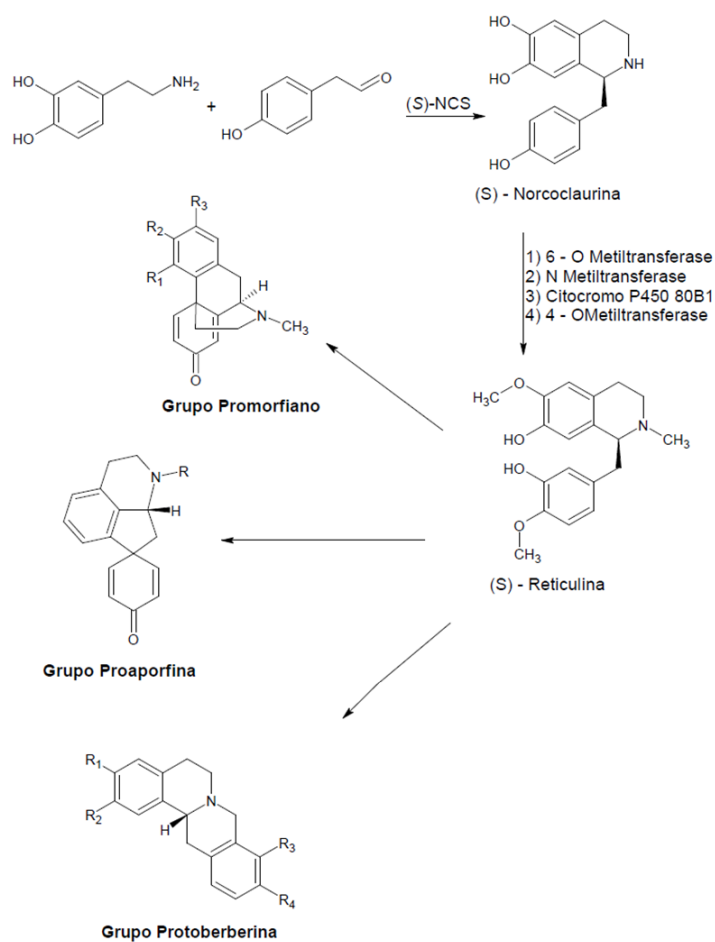


Figura 8 – Rota biossintética para a produção de (S)–reticulina e de alcaloides benzilisoquinolínicos.

Assim, observa-se a importância da família (S)-NCS, podendo ser usada para a produção de intermediários de rotas biossintéticas, ou até mesmo na produção de tetrahydroisoquinolinas inéditas. Embora a família (S)-NCS possua um potencial na síntese enantiosseletiva de tetrahydroisoquinolinas, não se compreende ao certo, quais os fatores poderiam estar associados a aceptividade do composto carbonílico frente a catálise da reação de Pictet–Spengler pela TñNCS. O estabelecimento das bases moleculares envolvidas no reconhecimento dos substratos e na reatividade relativa dos compostos carbonílicos frente a TñNCS, tem o potencial de fomentar a expansão da aplicação tecnológica da TñNCS, bem como contribuir para processos de otimização dessa enzima, via técnicas de engenharia de proteínas.

Nesse trabalho, objetivou-se estudar as propriedades estruturais e eletrônicas de aldeídos e cetonas que modulam a atividade catalítica da enzima TñNCS em reações de Pictet–Spengler. Para isso, utilizou-se técnicas de química computacional. Objetivou-se também estabelecer o protocolo de produção da enzima TñNCS via expressão heteróloga e os ensaios de atividade enzimática por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A partir de um levantamento bibliográfico detalhado, construiu-se uma biblioteca de compostos experimentalmente classificados como ativos (reativos) e inativos (não reativos). Utilizando a metodologia de QSAR (*Quantitative Structure – Activity Relationship*), identificou-se quais parâmetros moleculares e funções químicas presentes nas estruturas dos compostos carbonílicos estão associados a reatividade. Realizaram-se simulações de *docking* molecular e dinâmica molecular para avaliar interações importantes e impedimentos estéricos relacionados a reatividade dos compostos. Utilizando teoria de DFT (*Density functional theory*) juntamente com metodologia de cálculo de orbitais de fronteira e de descritores locais de reatividade, identificou-se as propriedades eletrônicas que poderiam estar relacionadas a atividade catalítica dos compostos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS PRINCIPAIS

Implementar protocolos de: expressão da *TANC*S recombinante; ensaios de atividade catalítica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN); e estudar através de técnicas computacionais os parâmetros que tornariam um composto carbonílico reativo ou não reativo na reação de Pictet–Spengler catalisada pela enzima *TANC*S.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir a enzima *TANC*S através de expressão heteróloga de proteínas;
- A partir de compostos carbonílicos presentes no laboratório, realizar ensaios biocatalíticos monitorados por espectroscopia de ¹H de RMN, avaliando a reatividade desses compostos frente a *TANC*S;
- Organizar uma biblioteca de compostos carbonílicos classificados como ativos e inativos para a *TANC*S;
- Realizar a modelagem molecular das estruturas dos compostos organizados na biblioteca citada anteriormente;
- Por meio de técnicas computacionais, buscar correlações com a tendência de um composto carbonílico ser ativo ou inativo para a catálise;
- A partir da literatura e da parte experimental do trabalho, construir um modelo QSAR, de modo a identificar compostos que seriam ativos para a biocatálise da *TANC*S;

- A partir dos resultados anteriores, realizar a identificação de compostos carbonílicos na literatura que seriam potencialmente ativos segundo a modelagem e que poderiam ser usadas para obtenção de produtos bioativos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PARTE EXPERIMENTAL

3.1.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA

O processo de expressão de proteínas^{32,33} utilizado nesse trabalho é descrito na Figura 9:

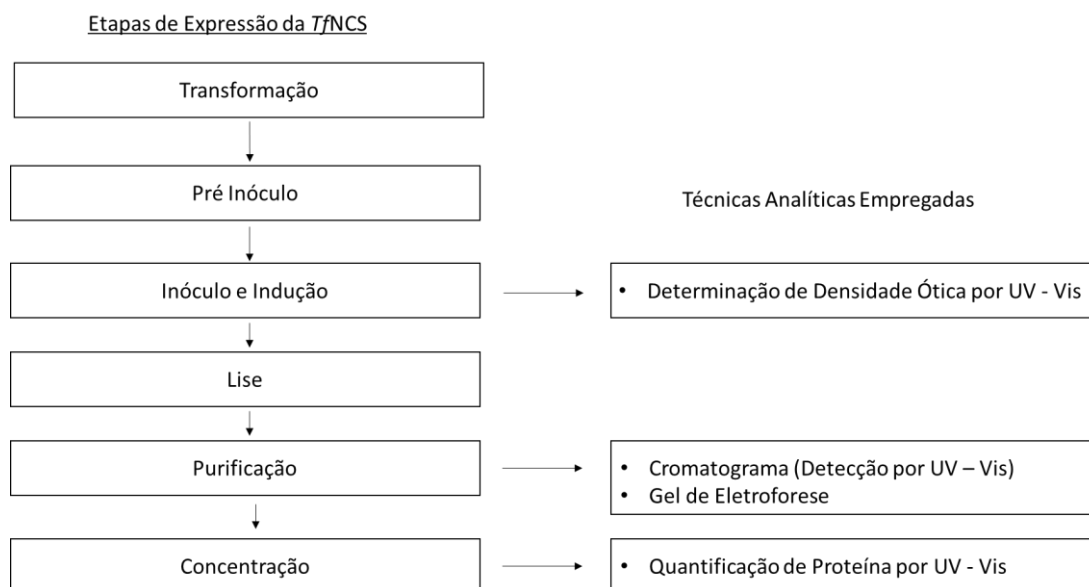


Figura 9 – Organograma simplificado de expressão enzimática.

A etapa de transformação foi feita a partir da mistura de 100 μL de solução contendo células de *Escherichia coli* da linhagem BL21(DE3) competentes em meio Luria Bertani (LB), com 2 μL do plasmídeo formado pelo vetor de expressão pET-28a(+), clonado com uma sequência de nucleotídeos que codifica a sequência de aminoácidos da TfnCS, entre os resíduos 20 a 210 (concentração $\sim 1 \text{ nM}$). O vetor de expressão pET-28a(+) possui uma sequência de nucleotídeos que confere as bactérias, com ele transformadas, resistência ao antibiótico canamicina. Dessa forma, através do cultivo das bactérias em meio contendo canamicina, é possível selecionar naturalmente as células que contém o plasmídeo. Além disso, o vetor pET-28a(+) codifica a proteína de interesse

fusionada a uma cauda de 6 histidinas seguida do sítio de clivagem a enzima trombina no terminal N da proteína de interesse.

A essa mistura, aplicou-se um choque térmico para que ocorresse a incorporação do plasmídeo. O choque térmico consistiu-se na incubação da mistura a 42°C por 90 segundos, seguido de 10 minutos em gelo a 4°C. Posteriormente, transferiu-se à mistura 500 µL de Meio LB e encubou-se o meio de cultura a 37°C, por 1 hora, em uma estufa tipo *shaker* rotacionando a 120 rpm. Posteriormente a esse processo, a solução foi centrifugada em temperatura ambiente, a 3000 rpm e por 3 minutos, então 540 µL do sobrenadante foram retirados e descartados e o *pellet* foi ressuspensão nos 60 µL restantes. Essa solução foi replicada em uma placa de Petri, contendo 5 mL de meio de cultura semi-sólido, LB-agar, contendo 50 µg/L de canamicina e colocada por 16 horas a 37°C em uma estufa.

Na etapa seguinte, 4 colônias foram transferidas para 50 mL de solução LB contendo 50 µg/L de canamicina (pré inóculo). Essa solução foi deixada em uma incubadora tipo *shaker*, a 37 °C, 180 rpm e 16 horas.

Para a realização das etapas de inoculação e indução, preparou-se 450 mL de meio LB autoclavado, contendo 50 µg/L de canamicina. Então, misturou-se o pré-inóculo a essa nova solução de meio LB, dando origem a solução do inóculo. O inóculo então foi encubado em uma estufa tipo *shaker*, a 37°C e 180 rpm, até que a densidade ótica atingisse um valor entre 0,6 e 0,8 em um comprimento de onda de 600 nm. Após a solução atingir um valor de densidade ótica adequado, adicionou-se o indutor IPTG (*isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*), visando uma concentração final de 1mM de IPTG. O inóculo induzido então foi colocado na incubadora tipo *shaker* a 22°C e 180 rpm por 16 horas.

Após 16 horas de incubação, a cultura celular oriunda da etapa de inóculo foi centrifugada a 4000 RPM e 4°C por 40 minutos, então o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 10 mL de uma solução tampão pH 8, 50 mM fosfato, 10 mM imidazol, 300 mM de NaCl e 2 mM de ditioneitol (DTT), chamada de solução A. A essa mistura de *pellet* com solução A então foi adicionada lisozima, para iniciar o processo de lise, cuja concentração final foi

ajustada para 1 mg/mL. O composto inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), foi também adicionado, com concentração final ajustada para 1 mM, para evitar a digestão proteolítica da TñNCS por proteases produzidas pela própria bactéria. A lise celular foi induzida pela combinação da ação da lisozima e de estresse mecânico promovido via utilização de seringa de 10 mL por 20 minutos. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 4°C e 11000 RPM por 40 minutos. O pellet então foi descartado e o sobrenadante contendo a enzima TñNCS foi utilizado na etapa de purificação.

O processo de purificação foi realizado em 2 etapas: a primeira via cromatografia por afinidade a Ni²⁺ e uma segunda, via purificação por cromatografia de exclusão molecular. Na primeira etapa de purificação, utilizou-se uma coluna HisTrap HP (GE *Healthcare*, EUA) com 5 mL de volume de coluna (V.C). Essa coluna foi lavada com 2 V.C de água, e posteriormente equilibrada com 3 V.C de solução A. Após essa ambientação da coluna com solução A, injetou-se a solução contendo a enzima TñNCS, e lavou-se a coluna com 12 V.C usando solução A como eluente, de modo a eluir todas as proteínas do lisado que não tiveram afinidade pela coluna por não possuírem cauda de histidina.

A partir da eluição total das proteínas que não tiveram afinidade pela coluna, aplicou-se um gradiente de eluição de imidazol. Para isso fez-se um gradiente de concentração entre a solução A e uma solução B (solução de tampão pH 8, 50 mM fosfato, 500 mM imidazol, 300 mM de NaCl e 2 mM de DTT) ao longo de 16 V.C, registrou-se o perfil cromatográfico desse gradiente por meio de um cromatógrafo fPLC AKTA START (GE *Healthcare*, EUA), localizado no laboratório MacroMol do Departamento de Química. Para confirmar a presença de proteínas nas alíquotas obtidas ao longo do primeiro processo cromatográfico, usou-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida 15% com SDS.

Na segunda etapa de purificação, foi usado uma coluna HiloLoad Superdex 16/600 (GE *Healthcare*, EUA) com 124 mL de volume de coluna (V.C). Essa coluna foi equilibrada com 5 volumes de coluna de água, após essa lavagem, a coluna foi equilibrada com 3 volumes de coluna de uma solução tampão pH 7, 50 mM HEPES, 100 mM NaCl e 2mM de DTT (solução C).

Após essa ambientação de coluna com solução C, misturou-se todas as amostras geradas na primeira etapa do processo de purificação que continham a enzima. Essa mistura então foi injetada na coluna e eluída com solução C, ao longo de 160 mL de eluição. As alíquotas então foram submetidas a uma nova eletroforese em gel.

As proteínas purificadas foram concentradas utilizando concentradores de centrifuga Vivaspin, com filtro de 10 kDa e volume de 20 mL (GE *Healthcare*, EUA). As soluções de proteína foram centrifugadas nos concentradores a 2800 RPM e 8°C até atingirem concentrações maiores do que 70 μM . A concentração da enzima em solução foi calculada a partir da leitura da absorbância a 280 nm, aferida em um espectrômetro UV – Vis (Varian, EUA), com cubeta de 1 cm de caminho ótico e aplicando a equação de Lambert Beer. O coeficiente de absorvidade molar teórico da (S)-NCS, cujo valor é $19940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, foi obtido a partir da sequência primária da T β NCS, usando o servidor *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>)

3.1.2. ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR RMN

A espectroscopia de RMN é uma técnica que permite obter informações referentes as estruturas moleculares que compõe a amostra³⁴. Sendo assim, conhecendo a origem dos sinais na amostra, é possível monitorar as possíveis mudanças estruturais que possam acontecer ao longo de uma reação. Devido a isso, escolheu-se essa técnica para o monitoramento da atividade enzimática da T β NCS, utilizando diferentes aldeídos nos ensaios. Esses ensaios de RMN foram empregados para a determinação de compostos ativos e inativos para a T β NCS.

Os experimentos de RMN foram realizados nos espectrômetros de RMN Bruker 400 MHz Avance III onebay, equipado com sonda de 5 mm de dupla ressonância BBI e no espectrômetro de RMN Bruker 600 MHz Avance Neo, equipado com sonda de 5 mm de dupla ressonância BBFO *Smart Probe*, ambos alocados no Laboratório Institucional de Pesquisa em RMN de Alta Resolução da UFMG, LIPq- LAREMAR.

As soluções reacionais foram preparadas seguindo protocolos previamente publicados¹⁴. As soluções reacionais foram preparadas adicionando 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM dos compostos carbonílicos, e 80 µg/mL de *T*ñCS purificada em solução tampão Hepes 50 mM, pH 7,0 contendo 5 mM de ácido ascórbico e 10% v/v de DMSO (dimetilsulfóxido). O ácido ascórbico foi adicionado para atuar como substância antioxidante e evitar a oxidação dos grupos hidroxila do anel catecol da dopamina^{15,17}. A alíquota de DMSO foi adicionada para garantir a solubilidade dos aldeídos em meio aquoso^{15,17}.

Para quantificar os sinais relativos aos reagentes e aos produtos ao longo do tempo, foi usada uma concentração de 0,13 mM de DSS (trimetilsililpropanosulfonato de sódio) como referência interna. Nos experimentos em que se observou mudança significativa nos sinais dos reagentes, realizou-se um experimento controle nas mesmas condições, mas sem a enzima, para confirmar se as mudanças espectroscópicas realmente provinham da atividade enzimática. Os espectros de ¹H para cada ensaio foram adquiridos em 3 momentos diferentes: (1) logo após a adição da enzima; (2) 2 horas após a mistura e; (3) 1 dia após a mistura.

Os espectros de RMN de ¹H de cada um dos compostos da solução reacional foram coletados, com o objetivo de identificar corretamente os sinais relativos aos diferentes compostos presentes, isto é: HEPES, ácido ascórbico e dopamina. Todos os espectros foram coletados nas mesmas concentrações utilizadas nas soluções reacionais. A partir desses espectros e dos seus devidos assinalamentos realizados baseando-se em dados publicados, pode-se identificar cada um dos sinais dos reagentes e produtos nos ensaios de atividade, assim como quais mudanças estariam associadas a essa atividade enzimática.

Para padronizar o protocolo de monitoramento da atividade enzimática da *T*ñCS recombinante via RMN de ¹H, utilizou-se o aldeído hexanal, pois ele já foi descrito como aldeído ativo em reações de Pictet-Spengler catalisadas pela *T*ñCS. Além disso, o produto da reação de Pictet-Spengler entre a dopamina e o hexanal, catalisada por *T*ñCS, já foi isolado e teve a estrutura determinada por RMN, tendo todos os sinais de RMN previamente assinalados¹⁴. O protocolo

estabelecido com o hexanal, foi então utilizado, para monitorar a atividade da *T*NCS frente a aldeídos disponíveis no laboratório.

3.2. PARTE TEÓRICA

3.2.1. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE COMPOSTOS ATIVOS E INATIVOS E MODELAGEM DOS COMPOSTOS

A partir de uma busca na literatura de artigos, nos quais a atividade catalítica da *T*NCS foi avaliada, identificou-se todas as substâncias carbonílicas que já foram submetidas a ensaios biocatalíticos para a reação de Pictet–Spengler. A partir das informações coletadas, organizou-se uma biblioteca de compostos, classificados como ativos e inativos.

Os aldeídos e cetonas da biblioteca foram modelados seguindo o seguinte protocolo: a estrutura química foi gerada usando o software ChemSketch³⁵. As estruturas químicas foram convertidas para o formato SMILES³⁶. As estruturas tridimensionais dos compostos no formato .pdb foram gerados no servidor CACTUS (<https://cactus.nci.nih.gov>) usando como entrada os códigos SMILES de cada uma das moléculas. As estruturas tridimensionais obtidas tiveram sua geometria otimizada através do software AVOGADRO³⁷, usando um campo de força do tipo UFF (*Universal Force Field*)³⁸ em pH 7.

Da biblioteca, selecionou-se 6 grupos representativos da diversidade estrutural observada, cada grupo contendo duas estruturas semelhantes, uma classificada como ativa e uma outra como inativa. Esses grupos foram submetidos a metodologias computacionais, buscando assim entender, quais características físico-químicas confeririam as substâncias carbonílicas a capacidade de serem reativas ou não reativas em uma reação de Pictet–Spengler catalisada pela *T*NCS. Todas as metodologias visaram estudar os aspectos que poderiam estar relacionados ao mecanismo, isto é: a aproximação do grupo carbonila à dopamina; a interação dos dois substratos ao longo do tempo; e o caráter eletrofílico dos compostos carbonílicos.

3.2.2. MODELAGEM DO ALVO

A partir das estruturas disponíveis no PDB, selecionou-se a estrutura cristalográfica da *TfNCS*, de código 5NON⁸ para o trabalho, pois nessa estrutura a enzima foi cristalizada no estado *holo*, isto é, associada a um ligante, sendo esse ligante um análogo de um dos estados de transição. Nessa configuração, a enzima apresenta uma conformação mais adequada à catálise, principalmente em relação aos resíduos de aminoácidos localizados no sítio catalítico.

Neste trabalho utilizou-se apenas a cadeia A, proveniente estrutura 5NON, uma vez que esta era bem mais representativa das demais presentes no arquivo .pdb. A partir dessa cadeia A, por meio de um editor de texto, editou-se o arquivo, visando eliminar a presença de conformeros de resíduos de aminoácidos, por fim adicionou-se os hidrogênios usando o servidor MolProbity³⁹.

3.2.3. CONSTRUÇÃO DE MODELO QSAR

A técnica de QSAR foi apresentada em 1964 por Hansch e Fujita, sendo aprimorada desde então^{40,41}. Essa técnica torna possível a predição de propriedades/dados experimentais de moléculas, através da análise da estrutura molecular⁴². É uma técnica muito usada na descoberta de novas substâncias bioativas, através da compreensão de quais parâmetros moleculares contribuem com atividades biológicas específicas⁴³.

A partir de um treinamento inicial, com diversas estruturas e as suas propriedades experimentais correspondentes, a técnica de QSAR busca uma correlação matemática entre suas estruturas e uma determinada propriedade. Para realizar essa busca, as moléculas são descritas estruturalmente por meio de descritores. Esses descritores definem as propriedades estruturais moleculares. A partir disso, é feita uma análise multivariada dos dados para tentar entender as relações matemáticas entre os descritores e os valores de atividade, por fim é realizada uma validação estatística para validar matematicamente se o modelo é um modelo preditivo ou não⁴². O ajuste e o treinamento de um QSAR⁴¹ segue o fluxograma apresentado na Figura 10.

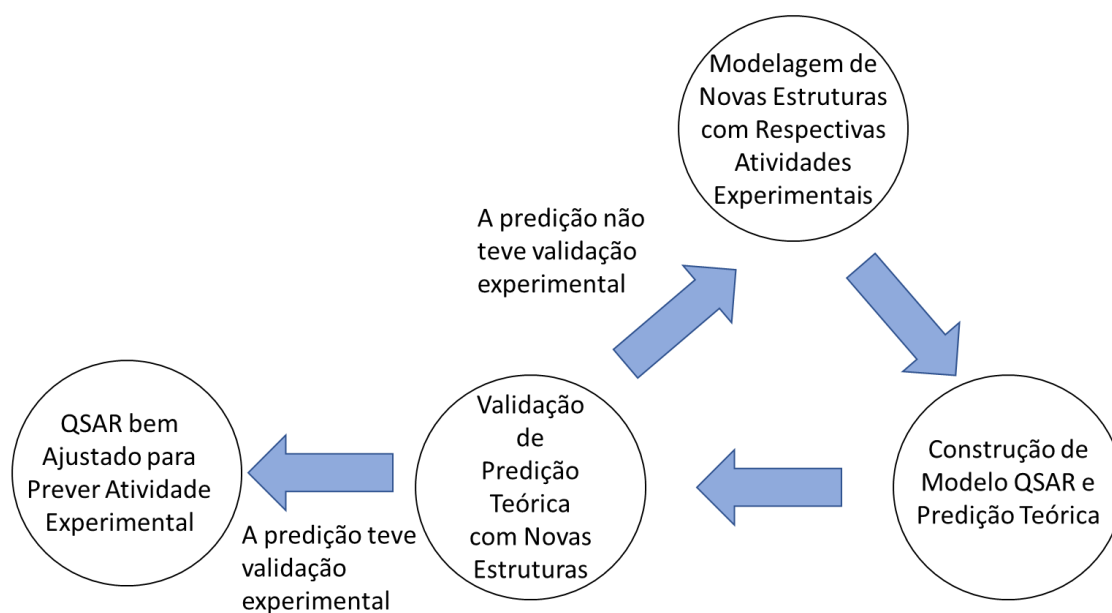


Figura 10 – Fluxograma de construção de um modelo QSAR.

A partir de um QSAR bem ajustado, o modelo é capaz de prever com considerável acurácia, as atividades de moléculas que ainda não tiveram sua atividade identificada, auxiliando, por exemplo, a busca por novos compostos com atividade biológica e assim, contribuindo para a aceleração do desenvolvimento de novos fármacos. Quanto mais bem treinado for o modelo, melhor será a acurácia. O bom treinamento depende de uma série de fatores, tais como: número de compostos da biblioteca, a complexidade do sistema, a semelhança entre as estruturas utilizadas, a metodologia usada para determinação da atividade experimental, dentre outros, e é uma técnica totalmente matemática, dependendo apenas da biblioteca de dados⁴².

Entre alguns dos resultados já obtidos pela modelagem de QSAR, validando a sua importância, podem-se citar a predição e o desenvolvimento de fármacos contra malária⁴⁴, transtornos de ansiedade⁴⁵, entre outros resultados⁴¹.

Embora o QSAR seja uma técnica bem prática, necessitando apenas de dados que podem ser encontrados na literatura, um protocolo cuidadoso deve ser utilizado. Um dos principais problemas encontrados é a inadequação do treinamento ao problema proposto. Isso pode ocorrer por diversos motivos: seja

por falta de dados na literatura para treinar o modelo, ou então pelo uso de dados experimentais que foram obtidos a partir de metodologias diferentes, como por exemplo: dados de atividade de moléculas obtidos a partir de espécies diferentes⁴⁶.

A metodologia da construção do modelo de árvore de decisão QSAR foi empregada de acordo com o fluxograma⁴⁷ descrito na Figura 11.

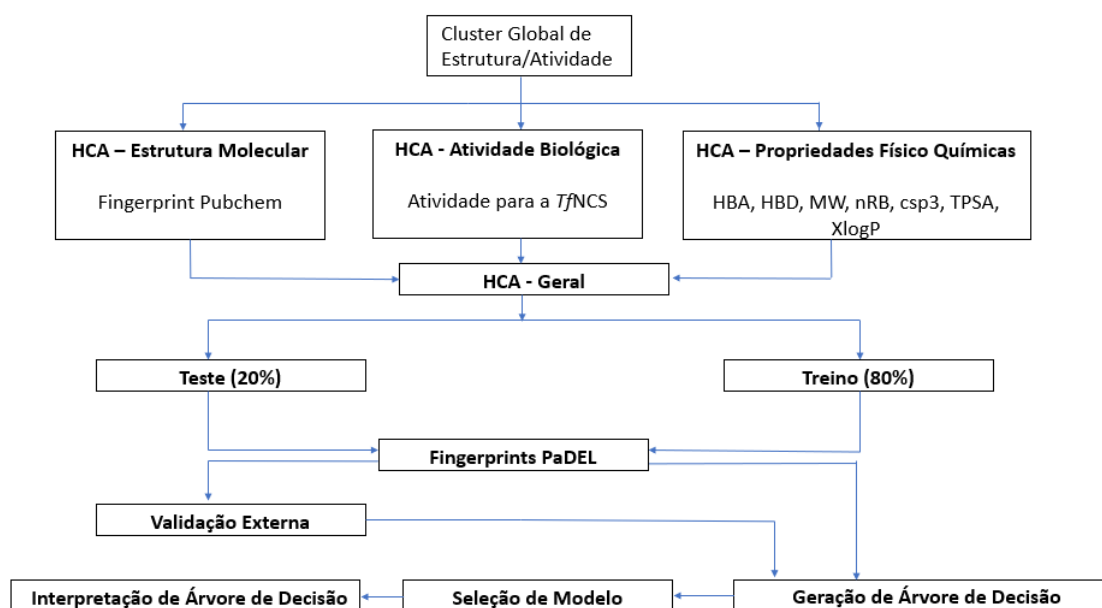


Figura 11 – Construção, seleção e interpretação de modelo de Árvore de Decisão QSAR.

O modelo QSAR, foi construído utilizando todas as estruturas para as quais, ensaios de atividade da enzima *TfNCS* já haviam sido realizados. As estruturas químicas dessas substâncias foram modeladas de acordo com o que foi descrito no tópico 3.2.1. Essas estruturas foram organizadas em um único arquivo utilizando o software Discovery Studio 2019⁴⁸. Nesse arquivo, foi atribuído código binário para cada molécula de acordo com sua reatividade, sendo 1 atribuído para moléculas reativas e 0 atribuído para moléculas não reativas. O arquivo contendo a biblioteca e o código de atividade de cada composto (*Cluster Global de Estrutura/Atividade*), foi salvo no formato .sdf.

Esse arquivo foi aberto no software Knime⁴⁹. As estruturas foram separadas em grupos através da aplicação do método de análise de *cluster*

hierarquizado (HCA - *Hierarchical Cluster Analysis*). Realizaram-se três separações do *cluster* global de estrutura/atividade por meio de três análises de HCA independente. As análises de HCA foram: (1) Atividade biológica (HCA - biológico), determinado pela reatividade do composto frente a *TfNCS*; (2) estrutura molecular (HCA - Estrutural), determinado pelo *fingerprint* Pubchem e; (3) propriedades físico-químicas (HCA – Propriedades Físico Químicas). Para o cálculo do HCA físico-químico considerou-se as seguintes propriedades: aceptores de ligações de hidrogênio (HBA – *Hydrogen Bond Acceptors*), doadores de ligação de hidrogênio (HBD - *Hydrogen Bond Donors*), massa molecular (MW – *Molecular Weight*), número de ligações rotacionáveis (nRB – *Rotatable Bonds Count*), caráter sp³ (csp3 – *sp3 Character*), topologia polar de área superficial (TPSA – *Topological Polar Surface Area*) e coeficiente de partição (xlogP). Após a análise das três HCA, foi feita uma nova análise de HCA, usando os parâmetros dessas três HCA, separando assim, todas as moléculas da biblioteca em um grupo de treino (80%) e um grupo de teste (20%), para as criações dos modelos, conforme o identificado pela Figura 11.

Os modelos de QSAR então foram gerados por meio de um fluxograma criado no software Knime⁴⁹, usando todos os 9 *fingerprints* gerados pelos descritores de PaDEL⁵⁰. A partir dos resultados, verificou-se qual *fingerprint* possuía os melhores resultados por meio da análise do Coeficiente de Correlação de Mathews (MCC - *Matthews correlation coefficient*), associado a validação cruzada (CV), uma métrica denominada de cvMCC.⁵¹ A partir do melhor *fingerprint*, avaliou-se qual o valor de *minNrec* (um parâmetro associado a construção de modelos) levava ao melhor modelo dentro do *fingerprint*. A partir do melhor resultado, uma árvore de decisão desse modelo foi analisada e interpretada estruturalmente.

Para entender melhor o domínio de aplicabilidade do modelo gerado, usou-se como métrica o coeficiente de Tanimoto⁵², analisando a média do grau de similaridade entre o grupo de treino e o grupo de teste.

3.2.4. DOCKING MOLECULAR

O *docking* molecular é um método de simulação de dinâmica molecular clássica simplificado utilizado para descrever a interação molecular. Nesse método, o modelo de reconhecimento molecular chave-fechadura é empregado^{53,54}. Dessa forma, as coordenadas do receptor são mantidas fixas, e poses distintas dos ligantes são avaliadas⁵⁴.

Existem muitos softwares que podem ser usados para os cálculos de *docking* molecular, tais como Autodock Vina⁵⁵, Gold⁵⁶, dentre outros. O *docking* molecular pode ser usado em metodologias como: identificação de ligantes, otimização de protótipos de fármacos, estudos de mecanismos enzimáticos, predições de sítios ativos, dentre outros^{54,57}. Cada algoritmo possui seu próprio modo de operar, no entanto o princípio lógico de todos é semelhante, esse princípio, diz respeito a utilizar uma função *score* para calcular a energia de interação entre a proteína e o ligante. A partir da variação espacial e conformacional do ligante, obtém-se diferentes valores de energia relacionados a diferentes posições, o algoritmo tenta então escolher as posições e conformações do ligante que estejam associadas a formação do complexo de menor energia⁵⁸. No algoritmo Gold, por exemplo, usa-se a seguinte função *score*⁵⁹, descrita pela Equação 1:

$$Gold_Score = S_{HB_ext} + S_{vdw_ext} + S_{HB_int} + \Delta S_{vdw_int} , \quad (1)$$

onde, S_{HB_ext} é uma função da energia entre as ligações de hidrogênio entre proteína e o ligante; S_{vdw_ext} , é a função da interações de Van der Waals entra a proteína e o ligante; S_{HB_int} é a função da energia entre as ligações de hidrogênio intramoleculares do ligante; e ΔS_{vdw_int} é a função de energia da tensão intramolecular no ligante.

A técnica de *docking* molecular foi empregada para estudar se os compostos dos grupos selecionados seriam capazes de adentrar no sítio catalítico, conseguindo a aproximação adequada para interagir com o nitrogênio do dopaminium e com os resíduos de aminoácidos de Asp141 e Glu110. A partir da preparação da estrutura da enzima TfNCS com código 5NON, descrita no tópico **3.2.2**, editou-se o arquivo por meio do software PyMOL⁶⁰, de modo a eliminar todas as moléculas de água. Na estrutura 5NON, a TfNCS foi co-cristalizada com um composto sintetizado e análogo a um dos estados de transição. A partir das coordenadas originais desse composto (ilustrado na Figura 5), modelou-se as coordenadas do dopaminium através de edição manual. A estrutura molecular do dopaminium foi então otimizada usando o software PyMol⁶⁰.

As simulações de *docking* molecular com aldeídos e cetonas foram realizadas com a estrutura da TfNCS ligada ao cátion dopaminium. Para isso, converteu-se os arquivos dos ligantes para formato .mol2 por meio do software Discovery Studio⁴⁸, então usou-se o software GOLD⁵⁶ para as simulações de *docking* molecular. O *docking* foi feito selecionando as coordenadas espaciais do átomo de nitrogênio do dopaminium, como ponto de ancoragem, utilizando para isso a função GoldScore com 200% de eficiência do algoritmo genético.

