

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“BIORREATOR DA 5’-DEOXI-5’-METILTIOADENOSINA  
FOSFORILASE: DO DESENVOLVIMENTO A APLICAÇÃO  
EM ENSAIOS DE AFINIDADE”**

**Juliana Gomes Rodrigues\***

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de DOUTORA EM  
CIÊNCIAS, área de concentração:  
QUÍMICA ORGÂNICA.

**Orientadora: Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass**

**\* bolsista CAPES**

**São Carlos - SP  
2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Juliana Gomes Rodrigues, realizada em 19/04/2023.

**Comissão Julgadora:**

Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass (UFSCar)

Prof. Dr. Fernando Gonçalves de Almeida (OMass Therapeutics)

Prof. Dr. Thiago André Moura Veiga (UNIFESP)

Profa. Dra. Lucilia Kato (UFG)

Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa (UFCAT)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Ana e João e ao  
meu marido João Gabriel*

“Nobody said it was easy  
No one ever said it would be this hard  
Oh, take me back to the start”  
(Coldplay)

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Quezia Cass pela orientação no desenvolvimento do projeto, por todas as discussões, sempre compartilhando todo seu conhecimento ao longo dessa jornada. Isso contribuiu imensamente na pessoa que me tornei. Agradeço também pela amizade, todas as conversas e momentos de descontração.

Ao Bruno Amaral e Izadora Furlani que me acolheram tão bem no laboratório, por todo apoio, todas as conversas, os ensinamentos e tantos momentos bons compartilhados e por terem se tornado grande amigos. Conversar, estar com vocês, é sempre maravilhoso e eu sinto muita saudade. Ao Bruno que com tanto amor e entusiasmo fez com que eu também me encantasse com a cromatografia e me incluiu a família Separare.

Aos meus amigos Cleiton, Luciano Rodrigues, Welma, Larissa, Thais, Marina, Marília e Júlia por tantos momentos bons dentro e fora da universidade, pelas conversas e tudo mesmo, muito obrigada. Vocês, junto com o Bruno e a Iza se tornaram uma família em São Carlos e só tenho saudades de todos nós reunidos.

Ao meu marido João Gabriel, por todo amor, apoio, carinho, conselhos, conversas e compreensão nos momentos árdusos ao longo dessa caminhada, sempre com paciência e zelo. Muito obrigada por todo incentivo e forças para concluir este trabalho, por todos os puxões de orelha que foram necessários para me manter firme até aqui.

A meus pais, Ana Paula e João e ao meu irmão Leandro, o meu agradecimento incondicional, por todo apoio durante minha jornada desde a graduação até o doutorado, sem vocês eu não teria chegado até aqui. Por terem compreendido os momentos de ausência, pelo incentivo, enfim não existe agradecimento suficiente. Dedico todo meu amor e carinho.

À Profa. Dra. Alessandra Leda Valverde pela colaboração com o fornecimento de extrato de esponja marinha para triagem.

À Profa. Dra. Richele Priscila Severino pela colaboração com o fornecimento de extratos de plantas do cerrado para triagem.

Aos docentes e ao corpo técnico e administrativo do Departamento de Química da UFSCar e ao Programa de Pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Adenosina desaminase
ADK	Adenilato quinase
ADSL	Adenilosuccinato liase
ADSS	Adenilosuccinato sintase
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise das variâncias
AS-MS	Seleção de afinidade por espectrometria de massas (do inglês, <i>affinity selection mass spectrometry</i> )
DMNP	<i>Dictionary of Marine Natural Products</i>
DNP	<i>Dictionary of Natural Products</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
FDA	(do inglês, <i>Food and Drug Administration</i> )
GNPS	(do inglês, <i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i> )
HGPRT	Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase
HMDB	Human Metabolome Database
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução (do inglês, <i>high resolution mass spectrometry</i> )
IMPDH	Inosina monofosfato desidrogenase
HTS	triagem de ligantes de alta eficiência em larga escala (do inglês, <i>high throughput screening</i> )
kDa	Kilodalton
$K_m$	Constante de Michaelis-Mentem
LC	Cromatografia líquida (do inglês, <i>liquid chromatography</i> )

LC-HRMS	<i>Liquid Chromatography – tandem High-resolution mass spectrometry</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry</i>
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MB	Partículas magnéticas (do inglês, <i>magnetic beads</i> )
MTAP	5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase
MTA	5'-metiltioadenosina
MTR1P	5-metiltioribose-1-fosfato
MeOH	Metanol
min	Unidade de Tempo (minutos)
mm	Unidade de Distância (milímetro)
MS	Espectrometria de massas (do inglês, <i>mass spectrometry</i> )
nm	Unidade de Distância (nanômetro)
NP	Nucleosídeo Fosforilase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PN's	Produtos naturais
PNP	Purina nucleosídeo fosforilase
PZQ	Praziquantel
RDA	Retro-Diels-Alder
QqTOF	<i>Quadrupole-quadrupole-time-of-flight</i>
s	Unidade de Tempo (segundos)
UHPLC	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
v/v	volume/volume
µm	Unidade de Distância (micrômetro)
λ	Comprimento de onda

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1. Características de ensaios HTS acoplados à espectrometria de massas. Adaptado de McLAREN et al <sup>33</sup> .....	7
TABELA 3.1. Informações sobre partículas magnéticas.....	21
TABELA 3.2. Parâmetros dos algoritmos para o processamento dos dados pelo MZmine.....	35
TABELA 3.3. Bases de dados utilizadas.....	39
TABELA 4.1. Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação de adenosina e adenina no modo HILIC de eluição. ....	46
TABELA 4.2. Dados de análise de variância (ANOVA) para a validação do método desenvolvido. Valores obtidos através da rotina computacional regression2 no software Octave (versão 4.2.1). <sup>75</sup> .....	50
TABELA 4.3. Estruturas moleculares dos compostos para triagem em ensaio de inibição.....	61
TABELA 4.4. Perfil químico dos extratos de <i>Aspidosperma macrocarpon</i> : informações dos compostos desreplicados. ....	79

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Exemplos de fármacos derivados de produtos naturais. ....	3
FIGURA 1.2. Etapas envolvidas nos ensaios de ligand fishing. Etapa 1: carregamento com uma biblioteca natural ou sintética e incubação por tempo estabelecido; Etapa 2: lavagem para retirada dos compostos não retidos, de 2 a 3 vezes; Etapa 3: dessorção dos ligantes; Etapa 4: Análise do dessorbato.....	10
FIGURA 1.3. Métodos de imobilização de enzimas: confinamento, encapsulação, adsorção, ligação covalente e reticulação. <sup>46</sup> .....	12
FIGURA 1.4. Reação catalisada pela MTAP: Clivagem fosfolítica de MTA em adenina e MTR1P.....	13
FIGURA 1.5. Estrutura química do praziquantel. Nome IUPAC, (R)-2-(cyclohexylcarbonyl)-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino (2,1-a)isoquinolin-4-one.....	15
FIGURA 1.6. Esquema da via de salvação de purinas em <i>S. mansoni</i> . ADA – adenosina desaminase, PNP - purina nucleosídeo fosforilase, HGPRT – hipoxantina guanina fosforibosiltransferase, APRT – adenina fosforibosiltransferase, AK – metiltioadenosina fosforilase, ADSL – adenilosuccinato liase, ADSS – adenilosuccinato sintase, IMPDH – inosina monofosfato desidrogenase, GMPS – GMP-sinsetase, GK – guanilato kinase, ADK – adenilato kinase, NDPK – nucleosídeo difosfato kinase, MTAP - 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase. Adaptado de SENFT <sup>61</sup> .....	16
FIGURA 1.7. Trímero da MTAP de <i>S. mansoni</i> Em amarelo, ligantes na interface entre as subunidades. Estrutura secundária em cores diferentes: Hélices em rosa; Loops em cinza e folhas em azul. <sup>48</sup> .....	17
FIGURA 4.1. Esquema do acoplamento das reações para a determinação das constantes catalíticas da SmMTAP. O substrato da enzima MTA pode ser substituído por adenosina na primeira reação. ....	44
FIGURA 4.2. Mecanismo de separação no modo HILIC de eluição. Fonte: Waters, 2022. <sup>73</sup> .....	45

FIGURA 4.3. Cromatograma de LC-UV da mistura de adenosina e adenina 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Coluna Acquity UPLC BEH Amide (100 $\times$ 2.1 mm, 1,7 $\mu\text{m}$ , Waters), modo de eluição isocrático, com fase móvel composta por ACN/H <sub>2</sub> O 85:15 (v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico, vazão 0,300 mL min <sup>-1</sup> e detecção a 254 nm. 1 – adenosina; 2 – adenina. ....	46
FIGURA 4.4. Cromatograma de LC-UV da reação enzimática catalisada pela SmMTAP na conversão direta de adenosina 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em adenina. Coluna Acquity UPLC BEH Amide (100 $\times$ 2.1 mm, 1,7 $\mu\text{m}$ , Waters), modo de eluição isocrático, com fase móvel composta por ACN/H <sub>2</sub> O 85:15 (v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico, vazão 0,300 mL min <sup>-1</sup> e detecção a 254 nm. 1 – adenosina; 2 – adenina.....	47
FIGURA 4.5 Curva de pH ótimo para enzima SmMTAP utilizando os tampões voláteis acetato e bicarbonato de amônio, analisado por LC-UV.....	48
FIGURA 4.6. Gráficos com o teste F obtidos através da rotina computacional regression2 no software Octave (versão 4.2.1). <sup>75</sup> .....	51
FIGURA 4.7. Variação explicada ( $R^2$ ) e explicável ( $R^2\text{max}$ ) e valor experimental versus o valor previsto no modelo. Gráficos obtidos através da rotina computacional regression2 no software Octave (versão 4.2.1). <sup>75</sup> .....	52
FIGURA 4.8. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de adenina pela enzima SmMTAP em solução tampão fosfato, nas condições do ensaio padrão, variando-se a concentração de adenosina. ....	53
FIGURA 4.9. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de adenina pela enzima SmMTAP em solução tampão bicarbonato, nas condições do ensaio padrão, variando-se a concentração de adenosina. ....	54
FIGURA 4.10. Esquematização do processo de imobilização da enzima SmMTAP em partículas magnéticas amino-terminadas.....	55
FIGURA 4.11. Gráfico da atividade enzimática após processo de imobilização da enzima SmMTAP para a produção de MTAP-MB, do primeiro dia (0 h) até 8 dias, variando o tempo de imobilização (4 e 8 h) e % de glutaraldeído (2,5 e 5%)....	56

FIGURA 4.12. Gráfico da atividade enzimática após processo de imobilização da enzima SmMTAP do primeiro dia (0 h) até 8 dias, variando o fabricante de partículas magnéticas (Bioclone e Sigma), com 2,5% de glutaraldeído e 4 horas de imobilização. ....	57
FIGURA 4.13. Esquematização do processo de imobilização da enzima SmMTAP em partículas magnéticas amino-terminadas.....	58
FIGURA 4.14. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de adenina pelo biorreator MTAP-MB, nas condições do ensaio padrão, variando-se a concentração de adenosina.....	59
FIGURA 4.15. Estrutura do inibidor reportado na literatura para MTAP, a 5-DCIFormicina.....	60
FIGURA 4.16. Cromatograma de LC-UV do ensaio de atividade de MTAP-MB, com tampão fosfato para conversão de adenosina (1) em adenina (2). Coluna Acquity UPLC BEH Amide (100 × 2.1 mm, 1,7 μm, Waters), modo de eluição isocrático, com fase móvel composta por ACN/H <sub>2</sub> O 85:15 (v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico, vazão 0,300 mL min <sup>-1</sup> , forno a 45 °C, detecção em 245 nm e tempo de corrida de 5 min.....	62
FIGURA 4.17. Cromatograma de LC-UV do ensaio de atividade de MTAP-MB para conversão de adenosina em adenina, na presença da quercetina 30 μmol L <sup>-1</sup> (1,5 x o K <sub>Mapp</sub> ). Coluna Acquity UPLC BEH Amide (100 × 2.1 mm, 1,7 μm, Waters), modo de eluição isocrático, com fase móvel composta por ACN/H <sub>2</sub> O 85:15, (v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico, vazão 0,300 mL min <sup>-1</sup> , forno a 45 °C, detecção em 245 nm e tempo de corrida de 5 min.....	63
FIGURA 4.18. Cromatograma de LC-UV do ensaio de atividade de MTAP-MB na presença da quercetina 20 μmol L <sup>-1</sup> (1,0 x o K <sub>Mapp</sub> ). Coluna Acquity UPLC BEH Amide (100 × 2.1 mm, 1,7 μm, Waters), modo de eluição isocrático, com fase móvel composta por ACN/H <sub>2</sub> O 85:15, contendo 0,1% de ácido fórmico, vazão 0,300 mL min <sup>-1</sup> , forno a 45 °C, detecção em 245 nm e tempo de corrida de 5 min.....	63