Os resultados das simulações de *docking* molecular foram analisados com o programa Chimera versão 1.13.1⁶¹. As posições resultantes do *docking* foram sobrepostas pela estrutura do alvo, gerada no tópico **3.2.2**, então removeu-se essas posições, deixando apenas uma das estruturas que se aproximaram do dopaminium. O arquivo então foi salvo no formato .pdb. A partir dessas “estruturas *holo*”, foi calculada a distância entre o nitrogênio e o carbono, de acordo com o retratado pela Figura 12.

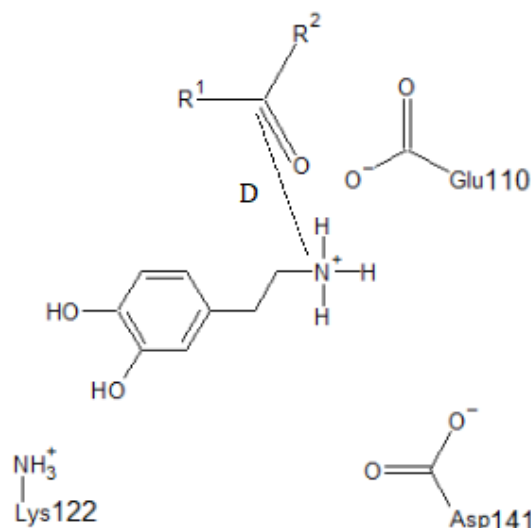


Figura 12 – Distância entre o cátion dopaminium e os compostos carbonílicos utilizada para avaliar os resultados das simulações de docking molecular.

3.2.5. DINÂMICA MOLECULAR

A dinâmica molecular (DM) é uma técnica computacional capaz de revelar como as proteínas e seus ligantes se comportam em questões espaciais, interacionais e temporais. Essa técnica pode servir como um microscópio computacional, revelando como acontecem fenômenos bioquímicos, como por exemplo: o transporte entre membranas⁶², regulações e mecanismos enzimáticos⁶², dentre outros⁶².

A dinâmica molecular tem sido muito usada para a compreensão dos mecanismos conformacionais envolvidos em biomoléculas e seus respectivos complexos, sendo utilizada no planejamento racional de fármacos⁶³. Um dos muitos exemplos de seu uso foi no planejamento de inibidores do vírus HIV-1⁶³.

Essa técnica considera que todo átomo que constitui o sistema de estudo, interage com todos os outros átomos do sistema, estando sujeito a forças eletrostáticas tridimensionais, fazendo com que esses átomos se movam, experimentando então mudanças conformacionais e translacionais. Um conjunto de todas as interações entre as partículas é chamado de campo de força⁶³. O campo de força empírico é uma função que calcula a energia potencial total do sistema. A partir do sistema inicial, é calculada toda energia potencial do sistema,

sendo calculado pelo somatório das energias represadas em cada átomo do conjunto⁶³, como descrito pela Equação 2.

$$V(r) = \sum E_{est} + \sum E_{def} + \sum E_{tor} + \sum E_{Van} + \sum E_{eletro} , \quad (2)$$

em que $V(r)$ é o campo de força, $\sum E_{est}$ a energia de estiramento em relação ao valor ideal, $\sum E_{def}$ é a energia de deformação do ângulo de ligação em relação ao valor ideal, $\sum E_{tor}$ é a energia de torção em torno de uma ligação em relação ao valor ideal, $\sum E_{Van}$ é a energia de Van der Waals e $\sum E_{eletro}$ as energias de atração e repulsão entre duas cargas⁶³.

A evolução temporal da dinâmica ocorre segundo a Equação 3.

$$F_i = m_i a_i \rightarrow F_i = -\frac{\partial V(r_i)}{\partial r_i} \rightarrow -\frac{\partial V(r_i)}{\partial r_i} = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} , \quad (3)$$

A integração na Equação 3 em relação ao tempo fornece as velocidades, e uma segunda integração em relação ao tempo fornece as posições dos átomos. Assim por cálculos sucessivos, consegue-se construir uma trajetória da simulação. Esses cálculos dependem do passo do tempo (t)⁶⁴. De modo geral o princípio da dinâmica molecular pode ser resumido na Figura 13.

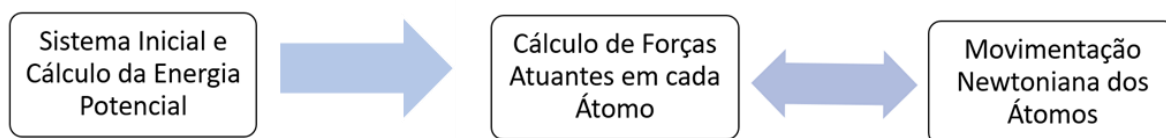


Figura 13 – Princípio da Dinâmica Molecular.

A técnica de DM foi usada para investigar o fenômeno da aproximação adequada do grupo carbonila dos aldeídos e cetonas ao átomo de nitrogênio da

dopamina, responsável pelo ataque nucleofílico e a formação da ligação N – C, na reação de Pictet–Spengler. Os parâmetros monitorados durante as simulações foram: (1) A distância entre o nitrogênio da dopamina e o carbono da carbonila (Distância N – C (Å) x Tempo (ns)) ; e (2) um perfil do ângulo desse ataque (Ângulo N – C – O (°) x Tempo (ns)).

A partir dos arquivos *holo*, produzidos pela metodologia descrita na seção **3.2.4**, o arquivo resultante teve os hidrogênios removidos utilizando o pacote Amber 14⁶⁵. Após isso, utilizando-se o pacote Amber 14, determinou-se todos os estados de protonação dos resíduos, e adicionou-se os hidrogênios. Para definir os estados de protonação das histidinas, usou-se a plataforma Propka^{66,67}. Então editou-se os estados de protonação das histidinas e os estados de protonação do sítio catalítico, de modo a reproduzir os estados descritos na proposta de mecanismo via cálculo quântico²² descrita na Figura 6, no Intermediário 1. Após essas edições, editou-se o cátion dopaminium, de forma a transformá-lo em uma dopamina, os arquivos então foram salvos, para cada um dos arquivos, seguiu-se o seguinte protocolo: todos os cálculos da dinâmica foram realizados com o campo de força ff14SB⁶⁸. As estruturas foram solvatadas em uma caixa retangular com moléculas de água, com todas as moléculas afastadas a pelo menos 10 Å, íons de Cl⁻ foram adicionados ao sistema para neutralizar a rede de carga⁶⁹. Buscando remover contatos desfavoráveis produzidos durante o processo de solvatação das proteínas, uma primeira minimização foi feita em 5000 passos: 1000 passos usando o algoritmo *steepest descent* e 4000 passos usando gradiente conjugado⁷⁰ com restrição potencial de 100 kcal mol⁻¹ Å⁻² na estrutura de toda proteína e dos ligantes⁷¹. Uma segunda etapa de minimização foi realizada em 5000 passos, porém com nenhuma restrição no sistema: 1000 passos usando o algoritmo *steepest descents*⁷² e 4000 passos usando gradiente conjugado.

Após essa segunda minimização, o sistema foi aquecido de 5 K até 300 K, por meio do procedimento de aquecimento em um *ensemble* NVT. Para isso foi feito um procedimento em 6 passos, onde para cada passo, alterna-se uma etapa de aquecimento e outra de relaxamento, sendo: um aquecimento (simulação de tempo de 10 ps e variação de temperatura de 50K) seguido de um relaxamento (simulação de tempo de 100 ps). Após esse procedimento o sistema

foi equilibrado durante 5000 ps. O termostato de Langevin^{73,74} foi usado para ligações não covalentes utilizando taxas de colisão de $2,0 \text{ ps}^{-1}$ e *cutoff* de 10 Å. As interações eletrostáticas de longo alcance foram modeladas usando o método de PME (*Particle Mesh Ewald*)⁷⁵.

A etapa da produção da dinâmica molecular envolveu a utilização do procedimento *ensemble* NPT nas condições de 300 K e 1 bar, empregando-se o barostato isotrópico de Berendsen⁷⁶ com uma constante de acoplamento de 1,0 ps e utilizando condições periódicas de contorno. O algoritmo SHAKE⁷⁷ foi utilizado nas simulações NVT e NPT para restringir as ligações envolvendo átomos de hidrogênio, para se diminuir as frequências de auto movimento. As produções das dinâmicas moleculares foram computadas realizando 100 ns de tempo de simulação para cada sistema. Todas as coordenadas foram salvas a cada 4 fs, gerando 25000 *frames* por simulação. Para analisar dos resultados usou-se o pacote cpptraj⁷⁸ e *scripts* desenvolvidos pelo próprio grupo em linguagem de programação de Python 3⁷⁹.

3.2.6. CÁLCULO DE ORBITAIS DE FRONTEIRA

A teoria dos orbitais de fronteira baseia-se nos cálculos referentes aos orbitais moleculares de uma estrutura e como esses orbitais se relacionariam com orbitais moleculares de outras estruturas⁸⁰.

O cálculo de orbitais de fronteira é uma metodologia baseada na teoria ácido-base, associada ao cálculo computacional de propriedades quânticas das estruturas químicas⁸¹. Esse tipo de cálculo quântico baseia-se na sobreposição de orbitais moleculares, e pode ser usado para calcular várias propriedades químicas, tais como a reatividade absoluta, a reatividade relativa (preferência reacional), a quimiosseletividade, a regioseletividade, a estereosseletividade e a reversibilidade⁸².

O desenvolvimento desse método iniciou-se com os estudos da relação entre a diferença de energia HOMO – LUMO de substâncias aromáticas e suas respectivas reatividades, sendo inicialmente proposto por Fukui⁸³. Nesse estudo, percebeu-se que a densidade eletrônica dos orbitais HOMO (*Highest Occupied*

Molecular Orbital) estava relacionada à reatividade. Dessa forma, seria possível prever quais átomos estariam mais susceptíveis a substituições eletrofílicas. Essa teoria foi aprofundada, dando origem ao cálculo de orbitais de fronteira, o que rendeu o Prêmio Nobel de Química a Fukui em 1981.

A partir da evolução desses estudos, dos conceitos de dureza e maciez, do cálculo de DFT (*Density functional theory*) e da utilização dos diferentes tipos de funcionais, a técnica do cálculo de orbitais de fronteira tem sido muito empregada para explicar e prever propriedades de estruturas como por exemplo: nucleofilicidade, eletrofilicidade, eletronegatividade, dentre outras⁸⁴. Uma das aplicações dessa técnica, é a obtenção de descritores locais em moléculas, isto é, a obtenção de propriedades eletrônicas relativas a átomos específicos da molécula, de modo a tentar explicar a reatividade observada para diversos compostos, incluindo compostos carbonílicos^{85,86}. No cálculo desses descritores locais, a função que descreve a habilidade de aceitar ou doar elétrons é descrita pela função de Fukui^{85,86}, expressa pela Equação 4.

$$f(r) = \left(\frac{\delta \rho(r)}{\delta N} \right)_{v(r)}, \quad (4)$$

onde valores altos de $f(r)$ estão relacionados à alta reatividade na coordenada r , $\rho(r)$ é a densidade eletrônica e N é o número de elétrons. A partir da Equação 4, obtém-se 2 definições das funções de Fukui⁸⁷, descritas pelas Equações 5 e 6.

$$f^+(r) = \left(\frac{\delta \rho(r)}{\delta N} \right)_{v(r)}^+ = \rho_{N+1}(r) - \rho_N(r), \quad (5)$$

$$f^-(r) = \left(\frac{\delta \rho(r)}{\delta N} \right)_{v(r)}^- = \rho_N(r) - \rho_{N-1}(r), \quad (6)$$

onde ρ_N é a densidade eletrônica com N elétrons na coordenada r , ρ_{N-1} é a densidade eletrônica do sistema com N-1 elétrons na coordenada r e ρ_{N+1} é a densidade eletrônica do sistema com N+1 elétrons na coordenada r . O coeficiente local f^+ está relacionado a reatividade para um ataque nucleofílico e f^- está relacionado a reatividade para um ataque eletrofílico⁸⁸. Além desses coeficientes, existem outros, como por exemplo o descritor dual^{85,86}, que é calculado a partir dos descritores de Fukui, a equação que descreve esse descritor está apresentada na Equação 7.

$$f(r)^{(2)} = f^+(r) - f^-(r). \quad (7)$$

Se $f(r)^{(2)} > 0$, a região local possui natureza eletrofílica e se $f(r)^{(2)} < 0$, a região local possui natureza nucleofílica.

Nesse trabalho, a técnica do cálculo de orbital de fronteiras foi empregada visando estudar a correlação entre a reatividade local no grupo carbonila de aldeídos e cetonas e a atividade da enzima *TNCS* na catálise das reações de Pictet–Spengler. Assim, essa técnica foi usada nos grupos selecionados visando correlacionar o caráter eletrofílico com a atividade catalítica.

As estruturas químicas dos aldeídos e cetonas dos grupos selecionados foram otimizadas utilizando o software Gaussian 09⁸⁹, usando formalismo quântico. Os cálculos de otimização e frequência das geometrias das estruturas foram realizados utilizando-se o funcional B3LYP e as funções de base 6-31G(d,p) para todos os átomos dos sistemas. A inclusão do efeito solvente implícito foi realizada utilizando-se o método de solvatação contínuo polarizável⁹⁰. Os cálculos de otimização e obtenção das frequências vibracionais foram realizados na presença de solvente implícito, considerando a água como solvente. A partir desse cálculo quântico, obteve-se 2 arquivos para cada molécula: um arquivo .fch e um arquivo .log⁹¹.

Utilizou-se os arquivos .log e .fch, como arquivos de entrada no software UCA_FUKUI⁹¹, no qual, calculou-se os valores dos coeficientes f^+ e dual para

cada átomo da molécula, selecionando assim o átomo de carbono referente a carbonila.

3.2.7. BUSCA POR SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

A partir do código smiles da estrutura da norcoclaurina, utilizou-se a plataforma *Pubchem* em uma busca manual. Essa busca manual visou identificar tetrahydroisoquinolinas com estruturas similares a norcoclaurina, com atividade biológica conhecida, cujos aldeídos precursores pudessem ser utilizados em reações de Pictet–Spengler, catalisada pela enzima *TfNCS*. A partir das buscas, identificou-se quatro tetrahydroisoquinolinas, então analisou-se as possibilidades da viabilização dessas reações em relação aos resultados do trabalho.

4. RESULTADOS

4.1 PARTE EXPERIMENTAL

4.1.1 EXPRESSÃO ENZIMÁTICA

A produção via expressão heteróloga da enzima *TfNCS*, pura e com atividade catalítica comprovada é uma etapa crucial desse trabalho. Nessa etapa, buscou-se implementar um protocolo de expressão e purificação da enzima. Após as etapas de expressão descritas na seção de materiais e métodos, realizou-se a primeira etapa de purificação por cromatografia de afinidade a níquel. O cromatograma obtido, e a análise das frações de volumes destacadas, e avaliadas por gel de eletroforese de poliacrilamida, com SDS, estão apresentadas nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

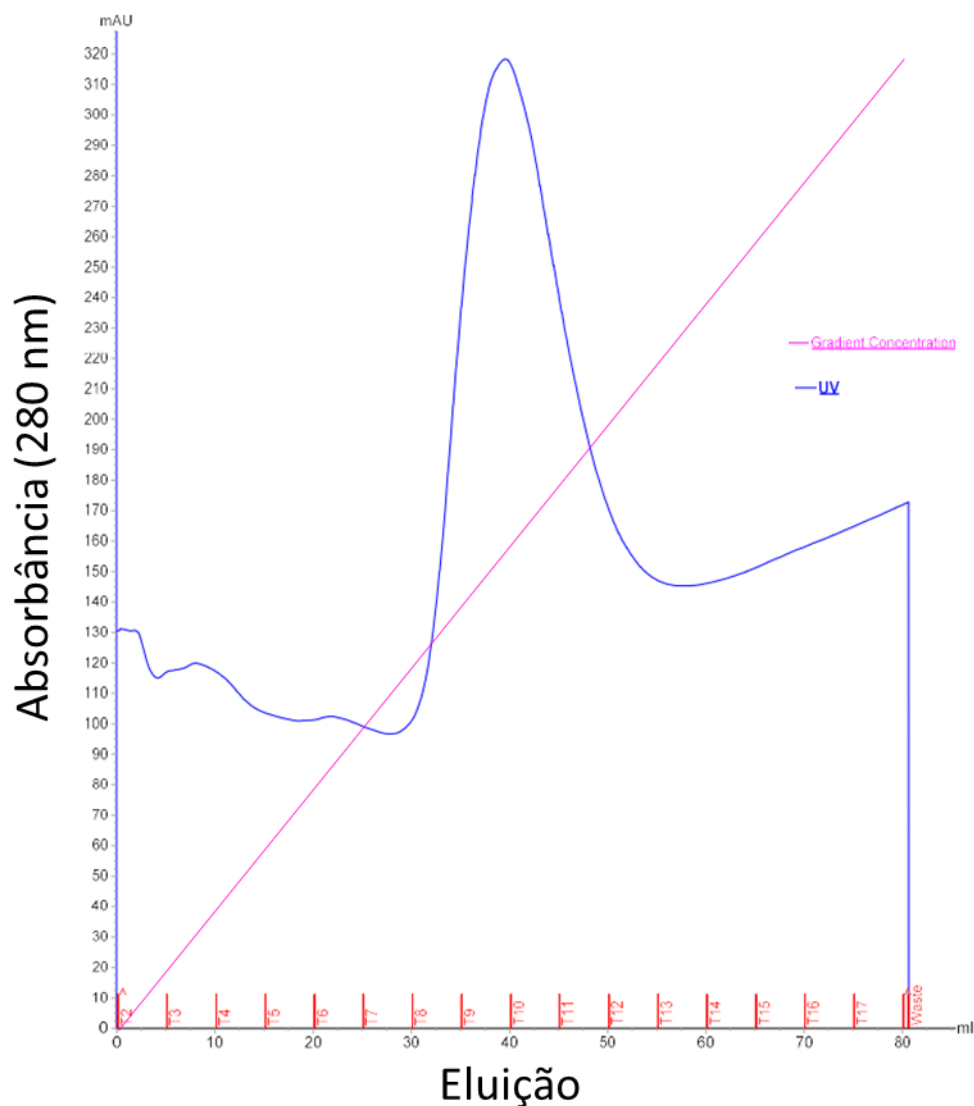


Figura 14 – Cromatograma de purificação da TfNCS recombinante via cromatografia de afinidade a Ni^{2+} , por coluna HisTrap HP. A linha azul representa a absorbância no comprimento de onda de 280 nm, a linha rosa representa o aumento da concentração de imidazol ao longo da eluição, variando a concentração do eluente de 10 mM até 500 mM.

A partir do gradiente de imidazol, observa-se uma grande absorção no comprimento de 280 nm, indicando a eluição da TfNCS recombinante. Observou-se uma banda cromatográfica entre os volumes de eluição de 30 mL a 50 mL, nas frações T8, T9, T10 e T11, na Figura 14.

O centro da banda foi identificado com aproximadamente 50% de razão v/v da solução B. A partir da eletroforese em gel das frações T8, T9, T10 e T11, ilustrada na Figura 15, confirmou-se a presença de *TfNCS* detectada no cromatograma. A partir da eletroforese em gel de poliacrilamida 15% SDS das frações T8, T9, T10 e T11 (Figura 14), apresentada na Figura 15, confirmou-se a presença de *TfNCS* detectada no cromatograma.

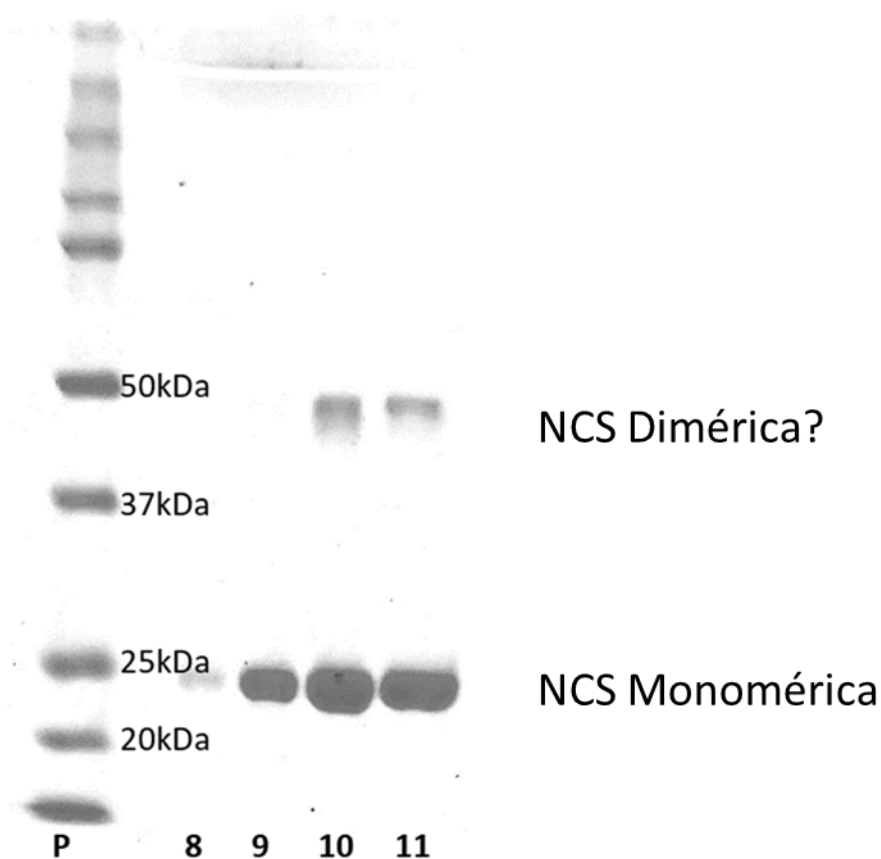


Figura 15 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%SDS das bandas cromatográficas observadas na primeira etapa de purificação via cromatografia de afinidade. Da esquerda para a direita são apresentados os resultados das frações: padrão das massas moleculares, T8, T9, T10; e T11.

A partir do gel, é possível entender melhor o cromatograma da Figura 14. Na fração T8, começa a se observar a eluição da *TfNCS* recombinante, isso é confirmado pelo aparecimento de uma banda pouco intensa em torno de 25 kDa. Na fração T9, a *TfNCS* recombinante apresenta uma banda mais intensa,

indicando maior concentração da enzima nessa fração. Nas frações T10 e T11 a banda em torno de 25 kDa é muito mais intensa, no entanto, percebe-se a presença de uma banda próxima de 50 kDa, que seria compatível com um dímero da TfNCS.

As alíquotas T8,T9,T10 e T11 - foram agrupadas em uma única solução. Essa solução então seguiu para a segunda etapa do processo de purificação: a cromatografia por exclusão molecular. Essa etapa foi realizada visando a separação do suposto dímero e a troca de tampão. O cromatograma obtido via cromatografia de exclusão molecular da TfNCS está apresentado na Figura 16.

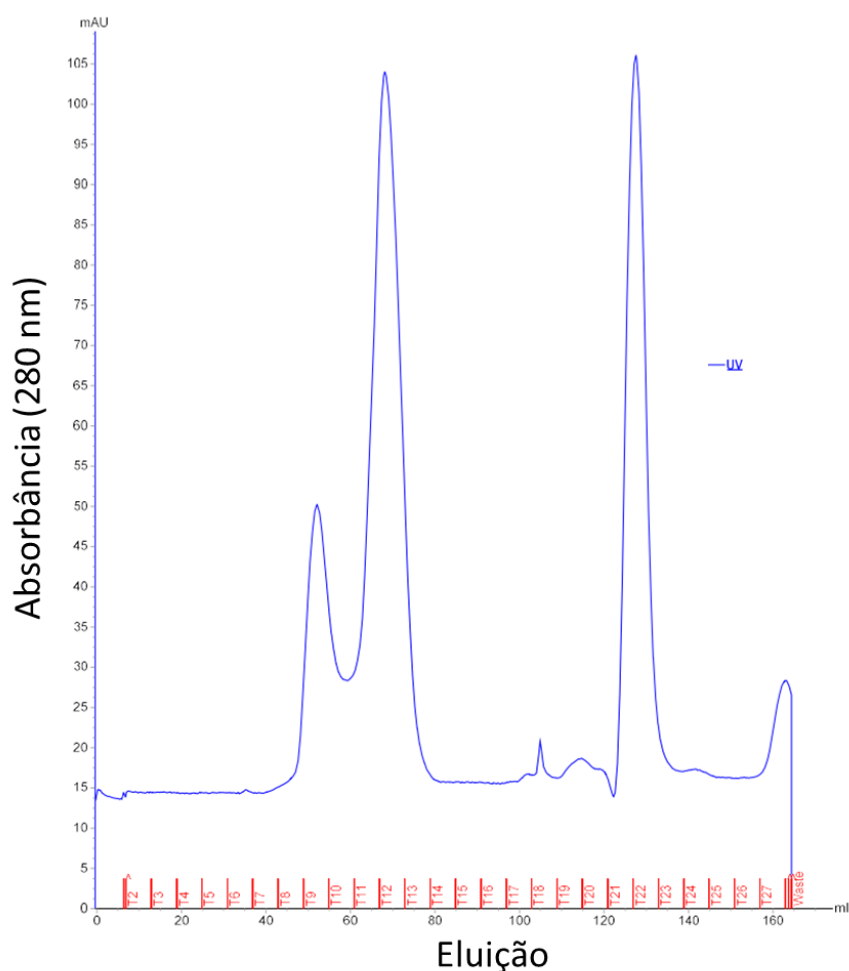


Figura 16 – Cromatograma de purificação da TfNCS recombinante via cromatografia por exclusão molecular por coluna Hiloal Superdex 16/600 (GE Healthcare, EUA) usando como eluente aproximadamente 163 mL de uma solução tampão pH 7, 50 mM HEPES, 100 mM NaCl e 2mM deDTT (solução C). A linha azul representa a absorção no comprimento de onda de 280 nm.

A partir do cromatograma, pode-se observar 4 bandas: a menor entre as frações T9 e T10; a segunda entre T11 e T12; a terceira em T22; e a quarta em T27, essas alíquotas foram recolhidas. A partir delas, foi feita uma análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% SDS para confirmar o grau de pureza das amostras e também para identificar a presença de frações da TfnCS monomérica (Figura 17).

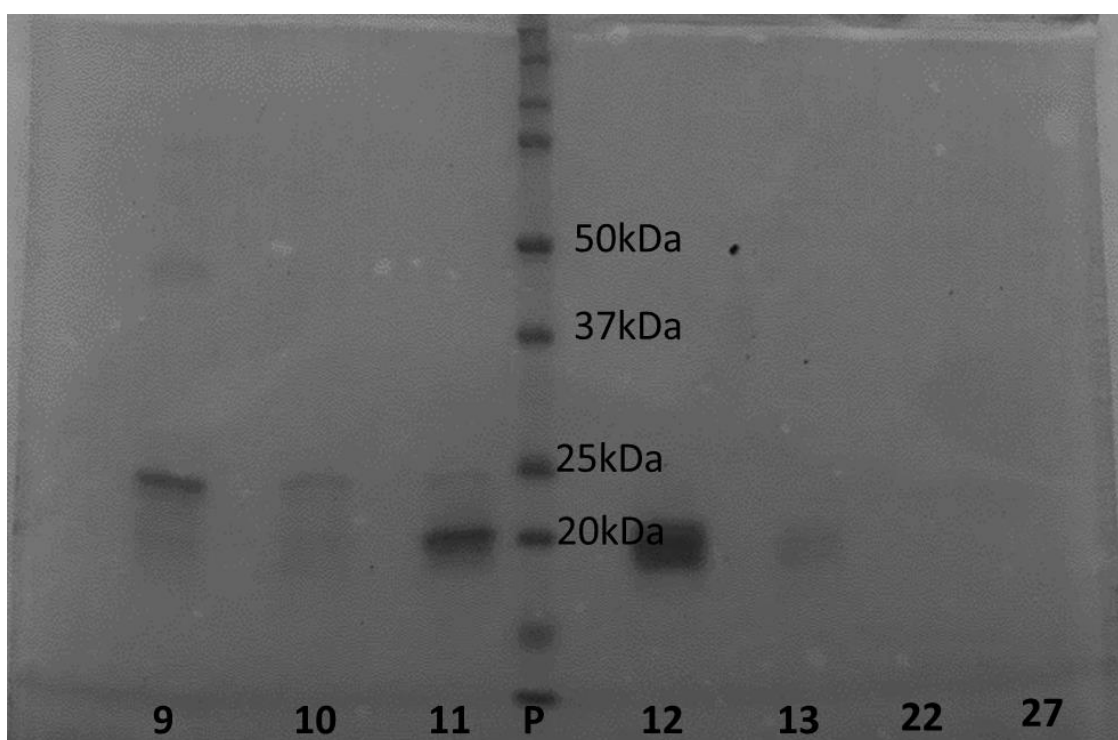


Figura 17 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%SDS das bandas cromatográficas observadas na segunda etapa de purificação via exclusão molecular. Da esquerda para a direita são apresentados os resultados das frações T9; T10; T11; o padrão de massas moleculares ; T12; T13; T22; e T27.

A partir do gel, confirmou-se a presença de TfnCS detectada no cromatograma nas frações 11, 12 e 13, sem observar a presença do suposto dímero. As frações 9 e 10 apresentaram resultados não conclusivos, já que se obteve bandas com baixa resolução. Uma banda pouco intensa compatível com massa molar de aproximadamente 50 kDa foi observada na banda 9. Apesar da baixa resolução, o volume de eluição observado para as frações 9 e 10 sugerem a presença de dímeros covalentes e/ou não covalentes.

As amostras das frações T11, T12 e T13 foram então agrupadas, e concentradas até a concentração final de ~ 70 μ M.

4.1.2. ENSAIO DE ATIVIDADE POR RMN

Nessa etapa os dois principais objetivos foram avaliar a atividade da enzima *TNCS* recombinante produzida seguindo o protocolo descrito no tópico **4.1.1**, purificada e estabelecer um protocolo para o monitoramento da reação de Pictet-Spengler catalisada pela enzima.

Para realizar o estudo de espectroscopia de RMN em um ensaio de atividade enzimática é necessário identificar todos os sinais de RMN da solução reacional composta por: 5 mM de ácido ascórbico, 50 mM de tampão HEPES, 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM do aldeído utilizado, todos esses espectros foram feitos em meio aquoso com 10% D₂O e 10% DMSO. Para isso, adquiriu-se espectros de RMN de ¹H de cada componente presente no meio reacional, isto é: HEPES, ácido ascórbico e dopamina. Os espectros e os seus respectivos assinalamentos dos compostos: HEPES⁹², ácido ascórbico⁹³ e dopamina⁹⁴ estão apresentados nas Figuras 18, 19 e 20, respectivamente.

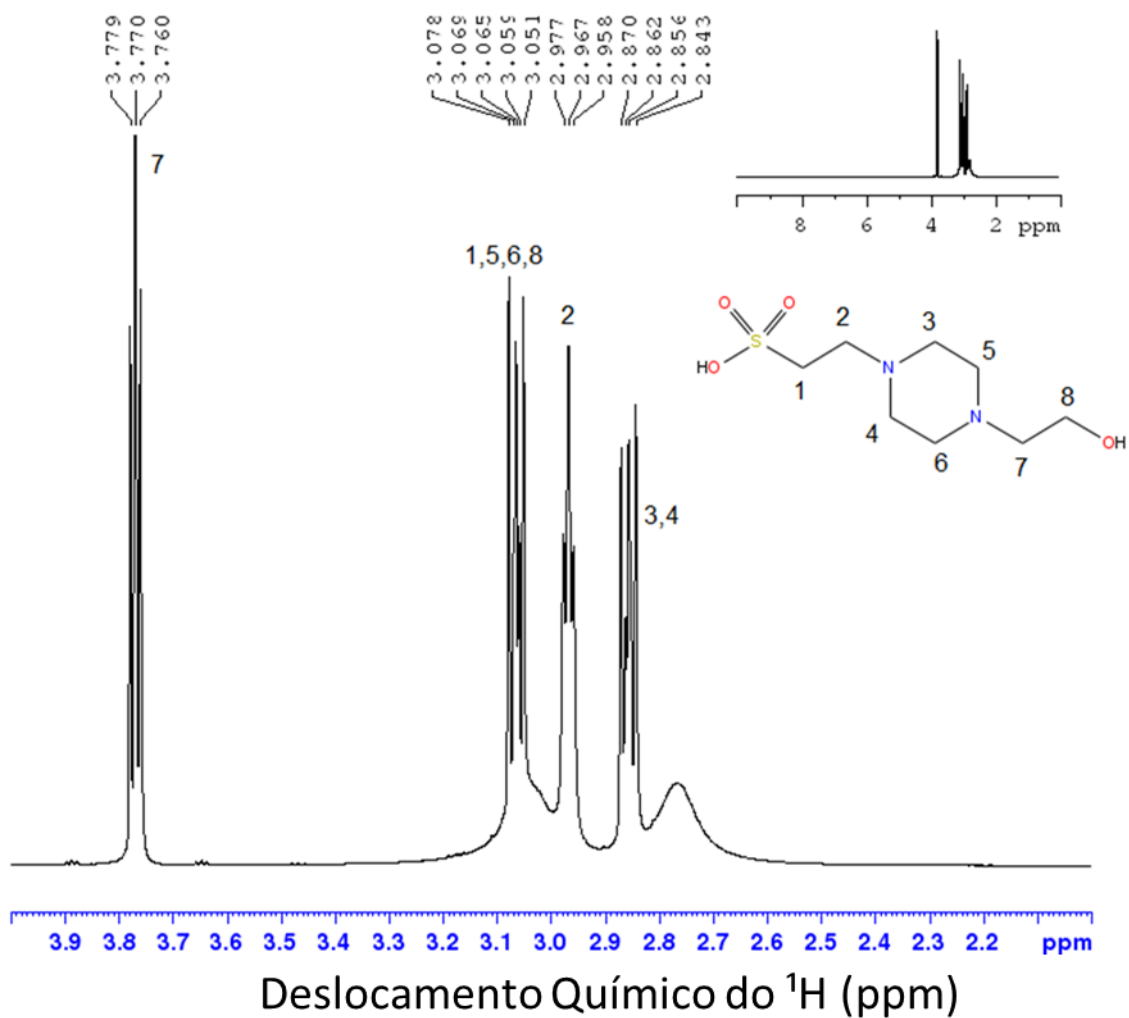


Figura 18 – Espectro de RMN de ^1H de 50 mM de tampão HEPES pH 7 com 10% v/v de D_2O . O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker 600 MHz Avance Neo. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp.

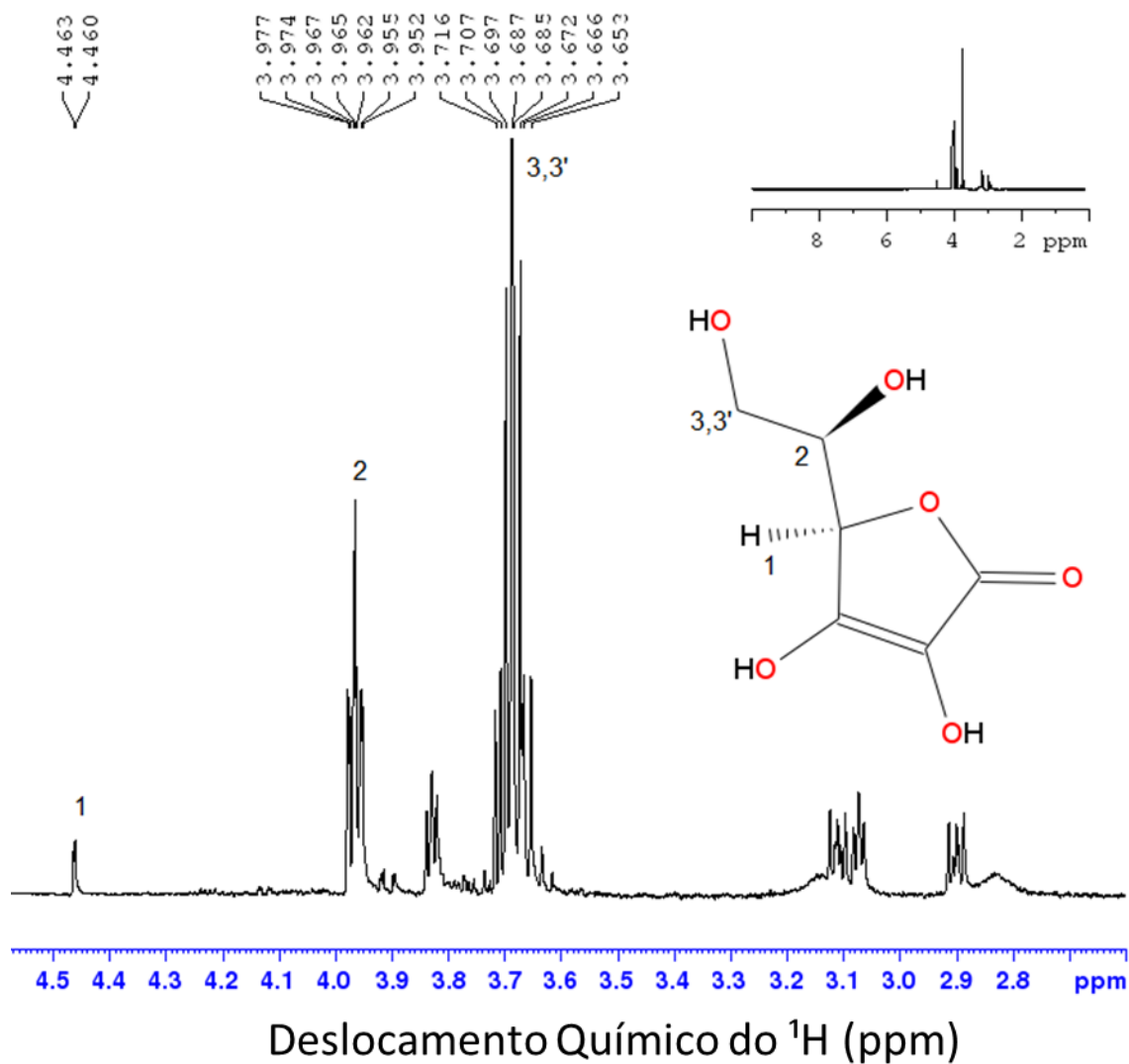


Figura 19 – Espectro de RMN de ^1H de 5 mM de ácido ascórbico em solução $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} = 90/10\%$ v/v. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker 600 MHz Avance Neo. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 8; número de duning scans = 4; tempo de recuperação = 1,2 s; e sequência de pulso Bruker p3919gp.

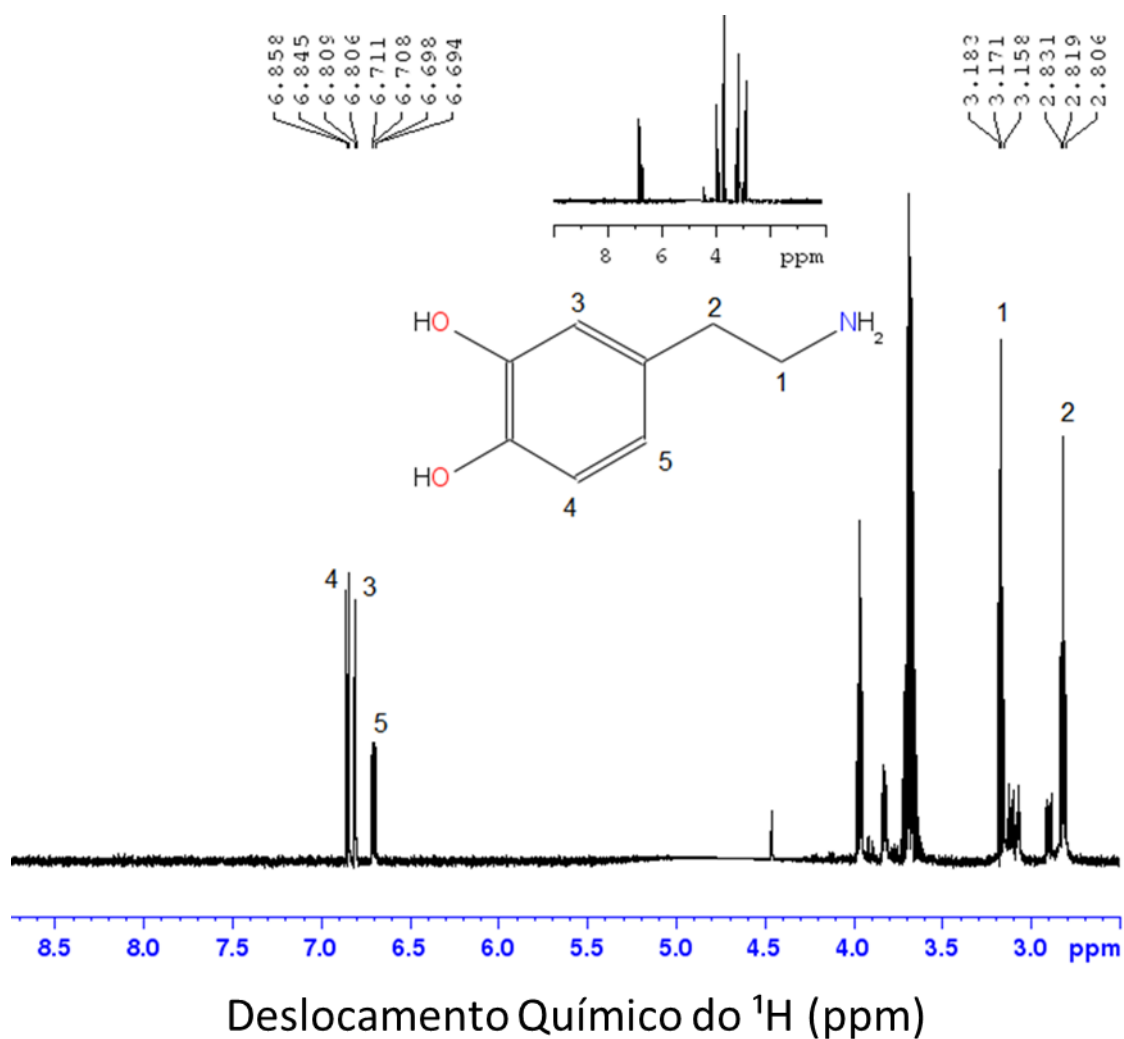


Figura 20 – Espectro de RMN de ¹H de 2,5 mM de dopamina na presença de 5mM de ácido ascórbico em solução H₂O/D₂O = 90/10 % v/v. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker 600 MHz Avance Neo. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 8; número de duning scans = 4; tempo de recuperação = 1,2s; e sequência de pulso Bruker p3919gp.

O espectro da dopamina é particularmente interessante, pois é um dos substratos da reação. Logo, espera-se uma mudança em algum dos seus sinais, em especial o sinal do hidrogênio 5, pois é necessário à sua eliminação para a formação do ciclo e a conservação da aromaticidade, como observado na Figura 6. Assim, espera-se uma mudança no sinal 5 e alterações nos sinais relativos aos núcleos de ¹H 3 e 4.

Para avaliar a atividade da enzima *TfNCS* e estabelecer o protocolo, é necessário usar um composto carbonílico com reatividade conhecida, nesse caso, optou-se pelo hexanal, que já teve o produto da reação de Pictet–Spengler catalisada pela *TfNCS* isolado e caracterizado por ^1H de RMN¹⁴. Para isso adquiriu-se um espectro do hexanal em DMSO com 10% de D_2O , realizando os assinalamentos conforme a literatura⁹⁵. Esse espectro é ilustrado na Figura 21.

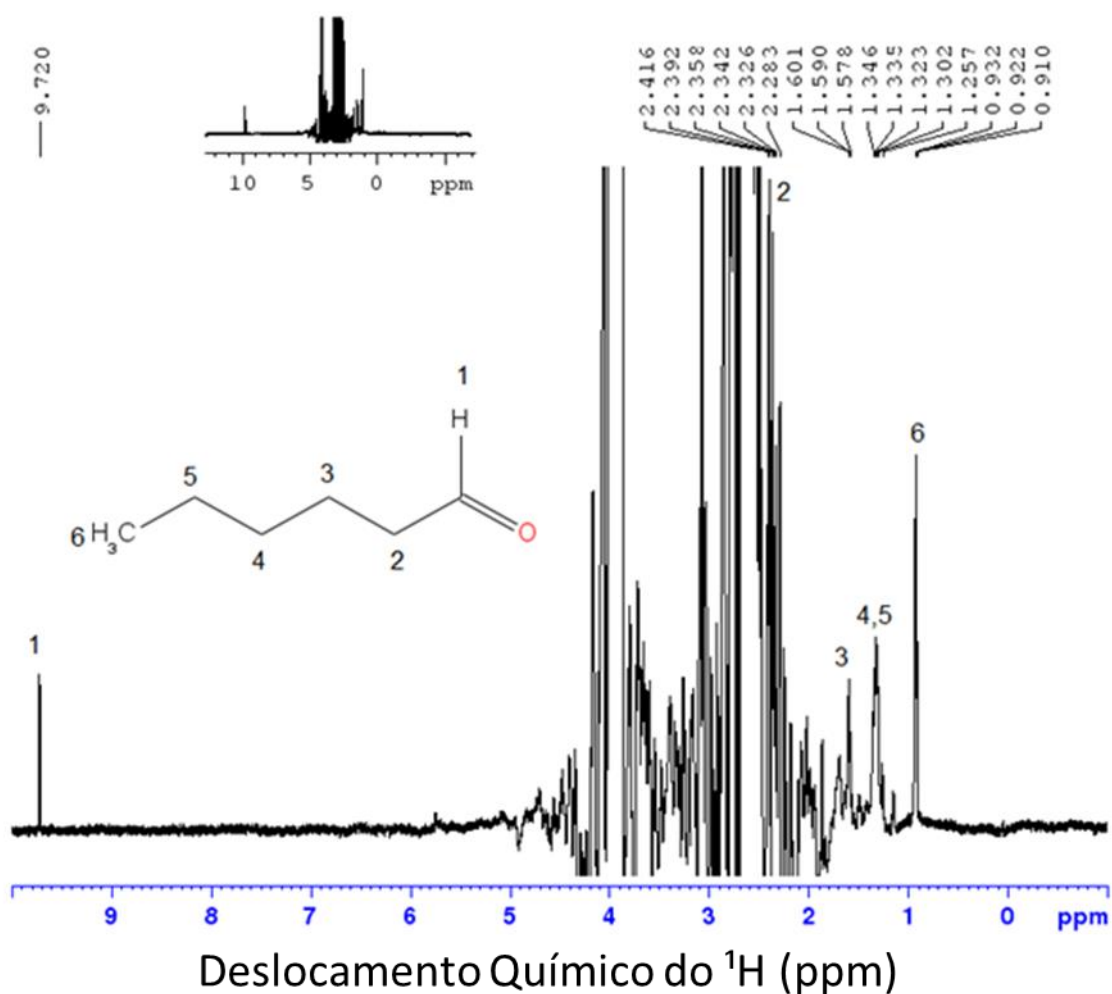


Figura 21 – Espectro de ^1H de RMN de uma solução de hexanal com 10% v/v de D_2O . O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker 600 MHz Avance Neo 600. Os parâmetros experimentais foram os seguintes: : número de scans = 8; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 30 s; e sequência de pulso Bruker noesygppr1d.

No espectro da Figura 21, pode-se visualizar um sinal na região de 9.7 ppm, que corresponde ao ^1H do aldeído. Espera-se que esse sinal diminua em função do consumo do aldeído ao decorrer da reação.

Para estabelecer o protocolo, foram realizados 2 experimentos, monitorados em 3 tempos diferentes: (1) logo após o momento da mistura; (2) 2 horas depois da mistura; (3) 1 dia após a mistura. O primeiro experimento foi feito sem a enzima (experimento controle) e o segundo foi realizado adicionando 80 $\mu\text{g/mL}$ de *TfNCS* recombinante. Assim, buscou-se entender quais as mudanças espectroscópicas realmente estão associadas a atividade enzimática e aos sinais do produto. Ambos os experimentos foram feitos em uma solução contendo 10% DMSO, e utilizando 0,13 mM de DSS como referência para a quantificação e monitoramento dos sinais principais dos 2 substratos: O sinal 1 do hexanal em 9,7 ppm; e os sinais 3, 4 e 5 da dopamina entre 6,5 e 7,0 ppm.

O monitoramento do experimento controle e do experimento com a *TfNCS* estão apresentados nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

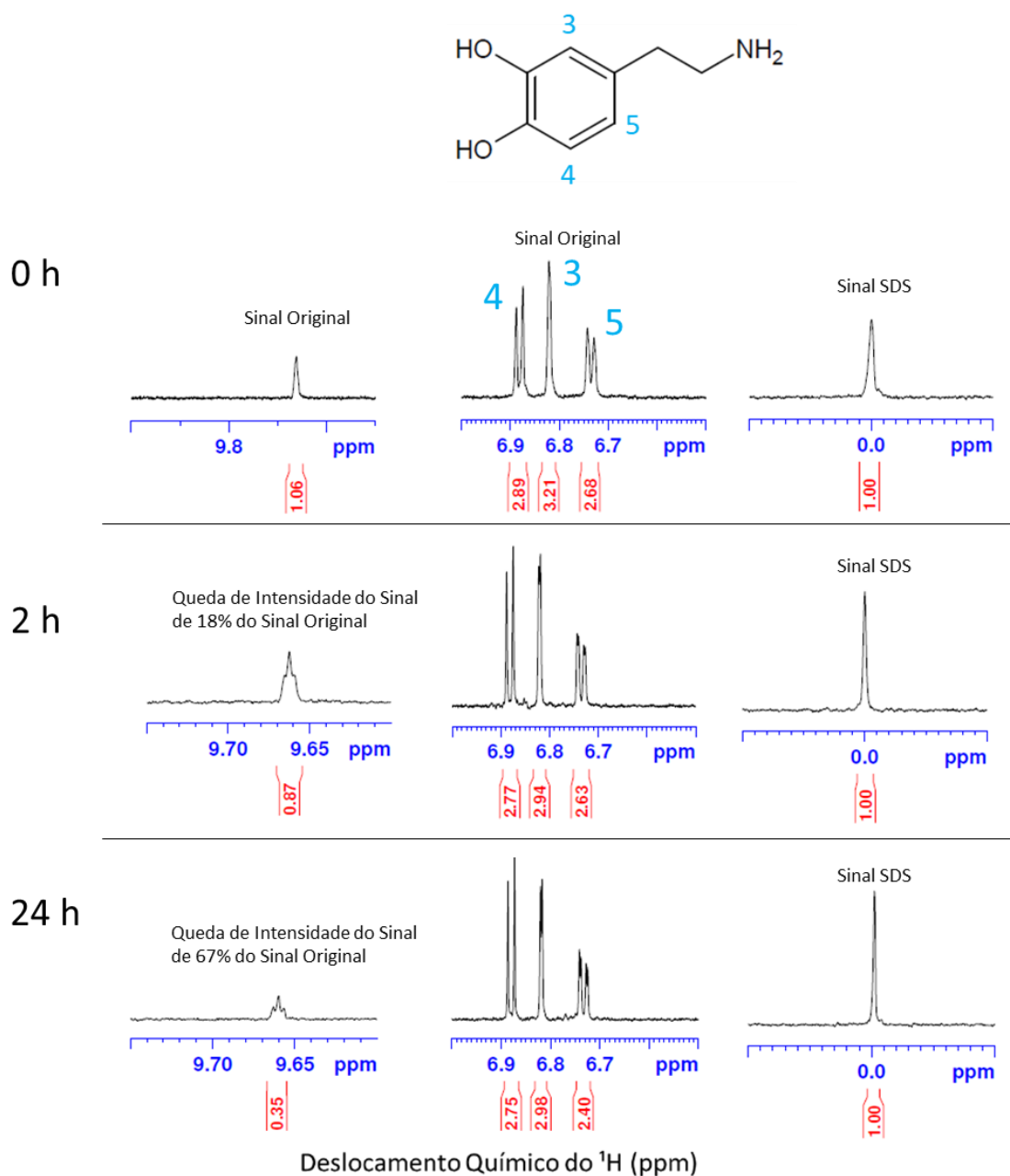


Figura 22 – Monitoramento da reação de Pictet–Spengler sem enzima (experimento controle), em solução 10% DMSO, 50 mM de HEPES, 5 mM de ácido ascórbico, 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal, ao longo de 0h, 2h e 24h, usando 0,13 mM de DSS para quantificação de sinais. O espectro foi adquirido a 310,2 K em um espectrômetro Bruker 600 MHz Avance Neo. Os parâmetros experimentais foram os seguintes: número de scans = 8; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 30 s; e sequência de pulso Bruker noesygppr1d.

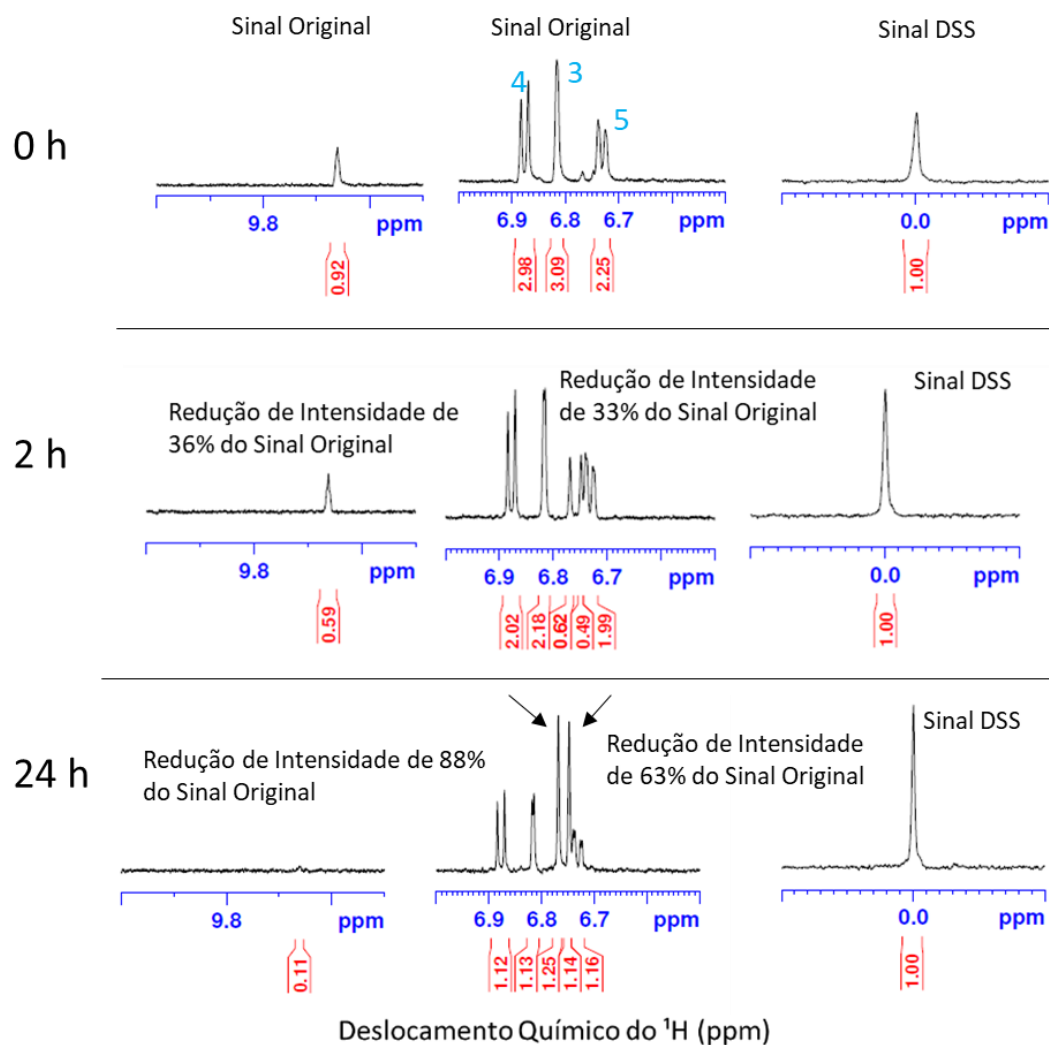


Figura 23 – Monitoramento da reação de Pictet–Spengler catalisada pela enzima TfNCS. Os ensaios foram realizados em solução contendo 10% DMSO, 50 mM de HEPES, 5 mM de ácido ascórbico, 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal e 80 $\mu\text{g/mL}$ de TfNCS recombinante, ao longo de 0h, 2h e 24h, usando 0,13 mM de DSS para quantificação de sinais. O espectro foi adquirido a 310,2 K em um Bruker 600 MHz Avance Neo. Os parâmetros experimentais foram os seguintes: número de scans = 8; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 30 s; e sequência de pulso Bruker noesygppr1d.

A partir das Figuras 22 e 23, nota-se que em ambos os casos houve uma queda para o sinal do aldeído. No entanto não houve queda do sinal para a dopamina no experimento controle. Na Figura 23, observa-se além da queda do sinal da dopamina, o aparecimento de 2 singletos: um em 6,76 ppm e outro em 6,74 ppm, sendo estes sinais apontados por duas setas na figura. Esses 2 singletos também foram observados no espectro de ^1H do produto isolado da reação com hexanal¹⁴, sendo o seu aparecimento em 6,60 ppm e 6,64 ppm.

Esses singletos entre 6,5 ppm e 7,0 ppm também são observados no isolamento dos produtos obtidos a partir da reação de Pictet–Spengler entre a dopamina e outros aldeídos¹⁷, sendo uma evidência da formação do produto da reação de Pictet–Spengler, conseqüentemente, uma evidência de atividade enzimática.

Assim, para um composto ser considerado como ativo em um ensaio biocatalítico, deve existir a queda do sinal da dopamina e o surgimento desses 2 singletos. Caso isso não ocorra o composto carbonílico será classificado como inativo. Ainda que exista o aparecimento dos 2 singletos é interessante a realização de um ensaio sem a presença de enzima (experimento controle) para a confirmação de que o fenômeno é proveniente da atividade enzimática.

A partir do protocolo de monitoramento da reação de Pictet–Spengler estabelecido para *TfNCS*, aplicou-se o mesmo procedimento para aldeídos cuja atividade biocatalítica ainda não estava estabelecida na literatura. Assim monitorou-se o comportamento do octanal, do 2-naftaldeído, do piperonal e do tereftaldeído. Os resultados dos ensaios foram descritos na Figura 24 e os espectros se encontram na seção 7.2, do Apêndice.

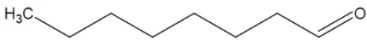
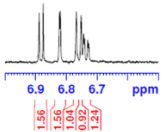
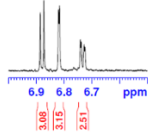
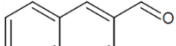
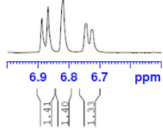
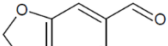
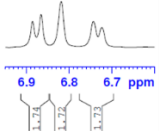
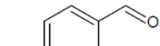
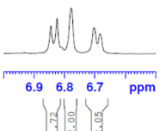
	Ensaio Enzimático (24h)	Experimento Controle (24h)	Classificação
 Octanal			Reativo
 2 - Naftaldeído		Não se Aplica	Não Reativo
 Piperonal		Não se Aplica	Não Reativo
 Tereftaldeído		Não se Aplica	Não Reativo

Figura 24 – Estrutura molecular dos aldeídos avaliados e os resultados dos ensaios de atividade da *TfNCS*.

4.2 PARTE TEÓRICA

4.2.1 CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA

A partir de uma busca na literatura, encontrou-se 49 compostos carbonílicos, para os quais a atividade catalítica da enzima TfNCS havia sido avaliada¹⁴⁻¹⁷. A partir dessas informações, construiu-se uma biblioteca de compostos com atividades conhecidas para a TfNCS. Essa biblioteca pode ser dividida em 2 sub-bibliotecas, uma de estruturas ativas e outra de estruturas inativas. Elas estão apresentadas na Figura 25 e na Figura 26, respectivamente, e seus nomes apresentados na seção 7.1 do Apêndice.

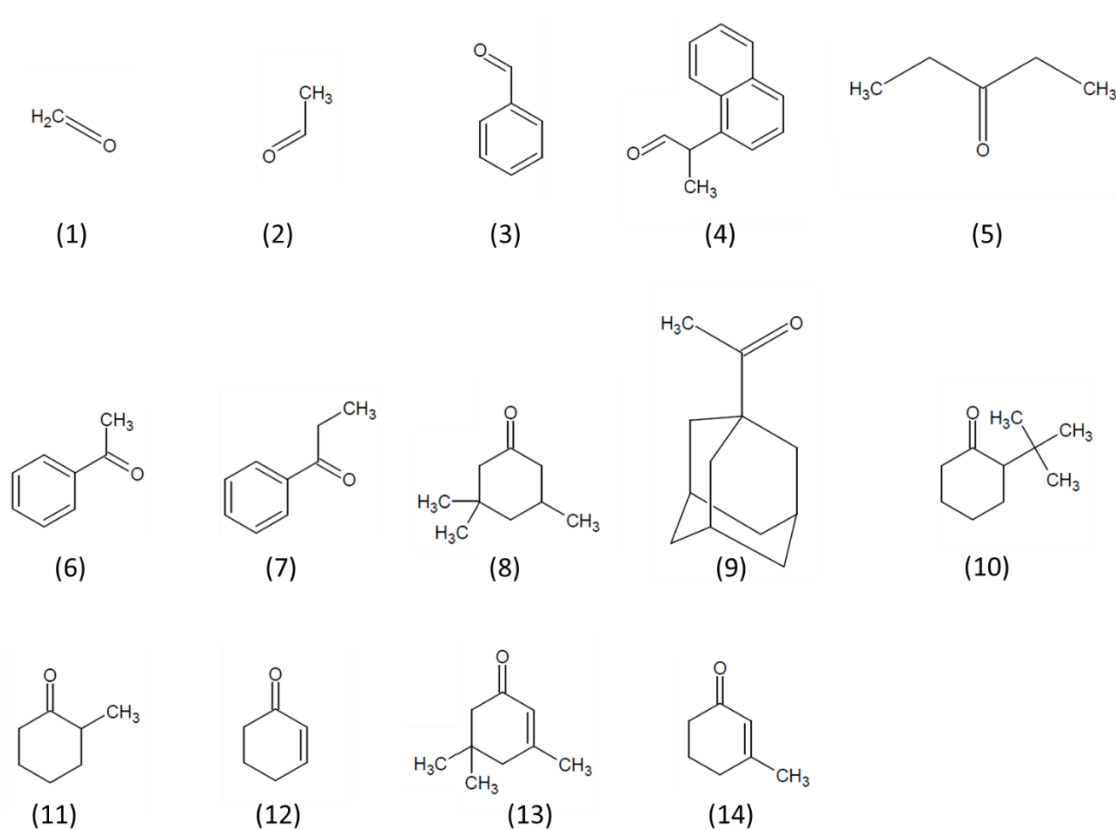
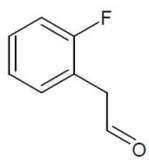
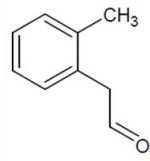


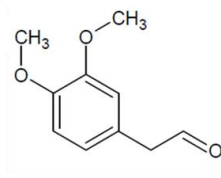
Figura 25 – Estruturas químicas de compostos identificados como não reativos em ensaios de atividade da enzima TfNCS.