- FIGURA 4.19. Valores de inibição ( $n = 2$ ) das moléculas triadas com  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$
- FIGURA 4.20. Valores de inibição ( $n = 2$ ) das moléculas triadas com  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  e o substrato adenosina a  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ , sendo (1) quercetina; (2) epicatequina; (3) catequina; (4) cafeína; (5) tubercidina; (6) aciclovir ..... 65
- FIGURA 4.21. Fluxograma do ensaio de ligand fishing com MTAP-MB e extrato de *Topsentia ophiraphidites* (FN 031)..... 67
- FIGURA 4.22. Cromatograma de pico base obtido por análise de LC-HRMS para o extrato de *Topsentia ophiraphidites* (FN 031). Coluna Acquity HSS T3 ( $100 \times 2,1 \text{ mm}$ ,  $1,8 \mu\text{m}$ ), fase móvel (A) solução de 0,1% de ácido fórmico em água e (B) de 0,1% de ácido fórmico em ACN, em eluição gradiente de 2 a 100% de B em 25 min, seguido de etapa isocrática 100% de B de 25 a 27,5 min e acondicionamento na condição inicial por 7 min, vazão  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ..... 68
- FIGURA 4.23. Cromatogramas de pico base obtidos por análise de LC-HRMS para etapa  $S_4$  do ensaio *ligand fishing* (Etapa de dessorção dos ligantes). Coluna Acquity HSS T3 ( $100 \times 2,1 \text{ mm}$ ,  $1,8 \mu\text{m}$ ), fase móvel (A) solução de 0,1% de ácido fórmico em água e (B) de 0,1% de ácido fórmico em ACN, em eluição gradiente de 2 a 100% de B em 25 min, seguido de etapa isocrática 100% de B de 25 a 27,5 min e acondicionamento na condição inicial por 7 min, vazão  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em azul, duplicata do ensaio para o MTA-MB ativo. Em vermelho, duplicata do ensaio para o MTAP-MB controle. .... 69
- FIGURA 4.24. Gráficos de dispersão dos ligantes identificados no ensaio de ligand fishing com MTAP-MB no extrato FN 031 da *Topsentia ophiraphidites*. ..... 71
- FIGURA 4.25. Espectro de  $\text{MS}^2$  do íon  $m/z$  314,3056, correspondente ao ácido 2-amino-9,13-dimetil heptadecanóico. .... 73
- FIGURA 4.26. Mecanismo de fragmentação proposto para íon  $m/z$  314,3056, correspondente ao ácido 2-amino-9,13-dimetil heptadecanóico. .... 73

FIGURA 4.27. Estrutura de esteroide sugerida pelo LIPID MAPS para o ligante com o íon m/z 535,3996.....	75
FIGURA 4.28. Espectro de MS <sup>2</sup> do íon m/z 535,3996.....	75
FIGURA 4.29. Partes de <i>Aspidosperma macrocarpon</i> . Da esquerda para direita e de cima para baixo: Caule, folhas, árvore, frutos e flores. <sup>96</sup> .....	76
FIGURA 4.31. Família molecular dos ácidos alcaloides, desreplicado nos extratos de <i>Aspidosperma macrocarpon</i> . ....	83
FIGURA 4.32. Mecanismo de fragmentação proposto para a kopsinina (m/z 339,2142).....	84
FIGURA 4.33. Família molecular de flavonoides glicosilados, desreplicados nos extratos de <i>Aspidosperma macrocarpon</i> . ....	85
FIGURA 4.34. Família molecular de flavonoides, desreplicados nos extratos de <i>Aspidosperma macrocarpon</i> .....	85
FIGURA 4.35. Mecanismo de fragmentação proposto para o kaempferol 3-O-rutinosídeo (m/z 595,1644). ....	86
FIGURA 4.36. Mecanismo de fragmentação proposto para o Diidrokaempferol, (m/z 289,0706). ....	87
FIGURA 4.37. Família molecular dos ácidos carboxílicos e outros compostos (TABELA 4.4), desreplicados nos extratos de <i>Aspidosperma macrocarpon</i> . ....	88
FIGURA 4.38. Mecanismo de fragmentação proposto para o ácido 3-O-cafeoilquínico (m/z 354,0951). ....	88
Figura 4.39. Cromatograma de pico base obtido por análise de LC-HRMS para o extrato de casca do caule <i>Aspidosperma macrocarpon</i> . Coluna Ascentis Express C18 (100 × 2,1 mm, 1,8 μm), fase móvel (A) solução de 0,1% de ácido fórmico em água e (B) de 0,1% de ácido fórmico em ACN, em eluição gradiente de 2 a 100% de B em 25 min, seguido de etapa isocrática 100% de B de 25 a 27,5 min e recondicionamento na condição inicial por 7 min, vazão 0,2 mL min <sup>-1</sup> , temperatura de 30 °C.....	89

- FIGURA 4.40. Cromatogramas de pico base obtidos por análise de LC-HRMS para etapa S<sub>4</sub> do ensaio ligand fishing (Etapa de dessorção dos ligantes). Coluna Ascentis Express C18 (100 × 2,1 mm, 1,8 μm), fase móvel (A) solução de 0,1% de ácido fórmico em água e (B) de 0,1% de ácido fórmico em ACN, em eluição gradiente de 2 a 100% de B em 25 min, seguido de etapa isocrática 100% de B de 25 a 27,5 min e recondicionamento na condição inicial por 7 min, vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 30 °C. Em azul, duplicata do ensaio para o biorreator ativo MTA-MB. Em vermelho, duplicata do ensaio para o biorreator controle MTAP-MBcontrole..... 90
- FIGURA 4.41. Gráfico de dispersão dos ligantes identificados no ensaio de ligand fishing com MTAP e *Aspidosperma macrocarpon* (casca do caule)..... 92
- FIGURA 4.42. Gráfico de dispersão dos ligantes identificados no ensaio de ligand fishing com MTAP-MB e *Aspidosperma macrocarpon* (casca do caule). Para visualização dos valores de R<sub>afinidade</sub> zoom entre os tempos de retenção cromatográfica de 21,5 min e 27,5 min..... 92

## RESUMO

### BIORREATOR DA 5'-DEOXI-5'-METILTIOADENOSINA FOSFORILASE: DO DESENVOLVIMENTO A APLICAÇÃO EM ENSAIOS DE AFINIDADE

- A 5'-desoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase (MTAP) é uma enzima presente em muitos organismos, dentre eles o parasita *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose. O ensaio enzimático clássico da MTAP é acoplado à reação de outra enzima e mede indiretamente a formação de adenina. A principal desvantagem destes ensaios acoplados é que qualquer interferência na atividade da segunda enzima afeta diretamente a atividade da enzima principal. Diante disso, foi desenvolvido e validado um método cromatográfico por LC-UV, para monitorar diretamente a atividade catalítica da MTAP na conversão do substrato adenosina em adenina. A enzima foi covalentemente ligada à superfície de partículas magnéticas para a obtenção de um biorreator, que foi aplicado na triagem de moléculas em extratos de produtos naturais, através da técnica *affinity selection mass spectrometry*. Nesse intuito, o ensaio conhecido como *ligand fishing* foi desenvolvido e aplicado para a prospecção de ligantes nos extratos metanólicos da esponja marinha *Topsentia ophiraphidites* e da casca do caule de *Aspidosperma macrocarpon*. Dentre o *Feature-Based Molecular Networking*, o *software* MZmine foi utilizado para o pré-processamento e interpretação dos cromatogramas de *fingerprint* obtidos por LC-HRMS do ensaio. Posteriormente, o *software* Ichthus foi utilizado para alinhar as características moleculares, calcular a razão de afinidade e, assim, distinguir os ligantes seletivos para a enzima. Os ligantes foram inspecionados manualmente através de análises no perfil químico dos extratos de produtos naturais e na amostra branco, para descarte dos artefatos. Após seleção, os ligantes foram submetidos ao processo de desreplicação com auxílio de plataformas como GNPS e em bases de dados como Dicionário de Produtos Naturais, KNApSAcK Core System, MassBank, PubChem, SciFinder, LIPID MAPS e HMDB.

## ABSTRACT

5'-DEOXY-5'-METHYTHIOADENOSINE PHOSPHORYLASE  
BIOREACTOR: FROM DEVELOPMENT TO APPLICATION IN AFFINITY  
ASSAYS - 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) is an enzyme present in many organisms, including the parasite *Schistosoma mansoni*, which causes schistosomiasis. The classic MTAP enzymatic assay is coupled to the reaction of another enzyme and indirectly measures adenine formation. The main disadvantage of these coupled assays is that any interference in the activity of the second enzyme directly affects the activity of the main enzyme. Therefore, an LC-UV chromatographic method was developed and validated to directly monitor the catalytic activity of MTAP in the conversion of adenosine substrate into adenine. The enzyme was covalently linked to the surface of magnetic particles, to obtain a bioreactor that was applied in the screening of molecules in extracts of natural products, through the affinity selection mass spectrometry technique. For this purpose, the test known as ligand fishing was developed and applied to prospect for ligands in methanolic extracts of the marine sponge *Topsentia ophiraphidites* and the stem bark of *Aspidosperma macrocarpon*. Among the Feature-Based Molecular Networking, the MZmine software was used for the processing and interpretation of the fingerprint chromatograms obtained by LC-HRMS of the assay. Subsequently, the Ichthus software was used to align the molecular characteristics, calculate the affinity ratio and thus distinguish the selective ligands for the enzyme. The binders were inspected manually through analyzes in the chemical profile of the extracts of natural products and in the blank sample, to discard the artifacts. After selection, the ligands were submitted to the dereplication process with the support of platforms such as GNPS and databases such as Dictionary of Natural Products, KNApSAcK Core System, MassBank, PubChem, SciFinder, LIPID MAPS and HMDB.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Enzimas e ensaios de triagem de alta eficiência.....	1
1.2. Produtos naturais .....	2
1.3. Novas abordagens de triagem em PN's.....	4
1.4. Imobilização de enzimas .....	11
1.5. A enzima 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase (MTAP).....	13
2. OBJETIVOS .....	19
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	20
3.1. Materiais .....	20
3.2. A enzima MTAP.....	22
3.3. Extratos naturais .....	24
3.4. Teste de atividade da <i>Sm</i> MTAP em solução tampão fosfato .....	25
3.5. O sistema LC-UV .....	25
3.6. Teste de pH com tampões voláteis para <i>Sm</i> MTAP .....	26
3.7. Qualificação do método de LC-UV para <i>Sm</i> MTAP.....	26
3.8. Caracterização cinética de <i>Sm</i> MTAP .....	27
3.9. Imobilização de <i>Sm</i> MTAP em partículas magnéticas.....	28

3.10.	Avaliação da atividade catalítica de MTAP-MB e MTAP-MB controle	30
3.11.	Caracterização cinética de SmMTAP.....	30
3.12.	Teste de inibição com a MTAP-MB .....	31
3.13.	Ensaio de ligand fishing com MTAP-MB para o extrato de <i>Topsentia ophiraphidites</i> (FN 031).....	32
3.13.1.	Preparo da amostra e método por LC-HRMS .....	32
3.13.2.	Ensaio de <i>ligand fishing</i> para MTAP-MB e MTAP-MB controle.....	33
3.13.3.	Processamento das análises .....	34
3.14.	Perfil químico de <i>Aspidosperma macrocarpon</i> .....	36
3.14.1.	Condições cromatográficas e método de LC-MS/MS para as amostras de <i>A. macrocarpon</i> .....	36
3.14.2.	Construção da rede molecular dos extratos de <i>A. macrocarpon</i> .....	37
3.14.3.	Propagação da desrepliação de <i>A. macrocarpon</i> .....	38
3.15.	Ensaio de ligand fishing com MTAP-MB para o extrato de casca do caule de <i>Aspidosperma macrocarpon</i> .....	39
3.15.1.	Preparo da amostra e método por LC-HRMS .....	39
3.15.2.	Ensaio de <i>ligand fishing</i> para MTAP-MB e MTAP-MB controle.....	40
3.15.3.	Processamento das análises .....	41
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1.	Desenvolvimento de método LC-UV para detecção da reação catalítica de SmMTAP .....	43
4.2.	Desenvolvimento das condições reacionais da enzima SmMTAP e teste com diferentes tipos de tampões .....	47
4.3.	Qualificação do método de LC-UV para SmMTAP.....	49

4.4.	Caracterização cinética de <i>Sm</i> MTAP em solução .....	52
4.5.	Imobilização de <i>Sm</i> MTAP em partículas magnéticas.....	54
4.6.	Estudo cinético do biorreator MTAP-MB .....	58
4.7.	Triagem de inibidores para MTAP-MB .....	60
4.8.	Ensaio de ligand fishing com MTAP-MB para o extrato de <i>Topsentia ophiraphidites</i> (FN 031).....	65
4.9.	Perfil químico de <i>Aspidosperma macrocarpon</i> por análises de LC-HRMS e redes moleculares .....	76
4.10.	Ensaio de ligand fishing com MTAP-MB para o extrato casca do caule de <i>Aspidosperma macrocarpon</i> .....	89
5.	CONCLUSÕES .....	94
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	96

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Enzimas e ensaios de triagem de alta eficiência

Enzimas são biocatalisadores com alta especificidade e seletividade e mediam o metabolismo fisiológico em uma variedade de processos nos organismos vivos, sendo essenciais à vida.<sup>1,2</sup> Por esse motivo, algumas doenças estão relacionadas a regulação anormal de enzimas, como por exemplo os tumores, doenças cardiovasculares, inflamações e doenças do sistema nervoso central.<sup>2,3</sup>