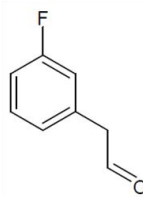
(15)



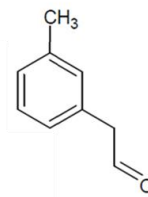
(16)



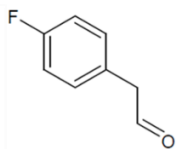
(17)



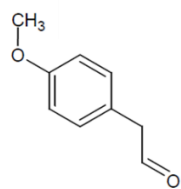
(18)



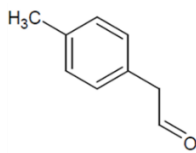
(19)



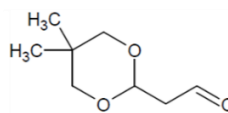
(20)



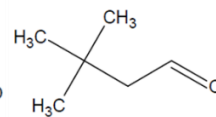
(21)



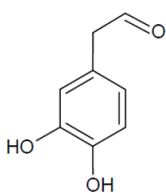
(22)



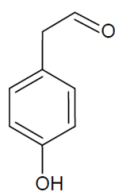
(23)



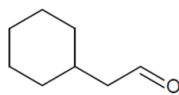
(24)



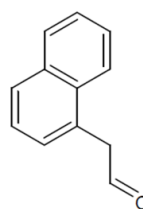
(25)



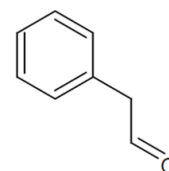
(26)



(27)



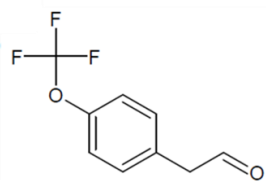
(28)



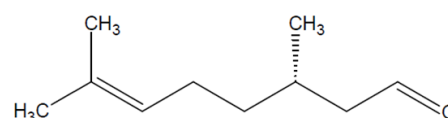
(29)



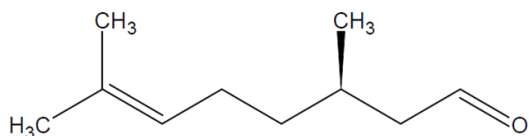
(30)



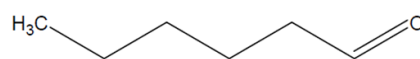
(31)



(32)



(33)



(34)

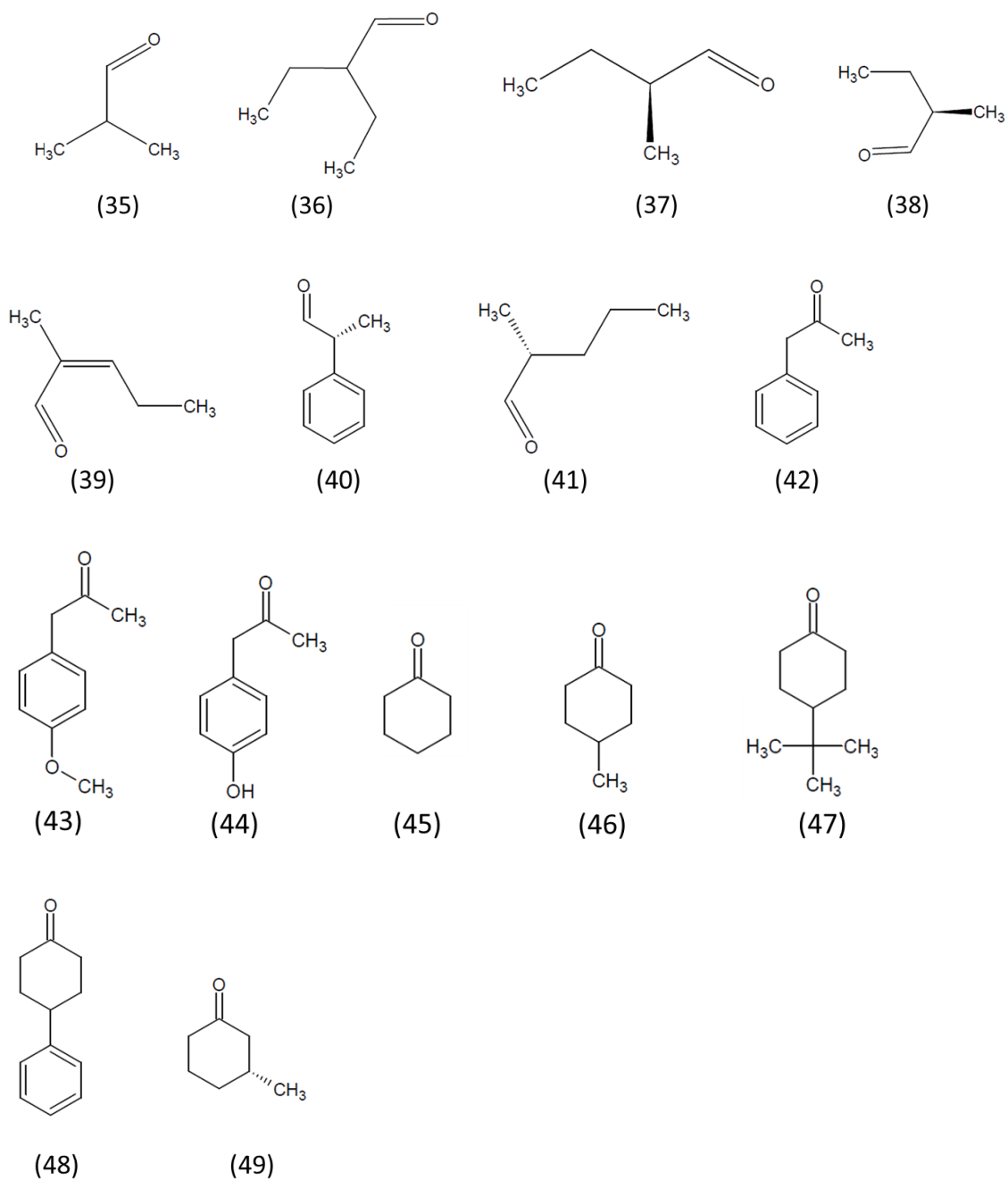


Figura 26 – Estruturas químicas de compostos identificados como reativos em ensaios de atividade da enzima TfNCS.

Além dessas estruturas, foram somadas à biblioteca as 4 estruturas contidas na Figura 27, isto é: octanal (50); 2 – naftaldeído (51); piperonal (52) e; tereftaldeído (53), totalizando 53 estruturas. Todas essas estruturas foram modeladas de acordo com a metodologia descrita na seção 3.2.1 e usadas para construção do modelo de QSAR.

Buscando compreender quais propriedades estruturais e eletrônicas dos aldeídos e cetonas são mais importantes para atividade catalítica da *TfNCS* em reações de Pictet-Spengler, selecionou-se da biblioteca de compostos organizada nas Figuras 25, 26 e na seção 7.1 do Apêndice, seis grupos estruturais que fossem representativos. Para cada grupo, dois compostos com estruturas semelhantes, porém com reatividades diferentes, foram selecionados. Os grupos e os compostos selecionados estão apresentados na Figura 27.



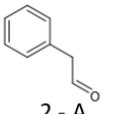
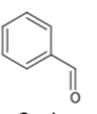
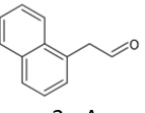
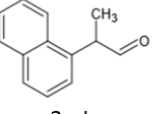
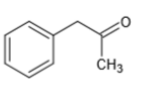
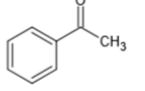
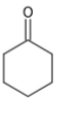
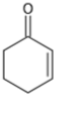
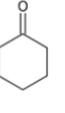
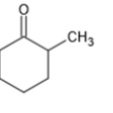
	Ativo (A)	Inativo (I)
Grupo 1	 1 - A	 1 - I
Grupo 2	 2 - A	 2 - I
Grupo 3	 3 - A	 3 - I
Grupo 4	 4 - A	 4 - I
Grupo 5	 5 - A	 5 - I
Grupo 6	 6 - A	 6 - I

Figura 27 – Organização dos grupos estruturais representativos para os cálculos computacionais de docking molecular, dinâmica molecular, e cálculo de orbitais de fronteira. Cada grupo, contendo duas estruturas químicas similares, porém, com atividades distintas, é apresentado em uma linha. Cada coluna está associada a atividade (A) ou inatividade (I) em ensaios catalíticos realizados com a enzima *TfNCS*. As relações código/nome da estrutura são: 1 - A: hexanal; 1 - I : etanal; 2 - A: fenilacetaldeído; 2 - I : benzaldeído; 3 - A : 2-(naftalen-1-il)acetaldeído; 3 - I : 2-(naftalen-1-il)propanal; 4 - A : fenilacetona; 4 - I : acetofenona; 5 - A: ciclohexanona; 5 - I : ciclohexenona; 6 - A: ciclohexanona; 6 - I : 2-metilciclohexanona;

A partir das diferentes técnicas de modelagem (*docking* molecular, dinâmica molecular e cálculo de orbitais de fronteiras), estudou-se as diferentes respostas para cada uma dessas estruturas, tentando entender o porquê da sua atividade/inatividade. Conjecturou-se que as diferenças de atividades enzimáticas poderiam estar associadas a impedimento estérico ou a propriedades do composto carbonílico.

4.2.2. CONSTRUÇÃO DE MODELO QSAR

A partir do fluxograma usado pelo software Knime⁴⁹, separou-se todas as 53 estruturas em grupos (*Clusters*) por meio de 3 diferentes análises de HCA, essas separações foram ilustradas nas Figuras 28,29 e 30.

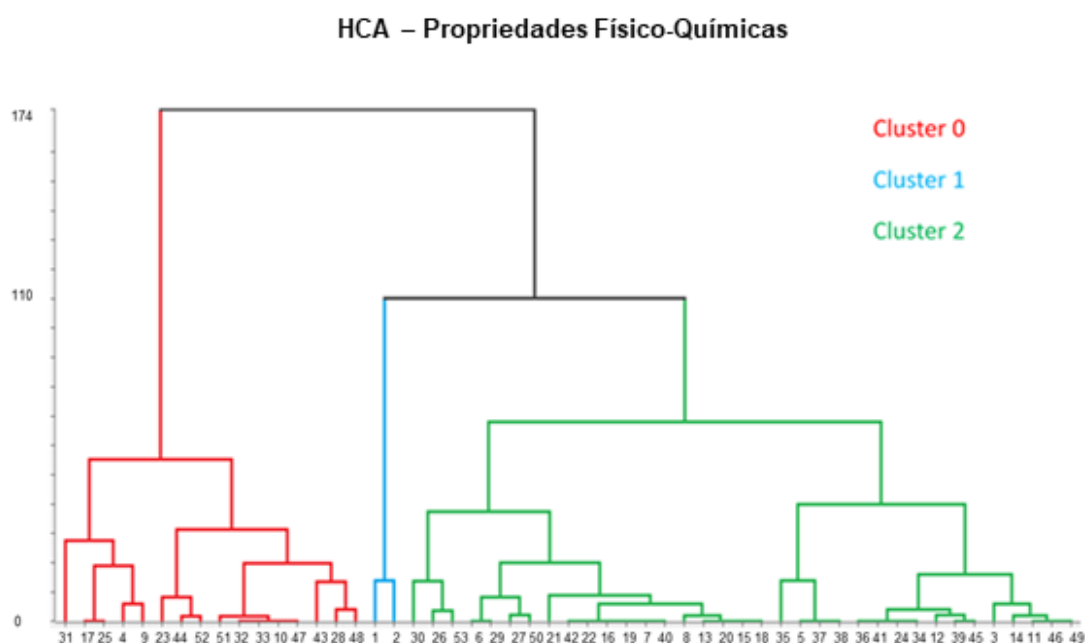


Figura 28 – Separação das 53 estruturas em 3 grupos (clusters) a partir da análise das propriedades físico-químicas: Aceptores de ligações de hidrogênio (HBA), doadores de ligação de hidrogênio (HBD), peso molecular (MW), número de ligações rotacionáveis (nRB), caráter sp³ (csp³), topologia polar de área superficial (TPSA) e coeficiente de partição (xlogP).

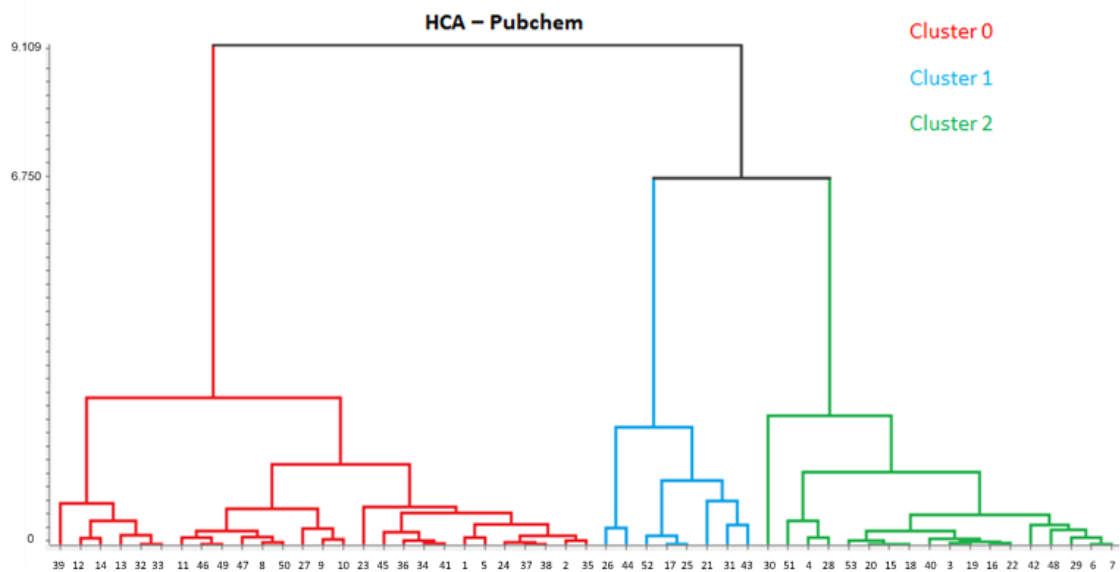


Figura 29 – Separação das 53 estruturas em 3 grupos (clusters) a partir da análise do fingerprint Pubchem.

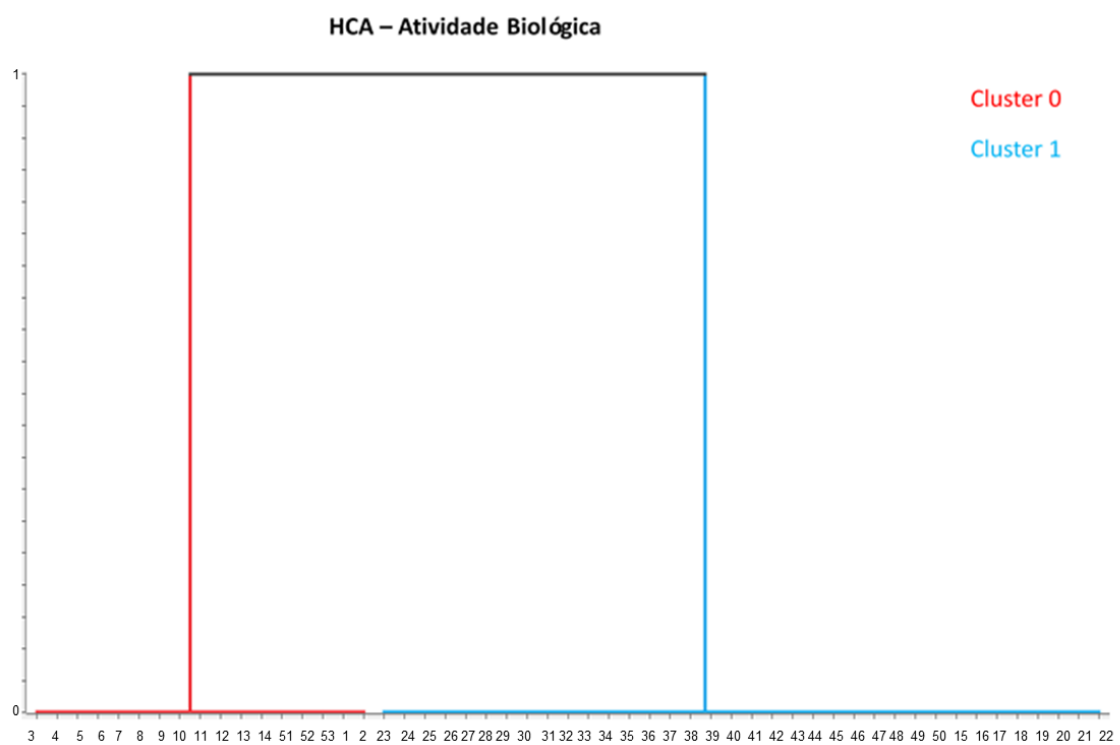


Figura 30 - Separação das 53 estruturas em 2 grupos (clusters) com base na atividade ou inatividade enzimática.

Os três modelos de HCA construídos foram usados para a seleção dos compostos constituintes dos grupos de treino (80% das moléculas) e teste (20% das moléculas). A partir do grupo de treino e teste, calcularam-se modelos matemáticos para explicar como os parâmetros estruturais se correlacionam com os dados experimentais. Foram gerados modelos, usando cada um dos *fingerprint*, associados a diferentes valores de *minNrec* (*minimum N records*), um dos parâmetros associados a construção de modelos. Cada modelo possui diferentes métricas de validação. Para escolher o modelo mais adequado, optou-se por usar a métrica *cvMCC*, que varia de -1 até 1. Um valor menor que 0 indica que o modelo não é preditivo, acima de 0 indica um modelo preditivo⁹⁶.

Calculou-se os valores de *cvMCC* para cada *fingerprint* com diferentes valores de *minNrec*. A partir desses resultados, calculou-se os valores de *cvMCC* médios para cada *fingerprint*, que estão representados na Figura 31.

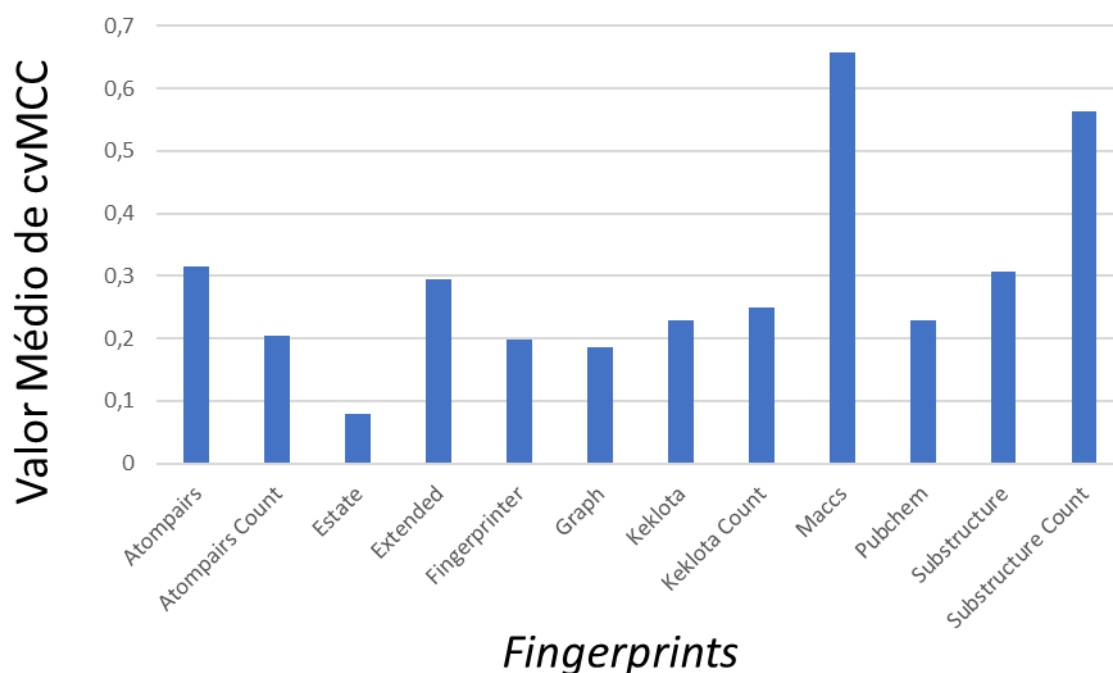


Figura 31 – Valores médios da métrica *cvMCC* calculados a partir dos diferentes valores de *minNrec* para cada *fingerprint*.

O melhor *fingerprint* representado foi o Maccs, possuindo cvMCC médio de 0.65. Analisando todos os modelos, para diferentes valores de *minNrec*, encontrou-se que o modelo com melhor pontuação foi o de *minNrec* igual a 6.

Existem também outras métricas para validação estatística do modelo, são exemplos dessas métricas: extMCC e extAUC⁹⁷, os seus valores para o *fingerprint* Maccs com *minNrec* igual a 6 foram apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados de Métricas

Métricas	Resultado
cvMCC (validação interna por MCC)	0,704
extMCC (validação externa por MCC)	0,828
extAUC (validação externa de área sob a curva)	0,883

Os valores de cvMCC, extMCC, extAUC, são maiores que 0,70; indicando um modelo com boa preditividade. Interpretando a árvore de decisão, expressa na Figura 32 - A, chegou-se à presença de 2 *keys* dentro desse *fingerprint*. Essas *keys* são os *fingerprints* MACCFP 155 e MACCFP 129. A presença ou ausência desses *fingerprints* específicos afeta o valor predito para a estrutura.

O *fingerprint* MACCFP 155 é definido como “A!CH!₂A” onde A! pode significar qualquer elemento da tabela periódica, não estando associado a um anel; e CH₂! é um metileno dissociado a um anel; e A pode significar qualquer elemento da tabela periódica, podendo estar ou não associado a um anel (Figura 32 – B). O *fingerprint* MACCFP 129 é definido como “ACH₂AACH₂A”, onde A pode significar qualquer elemento da tabela periódica (Figura 32 – C). A interpretação estrutural do modelo está exibida na Figura 32.

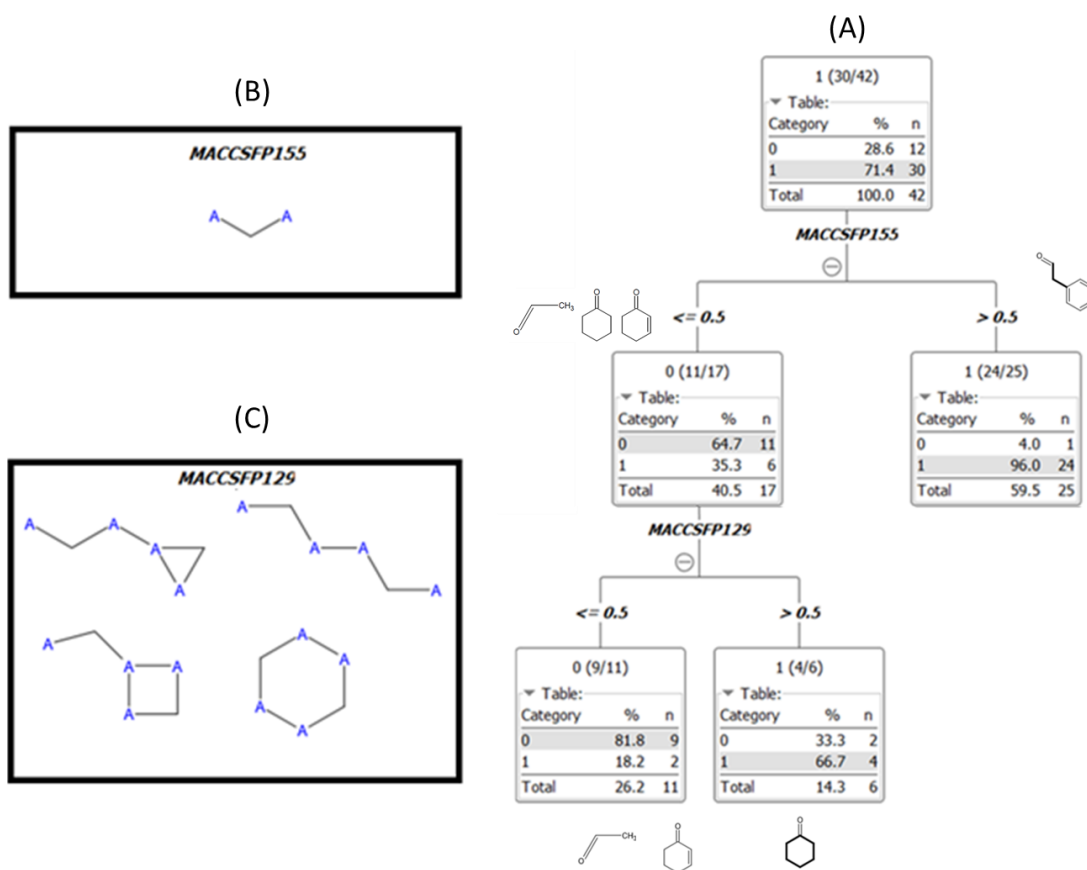


Figura 32 – Análise dos resultados da modelagem QSAR via árvore de decisão (A) árvore de decisão gerada pelo modelo QSAR, com base no fingerprint Maccs, utilizando minNrec de 6; (B) fingerprint MACCFP155 e possíveis interpretações estruturais; (C) fingerprint MACCFPP 129 e possíveis interpretações estruturais

A partir da interpretação estrutural, pode-se observar o impacto que a presença de metilenos (CH₂) exerce sobre a atividade enzimática. A presença de um simples metileno não cíclico junto a um átomo A não cíclico acarretou 96% de chance de atividade enzimática predita. O efeito da presença do metileno pode estar associado a ausência de efeito de conjugação com os elétrons da ligação C=O, essa ideia já havia sido conjecturada na literatura¹⁷.

Para compreender melhor as condições em que esse modelo pode ser preditivo, avaliou-se o domínio de aplicabilidade a partir do cálculo do coeficiente de Tanimoto⁹⁸, usando o *fingerprint* Maccs. A partir dos cálculos, chegou-se à Figura 33.

Código da Estrutura

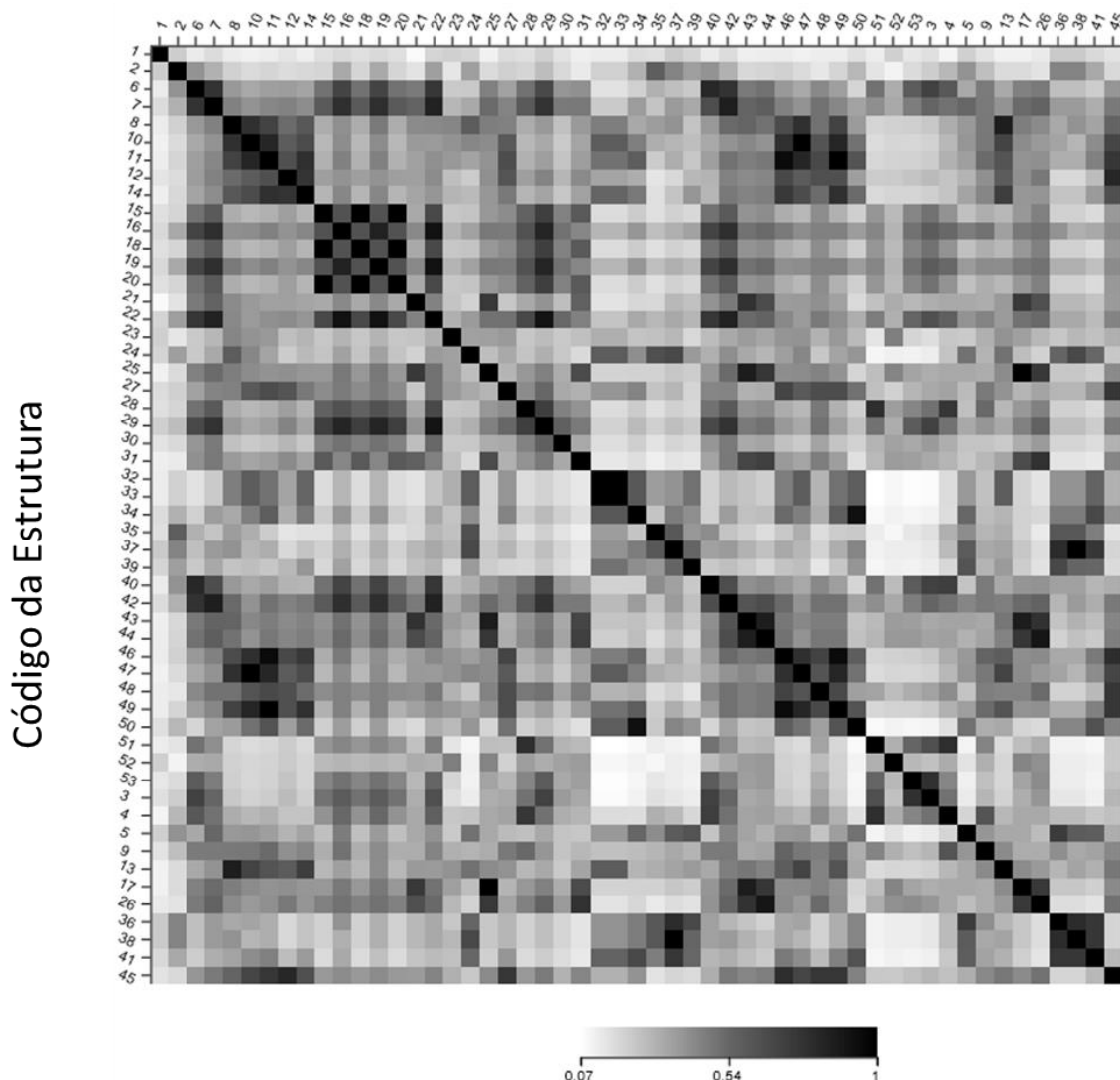


Figura 33 - Mapa representando os coeficientes de Tanimoto para cada comparação estrutura – estrutura, a cor indica o valor do coeficiente para cada comparação estrutural, cores mais escuras indicam similaridades maiores, enquanto cores mais claras indicam similaridades menores.

Na Figura 33 são apresentados todos os valores dos coeficientes de Tanimoto na forma de um gráfico de correlação, colorido com um gradiente de branco-preto. Quanto mais próximo do valor de 1, maior a similaridade, e quanto mais próximo de 0 menor a similaridade.

O modelo de QSAR foi criado com base no grupo de treino, usando o grupo de teste para sua validação, assim, avaliou-se a similaridade entre o grupo de treino e o grupo de teste. Para isso fez-se a média de todos os coeficientes

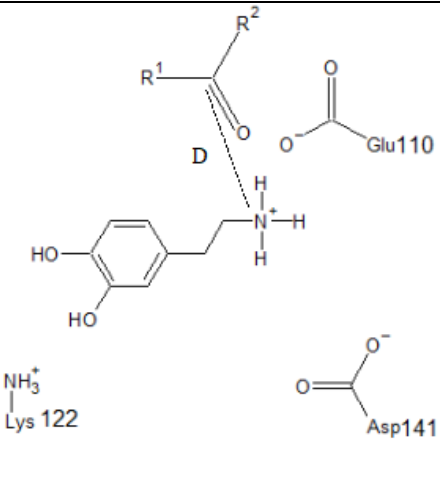
de Tanimoto de todas as comparações entre as estruturas do grupo de teste e as estruturas do grupo de treino, encontrando-se assim uma similaridade estrutural entre os 2 grupos de 37%, com um desvio padrão de 16%. Assim, pode-se esperar que estruturas que tenham uma similaridade por volta de 30% do grupo de treino possam ser aplicáveis para as interpretações do modelo de árvore de decisão.

4.2.3. DOCKING MOLECULAR

Com as simulações de *docking* molecular, buscou-se identificar as propriedades estruturais que poderiam estar envolvidas nas redes de interações entre os aldeídos/cetonas e os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da *TNCS*. Diferentes padrões de interação molecular poderiam afetar a correta aproximação do grupo carbonila dos aldeídos/cetonas ao nitrogênio da dopamina, responsável pelo ataque nucleofílico na reação de Pictet-Spengler.

A partir dos resultados de *docking* molecular, mediu-se as distâncias entre o nitrogênio da dopamina e o carbono do grupo carbonila dos aldeídos e das cetonas apresentados na Figura 27, sendo os resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Distância C – N calculada para cada uma das estruturas dos grupos a partir dos resultados das simulações de docking molecular.

Grupo de Estudo	Estrutura de Estudo	
Grupo 1	1 – A	D = 3,508 Å
	1 – I	D = 3,584 Å
Grupo 2	2 – A	D = 3,140 Å
	2 – I	D = 3,276 Å
Grupo 3	3 – A	D = 2,937 Å
	3 – I	D = 3,461 Å
Grupo 4	4 – A	D = 3,556 Å
	4 – I	D = 3,741 Å
Grupo 5	5 – A	D = 3,273 Å
	5 – I	D = 3,371 Å
Grupo 6	6 – A	D = 3,273 Å
	6 – I	D = 3,495 Å

A partir dos resultados, concluiu-se que a técnica de *docking* molecular pode ser útil para avaliar se interações entre o carbonílico e o sítio catalítico poderiam ocorrer, ou não, mas não fornece nenhuma informação que possa ser correlacionada com a reatividade dos compostos, pois todas se aproximaram do dopaminium de maneira semelhante. Valores entre 2 Å a 4 Å foram observados para todos os *dockings*, distâncias que favorecem a possibilidade de um ataque nucleofílico da dopamina no sítio catalítico.

4.2.4. DINÂMICA MOLECULAR

A partir dos resultados obtidos por simulação de dinâmica molecular, monitorou-se: (1) a distância do nitrogênio da dopamina ao carbono da carbonila ao longo do tempo de simulação, buscando entender se eles interagem apenas de uma maneira breve, ou se eles conseguem interagir de uma maneira mais efetiva ao longo do tempo de simulação; e (2) o ângulo formado entre o carbono da carbonila, o oxigênio carbonílico e o nitrogênio da dopamina, buscando entender se a diferença de atividade enzimática poderia estar associada ao ângulo de Bürgi–Dunitz, (um ângulo de ataque de cerca de 107°), ideal para aproximação de um nucleofílico em relação a uma estrutura trigonal planar⁹⁹.

Os resultados obtidos para uma dinâmica de 100 ns para cada um dos grupos está ilustrado nas Figuras 34, 35, 36, 37, 38, e 39.

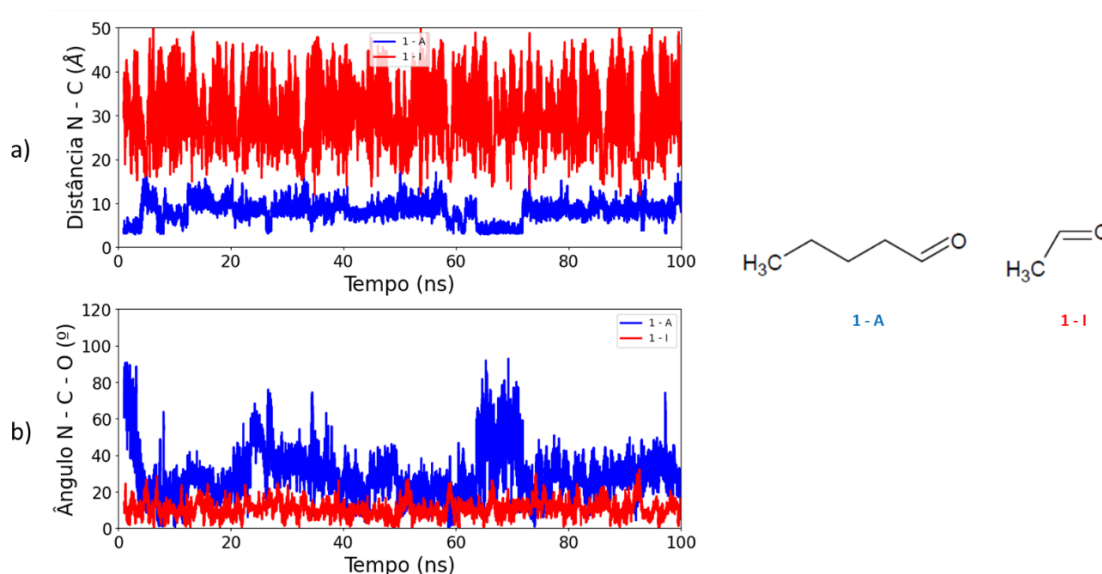


Figura 34 – Resultados de dinâmica molecular para o grupo 1. A cor azul refere-se ao composto reativo, enquanto a cor vermelha está associada ao composto não reativo. O gráfico a), refere-se a distância do nitrogênio da dopamina ao carbono dos compostos carbonílicos (C – N), monitorados ao longo de 100 ns da simulação de dinâmica molecular; e o gráfico b), refere-se ao ângulo formado entre o carbono carbonílico, o átomo de nitrogênio da dopamina e o átomo de oxigênio carbonílico, monitorados ao longo dos mesmos 100 ns de dinâmica.