Diante disso, as enzimas são alvos para a triagem de moléculas moduladoras de sua atividade, para que possam atuar como fármacos,<sup>2</sup> tal como a enzima que converte angiotensina I no potente vasoconstritor angiotensina II, que exerce um papel essencial na regulação da pressão arterial. Com o uso dos inibidores enzimáticos, como captopril e enalapril, a concentração de angiotensina II é reduzida, acarretando na diminuição da pressão arterial.<sup>4</sup>

A procura de novos compostos biologicamente ativos, de maneira eficaz e sem impactar a segurança ou qualidade<sup>5</sup>, tem induzido as pesquisas na busca de estratégias alternativas ou novas ferramentas.<sup>6-8</sup> O aspecto chave do processo de descoberta de novos fármacos é baseado no desenvolvimento de metodologias para triagem de ligantes de alta eficiência em larga escala, os ensaios HTS (do inglês, *high throughput screening*).<sup>9</sup> Esses ensaios são necessários para análise de interações medicamentosas, avaliação da atividade biológica e determinação das propriedades físico-químicas dos candidatos a fármacos.<sup>5,10</sup>

Os ensaios HTS frequentemente envolvem o uso de uma enzima alvo purificada ou parcialmente purificada no rastreamento de moléculas em

bibliotecas de compostos sintéticos ou purificados de produtos naturais (PN's). De modo geral, esses ensaios permitem a avaliação rápida da interação entre um alvo e uma molécula teste, visto que os estudos com células *in vivo* são muito mais complexos e podem dificultar a identificação de inibidores mais fracos. Na abordagem mais popular do HTS, os ensaios com a enzima ou alvo farmacológico geralmente envolvem experimentos fluorimétricos, espectrofotométricos ou com radioatividade através de placas multi-poços e robótica. No entanto, eles apresentam necessidade de reagentes colorimétricos e/ou fluorimétricos adequados para gerar um sinal e com isso podem apresentar interferências causadas por compostos que possuem absorbância ou fluorescência em comprimentos similares ao reagente, ou resultados falso-positivos.<sup>11,12</sup>

Ademais, apesar da eficiência na identificação de novas substâncias bioativas, o HTS possui a limitação de conseguir analisar somente compostos puros, sendo pouco viável o seu uso na avaliação para triagem de misturas ou extratos de plantas medicinais, para descoberta de novas moléculas com potencial biológico.<sup>10,13</sup>

Indubitavelmente, produtos naturais (PN's) são coleções de moléculas com alta complexidade estrutural e estereoquímica com uma diversidade de atividades biológicas.<sup>3,14-16</sup> Entretanto, as indústrias farmacêuticas preferem as triagens em bibliotecas de moléculas sintéticas<sup>14,16</sup>, pois os desafios envolvidos na descoberta de fármacos a partir de PN's, como a complexidade das amostras, o tempo e esforço para identificar e isolar os metabólitos, são fatores que contribuíram para o declínio do seu uso pela indústria farmacêutica dos anos 90 em diante.<sup>3</sup>

## **1.2. Produtos naturais**

Ao longo da história, os PN's desempenham um papel fundamental na descoberta de compostos biologicamente ativos.<sup>3,14-17</sup> Espécies de plantas

como o ópio (*Papaver somniferum*) e o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) foram mencionadas em tábuas de argila da Mesopotâmia, em 2600 a.C.<sup>17</sup> Alguns dos numerosos exemplos de medicamentos oriundos de compostos naturais aprovados e utilizados pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) são a morfina, penicilina, reserpina, galantamina, taxol, lovastatina, quinina e artemisinina (FIGURA 1.1).<sup>14,17,18</sup>

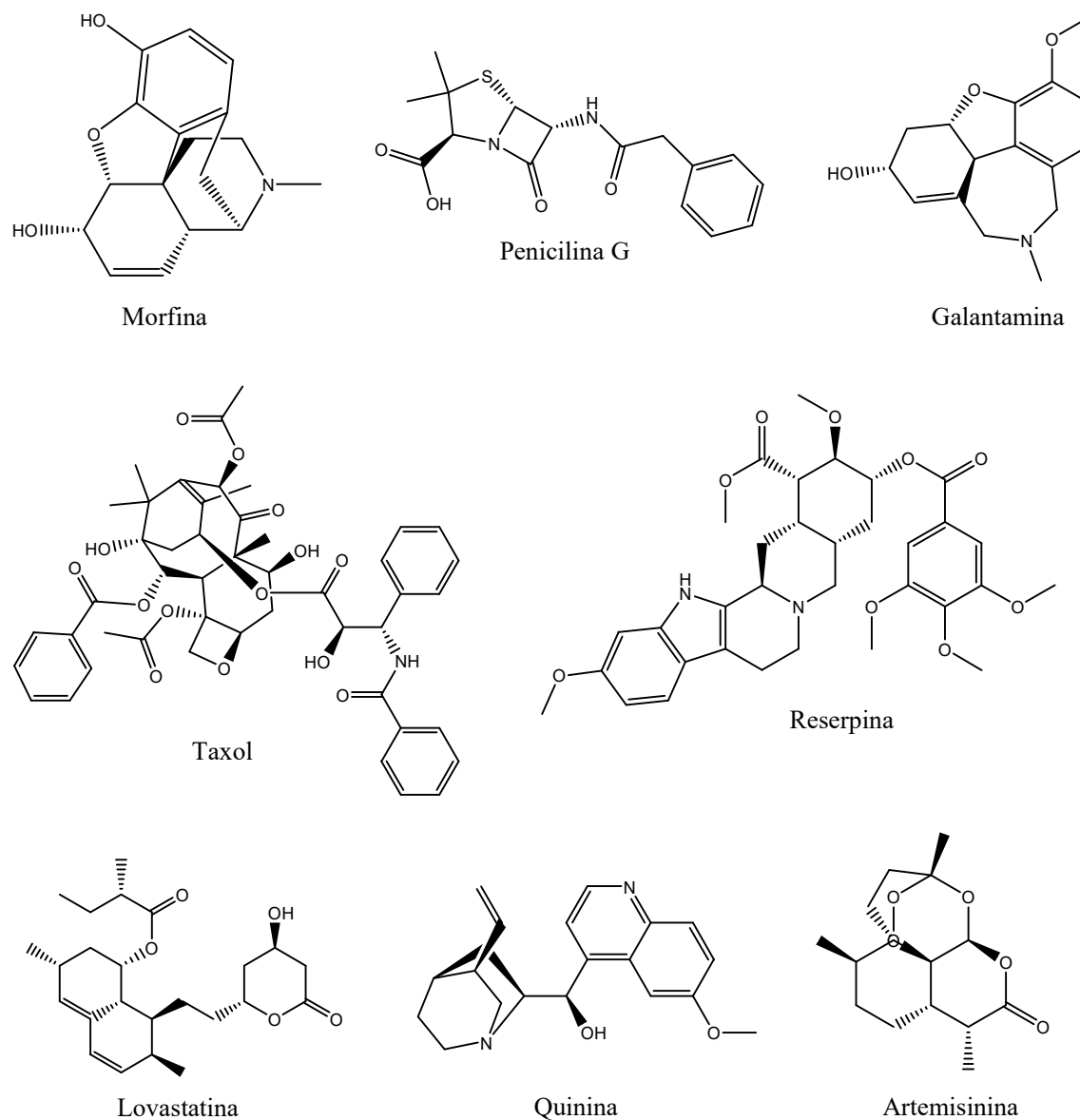


FIGURA 1.1. Exemplos de fármacos derivados de produtos naturais.

Os PN's são explorados pelas suas diversas funções biológicas e são produzidos a partir de intermediários biosintéticos oriundos dos processos

celulares básicos, como a fotossíntese e a glicólise. Esses intermediários passam por diversas modificações através de vários mecanismos e reações diferentes, o que permite produzir uma infinita diversidade e complexidade estrutural de moléculas.<sup>18,19</sup>

Essas moléculas são produzidas como resultados de milhões de anos de evolução, da adaptação ao ambiente, como possíveis mecanismos de defesa contra predadores, condições de estresse e fatores ambientais.<sup>19,20</sup> Ademais, existe uma incontável biodiversidade de organismos terrestres e marinhos que produzem diferentes estruturas<sup>19</sup> e estima-se que apenas 10% da biodiversidade do planeta Terra foi seriamente estudada.<sup>15</sup>

No entanto, apesar do enorme potencial, encontrar novos compostos bioativos em PN's é uma tarefa desafiadora que exige tempo, esforço<sup>14</sup> e sendo necessário amplas abordagens interdisciplinares.<sup>16</sup> Além do mais, as matrizes complexas de PN's apresentam vários metabólitos em baixas concentrações, sendo os processos tradicionais incapazes de detectar esses constituintes.<sup>21,22</sup> A abordagem tradicional para a descoberta de compostos bioativos de origem natural, concentra-se no isolamento das substâncias e caracterização estrutural, seguido de testes com a molécula em sua forma isolada.. Esses processos geralmente resultam no reisolamento de moléculas já conhecidas, são dispendiosos e laboriosos.<sup>14,23</sup> Neste contexto, o uso de abordagens, que acelerem o processo de identificação de novas substâncias bioativas, são necessárias.

### **1.3. Novas abordagens de triagem em PN's**

A demanda por procedimentos eficientes e rápidos para a descoberta de novos produtos bioativos, impulsionou o avanço das tecnologias analíticas em separação e aquisição espectral.<sup>24</sup> Os avanços obtidos com a cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS) permitiram acelerar a anotação de compostos pela determinação da

fórmula molecular e comparações individuais entre os espectros adquiridos pelos padrões de fragmentação característicos de cada composto.<sup>24,25</sup>

Posto que esses avanços contribuíram imensamente para a anotação e desrepliação de muitos compostos, na atualidade o desafio está em anotar/identificar as substâncias, uma vez que a quantidade/qualidade de informações espectrais obtidas, requer longos períodos de verificação e interpretação dos dados.<sup>24-27</sup>

Nesse sentido, a análise por redes moleculares (do inglês, *molecular networking*) surge como uma das ferramentas disponíveis que auxilia o processamento, compreensão e organização desses dados.<sup>24,25,28,29</sup> Através de algoritmos, a rede molecular agrupa os compostos da mesma classe de acordo com as semelhanças espectrais de fragmentação. Com o uso de *softwares*, bases de dados públicas e/ou privadas é possível comparar os dados obtidos para anotação dos metabólitos.<sup>26,29</sup> Uma das plataformas utilizadas com esse propósito é o GNPS (do inglês, *Global Natural Products Social Molecular Networking*). O GNPS é uma plataforma *online*, de acesso público, que armazena uma biblioteca espectral de compostos e permite analisar grandes conjuntos de dados de espectrometria de massas.<sup>24,27,29,30</sup> Além de acessar a biblioteca espectral dos compostos, ele permite que o pesquisador insira, de uma forma padronizada, seus próprios espectros o que propaga informações espectrais.<sup>24,25</sup>

Esta abordagem alternativa, baseada na seletividade, sensibilidade e velocidade na aquisição de dados por espectrometria de massas, tornou-se uma ferramenta valiosa na busca de novos compostos bioativos e que permite a detecção de compostos minoritários presentes na amostra.<sup>27</sup> Nesse intuito, a capacidade de identificar de maneira rápida moléculas que interagem com um alvo específico através de triagens baseadas em afinidade é um método conveniente para separar potenciais ligantes de uma mistura complexa<sup>21</sup> e acoplado à espectrometria de massas oferece maiores vantagens.<sup>31</sup>

Conhecida como seleção de afinidade por espectrometria de massas (do inglês, *affinity selection mass spectrometry*, AS-MS) é uma técnica de triagem que se tornou valiosa como uma das abordagens para identificar novos compostos que interagem com alvos terapêuticos.<sup>9,12,22,23,31,32</sup> A técnica AS-MS é ideal para triagem de moléculas em misturas complexas como os PN's. Grandes bibliotecas de compostos podem ser rapidamente testadas, com moléculas rastreadas através da interação com um alvo terapêutico<sup>9,12,23</sup>. De maneira geral, o ensaio AS-MS consiste na incubação de um receptor farmacológico (proteínas, enzimas, ácidos nucleicos) com coleções sintéticas ou naturais.<sup>9,12</sup> o ensaio consiste na etapa de incubação, para formação do complexo ligante-alvo, seguido das etapas de lavagem e dessorção. A identificação dos ligantes é através de um índice ou razão de afinidade e anotações dos compostos através da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução.<sup>31,32</sup> As interações não específicas são limitações em métodos desta natureza, por esta razão, geralmente as análises são conduzidas com experimentos controle.