A partir da Figura 34, observa-se algo muito interessante, a estrutura 1 – I (etanal), não consegue interagir tão bem com a dopamina ao longo do tempo, ficando a distâncias muito longas para que ocorresse um ataque nucleofílico. Enquanto isso, a estrutura 1 – A (hexanal), permanece relativamente próxima da dopamina ao longo de toda trajetória, possuindo valores de ângulos muito maiores do que a estrutura 1 – I. Para a estrutura 1 – I, a menor distância entre o nitrogênio e o carbono da carbonila foi em torno de 12 Å e o melhor ângulo foi por volta de 33°. Para a estrutura 1 – A, a menor distância foi em torno de 3 Å e o melhor ângulo foi por volta de 94°.

Outro ponto interessante observado é a variação da distância N-C do hexanal. Observa-se nitidamente uma flutuação da distância, o que indica alta flexibilidade da molécula de hexanal no sítio ativo da enzima. Uma menor distância da N-C está associada a maiores valores do ângulo de ataque, como pode ser observado no intervalo entre 63-73 ns. Isso indica que a aproximação, apesar de ser transitória, ocorre com orientações que favoreceriam o ataque nucleofílico. A partir da Figura 34, pode-se deduzir que a dinâmica foi capaz de revelar aspectos moleculares que poderiam explicar a inatividade enzimática da estrutura 1 – I em relação a atividade enzimática da estrutura 1 – A.

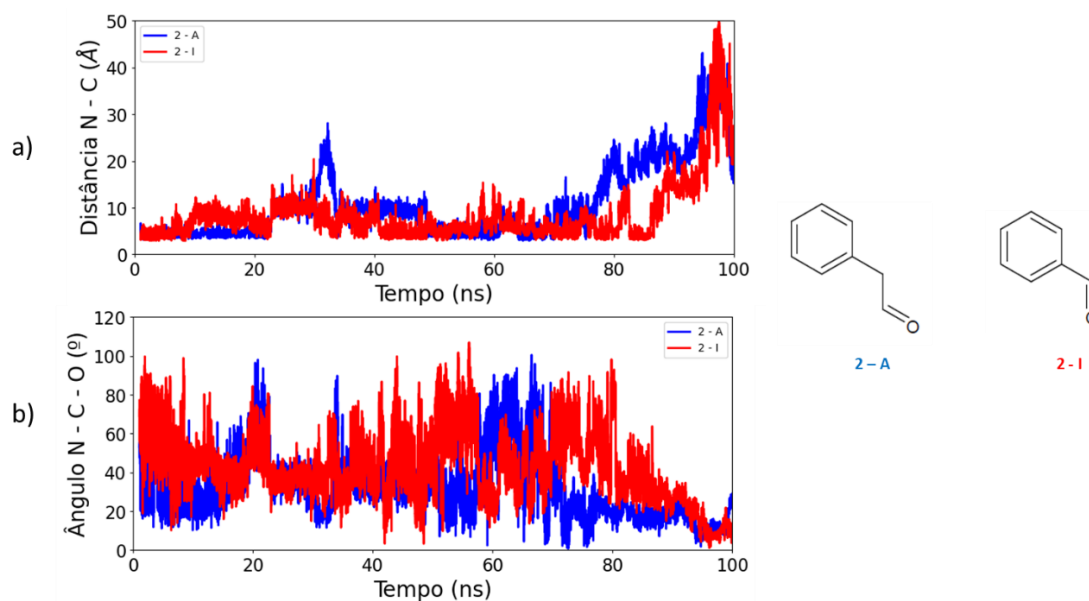


Figura 35 – Resultados de dinâmica molecular para o grupo 2. A cor azul refere-se ao composto reativo, enquanto a cor vermelha está associada ao composto não reativo. O gráfico a), refere-se a distância do nitrogênio da dopamina ao carbono dos compostos carbonílicos (C – N), monitorados ao longo de 100 ns da simulação de dinâmica molecular e o gráfico b), refere-se ao ângulo formado entre o carbono carbonílico, o átomo de nitrogênio da dopamina e o átomo de oxigênio carbonílico, monitorados ao longo dos mesmos 100 ns de dinâmica.

A partir da Figura 35, pode-se concluir que as 2 estruturas do grupo 2 se comportam de maneira semelhante, sendo assim, não se pode dizer que é possível entender pela dinâmica molecular e pelos parâmetros aqui avaliados, as razões de uma estrutura ser ativa e a outra inativa. Para a estrutura 2 – I (benzaldeído), a menor distância foi em torno de 3 Å e o melhor ângulo foi por volta de 105°, enquanto para a estrutura 2 – A (fenilacetaldéido), a menor distância foi em torno de 3 Å e o melhor ângulo foi por volta de 100°. A partir da Figura 35, pode-se deduzir que a dinâmica não foi capaz de explicar a diferença de atividade enzimática.

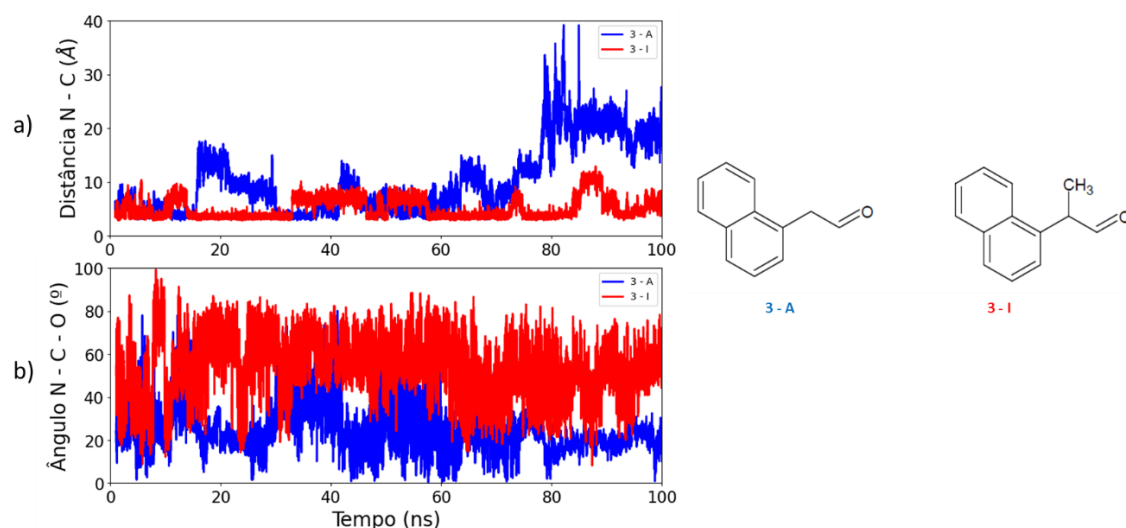


Figura 36 – Resultados de dinâmica molecular para o grupo 3. A cor azul refere-se ao composto reativo, enquanto a cor vermelha está associada ao composto não reativo. O gráfico a), refere-se a distância do nitrogênio da dopamina ao carbono dos compostos carbonílicos (C – N), monitorados ao longo de 100 ns da simulação de dinâmica molecular e o gráfico b), refere-se ao ângulo formado entre o carbono carbonílico, o átomo de nitrogênio da dopamina e o átomo de oxigênio carbonílico, monitorados ao longo dos mesmos 100 ns de dinâmica.

A partir da Figura 36, pode-se concluir que a estrutura 3 – I se comporta de uma maneira mais propensa a ser reativa do que a estrutura 3 – A, o que seria contraditório com os dados experimentais apresentados¹⁶. Para a estrutura 3 – I (2-(naftalen-1-il)propanal), a menor distância foi em torno de 3 Å e o melhor ângulo foi por volta de 100°, enquanto para a estrutura 3 – A (2-(naftalen-1-il)acetaldeído), a menor distância foi em torno de 2.8 Å e o melhor ângulo foi por volta de 81°. A partir da Figura 36, pode-se deduzir que a dinâmica não foi capaz de explicar a diferença de atividade enzimática.

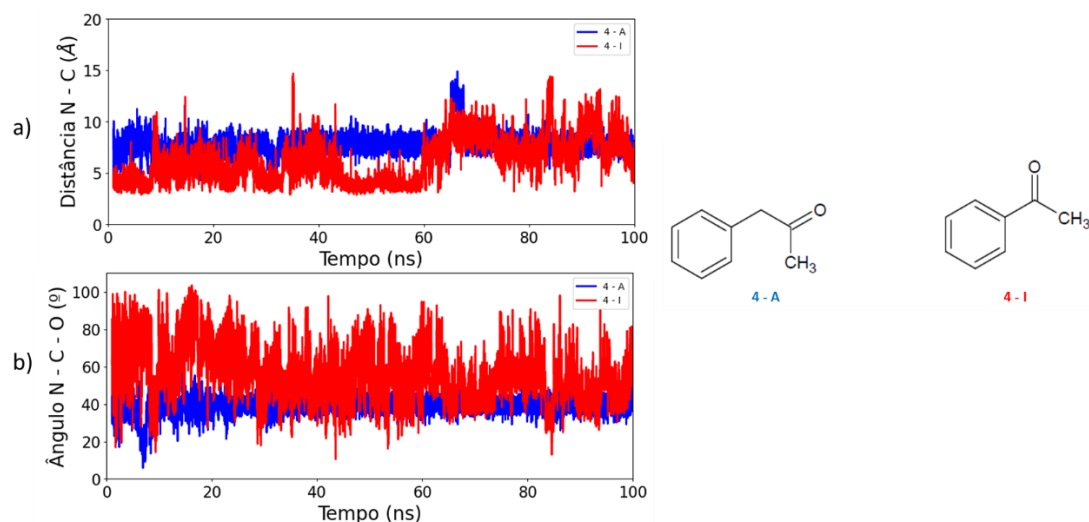


Figura 37 – Resultados de dinâmica molecular para o grupo 4. A cor azul refere-se ao composto reativo, enquanto a cor vermelha está associada ao composto não reativo. O gráfico a), refere-se a distância do nitrogênio da dopamina ao carbono dos compostos carbonílicos (C – N), monitorados ao longo de 100 ns da simulação de dinâmica molecular e o gráfico b), refere-se ao ângulo formado entre o carbono carbonílico, o átomo de nitrogênio da dopamina e o átomo de oxigênio carbonílico, monitorados ao longo dos mesmos 100 ns de dinâmica.

A partir da Figura 37, pode-se concluir que tanto a estrutura 4 – I como a estrutura 4 – A se comporta de uma maneira um pouco parecida, em relação a distância, pois ao longo de toda a simulação, ambos ficaram relativamente próximos a dopamina, no entanto se comportam de uma maneira bem diferente em relação ao ângulo. Para a estrutura 4 – I (acetofenona), a menor distância foi em torno de 2.9 Å e o melhor ângulo por volta de 104°. Para a estrutura 4 – A (fenilacetona), a menor distância foi em torno de 3.6 Å e o melhor ângulo foi por volta de 58°. A partir da Figura 37, pode-se deduzir que a dinâmica não foi capaz de explicar a diferença de atividade enzimática.

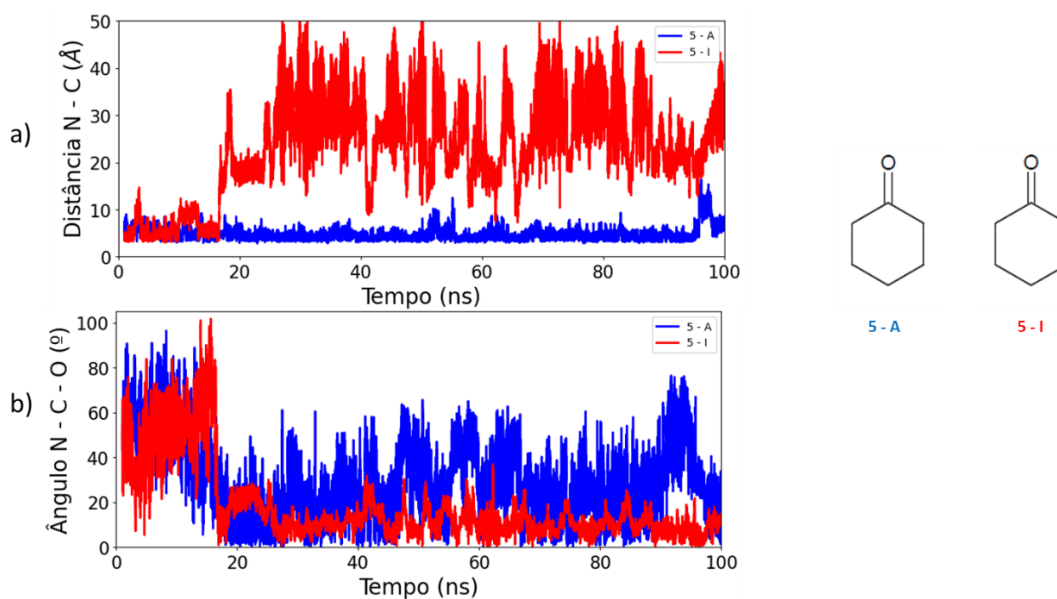


Figura 38 – Resultados de dinâmica molecular para o grupo 5. A cor azul refere-se ao composto reativo, enquanto a cor vermelha está associada ao composto não reativo. O gráfico a), refere-se a distância do nitrogênio da dopamina ao carbono dos compostos carbonílicos (C – N), monitorados ao longo de 100 ns da simulação de dinâmica molecular; e o gráfico b), refere-se ao ângulo formado entre o carbono carbonílico, o átomo de nitrogênio da dopamina e o átomo de oxigênio carbonílico, monitorados ao longo dos mesmos 100 ns de dinâmica.

A partir da Figura 38, pode-se concluir que a estrutura 5 – I, tem uma propensão a não ser ativa, pois ela não interage tanto com a dopamina ao longo do tempo quanto a estrutura 5 – A. Isso pode ser visualizado pelo distanciamento da dopamina após 15 ns. Para a estrutura 5 – I (ciclohexenona), a menor distância foi em torno de 3 Å e o melhor ângulo por volta de 103°. Para a estrutura 5 – A (ciclohexanona), a menor distância foi em torno de 2.9 Å e o melhor ângulo foi por volta de 98°. A partir da Figura 38, pode-se deduzir que a dinâmica foi capaz de revelar aspectos moleculares que poderiam explicar a diferença de atividade enzimática para as duas estruturas.

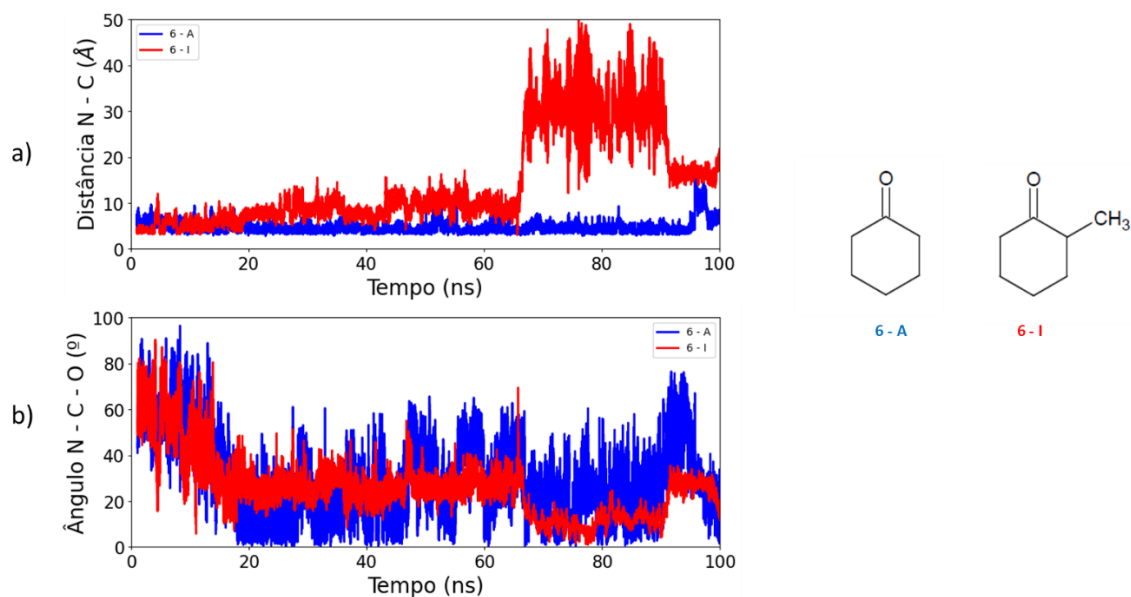


Figura 39 – Resultados de dinâmica molecular para o grupo 6. A cor azul refere-se ao composto reativo, enquanto a cor vermelha está associada ao composto não reativo. O gráfico a), refere-se a distância do nitrogênio da dopamina ao carbono dos compostos carbonílicos (C – N), monitorados ao longo de 100 ns da simulação de dinâmica molecular; e o gráfico b), refere-se ao ângulo formado entre o carbono carbonílico, o átomo de nitrogênio da dopamina e o átomo de oxigênio carbonílico, monitorados ao longo dos mesmos 100 ns de dinâmica.

A partir da Figura 39, observa-se que embora a estrutura 6 – I, possa interagir durante um tempo com a dopamina, o grupo CH₃ parece exercer um papel desestabilizador após 65 ns, assim essa estrutura não consegue interagir tão bem com a dopamina ao longo do tempo quanto a estrutura 6 – A. Para a estrutura 6 – I (2–metilciclohexanona), a menor distância foi em torno de 3 Å e o melhor ângulo por volta de 90°. Para a estrutura 6 – A (ciclohexanona), a menor distância foi em torno de 2.9 Å e o melhor ângulo foi por volta de 98°. A partir da Figura 39, pode-se deduzir que a dinâmica foi capaz de revelar aspectos moleculares que poderiam explicar a diferença de atividade entre as duas estruturas.

Nas simulações, a dinâmica se mostrou muito útil na compreensão das propriedades estruturais dos aldeídos e das cetonas importantes para a reação de Pictet – Spengler catalisada pela TINC. A partir das simulações de dinâmica molecular, e das análises dos parâmetros de distância N – C e ângulo de aproximação, foi possível sugerir propriedades estruturais que explicam a

diferença de atividade enzimática nos grupos 1,5 e 6. No entanto, novas simulações desses compostos devem ser realizadas, de modo a entender se essa instabilidade foi um evento acidental da dinâmica, ou se ela realmente é um evento reprodutível visualizável pela dinâmica.

O principal critério para a diferenciação entre substâncias ativas e inativas, nessa análise, foi a distância N – C ao longo do tempo. Parece que o tamanho da cadeia carbônica, como foi observado na diferença do hexanal – etanal, e a presença de certas assinaturas estruturais, como por exemplo insaturações ou grupos CH₃ poderiam influenciar profundamente a interação entre as substâncias carbonílicas e a dopamina, podendo deixar essa interação ao longo do tempo, mais ou menos favorável.

4.2.5. CÁLCULO DE ORBITAL DE FRONTEIRAS

A partir dos cálculos de orbitais realizados usando a metodologia descrita na seção **3.2.6**, buscou-se compreender se a densidade eletrônica do grupo dos aldeídos e cetonas correlacionam-se com os resultados experimentais para as reações de Pictet–Spengler catalisadas por *Tf*NCS. Usando a metodologia descrita na seção **3.2.6**, calculou-se os valores dos descritores f^+ e dual para cada uma das estruturas dos 6 grupos, assim, chegou-se aos valores expressos na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores dos descritores f^+ e dual para cada estrutura de cada um dos 6 grupos separados.

Grupo	Estrutura	f^+	Dual
Grupo 1	1 – A	0,5021	0,4777
	1 – I	0,5598	0,54
Grupo 2	2 – A	0,4204	0,3857
	2 – I	0,261	0,2407
Grupo 3	3 – A	0,0257	0,0012
	3 – I	0,0296	0,0104
Grupo 4	4 – A	0,4283	0,3928
	4 – I	0,2331	0,2173
Grupo 5	5 – A	0,3868	0,3613
	5 – I	0,2357	0,212
Grupo 6	6 – A	0,3868	0,3613
	6 – I	0,3722	0,3452

Ao analisar o grupo 1, percebe-se que a estrutura 1 – I, apresentou ambos os valores de descritores maiores do que a estrutura 1 – A. Indicando assim que a estrutura inativa tem um maior potencial eletrofílico do que a estrutura ativa. No entanto, experimentalmente, a estrutura 1 – I é inativa e a estrutura 1 – A ativa. Essa metodologia não explicou a diferença de atividade enzimática para o grupo 1. No entanto, a dinâmica molecular sugere uma interpretação do porquê dessa diferença de atividade enzimática, assim sendo, o que definiu a diferença de atividade do grupo 1, não foi um caráter eletrofílico, mas a grande liberdade de movimento do etanal.

Ao analisar o grupo 2, percebe-se que a estrutura reativa (2 – A) possui tanto para o descritor f^+ como para o dual um caráter eletrofílico 60% maior do que a estrutura não reativa (2 – I), o que poderia explicar a diferença de atividade enzimática entre essas 2 estruturas. A presença do metileno é a responsável por essa diferença, pois ela impede que a carbonila seja estabilizada pela conjugação com o anel aromático. Esse resultado está em acordo com os resultados obtidos através da construção do modelo QSAR (Figura 32), mostrando a influência do metileno. No entanto, o cálculo de orbital de fronteira explica de uma maneira mais quantitativa e associada a perspectiva eletrônica. Essa metodologia explica a diferença de atividade enzimática para o grupo 2.

Ao analisar o grupo 3, percebe-se que tanto a estrutura 3 – A como a estrutura inativa 3 – I possuem os menores valores de todos os cálculos, chegando a ser 900% menos eletrofílicas do que estruturas que possuem carbonila conjugada. Essa metodologia para o estudo dessa etapa não explica a diferença de atividade enzimática para o grupo 3.

Ao analisar o grupo 4, percebe-se o mesmo fenômeno do grupo 2, as estruturas reativas têm caráter eletrofílico 80% superior as inativas para os dois descritores utilizados, sugerindo que a conjugação exerce um papel fundamental na reatividade do composto frente a *T*NCS. Além disso, ao comparar a estrutura 4 – A (uma cetona) com a estrutura 2 – A (um aldeído), percebe-se que elas não possuem grande diferença entre os descritores f^+ e dual, isso poderia ser uma justificativa da viabilidade catalítica tanto para aldeídos como para cetonas. Essa metodologia explica a diferença de atividade enzimática para o grupo 4.

Ao analisar o grupo 5, percebe-se o mesmo fenômeno ocorrido nos grupos 2 e 4; uma conjugação exercendo influência grande no caráter eletrofílico. Essa diferença para ambos os descritores foi de mais de 60%. Essa metodologia explica a diferença de atividade enzimática para o grupo 5.

Ao analisar o grupo 6, percebe-se uma pequena variação no valor dos descritores da estrutura reativa para a estrutura não reativa, no entanto, essa diferença é desprezível, não sendo justificativa para a diferença da atividade enzimática entre as duas estruturas. Essa metodologia não explica a diferença de atividade enzimática para o grupo 6, no entanto, a dinâmica parece sugerir uma certa instabilidade das interações do composto inativo no sítio catalítico da enzima e em relação a interação com a dopamina, o que poderia explicar a diferença de atividade enzimática.

Expressando em termos gráficos, os descritores f^+ (eixo x), dual (eixo y) para a atividade para os grupos 2,4 e 5, construiu-se um gráfico, apresentado na Figura 40.

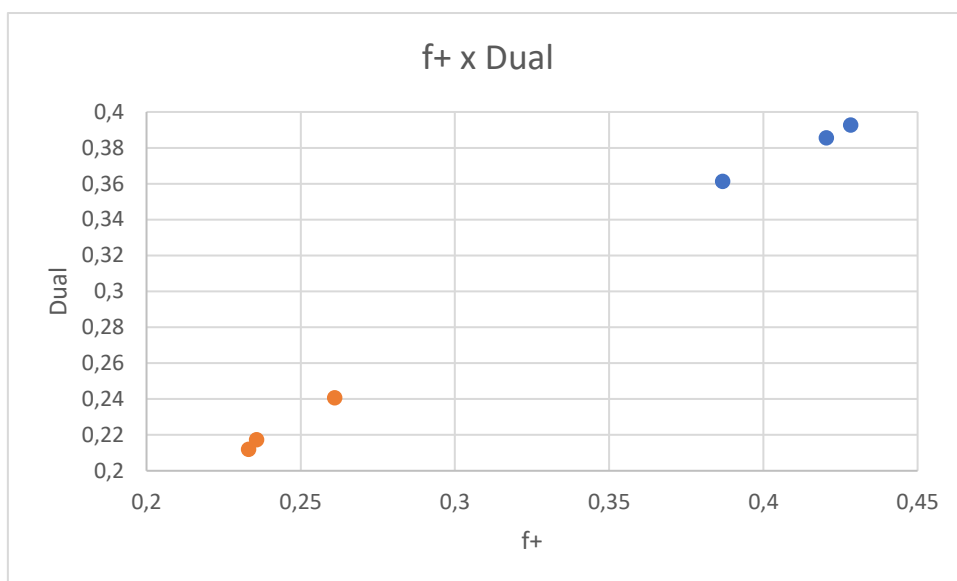


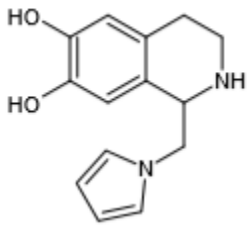
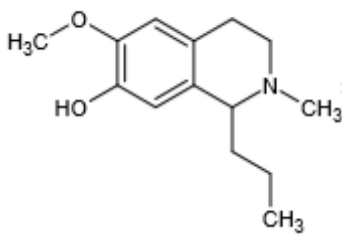
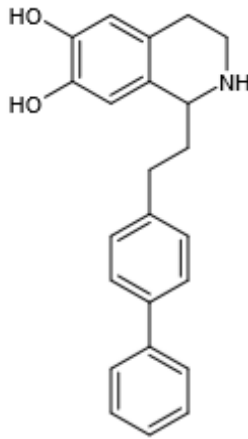
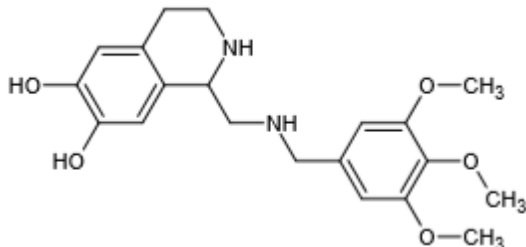
Figura 40 – Distribuição de $f+$ (eixo X) em relação ao descritor dual (eixo Y) para cada uma das estruturas contidas nos grupos 2,4 e 5. Os pontos azuis são estruturas ativas e os pontos laranjas são estruturas inativas.

A partir do gráfico contido na Figura 40, percebe-se o agrupamento dos valores dos descritores locais em duas ilhas, uma com maiores valores de descritores, relacionadas a compostos reativos, e uma com menores valores de descritores, relacionadas a compostos não reativos. Essa metodologia explicou satisfatoriamente 50% das atividades dos grupos, podendo ser um bom parâmetro para prever algum dos possíveis critérios, que implicariam na reatividade de um composto. As funções de Fukui funcionam bem para diferenciar a reatividade entre carbonílicos conjugados e não conjugados.

4.2.6 BUSCA POR SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

A partir de uma busca por tetrahydroisoquinolinas que possuíssem alguma atividade farmacológica, chegou-se aos compostos descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Tetrahydroisoquinolinas bioativas potencialmente passíveis de obtenção por biocatálise com a TñCS

Produto	Aplicação / Patente
	<p>Esse composto poderia ser produzido pela via biocatalítica em 1 etapa via reação de Pictet–Spengler por TñCS. Esse composto foi identificado como um vasodilatador.¹⁰⁰</p>
	<p>Esse composto poderia ser produzido em mais de uma etapa, no entanto um dos intermediários envolvidos nessas etapas poderia ser a reação de Pictet–Spengler por TñCS. Esse composto foi identificado como possuindo atividade no tratamento e da prevenção de doenças neurodegenerativas e de doenças inflamatórias, estando associado a proteção de neurônios¹⁰¹.</p>
	<p>Esse composto poderia ser produzido pela via biocatalítica em 1 etapa via reação de Pictet–Spengler por TñCS. Esse composto foi identificado como possuindo atividade antitumoral¹⁰².</p>
	<p>Esse composto poderia ser produzido pela via biocatalítica em 1 etapa via reação de Pictet–Spengler por TñCS. Esse composto foi identificado como possuindo uma atividade de relaxante muscular¹⁰³.</p>

Como as patentes não descrevem qual o enantiômero é o responsável pela ação, seria interessante a produção desses compostos utilizando a enzima TñCS como catalisador, e a realização desse estudo posteriormente, podendo vir a ser um método de obtenção muito mais efetivo em termos biológicos. Algumas propostas de retróssínteses, são apresentadas na Figura 41.

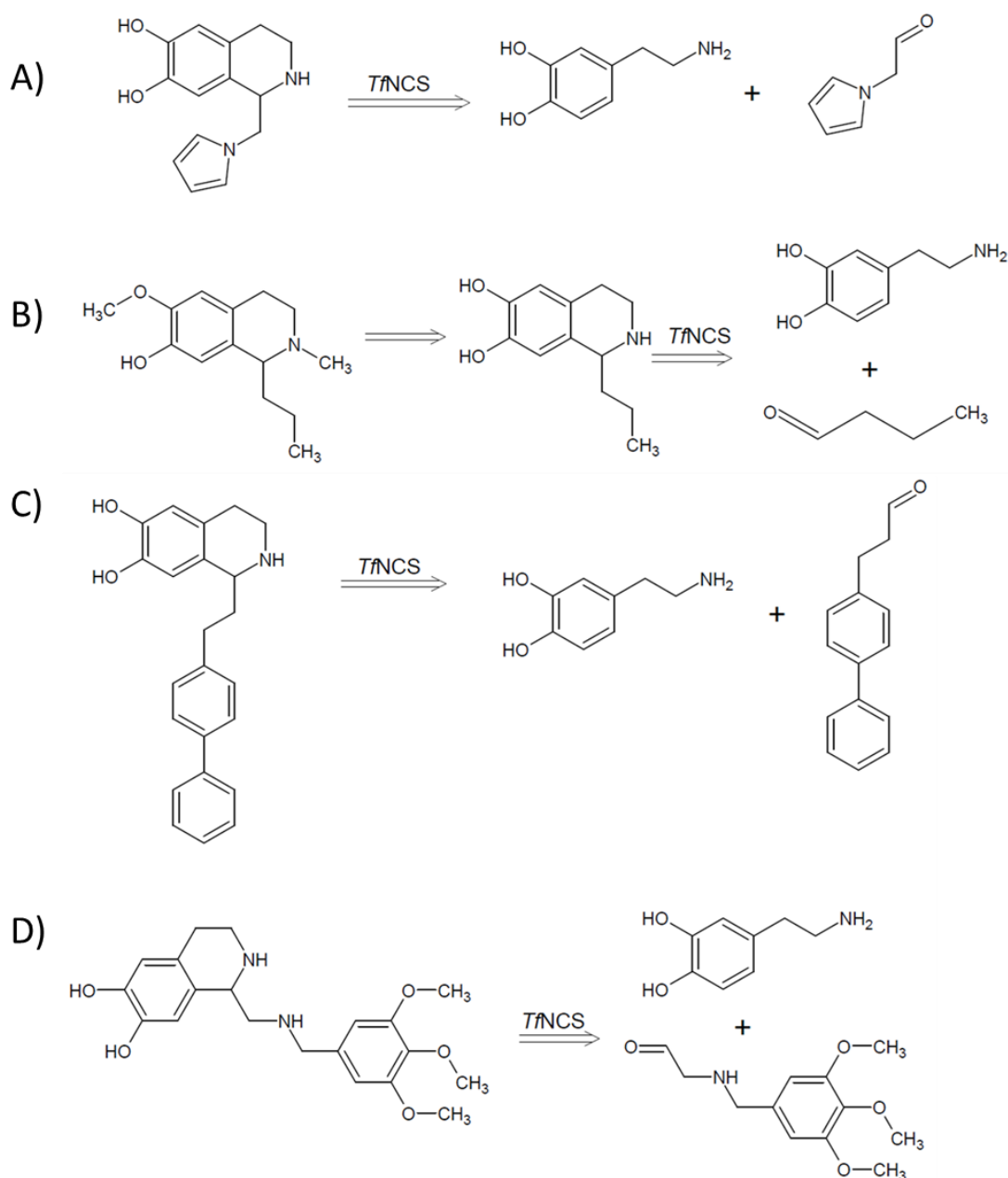


Figura 41 – Propostas de retrosínteses das estruturas apresentadas na Tabela 4.

Para o aldeído utilizado em A, o modelo de QSAR indica uma predição de 0,96, configurando uma estrutura reativa. Essa estrutura apresentou uma média de 22% de similaridade com o grupo de treino, com 7% de desvio padrão e uma média de 18% de similaridade com o grupo de teste, com 4% de desvio padrão. Os cálculos de orbital de fronteira indicaram um valor de $f+$ igual a 0,48 e um valor de coeficiente dual igual a 0,48. Logo, pode-se concluir que esse aldeído tem um potencial para ser ativo em uma reação de Pictet–Spengler catalisada por $TfNCS$, segundo o modelo de QSAR e o cálculo de orbitais.

Para o aldeído utilizado em B, o modelo de QSAR indica uma predição de 0,96, configurando uma estrutura reativa. Essa estrutura apresentou uma média de 34% de similaridade com o grupo de treino, com 13% de desvio padrão e uma média de 36% de similaridade com o grupo de teste, com 18% de desvio padrão. Os cálculos de orbital de fronteira indicaram um valor de $f+$ igual a 0,55 e um valor de coeficiente dual igual a 0,52. Logo pode-se concluir que esse aldeído tem um potencial para ser reativo em uma reação de Pictet–Spengler catalisada por *TfNCS*, segundo o modelo de QSAR e o cálculo de orbitais.

Para o aldeído utilizado em C, o modelo de QSAR indica uma predição de 0,96, configurando uma estrutura reativa. Essa estrutura apresentou uma média de 23% de similaridade com o grupo de treino, com 10% de desvio padrão e uma média de 24% de similaridade com o grupo de teste, com 11% de desvio padrão. Os cálculos de orbital de fronteira indicaram um valor de $f+$ igual a 0,023 e um valor de coeficiente dual igual a 0,016. Logo, pode-se concluir que esse aldeído pode vir a ter algum potencial para ser reativa em uma reação de Pictet–Spengler catalisada por *TfNCS*, segundo o modelo de QSAR. O cálculo de orbitais para esse aldeído fugiu muito do esperado, da mesma forma que o grupo 3, isso pode indicar que moléculas com uma alta densidade eletrônica, proveniente de 2 anéis aromáticos, podem não representar valores conclusivos para esse tipo de análise, isso provavelmente pode ocorrer por dois motivos: uma limitação na metodologia do cálculo de DFT; ou a mudança aparente de reatividade no sítio catalítico.

Para o aldeído utilizado em D, o modelo de QSAR indica uma predição de 0,96, configurando uma estrutura reativa. Essa estrutura apresentou uma média de 40% de similaridade com o grupo de treino, com 14% de desvio padrão e uma média de 35% de similaridade com o grupo de teste, com 11% de desvio padrão. Os cálculos de orbital de fronteira indicaram um valor de $f+$ igual a 0,47 e um valor de coeficiente dual igual a 0,47. Logo pode-se concluir que esse aldeído pode vir a ter algum potencial para ser reativa em uma reação de Pictet–Spengler catalisada por *TfNCS*, segundo o modelo de QSAR e o cálculo de orbitais.

5. CONCLUSÃO

A partir deste trabalho, foi possível modificar o processo de expressão enzimática, de modo a reduzir a presença de dímero da enzima *TfNCS* no final do processo de expressão. Além disso, o trabalho foi capaz de estabelecer um protocolo experimental para determinação de atividade ou inatividade de compostos carbonílicos em reações de Pictet–Spengler catalisadas pela enzima *TfNCS* recombinante, o que pode vir a ser muito útil para o aumento da biblioteca de compostos ativos ou inativos em trabalhos futuros e para a aplicação biotecnológica dessa enzima.

Em relação a metodologia computacional, concluiu-se que os resultados do *docking* molecular não parecem estar associados diretamente com a atividade enzimática sobre um composto, no entanto, as técnicas de dinâmica molecular e os cálculos de estrutura eletrônica, foram capazes de fornecer sugestões do porquê dessa diferença de atividade em certos grupos.

Os resultados da técnica de orbital de fronteiras parecem se relacionar com os resultados do modelo QSAR, sugerindo que a presença ou ausência da conjugação na carbonila influenciam na atividade. Os resultados da técnica de dinâmica molecular sugerem que dependendo da forma da estrutura ela pode interagir melhor com o composto carbonílico no sítio catalítico, ou até mesmo não chegar a interagir com ele, como ilustrado pelo resultado da estrutura 1 – I (etanal).

Assim concluiu-se que o emprego das técnicas computacionais, podem ser muito úteis para entender os dados experimentais de sistemas biocatalíticos em termos moleculares, compreendendo o porquê de os fenômenos ocorrerem como ocorrem e podendo vir a trazer novas ideias para experimentação.

A partir da busca por substâncias bioativas, chegou-se a estruturas bioativas que poderiam vir a ser produzidas por meio da biocatálise da *TfNCS*, cujos precursores apresentaram valores promissores para o cálculo de orbital de fronteira e para o modelo de QSAR, sugerindo aplicações biotecnológicas, tanto para a *TfNCS* como para as técnicas aqui implementadas.

6. REFERÊNCIAS

1. Fogler, H. S. Elementos de Engenharia das Reações Químicas 4^o ed. 521 - 529 (2002).
2. Bernardo-Gusmão, K., Pergher, S. B. C. & Dos Santos, E. N. Um panorama da Catálise no Brasil nos últimos 40 anos. *Quim. Nova* **40**, 650–655 (2017).
3. Nelson, David L.; Cox, Michael, M. Lehninger. Princípios de Bioquímica de Lehninger 6^o ed. 189 - 194 (2014).
4. Almeida, C. P., Rocha, J. C., Caritá, J. S., Souza, T. M. A. & Souza, P. V. S. Biotecnologia na Produção de Alimentos. SBRT (Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas) (2011).
5. Global industrial enzyme market growth estimated at CAGR of 5.8% for the forecast period 2016-2023. *Focus on Catalysts* **2017**, 2 (2017).
6. Bornscheuer, U. T. et al. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **485**, 185–194 (2012).
7. Sheldon, R. A. & Pereira, P. C. Biocatalysis engineering: The big picture. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 2678–2691 (2017).
8. Lichman, B. R. et al. Structural Evidence for the Dopamine-First Mechanism of Norcoclaurine Synthase. *Biochemistry* **56**, 5274–5277 (2017).
9. Minami, H., Dubouzet, E., Iwasa, K. & Sato, F. Functional analysis of norcoclaurine synthase in *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.* **282**, 6274–6282 (2007).
10. Vimolmangkang, S. et al. Evolutionary origin of the NCSI gene subfamily encoding norcoclaurine synthase is associated with the biosynthesis of benzyloquinoline alkaloids in plants. *Sci. Rep.* **6**, 26323 (2016).
11. Stöckigt, J., Antonchick, A. P., Wu, F. & Waldmann, H. The Pictet-Spengler Reaction in Nature and in Organic Chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed.* **50**, 8538–8564 (2011).
12. Samanani, N., Liscombe, D. K. & Facchini, P. J. Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an catalyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant J.* **40**, 302–313 (2004).
13. Cox, E. D. & Cook, J. M. The Pictet-Spengler Condensation: A New Direction for an Old Reaction. *Chem. Rev.* **95**, 1797–1842 (1995).
14. Lichman, B. R. et al. Dopamine-first mechanism enables the rational engineering of the norcoclaurine synthase aldehyde activity profile. *FEBS J.* **282**, 1137–1151 (2015).
15. Lichman, B. R., Zhao, J., Hailes, H. C. & Ward, J. M. Enzyme catalysed Pictet-Spengler formation of chiral 1,1'-disubstituted- And spiro-tetrahydroisoquinolines. *Nat. Commun.* **8**, 1–9 (2017).

16. Ruff, B. M., Bräse, S. & O'Connor, S. E. Biocatalytic production of tetrahydroisoquinolines. *Tetrahedron Lett.* **53**, 1071–1074 (2012).
17. Roddan, R. et al. Acceptance and Kinetic Resolution of α -Methyl-Substituted Aldehydes by Norcoclaurine Synthases. *ACS Catal.* **9**, 9640–9649 (2019).
18. Pesnot, T., Gershater, M. C., Ward, J. M. & Hailes, H. C. Phosphate mediated biomimetic synthesis of tetrahydroisoquinoline alkaloids. *Chem. Commun.* **47**, 3242 (2011).
19. Zhao, J., Méndez-Sánchez, D., Ward, J. M. & Hailes, H. C. Biomimetic Phosphate-Catalyzed Pictet–Spengler Reaction for the Synthesis of 1,1'-Disubstituted and Spiro-Tetrahydroisoquinoline Alkaloids. *J. Org. Chem.* **84**, 7702–7710 (2019).
20. Glinsky-Olivier, N., Yang, S., Retailleau, P., Gandon, V. & Guinchard, X. Enantioselective Gold-Catalyzed Pictet–Spengler Reaction. *Org. Lett.* **21**, 9446–9451 (2019).
21. Ilari, A. et al. Structural basis of enzymatic (S)-norcoclaurine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 897–904 (2009).
22. Sheng, X. & Himo, F. Enzymatic Pictet–Spengler Reaction: Computational Study of the Mechanism and Enantioselectivity of Norcoclaurine Synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 11230–11238 (2019).
23. Lind, M. E. S. & Himo, F. Quantum Chemical Modeling of Enantioconvergence in Soluble Epoxide Hydrolase. *ACS Catal.* **6**, 8145–8155 (2016).
24. Moa, S. & Himo, F. Quantum chemical study of mechanism and stereoselectivity of secondary alcohol dehydrogenase. *J. Inorg. Biochem.* **175**, 259–266 (2017).
25. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products*. **58**, 311 (John Wiley & Sons, Ltd, 2001).
26. Bribi, N. Pharmacological activity of Alkaloids : A Review. *Asian J. Bot.* **1**, 1–6 (2018).
27. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. 57 (IUPAC, 2009).
28. *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*. 47 - 48 (Springer Berlin Heidelberg, 1985).
29. Liscombe, D. K., MacLeod, B. P., Loukanina, N., Nandi, O. I. & Facchini, P. J. Evidence for the monophyletic evolution of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry* **66**, 47 - 48 2500–2520 (2005).
30. *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*. 25 (Springer Berlin Heidelberg, 1985).
31. Christina D. Smolke & Hawkins, K. M. . Engineered BIA pathway. (2019).
32. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, 1–17 (2014).

33. Overton, T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov. Today* **19**, 590–601 (2014).
34. Silva Elipe, M. V. Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. *Anal. Chim. Acta* **497**, 1–25 (2003).
35. ACD/ChemSketch.
36. Quirós, M., Gražulis, S., Girdzijauskaitė, S., Merkys, A. & Vaitkus, A. Using SMILES strings for the description of chemical connectivity in the Crystallography Open Database. *J. Cheminform.* **10**, 1–17 (2018).
37. Hanwell, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.* **4**, 17 (2012).
38. Rappe, A. K., Casewit, C. J., Colwell, K. S., Goddard, W. A. & Skiff, W. M. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10024–10035 (1992).
39. Williams, C. J. et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci.* **27**, 293–315 (2018).
40. Hansch, C. & Fujita, T. ρ - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1616–1626 (1964).
41. Neves, B. J. et al. QSAR-based virtual screening: Advances and applications in drug discovery. *Front. Pharmacol.* **9**, 1–7 (2018).
42. Nantasenamat, C., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Naenna, T. & Prachayasittikul, V. A practical overview of quantitative structure-activity relationship. *EXCLI J.* **8**, 74–88 (2009).
43. Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J. & Lowe, E. W. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacol. Rev.* **66**, 334–395 (2014).
44. Zhang, L. et al. Discovery of Novel Antimalarial Compounds Enabled by QSAR-Based Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 475–492 (2013).
45. Luo, M., Wang, X. S., Roth, B. L., Golbraikh, A. & Tropsha, A. Application of Quantitative Structure–Activity Relationship Models of 5-HT 1A Receptor Binding to Virtual Screening Identifies Novel and Potent 5-HT 1A Ligands. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 634–647 (2014).
46. Waters, L., Manchester, K. R., Maskell, P. D., Haegeman, C. & Haider, S. The use of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) model to predict GABA-A receptor binding of newly emerging benzodiazepines. *Sci. Justice* **58**, 219–225 (2018).
47. Veríssimo, G. C. et al. HQSAR and random forest-based QSAR models for anti-*T. vaginalis* activities of nitroimidazoles derivatives. *J. Mol. Graph. Model.* **90**, 180–191 (2019).
48. BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio 2019.
49. Berthold, M. R. et al. KNIME - the Konstanz information miner. *ACM SIGKDD Explor. Newsl.* **11**, 26–31 (2009).

50. Yap, C. W. PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints. *J. Comput. Chem.* **32**, 1466–1474 (2011).
51. Roy, K., Kar, S. & Das, R. N. Statistical Methods in QSAR/QSPR. in 37–59 (2015).
52. Rogers, D. J. & Tanimoto, T. T. A Computer Program for Classifying Plants. *Science* (80-.). **132**, 1115–1118 (1960).
53. Verli, H. & Barreiro, E. J. Flexibility, A medicinal chemistry paradigm: ligands and receptor. *Quim. Nova* **28**, 95–102 (2005).
54. Chaudhary, K. K., Inputs, D. A. & Mishra, N. A Review on Molecular Docking : Novel Tool for Drug Discovery. *J.SciMed Cent.* (2016).
55. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* NA-NA (2009).
56. Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R. & Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **267**, 727–748 (1997).
57. Bolcato, G., Cuzzolin, A., Bissaro, M., Moro, S. & Sturlese, M. Can we still trust docking results? An extension of the applicability of dockbench on PDB bind Database. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
58. Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M. & Cui, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* **7**, 146–57 (2011).
59. Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W. & Taylor, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **52**, 609–623 (2003).
60. The PyMOL Molecular Graphics System.
61. Pettersen, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
62. Dror, R. O., Dirks, R. M., Grossman, J. P., Xu, H. & Shaw, D. E. Biomolecular Simulation: A Computational Microscope for Molecular Biology. *Annu. Rev. Biophys.* **41**, 429–452 (2012).
63. Namba, A. M., Da Silva, V. B. & Da Silva, C. H. T. P. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclét. Quim.* **33**, 13–24 (2008).
64. Carvalho, A. Dinâmica Molecular Aplicada à Análise Estrutural da Hipoxantina-Guanina-Xantina Fosforibosil Transferase de *Plasmodium falciparum*. (2015).
65. Case, D. A. et al. Amber 2020.
66. Søndergaard, C. R., Olsson, M. H. M., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of p K a Values. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 2284–2295 (2011).

67. Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical p K a Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 525–537 (2011).
68. Maier, J. A. et al. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3696–3713 (2015).
69. Chagas, M., Rocha, W. & Moraes, A. Dynamics and allostery of Zika virus non-structural protein 5 methyltransferase. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1–13 (2020).
70. Hestenes, M. R. & Stiefel, E. Methods of conjugate gradients for solving linear systems. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* (1934). **49**, 409 (1952).
71. Lima, M. C. P. & Seabra, G. M. Reaction mechanism of the dengue virus serine protease: a QM/MM study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 30288–30296 (2016).
72. Arfken, G. B., Weber, H. J. & Spector, D. *Mathematical Methods for Physicists*, 4th ed. *Am. J. Phys.* **67**, 165–169 (1999).
73. Uberuaga, B. P., Anghel, M. & Voter, A. F. Synchronization of trajectories in canonical molecular-dynamics simulations: Observation, explanation, and exploitation. *J. Chem. Phys.* **120**, 6363–6374 (2004).
74. Chandrasekhar, S. *Stochastic Problems in Physics and Astronomy*. *Rev. Mod. Phys.* **15**, 1–89 (1943).
75. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**, 10089–10092 (1993).
76. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. & Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684–3690 (1984).
77. Miyamoto, S. & Kollman, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.* **13**, 952–962 (1992).
78. Roe, D. R. & Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 3084–3095 (2013).
79. Van Rossum, G. & Drake, F. L. *Python 3 Reference Manual*. (2009).
80. Pereira, D. H., La Porta, F. A., Santiago, R. T., Garcia, D. R. & Ramalho, T. C. New perspectives on the role of frontier molecular orbitals in the study of chemical reactivity: A review. *Revista Virtual de Química* **8**, (2016).
81. Domingo, L. R., Ríos-Gutiérrez, M. & Pérez, P. Applications of the conceptual density functional theory indices to organic chemistry reactivity. *Molecules* **21**, (2016).
82. Anh, N. T. *Frontier Orbitals. 2 - 3 Foreign Affairs* (John Wiley & Sons, Ltd, 2007).
83. Fukui, K. Role of Frontier Orbitals in Chemical Reactions. *Science* (80-.). **218**, 747–754 (1982).

84. Duarte, G. & Matos, R. Entendendo Reações S N 2: Teste de Metodologias e Exploração de Fronteiras Entendendo Reações S N 2: Teste de Metodologias e Exploração de Fronteiras. (2012).
85. Cao, J., Ren, Q., Chen, F. & Lu, T. Comparative study on the methods for predicting the reactive site of nucleophilic reaction. *Sci. China Chem.* **58**, 1845–1852 (2015).
86. Frau, J. & Glossman-Mitnik, D. A conceptual DFT study of the molecular properties of glycating carbonyl compounds. *Chem. Cent. J.* **11**, 1–8 (2017).
87. Martínez-Araya, J. I., Salgado-Morán, G. & Glossman-Mitnik, D. Computational nutraceuticals: Chemical reactivity properties of the flavonoid Naringin by means of conceptual DFT. *J. Chem.* (2013).
88. Glossman-Mitnik, D. Computational study of the chemical reactivity properties of the Rhodamine B molecule. *Procedia Comput. Sci.* **18**, 816–825 (2013).
89. Frisch, M. J. et al. Gaussian 09. (2016).
90. Dos Santos, H. F. et al. Water Solvent Effect on Theoretical Evaluation of ¹H NMR Chemical Shifts: O-Methyl-Inositol Isomer. *J. Phys. Chem. A* **121**, 2839–2846 (2017).
91. Sánchez-Márquez, J. et al. Introducing “UCA-FUKUI” software: reactivity-index calculations. *J. Mol. Model.* **20**, 1–13 (2014).
92. Jofre, F., Anderson, M. E. & Markley, J. L. Biological Magnetic Resonance Data Bank - HEPES.
93. Reid, R. S. The proton NMR spectrum of ascorbic acid: A relevant example of deceptively simple second-order behavior. *J. Chem. Educ.* **66**, 344 (1989).
94. Bisaglia, M., Mammi, S. & Bubacco, L. Kinetic and structural analysis of the early oxidation products of dopamine: Analysis of the interactions with α -synuclein. *J. Biol. Chem.* **282**, 15597–15605 (2007).
95. Wishart, D. S. et al. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.* **37**, Hexanal, HMDB0005994 (2009).
96. Boughorbel, S., Jarray, F. & El-Anbari, M. Optimal classifier for imbalanced data using Matthews Correlation Coefficient metric. *PLoS One* **12**, e0177678 (2017).
97. Maltarollo, V. G. Classification of Staphylococcus Aureus FabI Inhibitors by Machine Learning Techniques. *Int. J. Quant. Struct. Relationships* **4**, 1–14 (2019).
98. Bajusz, D., Rácz, A. & Héberger, K. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *J. Cheminform.* **7**, 20 (2015).
99. Bürgi, H. B., Dunitz, J. D., Lehn, J. M. & Wipff, G. Stereochemistry of reaction paths at carbonyl centres. *Tetrahedron* **30**, 1563–1572 (1974).
100. Hughes, J. L. & Seyler, J. K. Tetrahydroisoquinoline Compounds. (1974).

101. Hwang, O.-Y., Chi, D. Y., Son, H. J. & Seo, J. W. 1,2,3,4 - Tetrahydroisoquinoline Derivatives Having Effects of Preventing and Treating Degenerative and Inflammatory Diseases. (2010).
102. Miller, D. et al. Substitued Tetrahydroisoquinoline Compounds For Cancer Terapy. (2007).
103. Kishimoto, T., Kochi, H. & Kato, M. 1,2,3,4 - Tetrahydroisoquinolines 6.10,7,8 Dihydroxy Substitute-1-Methylanilino and use as Smooth Muscle Relaxants. (1984).

7. APÊNDICE

7.1. BIBLIOTECA DE DADOS

As estruturas contidas na Figura 25 (carbonílicos inativos), apresentam as seguintes nomenclaturas:

- 1) Metanal¹⁶
- 2) Etanal¹⁶
- 3) Benzaldeído¹⁶
- 4) 2-(Naftalen-1-il)propanal¹⁶
- 5) 3-Pentanona¹⁵
- 6) Acetofenona¹⁵
- 7) Propiofenona¹⁵
- 8) 3,3,5-Trimetil-Ciclohexanona¹⁵
- 9) Adamantil-Metil-Cetona¹⁵
- 10) 2-Tert-Butil-Ciclohexanona¹⁵
- 11) 2-Metil-Ciclohexanona¹⁵
- 12) Ciclohexenone¹⁵
- 13) Isoforona¹⁵
- 14) 3-Metil-Ciclohexenona¹⁵

As estruturas contidas na Figura 26 (carbonílicos ativos), apresentam as seguintes nomenclaturas:

- 15) (2-Fluor-Fenil)acetaldeído¹⁶
- 16) (2-Metil-Fenil)acetaldeído¹⁶

- 17) (3,4-Dimetoxi-Fenil)acetaldeído¹⁶
- 18) (3-Fluor-Fenil)acetaldeído¹⁶
- 19) (3-Metil-Fenil)acetaldeído¹⁶
- 20) (4-Fluor-Fenil)acetaldeído¹⁶
- 21) (4-Metoxi-Fenil)acetaldeído¹⁶
- 22) (4-Metil-Fenil)acetaldeído¹⁶
- 23) (5,5-Dimetil-1,3-dioxan-2-il)acetaldeído¹⁶
- 24) 3,3-Dimetil-Butanal¹⁶
- 25) (3,4-Dihidroxi-Fenil)acetaldeído¹⁶
- 26) (4-Hidroxi-Fenil)acetaldeído¹⁶
- 27) Ciclo-Hexil-acetaldeído¹⁶
- 28) 2-(Naftalen-1-il)acetaldeído¹⁶
- 29) Fenilacetaldeído¹⁶
- 30) (Tiofen-3-il)acetaldeído¹⁶
- 31) [(4-Trifluormetoxi)fenil]acetaldeído¹⁶
- 32) (*S*)-Citronella¹⁴
- 33) (*R*)-Citronella¹⁴
- 34) Hexanal¹⁴
- 35) 2-Metilpropanal¹⁷
- 36) 2-Etil-Butanal¹⁷
- 37) (2*S*) 2-Metil-Butanal¹⁷
- 38) (2*R*) 2-Metil-Butanal¹⁷
- 39) (2*Z*) 2-Metil-Pent-2-enal¹⁷
- 40) (2*R*) 2-Fenil-Propanal¹⁷

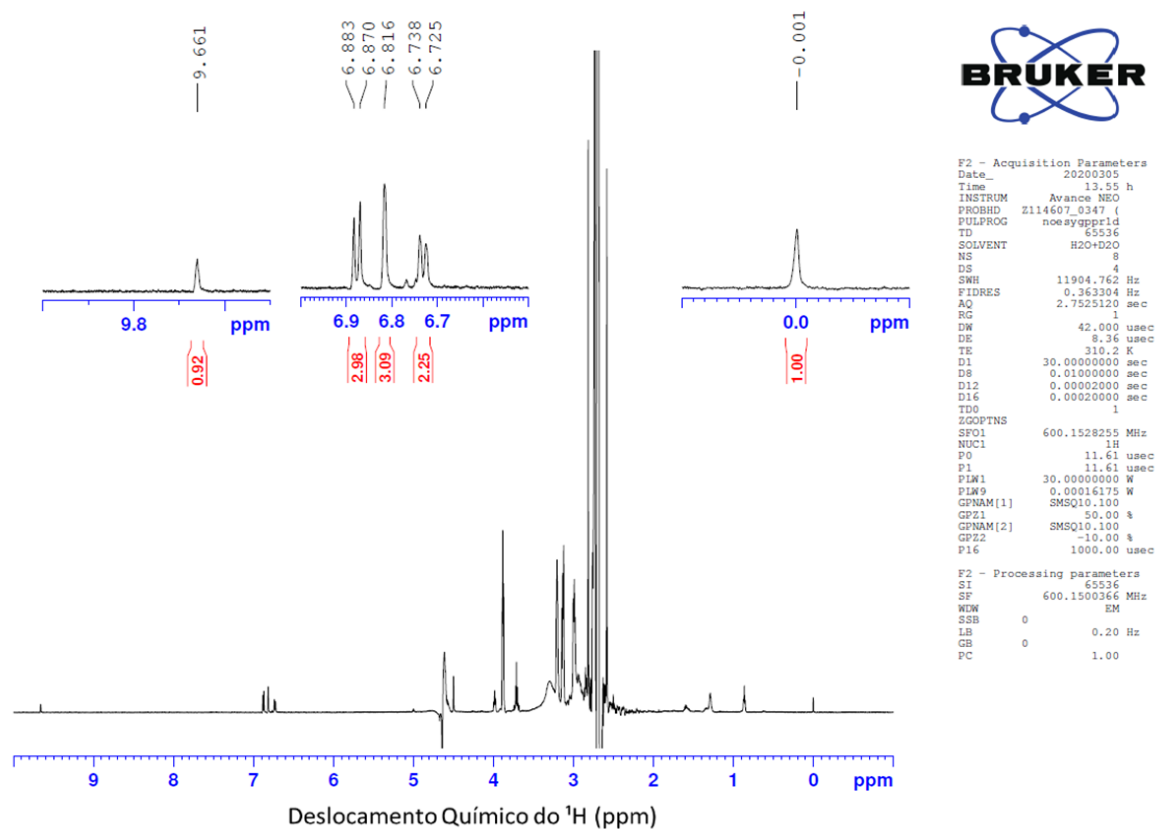
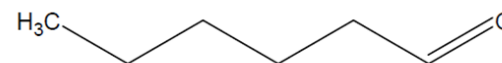
- 41) (2*R*) 2-Metil-Pentanal¹⁷
- 42) 1-Fenilpropan-2-ona¹⁵
- 43) 1-(4-Metoxi-Fenil)propan-2-ona¹⁵
- 44) 1-(4-Hidroxi-Fenil)propan-2-ona¹⁵
- 45) Ciclohexanona¹⁵
- 46) 4-Metil-Ciclohexan-1-ona¹⁵
- 47) 4-Tert-Butil-Ciclohexan-1-ona¹⁵
- 48) 4-Fenil-Ciclohexan-1-ona¹⁵
- 49) (3*R*)-3-Metil-Ciclohexan-1-ona¹⁵

7.2. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros que justificam as atribuições de atividade/inatividade na Figura 24, estão apresentados a seguir.

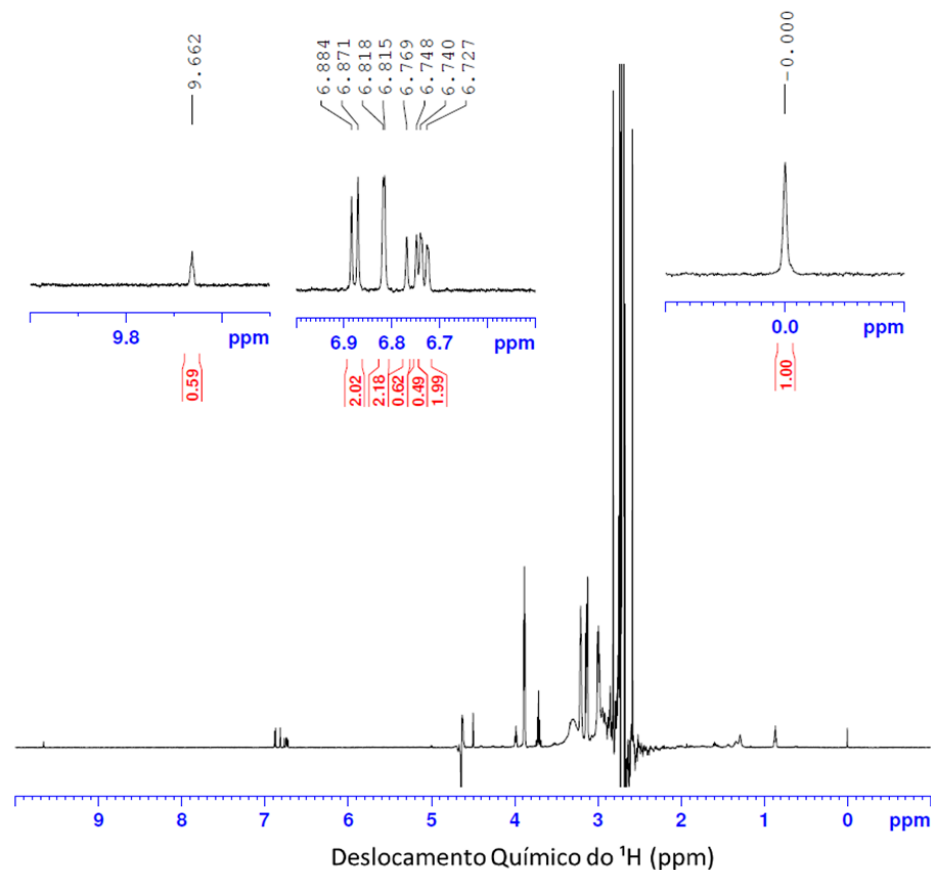
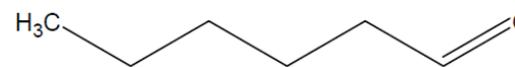
Primeiro foram retratados os resultados de compostos ativos, assim como seus respectivos ensaios não enzimáticos, justificando assim a atribuição para esses compostos como ativos. Em seguida, exibiu-se os compostos inativos.