Muitas indústrias farmacêuticas e de biotecnologia implementaram protocolos utilizando a técnica AS-MS<sup>12,33</sup> por oferecer várias vantagens quando comparada à técnica de HTS convencional<sup>9</sup>: o AS-MS não necessita de cromóforos, radioisótopos ou fluorescência e não sofre interferência de compostos absorventes e fluorescentes, evitando assim os resultados falso-positivos do HTS convencional;<sup>12</sup> permite analisar rapidamente bibliotecas combinatórias pois os compostos são identificados pelo seu valor de massa exata;<sup>9,12</sup> a AS-MS pode ser usada para diferentes tipos de alvo como receptores, enzimas, proteínas de membranas, etc.<sup>9,12</sup>; é compatível com alvos novos e pouco estudados pois não depende de um conhecimento avançado da sua estrutura ou função.<sup>12,33</sup>

A seguir, na TABELA 1.1, adaptada de McLAREN et al.<sup>33</sup>, são descritas algumas características de ensaios HTS acoplados à espectrometria de

massas, com a AS-MS aqui discutida, bem como outras técnicas utilizadas para triagem de compostos.

TABELA 1.1. Características de ensaios HTS acoplados à espectrometria de massas. Adaptado de McLAREN et al<sup>33</sup>

<b>Técnica</b>	<b>Ciclo de tempo por amostra (s)*</b>	<b>Número de compostos</b>	<b>Características</b>
<i>Parallel LC-MS</i>	15 – 30	$10^3 - 10^5$	Análises flexíveis devido a capacidade de realizar separação cromatográfica antes da detecção por MS
<i>RapidFire-MS</i>	6 – 10	$10^3 - 10^5$	Atualmente, a técnica mais rápida para realizar uma limpeza cromatográfica antes da detecção por MS
<i>ADE-OPI-MS</i>	0,3 – 1,2	$10^4 - 10^5$	Introdução direta de amostras líquidas e alta tolerância de matriz
<i>MIST-MS</i>	0,3 – 0,5	$10^4 - 10^6$	Introdução direta de amostras sem a necessidade de diluições
<i>SAMDI-ToF-MS</i>	1 – 2	$10^4 - 10^5$	Aplicabilidade para triagens baseadas em atividade e afinidade
<i>MALDI-ToF-MS</i>	0,2 – 1,5	$10^4 - 10^6$	Necessário pouco volume de amostra, vantajosa para moléculas grandes e alta tolerância de matriz
<i>AS-MS</i>	> 60	$10^5 - 10^6$	Maiores rendimentos, apontamento das classes através das plataformas de MS atuais

\*Apenas para as análises instrumentais, não incluindo o tempo para o preparo das amostras.

Dentre as AS-MS, diferentes abordagens podem ser realizadas para identificar compostos bioativos. As estratégias mais bem sucedidas e amplamente utilizadas são a ultrafiltração pulsada, cromatografia por exclusão de tamanho e seleção por afinidade utilizando partículas magnéticas.<sup>9,12,22,31</sup>

A ultrafiltração pulsada é realizada em solução, onde uma mistura de compostos é incubada com o alvo macromolecular (como proteínas ou RNA). Depois que o equilíbrio é alcançado, a ultrafiltração é utilizada para separar os complexos ligante-alvo. Para uma ultrafiltração mais rápida, são utilizados de poros do máximo tamanho permitido, desde que retenham o alvo macromolecular.<sup>21,22</sup>

O ensaio utilizando cromatografia por exclusão de tamanho, assim como a ultrafiltração pulsada, é realizado em solução com uma mistura de compostos incubados com o alvo macromolecular. Após o equilíbrio, a cromatografia por exclusão de tamanho é utilizada para separar os grandes complexos formados de ligantes-receptores das moléculas menores que são os compostos que não apresentaram afinidade pelo alvo. Em seguida, esses complexos macromoleculares são eluidos e desnaturados utilizando solvente orgânico para liberar os ligantes que são analisados por espectrometria de massas.<sup>22</sup> Dois métodos utilizando esta técnica são muito bem estabelecidos: o *SpeedScreen*, desenvolvido pela Novartis, e o *Automated Ligand Identification System*, introduzido pela farmacêutica NeoGenesis e adquirido pela Merck & Co.<sup>9,33</sup>

Diferentemente dos métodos acima descritos, a seleção por afinidade utilizando partículas magnéticas é uma alternativa de ensaio em fase sólida que complementa os ensaios em solução. Neste ensaio o alvo biomolecular (como proteínas ou enzimas) é imobilizado em partículas magnéticas e posteriormente incubado com a coleção em triagem. O magnetismo das partículas é utilizado para separar os complexos formados de ligante-alvo imobilizado, das moléculas que não apresentaram afinidade. Em seguida, os ligantes que

apresentaram afinidade são removidos para análise por espectrometria de massas.<sup>22,34</sup> Para a aplicação desta técnica, é importante garantir que o processo de imobilização não afete a funcionalidade da biomolécula.<sup>9</sup>

Além de rastrear bibliotecas combinatórias de compostos sintéticos ou isolados de PN's, a AS-MS também é compatível com misturas complexas como extratos de plantas, fungos ou outros microrganismos, o que fornece uma imensa gama de moléculas para a descoberta de novos compostos bioativos. Com a AS-MS, novas aplicações diversificadas e inovadoras estão sendo realizadas. Ademais, os avanços em espectrometria de massas, automação e análise de dados continuarão a melhorar a produtividade e o rendimento da técnica.<sup>12,22</sup>

Em ensaios de afinidade utilizando proteínas imobilizadas, o AS-MS geralmente, tem sido referido como *ligand fishing*.<sup>8,35-41</sup> Várias técnicas como encapsulamento, ligação covalente, ligação cruzada foram relatadas como abordagens para o *ligand fishing*.<sup>36</sup> Esses ensaios são considerados um modo eficiente, conveniente e rápido para separar potenciais candidatos em uma mistura complexa, pois não necessita que todos os componentes estejam separados. Vários tipos de alvos biológicos podem ser aplicados nos ensaios baseados na afinidade, como enzimas, neurotransmissores, DNA, proteínas de transporte e quaisquer outras bio-macromoléculas.<sup>6,21</sup>

Para enzimas, um excelente suporte para imobilização são as partículas magnéticas (MB, do inglês, *magnetic beads*), devido à alta área de superfície disponível, que propicia interações eficientes com os analitos; ao paramagnetismo, que permite que a enzima imobilizada seja separada de uma mistura complexa através da aplicação de um campo magnético externo; a praticidade no manuseio e a elevada estabilidade enzimática.<sup>38-40,42</sup>

A FIGURA 1.2 evidencia como é realizado este ensaio e quais são as etapas do processo até a detecção dos compostos. As partículas magnéticas revestidas da proteína alvo (MB-P) são imersas diretamente na mistura de

interesse ou extrato de produtos naturais (etapa de carregamento) e, após um período de incubação, os compostos que possuem afinidade pela proteína ficam retidos por ela no biorreator. Após etapas de lavagem para remoção dos compostos que não apresentaram afinidade, é realizada a etapa de dessorção dos ligantes retidos. A interação das MB-Ps com um campo magnético permite, então, a fácil separação do biorreator da mistura complexa, sendo a grande vantagem do ensaio de *ligand fishing*.<sup>6-8</sup>

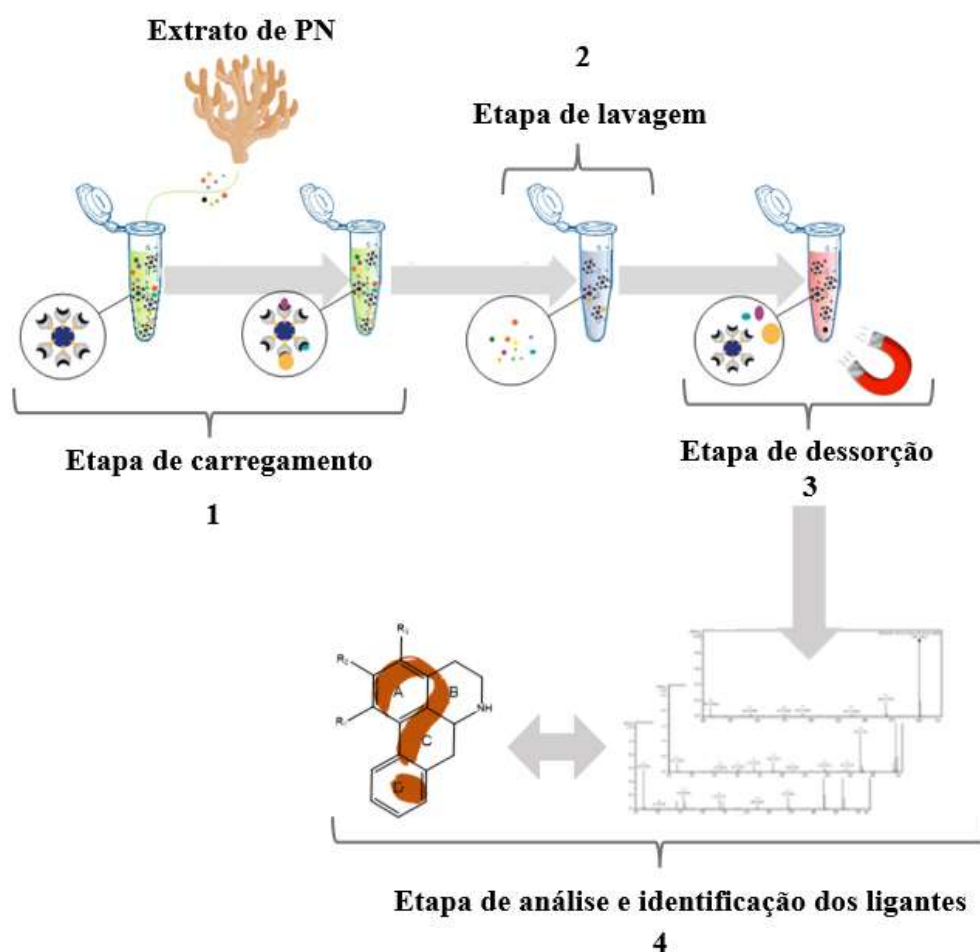


FIGURA 1.2. Etapas envolvidas nos ensaios de ligand fishing. Etapa 1: carregamento com uma biblioteca natural ou sintética e incubação por tempo estabelecido; Etapa 2: lavagem para retirada dos compostos não retidos, de 2 a 3 vezes; Etapa 3: dessorção dos ligantes; Etapa 4: Análise do dessorbato.

As partículas magnéticas têm sido produzidas e estão disponíveis comercialmente em diferentes tamanhos (nm a  $\mu\text{m}$ ) e com diferentes superfícies

e propriedades físico-químicas. As partículas são constituídas de um material magnético, como óxido de ferro, cobalto ou níquel, e funcionalizadas com diferentes grupos químicos que permitem derivação. As partículas mais comumente utilizadas são de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ).<sup>38,43</sup> No ensaio de *ligand fishing*, fatores como tempo de incubação da mistura complexa com o biorreator, lavagens e dessorção dos ligantes retidos são variáveis que devem ser avaliadas para cada caso, bem como os tipos de solução utilizados em cada etapa do ensaio. A solução de dessorção deve ser capaz de romper a interação entre o ligante e a proteína, para que os compostos retornem ao sobrenadante para serem analisados.<sup>44</sup>

A combinação deste ensaio com cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução permite a detecção e identificação das estruturas dos bioativos que interagiram com a proteína.<sup>6-8</sup> Além disso, o ensaio de *ligand fishing* possibilita a identificação de metabólitos secundários de baixa concentração no extrato, mas que possuem alta afinidade pela enzima ou a identificação de ligantes de baixa afinidade, que podem ser negligenciados em outros ensaios de triagem.<sup>7</sup>

#### **1.4. Imobilização de enzimas**

As enzimas em suas condições ideais de pH, temperatura, solvente e pressão são extremamente eficientes para as reações nas quais catalisam, devido à especificidade, regio-, quimio- e estereosseletividade. No entanto, para aplicações industriais e entre outros processos, suas condições funcionais são limitadas.<sup>1,2,45</sup>

A procura crescente por biocatalisadores para o desenvolvimento de processos químicos mais sustentáveis, aumentou a necessidade de estratégias para expandir o desempenho enzimático e superar as desvantagens citadas. Nesse sentido, a imobilização enzimática pode fornecer uma ampla variedade de

benefícios, tais como melhorar a sua resistência térmica, ampliar sua faixa de pH;<sup>46</sup> maior estabilização à ataques químicos ou ambientais; melhor desempenho da enzima sob condições reacionais extremas, resistência à desnaturação;<sup>43</sup> além da recuperação da enzima para reutilização ao final do processo.

A imobilização enzimática é um termo empregado para confinar uma enzima solúvel em um suporte sólido insolúvel em meio aquoso ou orgânico, tornando, assim, a enzima imobilizada robusta, resistente a mudanças ou condições ambientais adversas e podendo ser aplicada em processos contínuos.<sup>1</sup>

Quanto ao processo de imobilização, existem diferentes métodos como ligação a um suporte (iônica ou covalente), encapsulação, confinamento, adsorção, reticulação, entre outros<sup>46</sup> (FIGURA 1.3), como também diferentes tipos de suporte: partículas magnéticas, fibras mesoporosas, grafeno, nanotubos de carbono, nanoesferas de sílica, quitosana e outros.<sup>36,45</sup>

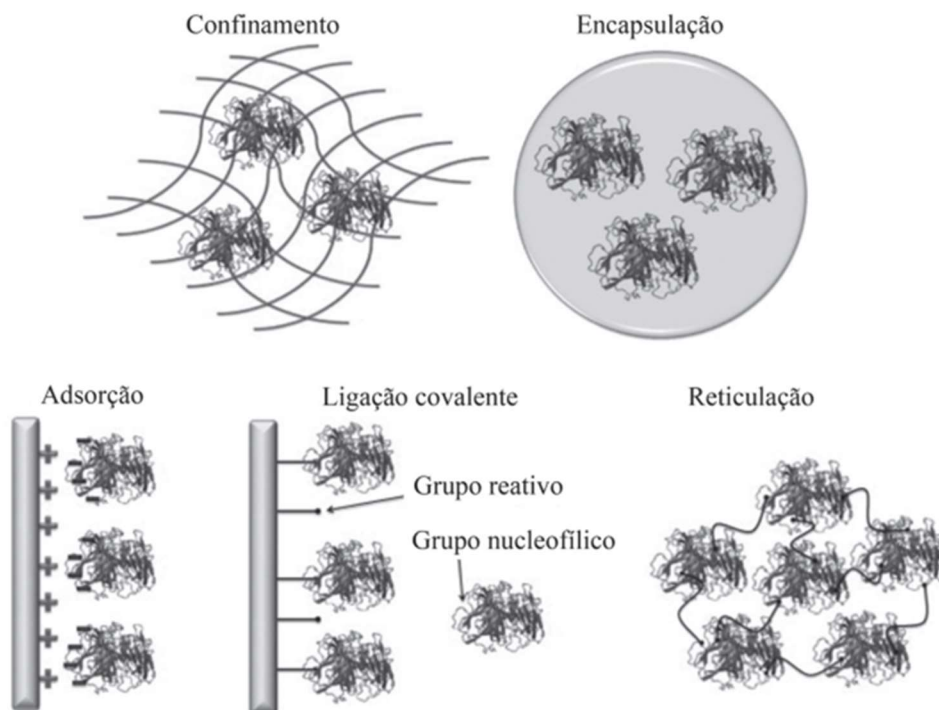


FIGURA 1.3. Métodos de imobilização de enzimas: confinamento, encapsulação, adsorção, ligação covalente e reticulação.<sup>46</sup>

A escolha do método, do suporte de imobilização e das condições ótimas para imobilizar uma enzima são totalmente empíricas. Todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens, onde a escolha mais adequada dependerá das características de cada enzima, da aplicação, das propriedades do substrato, estabilidade química e biológica.<sup>46</sup>

### 1.5. A enzima 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase (MTAP)

A 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase (MTAP, EC 2.4.2.28), dentre os membros da família das Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP), é uma enzima que tem sido encontrada em mamíferos e em outros organismos. A MTAP catalisa a fosforilação reversível de 5'-metiltioadenosina (MTA), um nucleosídeo formado a partir de *S*-adenosilmetionina por várias vias independentes. Os produtos da reação são adenina e 5-metiltioribose-1-fosfato (MTR1P)<sup>47</sup> (FIGURA 1.4).

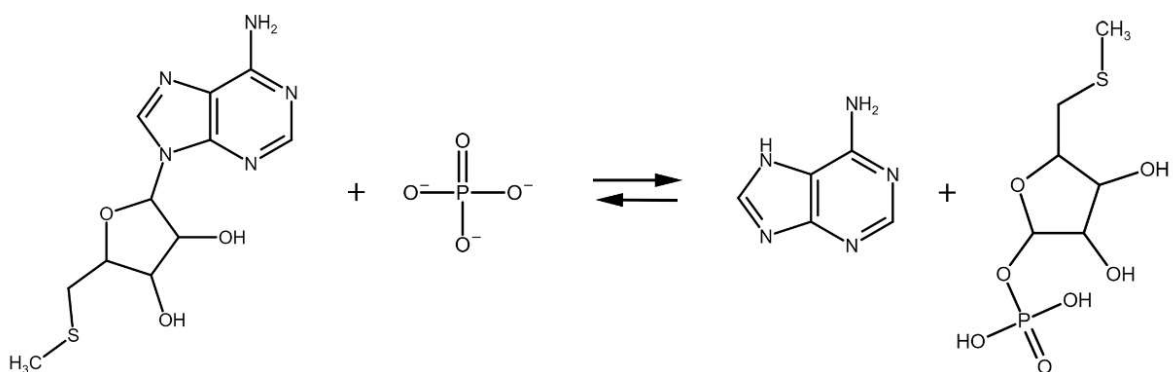


FIGURA 1.4. Reação catalisada pela MTAP: Clivagem fosfolítica de MTA em adenina e MTR1P.

Os nucleotídeos de purina são essenciais em todas as células vivas, para síntese de DNA, RNA e outros metabólitos.<sup>48,49</sup> Os componentes específicos desses nucleotídeos são uma base nitrogenada, pentose e fosfato. As bases nitrogenadas podem ser derivadas de pirimidinas (timina, citosina e uracila) e purinas (adenina e guanina).<sup>48</sup>

A obtenção desses nucleotídeos pode ocorrer de duas maneiras: através da via “de novo” e/ou da via de salvação, também conhecida como de recuperação. A via “de novo” utiliza precursores mais simples para a síntese, como precursores metabólicos aminoácidos, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> e ribose 5-fosfato. No entanto, a via de salvação reutiliza purinas pré-formadas de maneira endógena ou exógena, reciclando bases livres e os nucleotídeos liberados na quebra de ácidos nucléicos.<sup>48,49</sup>

Os mamíferos utilizam as duas vias para a síntese dos nucleotídeos purínicos, enquanto os parasitas dependem exclusivamente da reutilização das purinas existentes e não são capazes de sintetizá-las a partir de moléculas mais simples.<sup>49-51</sup>

O parasita humano *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), é o principal parasita causador da esquistossomose<sup>51-55</sup>, uma doença considerada negligenciada, cujo impacto socioeconômico só é superado pela malária.<sup>53</sup> A esquistossomose é relatada em mais de 70 países e afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo, sendo que a Organização Mundial da Saúde (OMS) a considera como um problema de saúde pública mundial, pela gravidade da infecção em humanos. A doença que é transmitida pela água ou hospedeiros intermediários, de muitas partes tropicais e subtropicais do mundo, está associada à pobreza, onde as condições higiênicas e sanitárias são limitadas.<sup>48,52,53,56</sup>

No momento atual, não existe uma vacina anti-esquistossômica eficaz e o único medicamento disponível para controlar a doença é o praziquantel (PZQ), um derivado pirazino-isoquinoleínico (FIGURA 1.5), que foi

desenvolvido em 1970. <sup>48,53,57</sup> O PZQ é ativo contra todas as espécies de esquistossoma e tem baixos efeitos colaterais, no entanto, se mostrou ineficaz contra o estágio larval do parasita. Ademais, já foi observado que ciclos repetidos de uso do PZQ em crianças de áreas endêmicas da doença, levaram a falhas terapêuticas do medicamento, e a ineficácia no tratamento em viajantes que retornam dessas áreas, traz preocupações crescentes sobre resistência ao medicamento.<sup>53,55</sup>

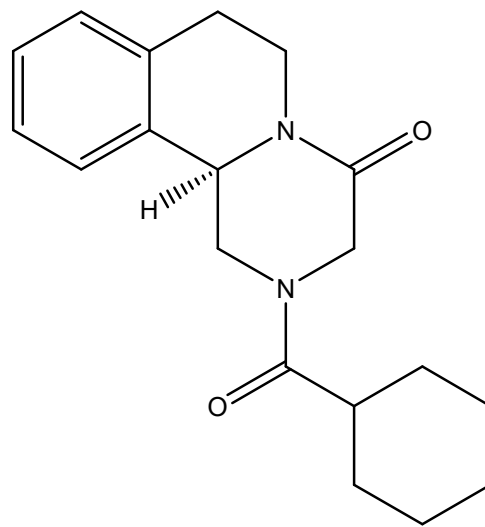


FIGURA 1.5. Estrutura química do praziquantel. Nome IUPAC, (*R*)-2-(cyclohexylcarbonyl)-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4*H*-pyrazino (2,1-*a*)isoquinolin-4-one.

O *S. mansoni* teve seu metabolismo purínico estudado por Senft e colaboradores<sup>58-64</sup> e Dovey<sup>65</sup> entre os anos de 1970 e 1980. Os autores demonstraram que, ao contrário do seu hospedeiro, *S. mansoni* depende exclusivamente da via de salvação para aquisição de purinas, pois não possui a via biossintética de purinas “de novo”. A FIGURA 1.6, esquematiza de forma adaptada as várias vias de salvação de purinas em *S. mansoni*.

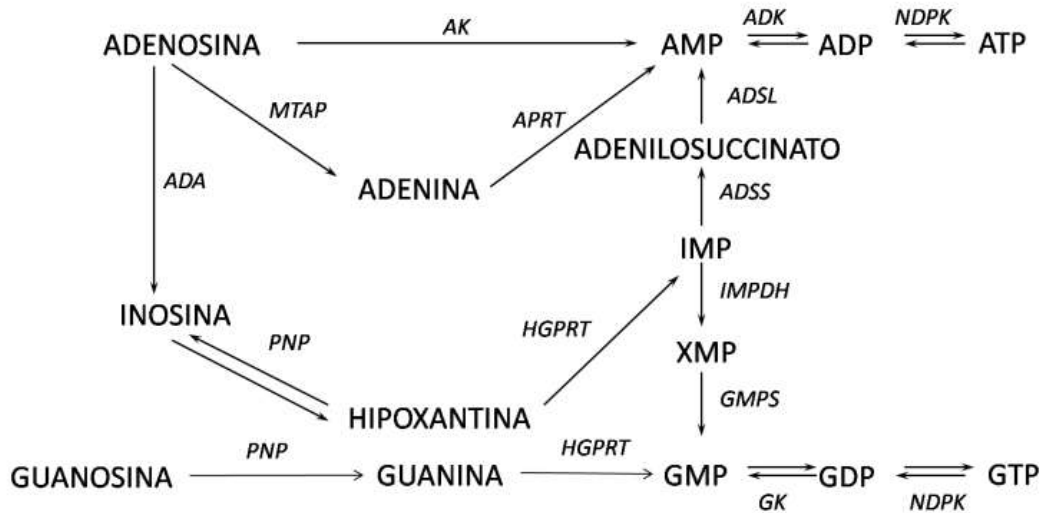


FIGURA 1.6. Esquema da via de salvação de purinas em *S. mansoni*. ADA – adenosina desaminase, PNP - purina nucleosídeo fosforilase, HGPRT – hipoxantina guanina fosforibosiltransferase, APRT – adenina fosforibosiltransferase, AK – metiltioadenosina fosforilase, ADSL – adenilossuccinato liase, ADSS – adenilossuccinato sintase, IMPDH – inosina monofosfato desidrogenase, GMPS – GMP-sinsetase, GK – guanilato kinase, ADK – adenilato kinase, NDPK – nucleosídeo difosfato kinase, MTAP - 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase. Adaptado de SENFT<sup>61</sup>

Em *S. mansoni* a enzima MTAP é capaz de acelerar reações químicas celulares mesmo na ausência de fosfato, seu substrato por natureza. Além disso, a enzima MTAP desse parasita possui uma característica diferente quando comparada com as encontradas em mamíferos, que é um baixo valor de  $K_M$  para o substrato adenosina e análogos.<sup>54</sup> Ou seja, a afinidade de MTAP de *S. mansoni* é maior por adenosina do que com seu próprio substrato natural, o MTA. No parasita, a enzima MTAP tem um mecanismo de ação completamente diferente do que é apresentado no organismo humano, auxiliando-o na síntese de DNA e na obtenção de energia, sendo assim, vital para o organismo. A enzima em *S. mansoni* converte diretamente adenosina em adenina, todavia em humanos, a conversão é feita em duas etapas por outras enzimas.<sup>51,54</sup>

A enzima MTAP do parasita (*Sm*MTAP) é uma proteína que apresenta 299 resíduos de aminoácidos, sendo que 16 são inexistentes na MTAP humana. Quando comparadas, as enzimas possuem 46% de identidade sequencial. Essas enzimas, responsáveis pela clivagem fosfolítica da ligação glicosídica em nucleosídeos, são estruturalmente classificadas em duas famílias conhecidas como Nucleosídeo Fosforilase I e II (NP-I e NP-II). A estrutura da *Sm*MTAP é similar às NP-I de baixo peso molecular, que consiste em um trímero de subunidades idênticas relacionadas por um eixo de simetria de ordem 3, com um barril distorcido central contornado por  $\alpha$ -hélices, como mostrado na FIGURA 1.7.<sup>54</sup>

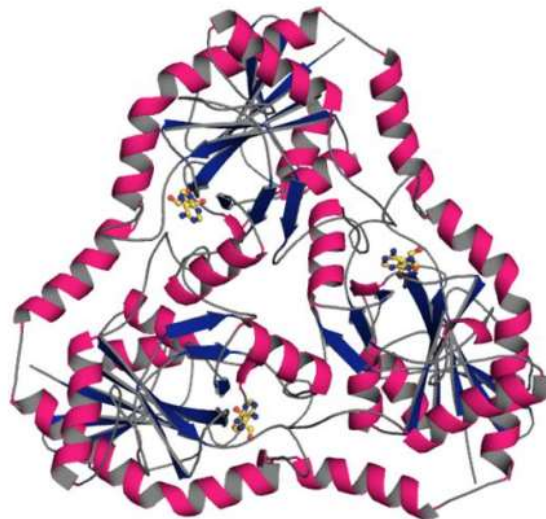


FIGURA 1.7. Trímero da MTAP de *S. mansoni*. Em amarelo, ligantes na interface entre as subunidades. Estrutura secundária em cores diferentes: Hélices em rosa; Loops em cinza e folhas em azul.<sup>48</sup>

De acordo com Souza<sup>48</sup>, na comparação das estruturas da MTAP de *S. mansoni* e de *H. sapiens* foi possível identificar três mutações no sítio ativo, sendo que duas delas parecem estar diretamente ligadas com a preferência (menor valor de  $K_M$ ) por adenosina ao seu substrato natural; o MTA, e com a catálise da

enzima na ausência de fosfato, uma evolução que proporcionou uma melhor adaptação ao parasita, respectivamente.