Hexanal – Ensaio Enzimático (0h)



Espectro de ensaio enzimático com hexanal, logo após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de hexanal e 80 µg/mL de *TfNCS* recombinante, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Hexanal – Ensaio Enzimático (2h)



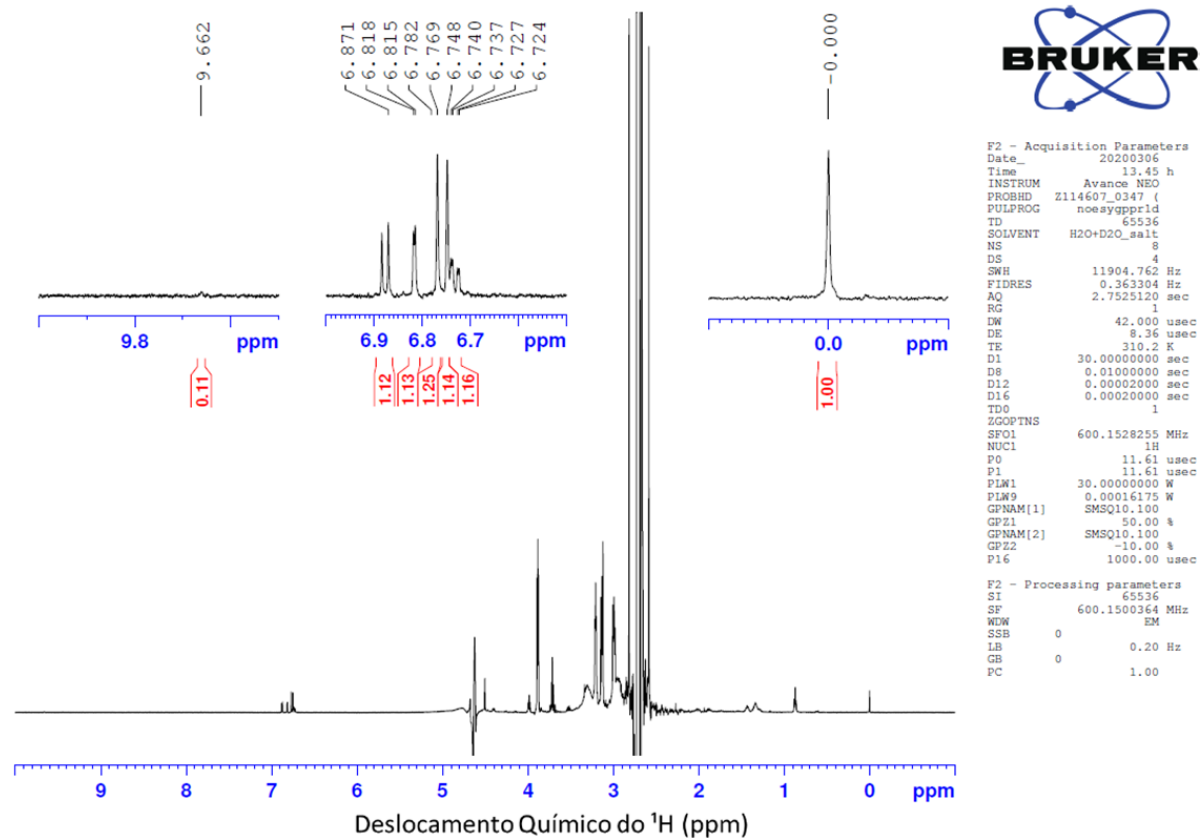
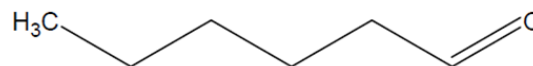
```

F2 - Acquisition Parameters
Date_      20200305
Time       15.47 h
INSTRUM    Avance NEO
PROBHD     Z114607_0347 (
PULPROG    noesygpprd
TD         65536
SOLVENT    H2O+D2O_salt
NS         8
DS         4
SWH        11904.762 Hz
FIDRES     0.362304 Hz
AQ         2.7525120 sec
RG         1
DW         42.000 usec
DE         8.36 usec
TE         310.1 K
D1         30.00000000 sec
D8         0.01000000 sec
D12        0.00002000 sec
D16        0.00020000 sec
TDO        1
ZGPPPTS
SFO1       600.1528255 MHz
NUC1       1H
FO         11.61 usec
P1         11.61 usec
PLW1       30.00000000 W
PLW9       0.00016175 W
GPNAM[1]   SMSQ10.100
GPZ1       50.00 %
GPNAM[2]   SMSQ10.100
GPZ2       -10.00 %
P16        1000.00 usec

F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         600.1500359 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.20 Hz
GB         0
PC         1.00
    
```

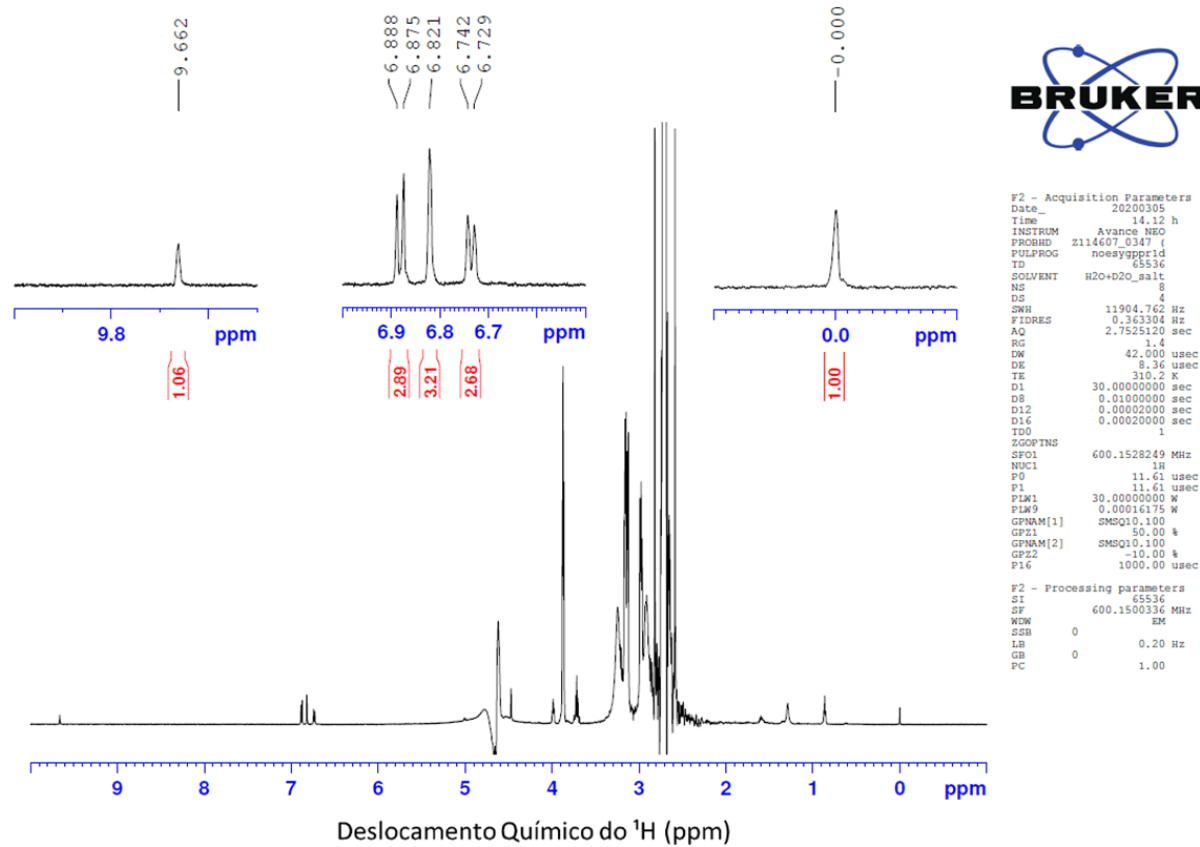
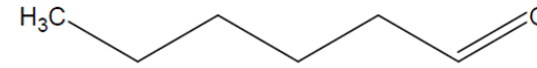
Espectro de ensaio enzimático com hexanal, 2 horas após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de hexanal e 80 µg/mL de *Tf*NCS recombinante, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Hexanal – Ensaio Enzimático (1 dia)



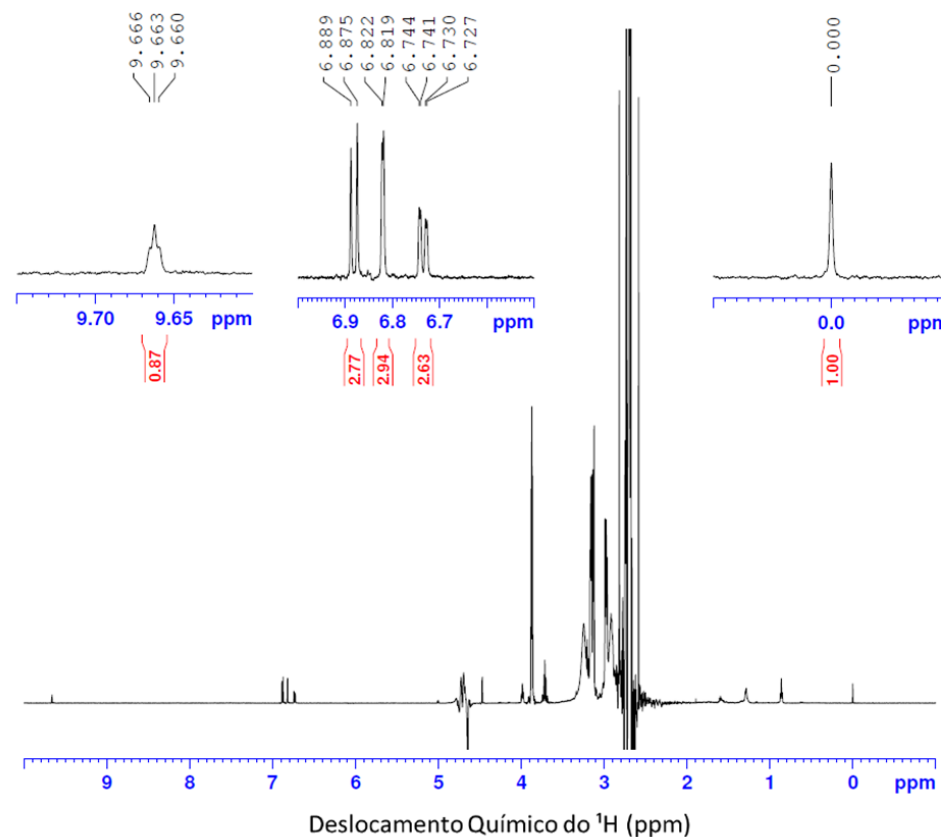
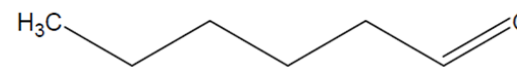
Espectro de ensaio enzimático com hexanal, 1 dia após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de hexanal e 80 µg/mL de *Tf*NCS recombinante, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Hexanal – Experimento Controle (0h)



Espectro de experimento controle com hexanal, logo após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Hexanal – Experimento Controle (2h)



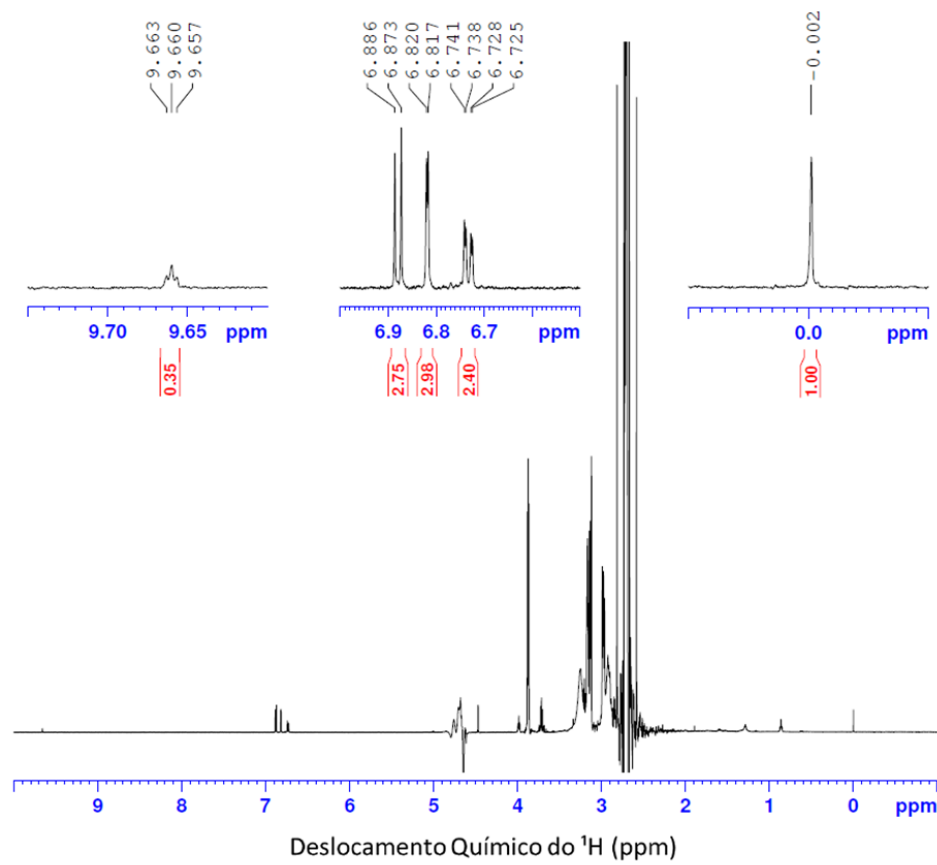
```

F2 - Acquisition Parameters
Date_      20200305
Time       16.10 h
INSTRUM    Avance NEO
PROBRD     Z114607_0347 (
PULPROG    noesyppr1d
TD         65536
SOLVENT    H2O+d2O_salt
NS         8
DS         4
SWH        11904.762 Hz
FIDRES     0.363304 Hz
AQ         2.7525120 sec
RG         1.4
DW         42.000 usec
DE         8.36 usec
TE         310.2 K
D1         30.00000000 sec
D8         0.01000000 sec
D12        0.00002000 sec
D16        0.00020000 sec
TD0        1
ZCOPTNS
SF01       600.1528249 MHz
NUC1       1H
P0         11.61 usec
P1         11.61 usec
PLM1       30.00000000 W
PLM2       0.00016175 W
GPNAM[1]   SMSQ10.100
GPZ1       50.00 %
GPNAM[2]   SMSQ10.100
GPZ2       -10.00 %
P16        1000.00 usec

F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         600.1500325 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.20 Hz
GB         0
PC         1.00
    
```

Espectro de experimento controle com hexanal, 2 horas após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascórbico, 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Hexanal – Experimento Controle (1 dia)



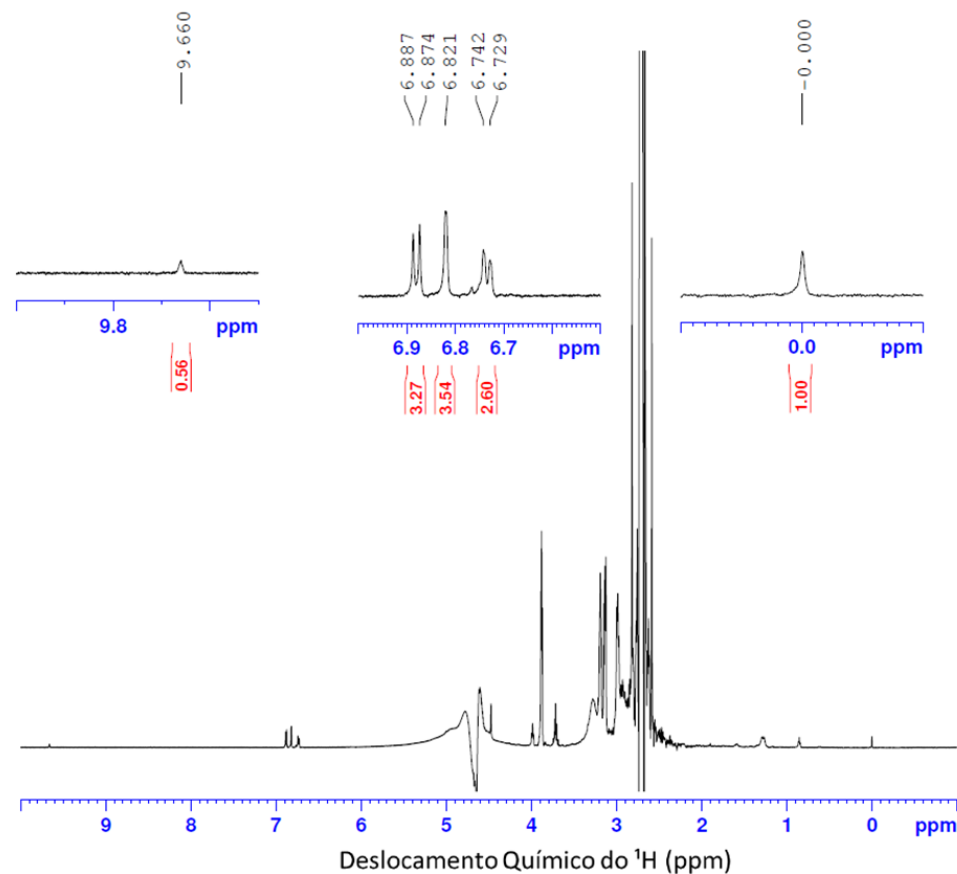
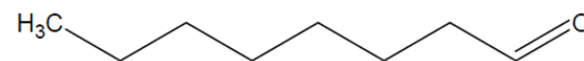
```

F2 - Acquisition Parameters
Date_      20200306
Time       14.09 h
INSTRUM    Avance NEO
PROBHD     z114607_0347 (
PULPROG    noesygpr1d
TD         65536
SOLVENT    H2O+D2O_salt
NS         8
DS         4
SWH        11904.762 Hz
FIDRES     0.363304 Hz
AQ         2.7525120 sec
RG         1.4
LW        42.000 usec
DE        8.36 usec
TE         310.2 K
D1        30.0000000 sec
D8        0.0100000 sec
D12       0.00002000 sec
D16       0.00002000 sec
TD0       1
ZGPGTNS
SF01      600.1528249 MHz
NUC1      1H
P0        11.61 usec
P1        11.61 usec
P1M1     30.00000000 W
P1M9     0.00016175 W
GPNAM[1]  SMSQ10.100
GP21     50.00 %
GPNAM[2]  SMSQ10.100
GP22     -10.00 %
P16      1000.00 usec

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        600.1500344 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.20 Hz
GB        0
PC        1.00
    
```

Espectro de experimento controle com hexanal, 1 dia após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Octanal – Ensaio Enzimático (0h)



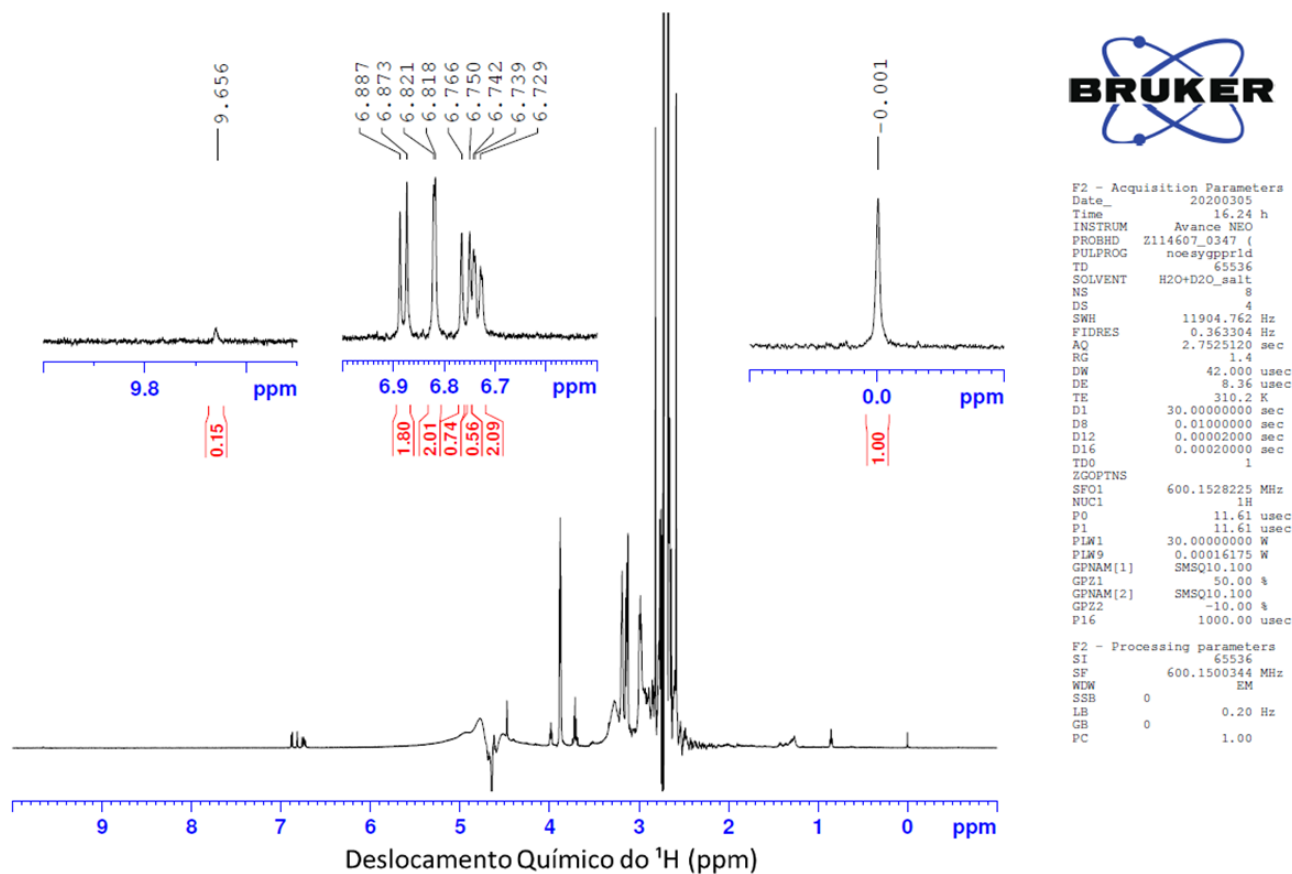
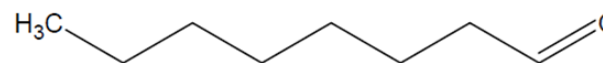
```

F2 - Acquisition Parameters
Date_      20200305
Time       14.29 h
INSTRUM    Avance NEO
PROBHD     Z114607_0347 (
PULPROG    noesygpprid
TD         65536
SOLVENT    H2O+D2O_salt
NS         8
DS         4
SWH        11904.762 Hz
FIDRES     0.363304 Hz
AQ         2.7525120 sec
RG         1.4
LW         42.000 usec
DE         8.36 usec
TE         310.1 K
D1         30.00000000 sec
D8         0.01000000 sec
D12        0.00002000 sec
D16        0.00020000 sec
TDO        1
ZGPTNS
SFO1       600.1528225 MHz
NUC1       1H
PO         11.61 usec
P1         11.61 usec
PLW1       30.00000000 W
PLW9       0.00016175 W
GPNAM[1]   SMSQ10.100
GPZ1       50.00 %
GPNAM[2]   SMSQ10.100
GPZ2       -10.00 %
P16        1000.00 usec

F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         600.1500333 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.20 Hz
GB         0
PC         1.00
    
```

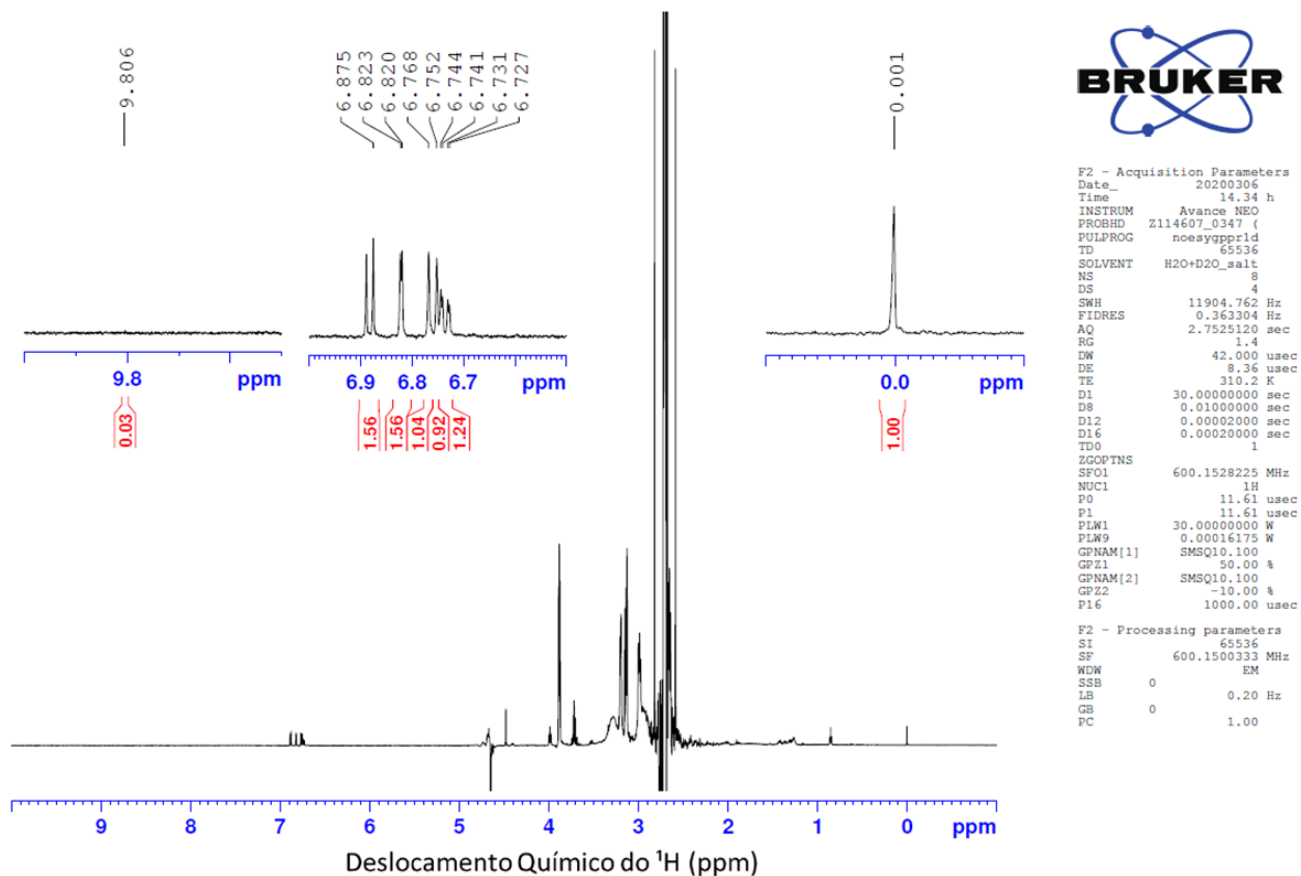
Espectro de ensaio enzimático com octanal, logo após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de octanal e 80 µg/mL de TNCs recombinante, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Octanal – Ensaio Enzimático (2h)



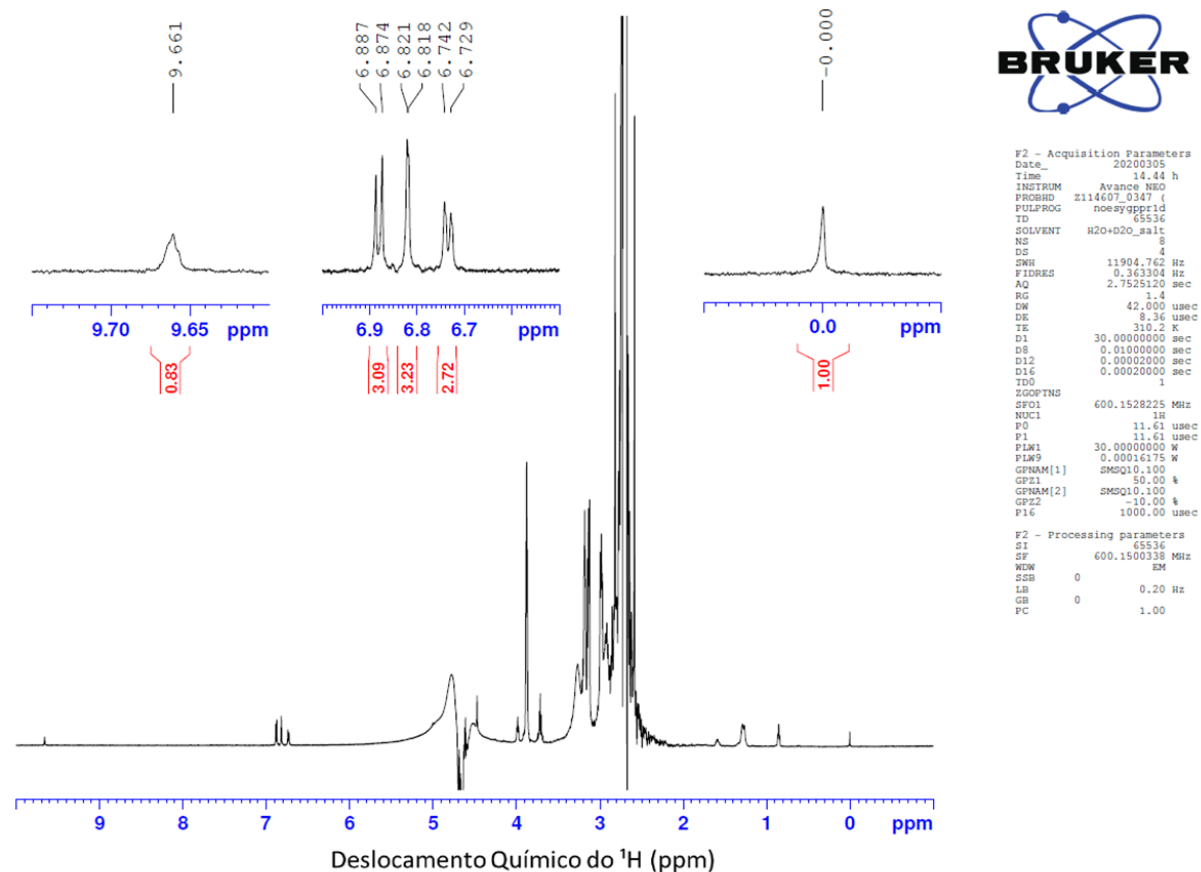
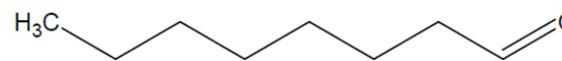
Espectro de ensaio enzimático com octanal, 2 horas após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de octanal e 80 µg/mL de TNCs recombinante, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Octanal – Ensaio Enzimático (1 dia)



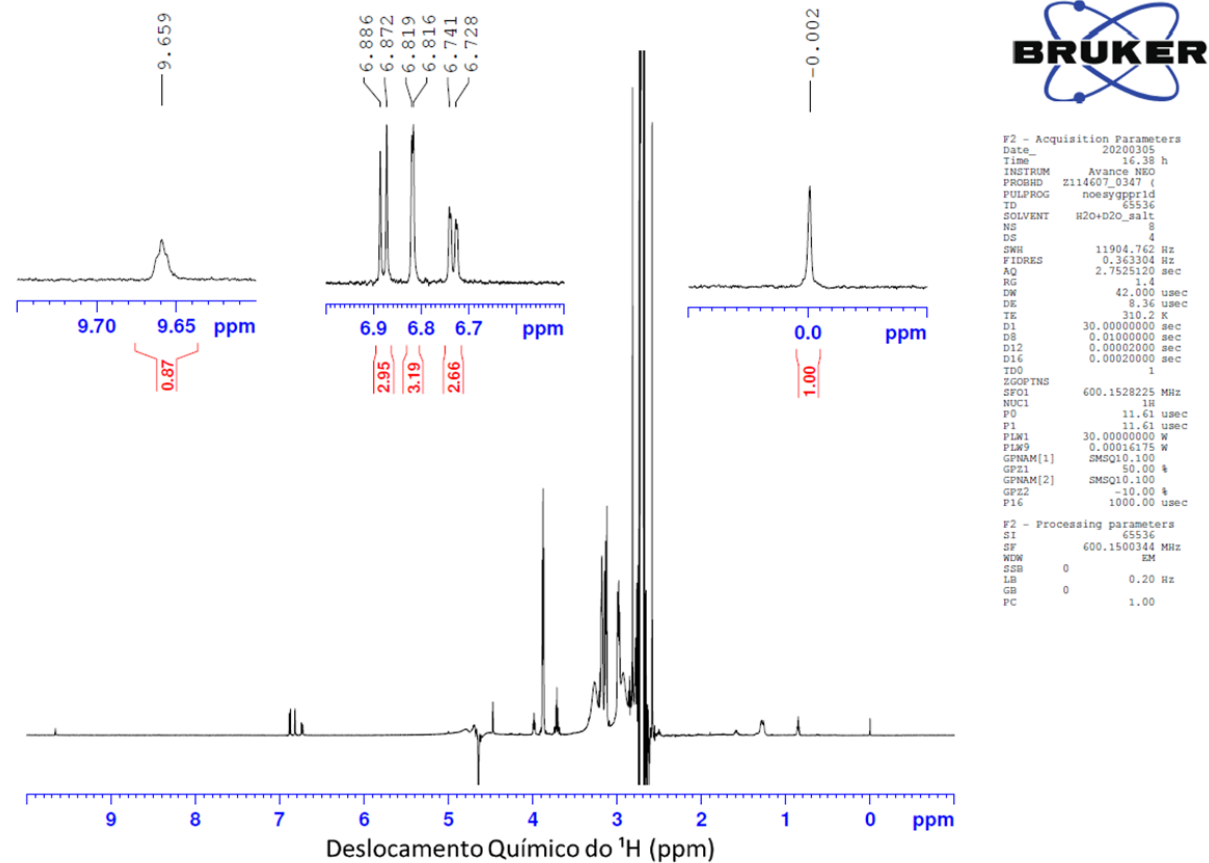
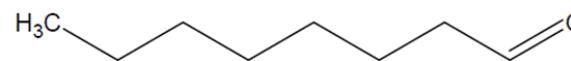
Espectro de ensaio enzimático com octanal, 1 dia após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de octanal e 80 µg/mL de TNCs recombinante, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Octanal – Experimento Controle (0h)



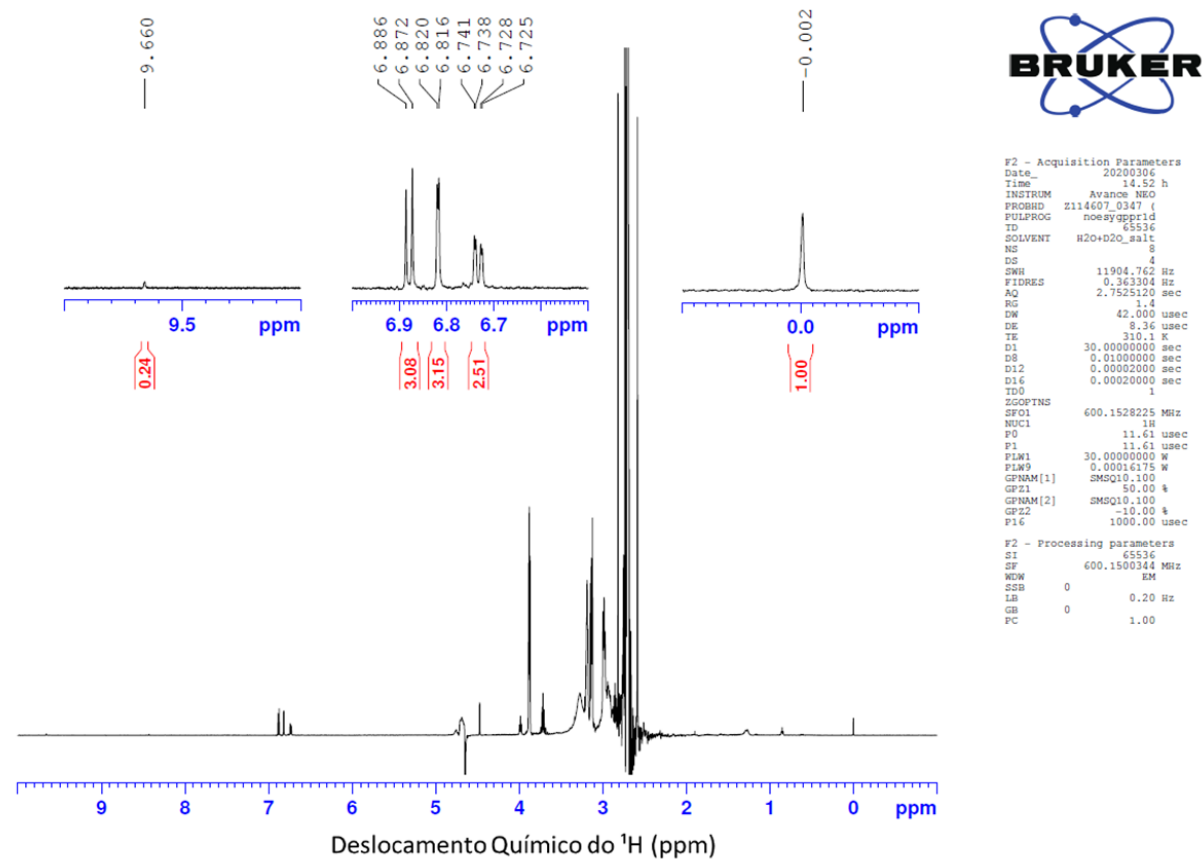
Espectro de experimento controle com octanal, logo após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de octanal, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Octanal – Experimento Controle (2h)



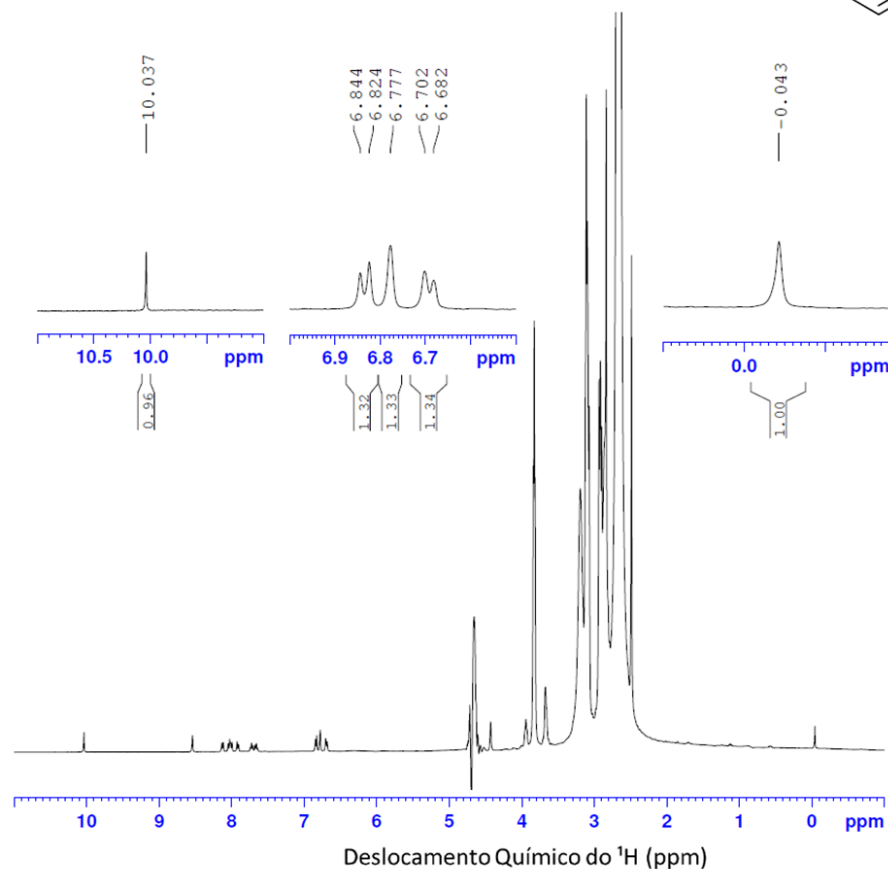
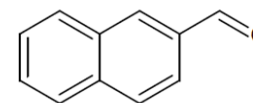
Espectro de experimento controle com octanal, 2 horas após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de octanal, usando 0,13 mM de DSS.para quantificação dos sinais.