## 2. OBJETIVOS

Desenvolver biorreatores com a enzima heteróloga MTAP de *S. mansoni* covalentemente imobilizada em partículas magnéticas, para serem empregados na triagem de ligantes da enzima.

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1. Materiais

Todos os procedimentos cromatográficos analíticos aqui descritos, referentes ao monitoramento de atividade e caracterização da *SmMTAP* em solução e imobilizada, foram realizados utilizando um cromatógrafo líquido composto por duas bombas quaternárias de UHPLC LC-30AD série NEXERA X2 da SHIMADZU, com auto-injetor SIL-30AC, forno CTO-30A e válvula seletora para a comutação de colunas e desenvolvimento de métodos analíticos usando o sistema Method Scouting Solution. Uma interface modelo CBM-20A conecta o sistema, com um detector de ultravioleta com comprimento de onda variável SPD-M30A e a aquisição e processamento dos dados foi realizada através do *software* Lab Solutions.

Para a análise dos ensaios de *ligand fishing* com os extratos de produtos naturais, foi utilizado um equipamento de espectrometria de massas de alta resolução (do inglês, *High Resolution Mass Spectrometry* - HRMS) utilizando o sistema UHPLC Agilent 1290 Infinity I (Agilent Technologies) composto por uma bomba binária (G7120A –), auto-injetor e compartimento de colunas (G7129B – 1290) e detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (G7114B – modelo 1260 Infinity II – VWD), acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo QqTOF (Bruker Daltonics – Impact HD) equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A aquisição e processamento dos dados foi realizada utilizando o software Data Analysis<sup>®</sup> (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha).

As partículas magnéticas (MB), utilizadas na imobilização de proteína, foram adquiridas de dois fabricantes diferentes, e suas características estão listadas na Tabela 3.1 a seguir.

TABELA 3.1. Informações sobre partículas magnéticas.

Fabricante	Nome	Descrição	Concentração estoque	Tamanho
Bioclone Inc	BcMag <sup>TM</sup>	Óxido de ferro com revestimento de sílica, funcionalizada com aminas primárias	50 mg mL <sup>-1</sup>	1,0 µm
Sigma-Aldrich	Sigma	Óxido de ferro revestido com grupos amino	50 mg mL <sup>-1</sup>	1,0 µm

O solvente orgânico acetonitrila de grau HPLC foi obtido comercialmente da Merck, Honeywell e J.T. Baker. A água ultrapura utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi obtida em um sistema Milli-Q (MILLIPORE, Merck).

O formiato de sódio, obtido comercialmente de Sigma-Aldrich, foi utilizado em solução 1 mmol L<sup>-1</sup> (acetonitrila: água, 4:1, v/v) para calibrar o espectrômetro de massas.

A pesagem de padrões foi realizada em balança analítica modelo HR-200 (A&D Weighing), com precisão de 0,0001 g.

As amostras ou reagentes foram solubilizados com auxílio do ultrassom modelo 1510 (BRANSON). E a homogeneização das soluções foi efetuada em vórtex modelo Lab Dancer (IKA).

As medidas e ajustes de pH foram efetuadas em pHmetro PG1800 (Gehaka), com precisão de 0,01 unidade.

Para a imobilização em partículas magnéticas, foi utilizado o agitador rotatório, modelo Revolver (Labnet), com velocidade fixa de 20 rpm, com capacidade para microtubos de 1,5 e 2 mL e tubos Falcon de 15 e 50 mL.

Para as separações das partículas do sobrenadante, foi utilizado o separador magnético manual para seis microtubos de 1,5 mL, modelo WM206 (Wang Yuan Biotech).

As amostras foram centrifugadas na centrífuga modelo 5415 R (Eppendorf).

O calibrante formiato de sódio foi infundido no sistema de espectrometria de massas com auxílio de uma bomba seringa de 1 via LEGATO<sup>®</sup> 110 DRS (Kd Scientific).

O glutaraldeído (solução 25% em água), fosfato de potássio, acetato de amônio, ácido fórmico, ácido acético, ácido clorídrico, hidróxido de potássio, hidróxido de amônio, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), adenosina (substrato), adenina (produto), catequina, epicatequina, quercetina, cafeína e tubercidina foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico e adquiridos da Sigma-Aldrich.

### **3.2. A enzima MTAP**

A enzima MTAP de *S. mansoni* que foi gentilmente doada pela Profa. Dra. Marcela Cristina de Moraes, foi expressa e purificada no Laboratório de Síntese Orgânica, Cromatografia e Química Ambiental (SINCROMA), Instituto de Química – Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Fluminense em quantidade suficiente para os estudos a serem realizados neste presente trabalho.

Resumidamente, para a expressão da enzima o plasmídeo pET28a, que possui o gene da *SmMTAP*, foi transformado em células de bactérias competentes *Escherichia coli* BL21 (DE3) códon plus. Para a expressão da

enzima, foi utilizado 500 mL de meio 2x (*Tryptone, Yeast extract*) suplementado com 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de kanamicina e 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de clorafenicol, inoculado com uma cultura crescida por 16 horas contendo o plasmídeo. Os tubos foram mantidos sob agitação (250 rpm) até que a DO (densidade óptica) fosse igual ou superior a 0,6. A expressão da proteína foi induzida com 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de IPTG. O produto da expressão foi centrifugado por 20 minutos a 9000 g, o *pellet* foi suspenso com 50 mL de tampão de lise ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7,4, NaCl 300  $\text{mmol L}^{-1}$ , imidazol 10  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\beta$ -Mercaptoetanol 5  $\text{mmol L}^{-1}$ ). As bactérias foram lisadas por sonicação e novamente centrifugadas por 20 minutos a 9000 g.

Para a purificação, foi utilizada cromatografia por afinidade, onde o extrato bruto contendo a proteína foi aplicado na coluna contendo a resina cromatográfica Chelating Sepharose Fast Flow da GE Healthcare. A coluna foi, então, lavada com 10 volumes de tampão de lavagem ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 7,4, NaCl 300  $\text{mmol L}^{-1}$ , imidazol 20  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\beta$ -Mercaptoetanol 5  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Para a eluição da proteína ligada na coluna, foi utilizado 1,5 volume de tampão de eluição ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 7,4, NaCl 300  $\text{mmol L}^{-1}$ , imidazol 200  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\beta$ -Mercaptoetanol 5  $\text{mmol L}^{-1}$ ). A *SmMTAP* foi, então, dialisada contra Tris 20  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 7,4, NaCl 200  $\text{mmol L}^{-1}$  e de  $\beta$ -Mercaptoetanol 10  $\text{mmol L}^{-1}$  e concentrada até 10  $\text{mg mL}^{-1}$ . A proteína foi armazenada à  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  com 50% de glicerol, concentração final.

A enzima foi enviada em tubos eppendorf de 1,5 mL, em tampão Tris 20  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 7,4, de NaCl 200  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\beta$ -Mercaptoetanol 10  $\text{mmol L}^{-1}$  e 1,8  $\text{mg mL}^{-1}$ . Para as reações de atividade catalítica e todos os procedimentos do trabalho, a *SmMTAP* foi dialisada contra tampão fosfato de potássio 100  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,4, por 9 horas e armazenada à  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.3. Extratos naturais

O extrato do organismo marinho, a esponja *Topsentia ophiraphidites*, foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Alessandra L. Valverde do Instituto de Química – Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Fluminense. A amostra foi coletada pela Profa. Dra. Rosângela de A. Epifanio no Arquipélago de Fernando de Noronha em 1998, identificada pelo biólogo Dr. Guilherme Muricy (Laboratório de Porífera, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro), e depositada no Museu Nacional. Este trabalho está registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o código AB724BB.

O extrato de *T. ophiraphidites* sob o código FN 031, foi coletado na Ponta da Sapata, com profundidade de 20-23 m e exsicata depositada no Museu Nacional 22336. O extrato foi preparado por maceração estática com etanol por 7 dias, seguido da mistura de acetato de etila e metanol (1:1, v/v), por duas vezes também por 7 dias cada. Após, o extrato teve seu solvente removido com auxílio de um rotaevaporador à vácuo (BUCHI Brasil Ltda) e um concentrador à vácuo refrigerado Savant Speedvac (Thermo Fisher Scientific) e, armazenado em freezer a -20 °C.

O extrato de *Aspidosperma macrocarpon* foi coletado nas dependências da Universidade Federal de Catalão (UFCAT), no município de Catalão - GO em 19 de fevereiro de 2021, sendo os dados e as coordenadas do GPS (S18°09'16.4"; W47°55'43.2"). Esta parte do trabalho foi realizada pela Profa. Dra. Richele Priscila Severino com o auxílio do Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro (Instituto de Biotecnologia - UFCAT), o qual realizou a identificação da espécie. O material vegetal (folhas, cascas do caule e caule) foi seco à temperatura ambiente e posteriormente submetido à maceração com etanol grau HPLC, sendo realizadas três extrações de três dias cada. Após cada extração, o material foi filtrado e o solvente evaporado em evaporador rotativo à baixa

pressão, obtendo-se os extratos etanólicos das folhas, cascas e caule que foram armazenados em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4. Teste de atividade da *Sm*MTAP em solução tampão fosfato**

As reações de atividade foram realizadas em eppendorf de 1,5 mL contendo adenosina  $20\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $5\text{ }\mu\text{L}$  da fração da enzima *Sm*MTAP e volume final ajustado para  $200\text{ }\mu\text{L}$  com tampão fosfato de potássio  $100\text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,4. A reação foi incubada a temperatura ambiente do laboratório, por 10 min. Em seguida, foi adicionado  $200\text{ }\mu\text{L}$  de acetonitrila (ACN) com posterior centrifugação a  $9.300\text{ g}$ , 10 min, a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante ( $5\text{ }\mu\text{L}$ ) foi injetado em LC-UV nas condições descritas no tópico 3.5.

### **3.5. O sistema LC-UV**

Para monitorar a atividade catalítica da *Sm*MTAP de maneira direta, com a conversão de adenosina para adenina, foi utilizada uma coluna Acquity UPLC BEH Amide ( $100\text{ x }2.1\text{ mm}$ ,  $1,7\text{ }\mu\text{m}$ , Waters), modo de eluição isocrático, com fase móvel composta por ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  85:15 (v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico, vazão  $0,300\text{ mL min}^{-1}$ , forno a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , detecção em 245 nm e tempo de corrida de 5 min.

As análises foram realizadas no UHPLC LC-30AD série NEXERA X2 da SHIMADZU, com detalhes descritos na seção 3.1.

### 3.6. Teste de pH com tampões voláteis para *SmMTAP*

Para o teste de pH com tampões voláteis, foi utilizado os tampões acetato de amônio (pH: 4,2; 5,2; 8,2 e 9,2) e bicarbonato de amônio (pH: 6,8; 7,0; 7,2; 7,4 e 7,6) ambos na faixa tamponante dos respectivos sais e na concentração de 10 mmol L<sup>-1</sup>. As reações catalíticas para enzima foram realizadas como descrito no tópico 3.4 e 3.5, em triplicata, utilizando os pHs citados, e analisadas por LC-UV conforme descrito na seção 3.1.

### 3.7. Qualificação do método de LC-UV para *SmMTAP*

O estudo de linearidade do método foi realizado através da construção de curvas analíticas com padrão externo. Para isso, uma solução estoque de adenina 1 mmol L<sup>-1</sup> foi preparada em tampão fosfato de potássio, 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,4. As soluções de trabalho para as curvas analíticas e controles de qualidade (CQs) foram preparadas a partir da solução estoque.

As concentrações utilizadas para curva foram: 16; 20; 32; 64; 128; 256; 512; e 600 µmol L<sup>-1</sup> e, os CQs: 25; 256 e 415 µmol L<sup>-1</sup>. Para tanto, em tubos eppendorf foi transferido volumes em µL da solução de trabalho adenina (de acordo com a concentração utilizada na curva) onde o tampão fosfato de potássio, 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,4 foi usado para corrigir o volume para 200 µL. Em seguida, foi adicionado 200 µL de ACN. A mistura foi centrifugada a 9.300 g, 10 min e 4 °C. O sobrenadante foi transferido para *vials* do auto-injetor e injetado em LC-UV, como descrito na seção 3.5. Os critérios para a concentração dos CQs do método foram: i) CQ de menor concentração em até 3 vezes a concentração do menor ponto da curva; ii) CQ de concentração intermediária entre 40-60% da

concentração do maior ponto da curva e iii) CQ de maior concentração entre 75-95% da concentração do maior ponto da curva.

Os padrões da curva de calibração foram preparados em triplicata e a curva analítica construída através de regressão linear, a partir da área do pico de adenina em função de sua concentração.

Foram avaliados a seletividade, linearidade, precisão e exatidão intra e inter-lotes. A seletividade foi avaliada através da injeção da matriz isenta do padrão, onde não foi observado a presença de nenhum pico no mesmo tempo de retenção.

A precisão do método foi expressa como o coeficiente de variação (CV%). A exatidão foi determinada pelo cálculo de volta e expressa em porcentagem, como a razão do valor médio encontrado e o valor de referência das concentrações preparadas. A precisão e exatidão intra e inter-lotes foram mensuradas analisando-se três replicatas dos três níveis de CQs.

### **3.8. Caracterização cinética de *Sm*MTAP**

Após a qualificação do método, os parâmetros cinéticos da *Sm*MTAP foram determinados na presença e ausência de fosfato.

Nesse intuito, a concentração de adenosina para a determinação do  $K_M$  no tampão fosfato de potássio variou entre 8 e 600  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , enquanto para a determinação do  $K_M$  em tampão bicarbonato de amônio a concentração de adenosina variou entre 0,5 e 10000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

As reações de atividade foram realizadas em eppendorf de 1,5 mL contendo adenosina variando nas concentrações citadas anteriormente para cada tampão, 5  $\mu\text{L}$  da fração da enzima *Sm*MTAP e volume final ajustado para 200  $\mu\text{L}$  com tampão bicarbonato de amônio 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,6 ou tampão fosfato de

potássio 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,4. A reação foi mantida a temperatura ambiente do laboratório, por 10 min, seguido da adição de 200 µL de ACN e centrifugação a 9.300 g, 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para *vials* do auto-injetor e injetado em LC-UV, como descrito na seção 3.5.

Os experimentos foram realizados em triplicata e as constantes de Michaelis-Menten aparente ( $K_{Mapp}$ ), para ambos os substratos, foram estimadas usando o *software* GraphPad Prism 5.0 através de análise de regressão não-linear.

### 3.9. Imobilização de *Sm*MTAP em partículas magnéticas

De acordo com protocolo estabelecido no grupo de pesquisa<sup>66</sup>, com modificações, realizou-se a imobilização da enzima em partículas magnéticas (MB).

Inicialmente, pesou-se 5 mg de partículas magnéticas (Bioclone) em 4 eppendorfs diferentes e lavou-se cada uma com 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,4 por 3 vezes, sempre em ciclos de 10 s de agitação em vórtex e 2 minutos no separador magnético. Em seguida, em 2 eppendorfs foi adicionado 1 mL de uma solução de glutaraldeído 5% em tampão fosfato e nos outros 2 eppendorfs restantes foi adicionado 1 mL de uma solução glutaraldeído 2,5%. As soluções foram deixadas sob agitação a temperatura ambiente, por 3 h, em agitador rotatório.

Após este procedimento, as 4 alíquotas de partículas foram lavadas cada uma por 3 vezes com 1 mL de tampão fosfato 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,4 e, em seguida, adicionado 500 µL da solução da enzima *Sm*MTAP com concentração de 0,08 mg mL<sup>-1</sup>. As soluções foram mantidas por 4 e 8 horas, a 4 °C, sob agitação suave em agitador rotatório.

Após o procedimento de imobilização, os 4 biorreatores foram denominados MTAP-MB e lavados 3 vezes com tampão fosfato 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,4, sempre em ciclos de 10 s de agitação em vórtex e 2 minutos no separador magnético. Assim, foram obtidos dois biorreatores com 8 h de imobilização, sendo um com 5% de glutaraldeído e outro com 2,5% (MTAP-MB 8 h 5% e MTAP-MB 8 h 2,5%). Os outros dois biorreatores foram obtidos com 4 h de imobilização, sendo também um com 5% de glutaraldeído e outro com 2,5% (MTAP-MB 4 h 5% e MTAP-MB 4 h 2,5%). Os biorreatores foram avaliados frente à atividade catalítica da enzima, conforme descrito a seguir na seção 3.10.

Outros dois experimentos de imobilização foram realizados nas condições descritas: 5 mg de partículas, com 2,5% de glutaraldeído e 4 horas de imobilização. O processo sucedeu-se da mesma maneira citada acima e nesse experimento, variou-se o fabricante das partículas magnéticas: Bioclone (MTAP-MB bioclone) e Sigma Aldrich (MTAP-MB sigma). Os biorreatores produzidos foram avaliados frente à atividade catalítica da enzima, conforme descrito a seguir na seção 3.10.

Para avaliar interações inespecíficas, foram feitos controles negativos do biorreator MTAP-MB (Sigma). Em duplicata, MTAP-MB foi submetida a desnaturação da enzima e, para isso, alíquotas de 1 mg dos biorreatores foram incubados com uma mistura de MeOH/ACN (1:1) em banho maria a 50 °C por 1 h, seguido de choque térmico por 10 min a -20 °C, gerando, então, os biorreatores de enzima inativa: Controle-MB1 e Controle-MB2. Da mesma maneira, os biorreatores foram avaliados conforme descrito a seguir, na seção 3.10.

### **3.10. Avaliação da atividade catalítica de MTAP-MB e MTAP-MB controle**

Para avaliar a atividade enzimática dos biorreatores MTAP-MB e Controle-MB, através da conversão de adenosina em adenina, em 1 mg de cada biorreator foi adicionado adenosina  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  com o volume final ajustado para  $200 \mu\text{L}$  com tampão fosfato  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,4. As reações foram incubadas a temperatura ambiente e sob agitação por rotação suave com auxílio do agitador rotatório, por 10 min. Após a separação magnética, por 2 minutos em repouso no separador, o sobrenadante da reação ( $200 \mu\text{L}$ ) foi recolhido em eppendorf e adicionado  $200 \mu\text{L}$  de ACN, seguido de centrifugação a  $9.300 \text{ g}$ , 10 min, a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em seguida, os sobrenadantes foram analisados pelo método de LC-UV, com as condições descritas na seção 3.5.

Após os experimentos de atividade, os biorreatores foram lavados 3 vezes com 1 mL de tampão TRIS-HCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 7,4, sempre em ciclos de 10 segundos de agitação em vórtex e 2 minutos no separador magnético e armazenados neste mesmo tampão.

### **3.11. Caracterização cinética de SmMTAP**

Os parâmetros cinéticos da MTAP imobilizada em partículas magnéticas (MTAP-MB) foram determinados em tampão fosfato  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 7,4 para o substrato adenosina. A concentração de adenosina para a determinação do  $K_{\text{Mapp}}$  variou entre 8 e  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Inicialmente, foi preparada uma solução estoque de adenosina na concentração de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ . A partir da solução estoque foram preparadas as triplicatas das reações de trabalho para o estudo cinético nas seguintes concentrações: 8; 16; 32; 64; 128; 190; 256 e  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Para tanto, em 3 eppendorf de 1,5 mL contendo MTAP-MB (1 mg) foi adicionado o volume

correspondente a concentração de  $8 \mu\text{mol L}^{-1}$  e o volume ajustado para  $200 \mu\text{L}$  com tampão fosfato de potássio  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 7,4. A reação foi incubada a temperatura ambiente do laboratório, por 10 min. Ao final, os sobrenadantes foram separados da MTAP-MB e transferidos, onde foram adicionadas alíquotas de  $200 \mu\text{L}$  de ACN com posterior centrifugação a  $9.300 \text{ g}$ , 10 min, a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . As reações foram feitas e injetadas em triplicata com volume de injeção de  $5 \mu\text{L}$  em LC-UV de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas anteriormente na seção 3.5.

Em seguida, as MTAP-MB foram lavadas 3 vezes com  $500 \mu\text{L}$  de tampão fosfato, sendo agitadas por 10 s em vórtex, levadas para o separador magnético por 2 minutos e, então, o tampão foi descartado. Desta forma, a MTAP-MB estava pronta para a próxima reação, que foi realizada da mesma maneira, porém com a solução estoque de adenosina com concentração imediatamente superior.

Os experimentos foram realizados em triplicata e a constante de Michaelis-Menten aparente ( $K_{\text{Mapp}}$ ), foi estimada usando o *software* GraphPad Prism 5.0 através de análise de regressão não-linear, para MTAP-MB.

### 3.12. Teste de inibição com a MTAP-MB

Foram escolhidas seis moléculas: quercetina, cafeína, tubercidina, catequina, epicatequina e aciclovir. Os testes de inibição foram realizados em duplicatas, em microtubos de  $1,5 \text{ mL}$  contendo a MTAP-MB com concentração de  $20$  e  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  desses compostos,  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de adenosina e o volume final da reação ajustado para  $200 \mu\text{L}$  com tampão fosfato  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,4.

Ao final de cada reação, os biorreatores foram lavados com  $3 \times 500 \mu\text{L}$  de tampão fosfato, sendo agitados por 10 segundos em vórtex, levados para o

separador magnético por 2 minutos e então o tampão foi descartado. Desta forma, as MTAP-MB estavam prontas para a próxima reação, com o próximo composto.

Os compostos triados foram solubilizados em uma mistura de H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, em que a atividade da enzima na presença desse solvente foi previamente testada e não houve alteração na formação de produto. Para o teste de inibição, os compostos foram solubilizados em tampão na presença da enzima imobilizada e em seguida o substrato adenosina foi adicionado. A reação e a análise cromatográfica seguiram-se como já citado anteriormente, na seção 3.5.

### **3.13. Ensaio de ligand fishing com MTAP-MB para o extrato de *Topsentia ophiraphidites* (FN 031)**

#### **3.13.1. Preparo da amostra e método por LC-HRMS**

O extrato da esponja marinha *T. ophiraphidites* (4 mg) foi solubilizado em 100% de metanol e diluído até a concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> em solução de acetato de amônio (15 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,2) contendo 10% de MeOH.

No sistema de LC-HRMS, para análise do perfil cromatográfico de *T. ophiraphidites*, bem como todos os sobrenadantes do ensaio de *ligand fishing*, foi utilizada a coluna de fase reversa Acquity HSS T3 (100 × 2,1 mm, 1,8 μm), fase móvel composta por (A) água e (B) ACN, ambas contendo 0,1% de ácido fórmico, em modo de eluição gradiente de 2 a 100% de B em 25 min, seguido de etapa isocrática 100% de B de 25 a 27,5 min e condicionamento na condição inicial por 7 min, vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 30 °C e 5 μL de volume de injeção. Os parâmetros do QqTOF foram: modo positivo de ionização, experimento de varredura de íons totais entre *m/z* 50 ou 100 a 1300, 4500 V de voltagem do capilar, 500 V no *end plate*, 9 L min<sup>-1</sup> de vazão do gás de secagem,

2,0 bar como pressão do gás de nebulização, 180 °C de temperatura de secagem, 1 eV de energia de ionização do quadrupolo, 12 eV de energia da cela de colisão, 8  $\mu$ s de tempo de pré pulso.

Para as análises de LC-HRMS o QqTOF operou nas mesmas condições descritas acima, com aquisições no modo autoMS por ciclo de tempo de 3 segundos, com reconsideração do íon após 0,5 min, caso a intensidade fosse 2 vezes maior, tempos de transferência de 40 e 80  $\mu$ s, energia para fragmentação de 15–75 eV para a faixa de  $m/z$  100–1300.

Os dados por LC-HRMS foram calibrados internamente com solução de formiato de sódio (1 mmol L<sup>-1</sup>) e convertidos para mzXML pelo software Bruker Compass DataAnalysis<sup>®</sup> 4.2 (Bruker Daltonics).

### **3.13.2. Ensaio de *ligand fishing* para MTAP-MB e MTAP-MBcontrole**

O ensaio de *ligand fishing* foi realizado em duplicata para o biorreator ativo (MTAP-MB) e biorreator controle (MTAP-MBcontrole), de acordo com procedimento descrito por VANZOLINI et al.<sup>66</sup> com algumas modificações.

Resumidamente, uma mistura (solução S<sub>0</sub>) de 500  $\mu$ L de extrato da *T. ophiraphidites* (1 mg em tampão acetato de amônio 15 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,2, contendo 10% de MeOH) foi homogeneizada com 5 mg de MTAP-MB, em vórtex por 10 segundos. Em seguida, a mistura foi incubada por 10 min para carregamento dos ligantes na enzima, a temperatura ambiente e sob agitação constante e suave no agitador rotatório. O sobrenadante (S<sub>1</sub>) foi coletado e os biorreatores lavados por 2 vezes com 500  $\mu$ L de água, resultando nos sobrenadantes S<sub>2</sub> e S<sub>3</sub>. Em seguida, os biorreatores foram incubados por 15 min em 500  $\mu$ L de solução de extração constituída por 100% metanol, sob agitação

constante suave com auxílio do agitador rotatório e temperatura ambiente, para dessorção dos ligantes. O sobrenadante (S<sub>4</sub>) da extração foi coletado. Os biorreatores foram ainda lavados por 2 vezes com 500 µL água.