Octanal – Experimento Controle (1 dia) CCCCCCCC=O



Espectro de experimento controle com octanal, 1 dia após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de octanal, usando 0,13 mM de DSS.para quantificação dos sinais.

2 - Naftaldeído – Ensaio Enzimático (0h)



BRUKER

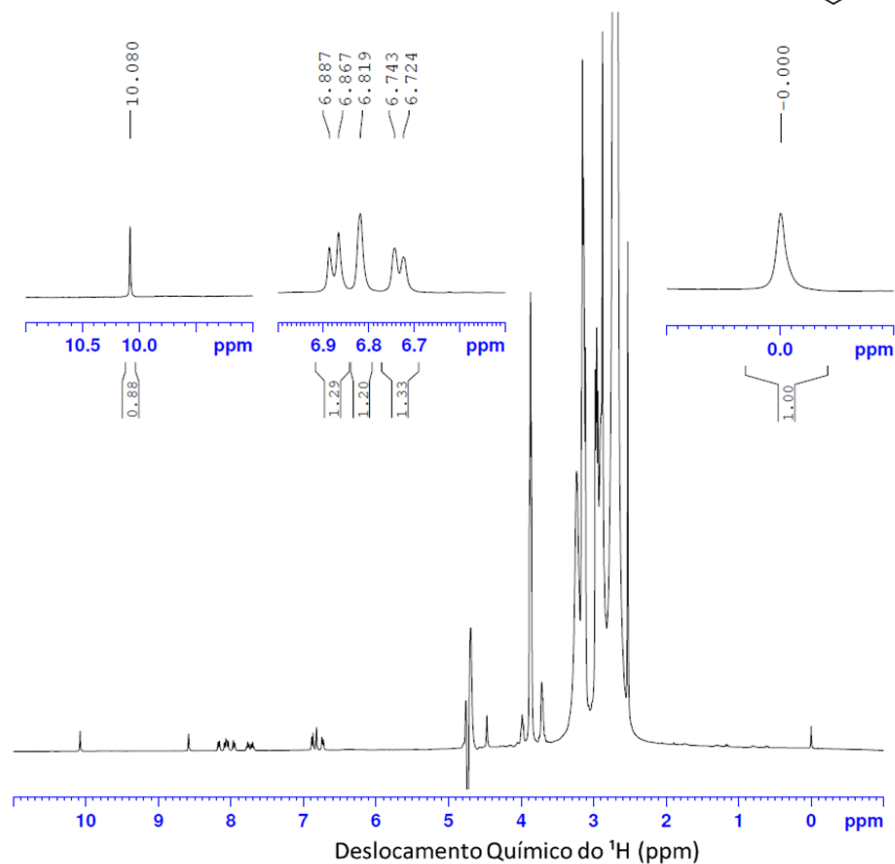
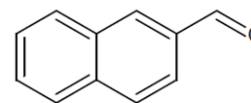
```

F2 - Acquisition Parameters
Date_      20191221
Time       19.07 h
INSTRUM    spect
PROBHD     z3750_0125 (5)
PULPROG    noesygppr1d
ID         65536
SOLVENT    H2O+D2O_salt
NS         40
DS         0
SWH        6402.049 Hz
FIDRES     0.195375 Hz
AQ         5.1183615 sec
RG         31.88
DW         78.100 usec
DE         19.38 usec
TE         300.1 K
D1         2.0000000 sec
D8         0.0100000 sec
D12        0.00002000 sec
D16        0.00020000 sec
TD0        1
ZCOPTNS
SF01       400.1818808 MHz
NUC1       1H
P0         8.43 usec
P1         8.43 usec
PLW1       10.47099972 W
PLW9       0.00002977 W
GPNAM[1]   SMSQ10.100
GPZ1       50.00 %
GPNAM[2]   SMSQ10.100
GPZ2       -10.00 %
P16        1000.00 usec

F2 - Processing parameters
SI         16384
SF         400.1800000 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         2.00 Hz
GB         0
PC         1.00
    
```

Espectro de ensaio enzimático com 2-naftaldeído, logo após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascórbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de 2-naftaldeído e 80 $\mu\text{g/mL}$ de *Tf*NCS recombinante, usando 0,13 mM de DSS.para quantificação dos sinais.

2 - Naftaldeído – Ensaio Enzimático (2h)



BRUKER

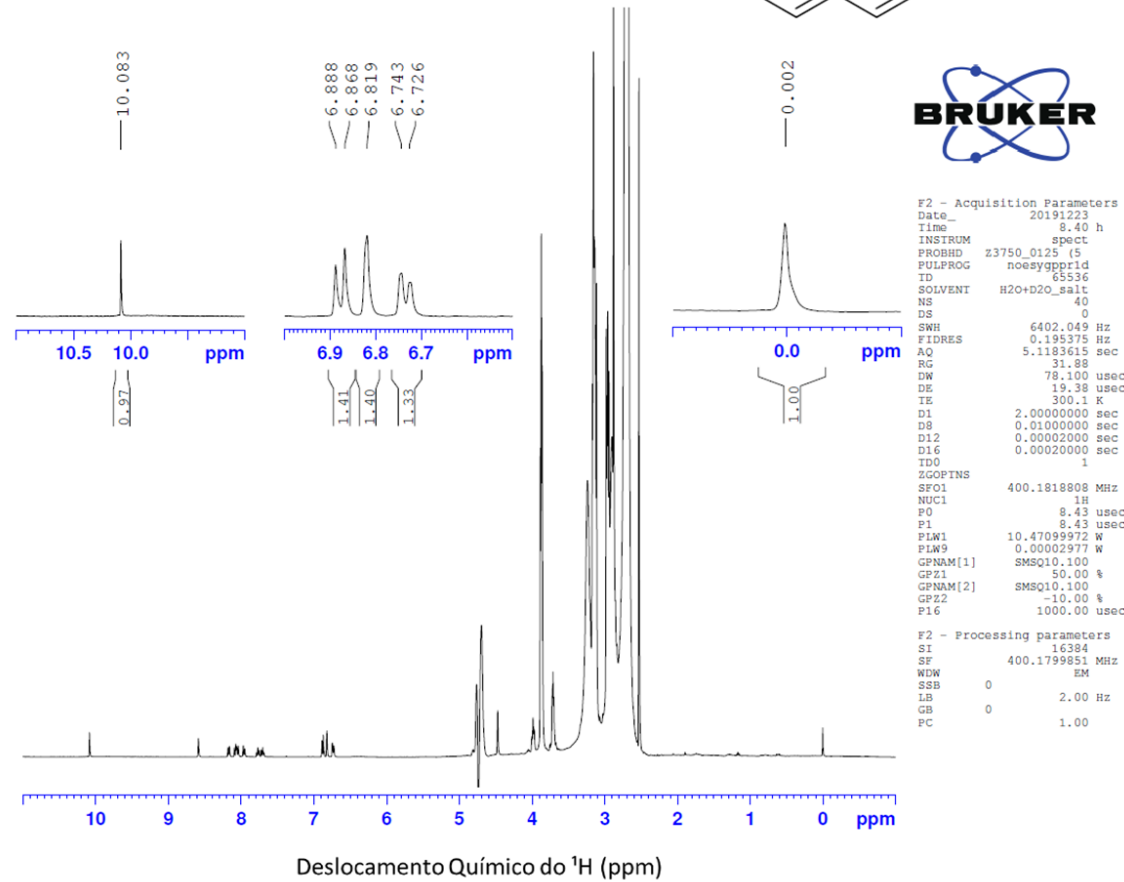
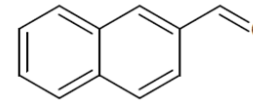
```

F2 - Acquisition Parameters
Date_      20191221
Time       21.02 h
INSTRUM    spect
PROBHD     z3750_0125 (5)
PULPROG    noesygpprid
ID         65536
SOLVENT    H2O+D2O_salt
NS         40
DS         0
SWH        6402.049 Hz
FIDRES     0.195375 Hz
AQ         5.1183615 sec
RG         31.88
DW         78.100 usec
DE         19.38 usec
TE         300.1 K
D1         2.00000000 sec
D8         0.01000000 sec
D12        0.00002000 sec
D16        0.00020000 sec
TD0        1
ZGPGPNS
SFO1       400.1818808 MHz
NUC1       1H
P0         8.43 usec
P1         8.43 usec
PLW1       10.47099972 W
PLW9       0.00002977 W
GPNAM[1]   SMSQ10.100
GPZ1       50.00 %
GPNAM[2]   SMSQ10.100
GPZ2       -10.00 %
P16        1000.00 usec

F2 - Processing parameters
SI         16384
SF         400.1799851 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         2.00 Hz
GB         0
PC         1.00
    
```

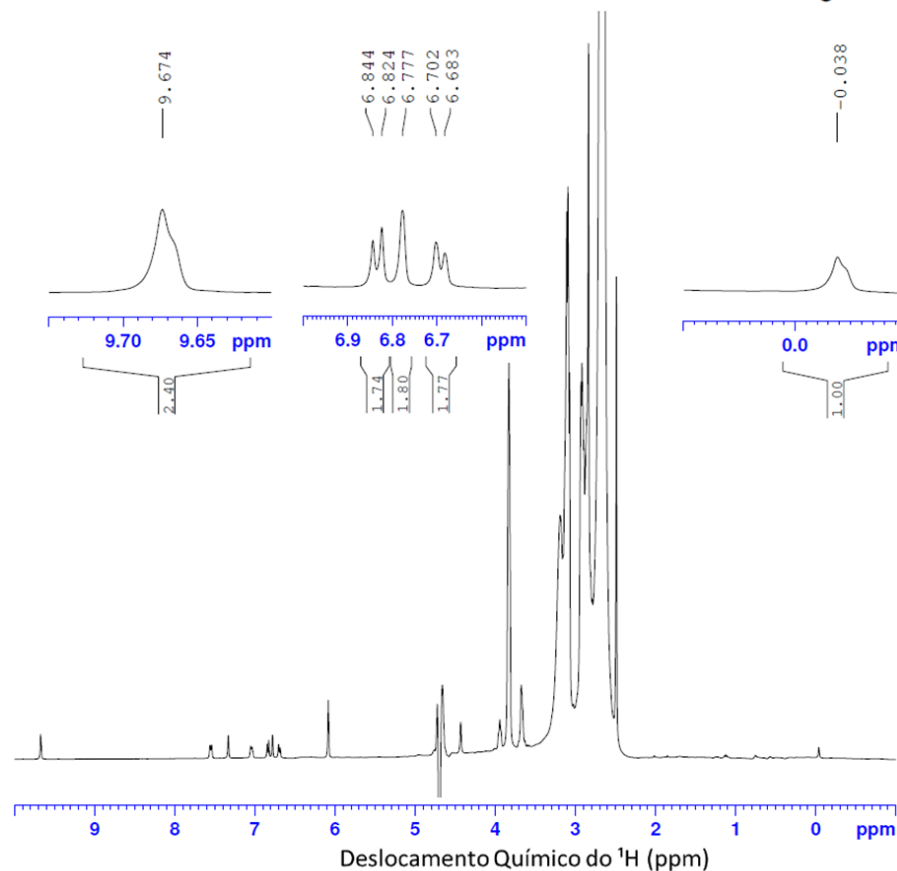
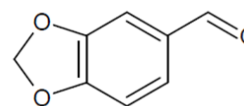
Espectro de ensaio enzimático com 2-naftaldeído, 2 horas após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de 2-naftaldeído e 80 µg/mL de *T*NCS recombinante, usando 0,13 mM de DSS.para quantificação dos sinais.

2 - Naftaldeído – Ensaio Enzimático (1 dia)



Espectro de ensaio enzimático com 2-naftaldeído, 1 dia após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de 2-naftaldeído e 80 µg/mL de *Tf*NCS recombinante, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Piperonal – Ensaio Enzimático (0h)



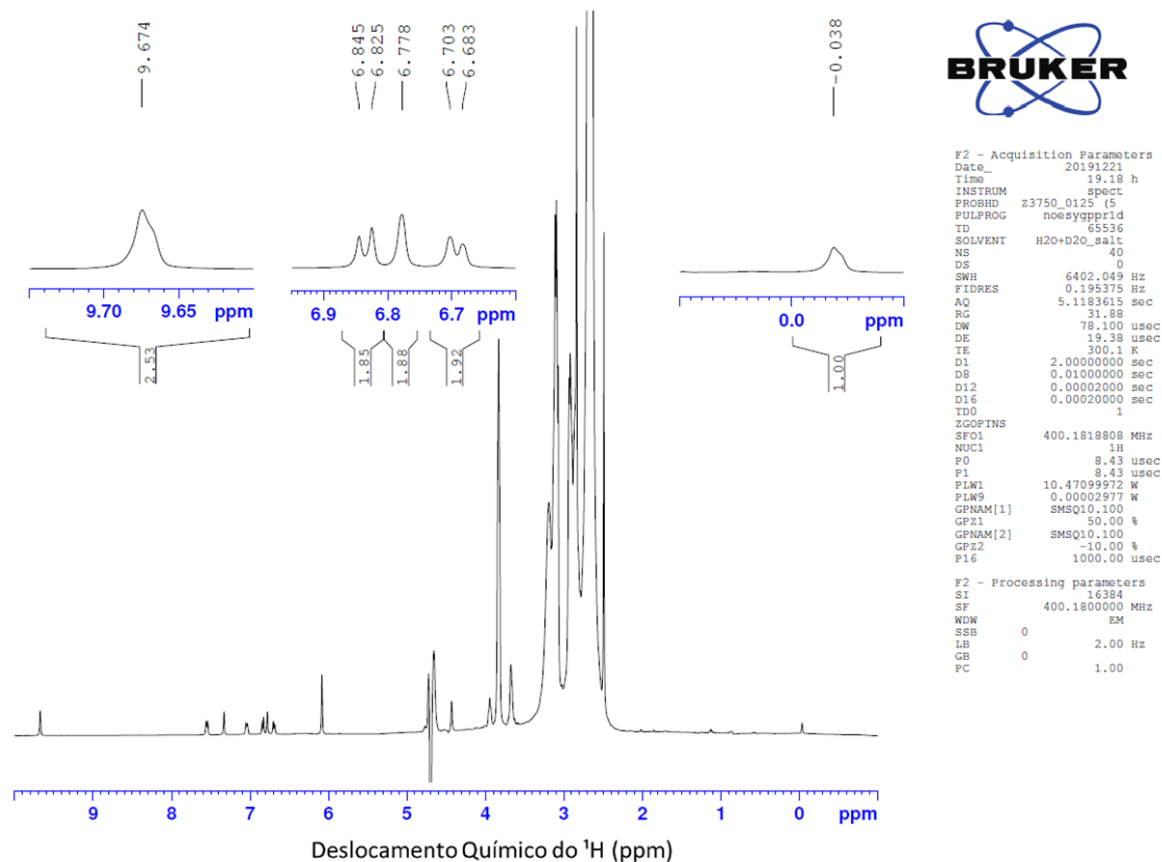
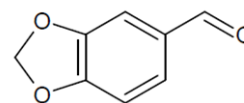
```

F2 - Acquisition Parameters
Date_      20191221
Time       17.00 h
INSTRUM    spect
PROBHD     z3750_0125 (5)
PULPROG    noesygpprid
TD         65536
SOLVENT    H2O+D2O_salt
NS         40
DS         0
SWH        6402.049 Hz
FIDRES     0.195375 Hz
AQ         5.1183615 sec
RG         31.88
DW         78.100 usec
DE         19.38 usec
TE         300.2 K
D1         2.00000000 sec
D8         0.01000000 sec
D12        0.00002000 sec
D16        0.00020000 sec
TD0        1
ZGPGTNS
SFO1       400.1818808 MHz
NUC1       1H
P0         8.43 usec
P1         8.43 usec
P1W1       10.47099972 W
P1W9       0.00002977 W
GPNAM[1]   SMSQ10.100
GPZ1       50.00 %
GPNAM[2]   SMSQ10.100
GPZ2       -10.00 %
P16        1000.00 usec

F2 - Processing parameters
SI         16384
SF         400.1800000 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         2.00 Hz
GB         0
PC         1.00
    
```

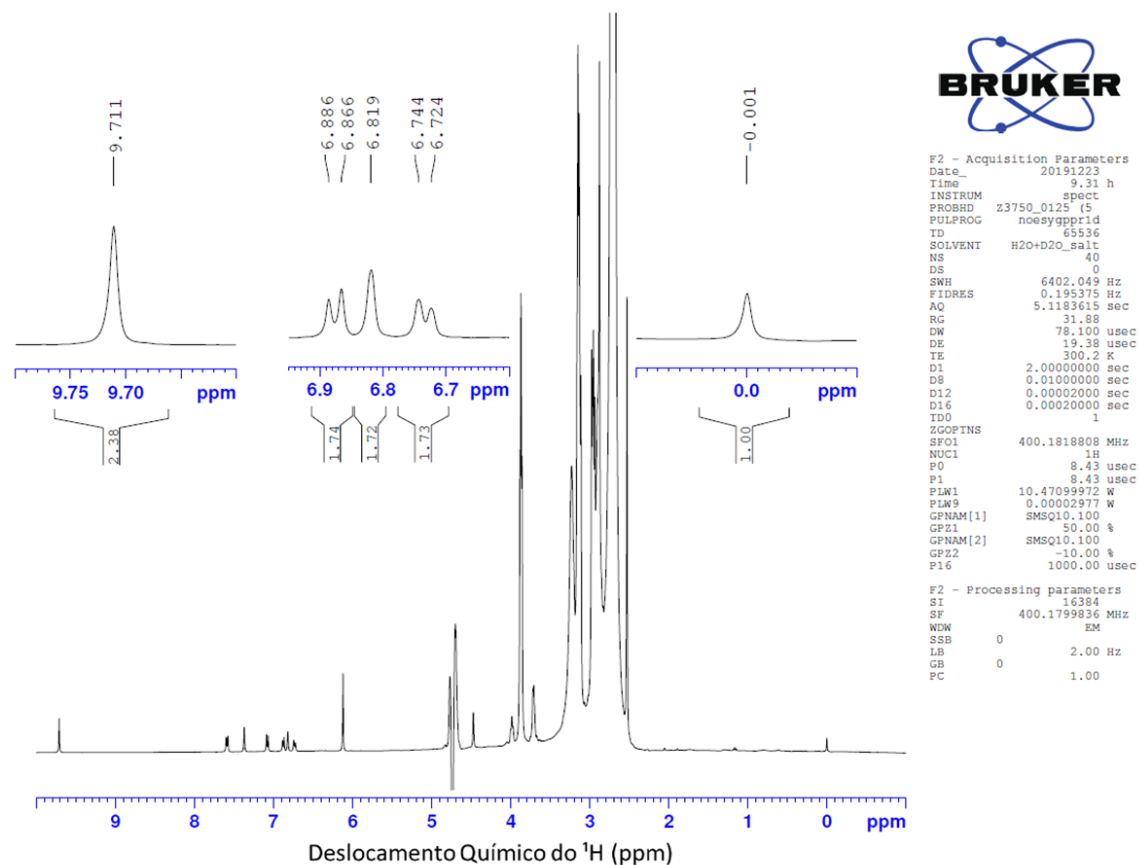
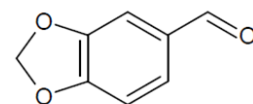
Espectro de ensaio enzimático com piperonal, logo após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de piperonal e 80 µg/mL de *T*NCS recombinante, usando 0,13 mM de DSS.para quantificação dos sinais.

Piperonal – Ensaio Enzimático (2h)



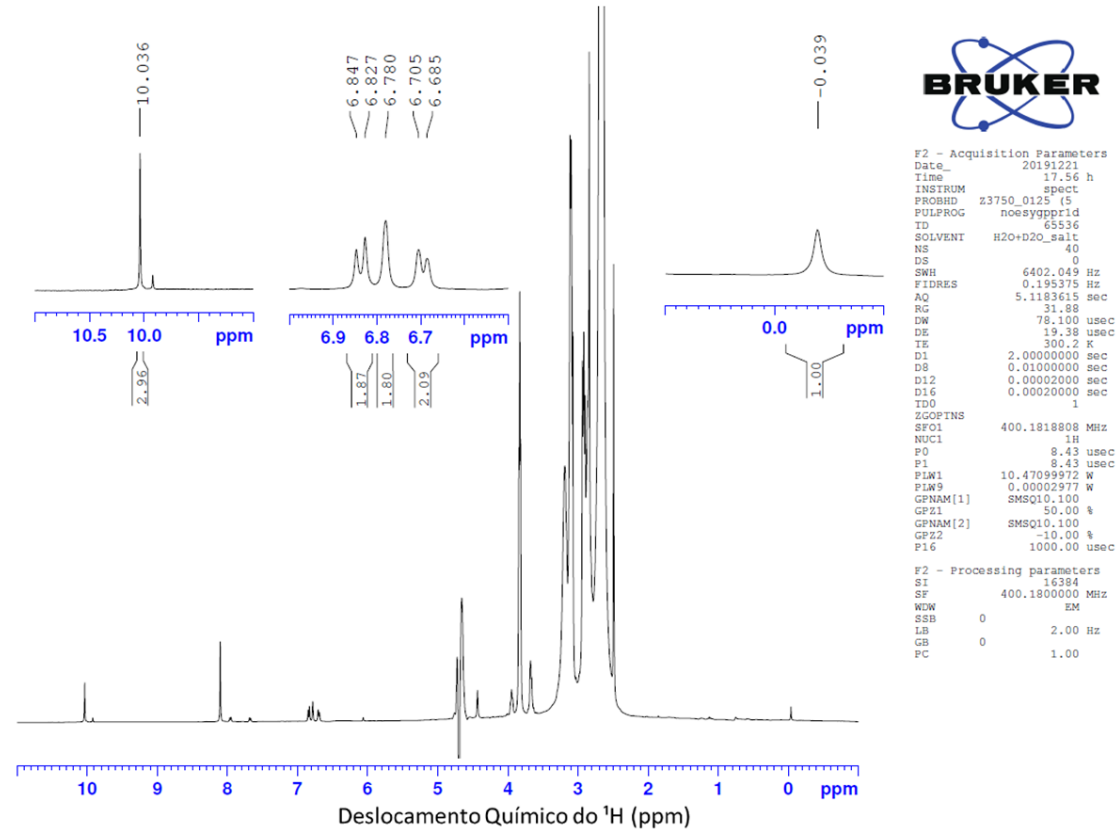
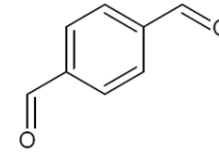
Espectro de ensaio enzimático com piperonal, 2 horas após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de piperonal e 80 µg/mL de *T*NCS recombinante, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Piperonal – Ensaio Enzimático (1 dia)



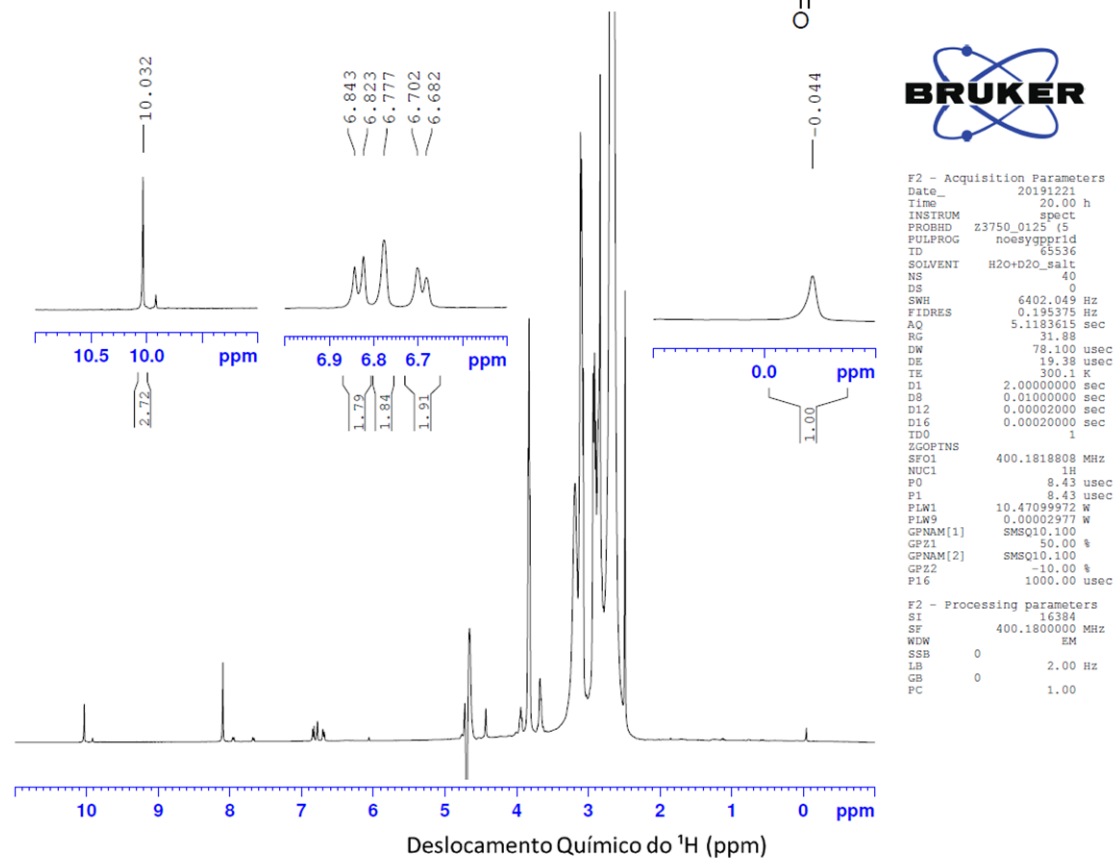
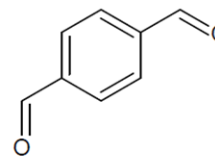
Espectro de ensaio enzimático com piperonal, 1 dia após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascórbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de piperonal e 80 µg/mL de TINCNS recombinante, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Tereftaldeído – Ensaio Enzimático (0h)



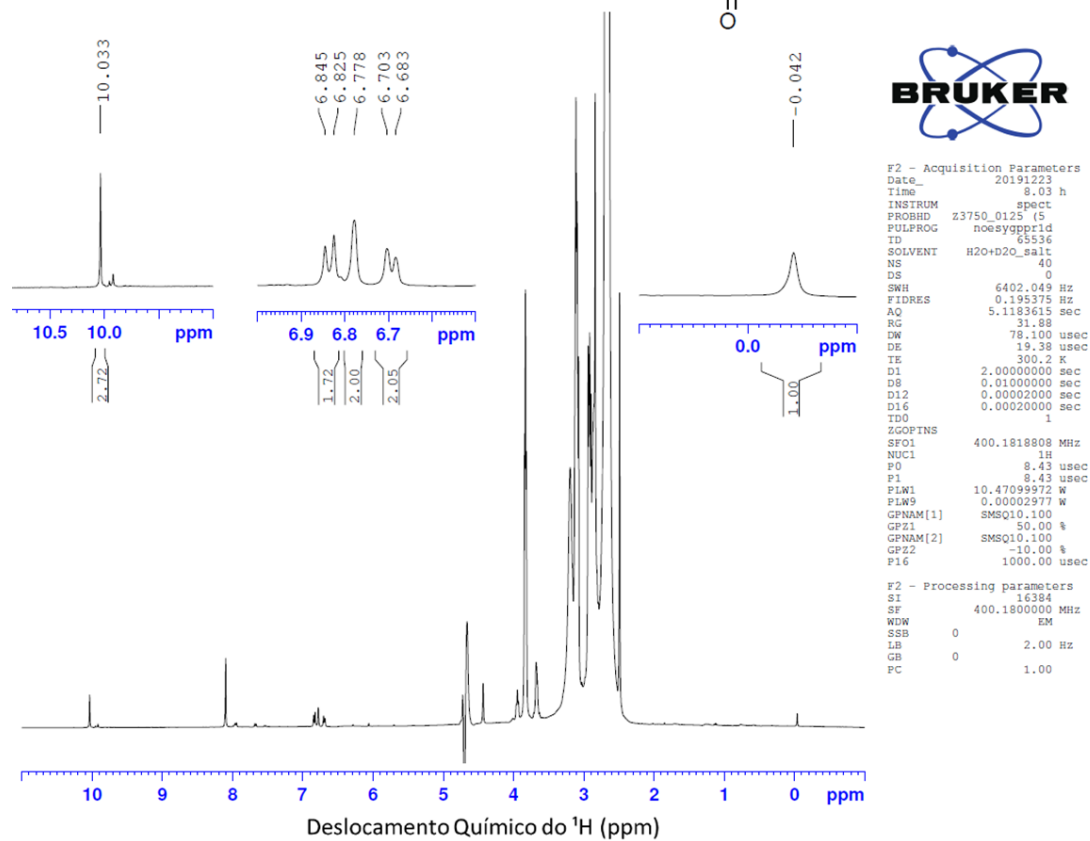
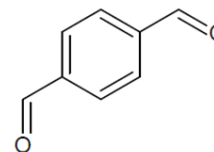
Espectro de ensaio enzimático com tereftaldeído, logo após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascórbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de tereftaldeído e 80 µg/mL de *Tf*NCS recombinante, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Tereftaldeído – Ensaio Enzimático (2h)



Espectro de ensaio enzimático com tereftaldeído, 2 horas após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de tereftaldeído e 80 µg/mL de *T*NCS recombinante, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.

Tereftaldeído – Ensaio Enzimático (1 dia)



Espectro de ensaio enzimático com tereftaldeído, 1 dia após a mistura. Solução 10% DMSO, 50 mM HEPES, 5 mM ácido ascorbico, 2,5 mM de dopamina, 2,5 mM de tereftaldeído e 80 µg/mL de TANCs recombinante, usando 0,13 mM de DSS para quantificação dos sinais.