O mesmo procedimento foi realizado para os biorreatores controle. Todos os sobrenadantes foram analisados por método LC-HRMS, como descrito no tópico 3.13.1, e, ainda, foram feitas análises branco, com a injeção de tampão acetato de amônio (15 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,2) contendo 10% de MeOH.

Os dados por LC-HRMS foram calibrados internamente com solução de formiato de sódio (1 mmol L<sup>-1</sup>) e convertidos para o formato mzXML pelo software Bruker Compass DataAnalysis<sup>®</sup> 4.2 (Bruker Daltonics).

### **3.13.3. Processamento das análises**

Os dados obtidos na análise de LC-HRMS dos sobrenadantes S<sub>4</sub> foram processados no *software* MZmine, de acordo com algoritmos e parâmetros descritos na Tabela 3.2 a seguir:

TABELA 3.2. Parâmetros dos algoritmos para o processamento dos dados pelo MZmine.

<b>Algoritmo</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<i>Mass Detection</i>	Intervalo de tempo	1,0 a 27,5 min
	Nível de ruído no MS <sup>1</sup>	$1 \times 10^3$
	Modo	centroide
<i>Chromatogram Builder</i>	Tempo	1,0 a 27,5 min
	Intervalo de tempo mínimo	0,05 min
	Mínimo de altura da banda cromatográfica	$3 \times 10^3$
	Diferença de $m/z$ tolerada	0,001 Da / 5 ppm
<i>Automated Data Analysis Pipeline - (ADAP)</i>	Cálculo do centro de $m/z$	mediana
	Limite de relação sinal/ruído (S/N)	10
	Estimador de S/N	Janela de Intensidade
	Mínimo de altura da banda cromatográfica	$3 \times 10^3$
	Limite de coeficiente/área	20
	Intervalo de duração da banda cromatográfica	0,0 a 1,0 min
	Intervalo de tempo de retenção da banda cromatográfica	0,0 a 0,1 min
<i>Isotopic Peaks Grouper</i>	Diferença de $m/z$ tolerada	0,001 Da / 5 ppm
	Diferença de tempo de retenção tolerada	0,1 min
	Máxima carga do íon	2
	Isótopo representativo	menor valor de $m/z$
<i>Join Aligner</i>	Tolerância de $m/z$	0,001 Da / 5 ppm
	Tolerância de tempo	0,5 min
	Peso para o parâmetro $m/z$	75%
	Peso para o parâmetro tempo de retenção	25%
<i>Gap Filling – (Peak Finder)</i>	Tolerância de intensidade	10%
	Tolerância de $m/z$	0,002 Da
	Tolerância do tempo	0,2 min

Após as etapas de processamento, foram removidas as características moleculares que estavam duplicadas. Na sequência, a tabela com os dados alinhados foi exportada (.csv) contendo as informações, como número da informação molecular, valor médio de  $m/z$ , tempo médio de retenção e área correspondente ao cromatograma de íon extraído para cada informação molecular em cada uma das análises.

A tabela de dados alinhados foi convertida em .txt e importada para o software Excel<sup>®</sup> (Microsoft Office Professional Plus 2016).

Posteriormente, a tabela com os dados alinhados no Excel<sup>®</sup> foi submetida ao processamento com o software Ichthus (<https://github.com/MHBrito/IchthusSoftware>), o qual foi desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, através de um trabalho em parceria com colaboradores da Universidade Federal do Pernambuco. O software alinha as informações moleculares e realiza cálculos de razão de afinidade para cada característica conforme a equação abaixo:

$$AR (\text{Razão}_{\text{afinidade}}) = \frac{\text{Média da área da banda cromatográfica em } S_4 (\text{MTAP} - \text{MB})}{\text{Média da área da banda cromatográfica em } S_4 (\text{MTAP} - \text{MB}_{\text{controle}})}$$

### 3.14. Perfil químico de *Aspidosperma macrocarpon*

#### 3.14.1. Condições cromatográficas e método de LC-MS/MS para as amostras de *A. macrocarpon*

Para os extratos de galhos, folhas e casca do caule de *A. macrocarpon*, foram testadas diferentes concentrações de 100, 500 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O branco das amostras foi uma solução contendo metanol e água.

Além da concentração, foram exploradas colunas cromatográficas ortogonais: Acquity HSS T3 (100 × 2,1 mm, 1,8 μm, Waters<sup>TM</sup>), Ascentis Express C<sub>18</sub> (100 × 2,1 mm, 2,7 μm, Supelco); Cortecs C18+ (100 × 2,1 mm, 2,7 μm, Waters<sup>TM</sup>).

As análises foram realizadas no sistema de LC-HRMS, com fase móvel (A) água e (B) ACN, ambas contendo 0,1% de ácido fórmico, em eluição gradiente de 2 a 100% de B em 25 min, seguido de etapa isocrática 100% de B de 25 a 27,5 min e recondicionamento na condição inicial por 7 min, vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 30 °C e 5 μL de volume de injeção. Os parâmetros do QqTOF foram: modo positivo de ionização, experimento de varredura de íons totais entre *m/z* 50 ou 100 a 1300, 4500 V de voltagem do capilar, 500 V no *end plate*, 9 L min<sup>-1</sup> de vazão do gás de secagem, 2,0 bar como pressão do gás de nebulização, 180 °C de temperatura de secagem, 1 eV de energia de ionização do quadrupolo, 12 eV de energia da cela de colisão, 8 μs de tempo de pré pulso.

Para as análises de LC-HRMS/MS, o QqTOF operou nas mesmas condições descritas acima, com aquisições no modo autoMS, por ciclo de tempo de 3 segundos, com reconsideração do íon após 0,5 min, caso a intensidade fosse 2 vezes maior, tempos de transferência de 40 e 80 μs, energia para fragmentação de 15–75 eV para a faixa de *m/z* 100–1300.

Os dados por LC-HRMS foram calibrados internamente com solução de formiato de sódio (1 mmol L<sup>-1</sup>) e convertidos para mzXML pelo software Bruker Compass DataAnalysis<sup>®</sup> 4.2 (Bruker Daltonics).

### **3.14.2. Construção da rede molecular dos extratos de *A. macrocarpon***

As análises por LC-HRMS dos extratos casca do caule, folhas, galhos e amostra branco foram submetidas para a plataforma do GNPS

(<http://gnps.ucsd.edu>)<sup>30</sup> para construção da rede molecular, sob o formato mzXML.

O espectro de MS/MS foi filtrado e apenas os quatro fragmentos mais intensos, com janela de +/- 50 Da foram escolhidos ao longo do espectro. A tolerância de erro de  $m/z$ , para espectros consensos, foi de 0,02 Da tanto para íons precursores quanto para íons produtos. Em seguida, a rede molecular foi construída por agrupamentos de espectros consensos (nodos) por arestas, com uma pontuação mínima de similaridade de cosseno de 0,70 e três íons fragmentos correspondentes. Além disso, um nodo só poderia ser agrupado a outros dez mais semelhantes, e o tamanho máximo do agrupamento ou família molecular era de 100 nodos. Os dados das amostras foram filtrados a partir da análise em branco.

A partir das análises das amostras de galho, folhas e casca do caule foi gerada a rede molecular da *Aspidosperma macrocarpon*, a qual foi importada e visualizada no software Cytoscape (National Resource for Network Biology) versão 3.7.1.

### **3.14.3. Propagação da desreplicação de *A. macrocarpon***

A propagação da desreplicação foi realizada de forma manual, com auxílio das bases de dados listadas na Tabela 3.3. As substâncias propostas foram consideradas com espectro de MS/MS coincidente com a literatura, juntamente com o perfil do mecanismo de fragmentação semelhante ao espectro de MS/MS obtido experimentalmente. Além disso, as substâncias deveriam apresentar um baixo erro de massa exata < 5 ppm.

TABELA 3.3. Bases de dados utilizadas.

Bases de dados	
Dictionary of Natural Products	<a href="https://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml">https://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml</a>
SciFinder <sup>®</sup>	<a href="https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf">https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf</a>
PubChem	<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
KNAPSAcK Core System	<a href="http://www.knapsackfamily.com/knapsack_core/top.php">http://www.knapsackfamily.com/knapsack_core/top.php</a>
LIPID MAPS Human Metabolome Database	<a href="https://www.lipidmaps.org/databases/lmsd/browse">https://www.lipidmaps.org/databases/lmsd/browse</a>
MassBank	<a href="https://massbank.eu/MassBank/Search">https://massbank.eu/MassBank/Search</a>

### 3.15. Ensaio de ligand fishing com MTAP-MB para o extrato de casca do caule de *A. macrocarpon*

#### 3.15.1. Preparo da amostra e método por LC-HRMS

O extrato da casca do caule de *A. macrocarpon* (4 mg) foi solubilizado em 100% de metanol e diluído até a concentração de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em tampão de acetato de amônio (15  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 5,2) contendo 10% de MeOH.

No sistema de LC-HRMS, para análise dos sobrenadantes do ensaio *ligand fishing*, foi utilizado coluna de fase reversa Ascentis Express C<sub>18</sub> (100 × 2,1 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ , Supelco) com fase móvel (A) água e (B) ACN, ambos contendo

0,1% de ácido fórmico, em eluição gradiente de 2 a 100% de B em 25 min, seguido de etapa isocrática 100% de B de 25 a 27,5 min e recondicionamento na condição inicial por 7 min, vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 30 °C e 5 µL de volume de injeção. Os parâmetros do QqTOF massas foram: modo positivo de ionização, experimento de varredura de íons totais entre  $m/z$  50 ou 100 a 1300, 4500 V de voltagem do capilar, 500 V no *end plate*, 9 L min<sup>-1</sup> de vazão do gás de secagem, 2,0 bar como pressão do gás de nebulização, 180 °C de temperatura de secagem, 1 eV de energia de ionização do quadrupolo, 12 eV de energia da cela de colisão, 8 µs de tempo de pré pulso.

Para as análises de LC-HRMS/MS o QqTOF operou nas mesmas condições descritas acima e para aquisições no modo autoMS, por ciclo de tempo de 3 segundos, com reconsideração do íon após 0,5 min, caso a intensidade fosse 2 vezes maior, tempos de transferência de 40 e 80 µs, energia para fragmentação de 15–75 eV para a faixa de  $m/z$  100–1300.

Os dados por LC-HRMS foram calibrados internamente com solução de formiato de sódio (1 mmol L<sup>-1</sup>) e convertidos para mzXML pelo *software* Bruker Compass DataAnalysis® 4.2 (Bruker Daltonics).

### **3.15.2. Ensaio de *ligand fishing* para MTAP-MB e MTAP-MBcontrole**

O ensaio de *ligand fishing* foi realizado em duplicata para o biorreator ativo (MTAP-MB) e biorreator controle (MTAP-MBcontrole), de acordo com procedimento descrito por VANZOLINI et al.<sup>66</sup> com algumas modificações.

Resumidamente, uma mistura (solução S<sub>0</sub>) de 500 µL de extrato de *A. macrocarpon* (500 µg, com 10% de MEOH e 90% de tampão acetato de amônio 15 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,2) foi homogeneizada a 5 mg de MTAP-MB, com

vórtex por 10 segundos. Em seguida, a mistura foi incubada por 10 min para carregamento dos ligantes na enzima, a temperatura ambiente e sob agitação constante e suave no agitador rotatório. O sobrenadante ( $S_1$ ) foi coletado e os biorreatores lavados por 2 vezes com 500  $\mu\text{L}$  de água, resultando nos sobrenadantes  $S_2$  e  $S_3$ . Em seguida, os biorreatores foram incubados por 15 min em 500  $\mu\text{L}$  de solução de extração constituída por 100% metanol, sob agitação constante suave com auxílio do agitador rotatório e temperatura ambiente, para que os ligantes fossem desligados da enzima imobilizada e extraídos para o sobrenadante. O sobrenadante ( $S_4$ ) da extração foi coletado. Os biorreatores foram ainda lavados por 2 vezes com 500  $\mu\text{L}$  água e seus sobrenadantes recolhidos ( $S_5$  e  $S_6$ ).

O mesmo procedimento foi realizado para os biorreatores controle. Todos os sobrenadantes foram analisados por método LC-HRMS descrito no tópico 3.15.1 e, ainda foram feitas análises de branco, com a injeção de 10% metanol em solução de acetato de amônio (15  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 5,2).

Os dados por LC-HRMS foram calibrados internamente com solução de formiato de sódio (1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e convertidos para o formato mzXML pelo software Bruker Compass DataAnalysis<sup>®</sup> 4.2 (Bruker Daltonics).

### **3.15.3. Processamento das análises**

Os dados obtidos na análise de LC-HRMS dos sobrenadantes  $S_4$  foram processados no software MZmine, de acordo com algoritmos e parâmetros descritos na seção 3.13.3, a tabela com os dados alinhados foi convertida em .txt e importada para o software Excel<sup>®</sup> (Microsoft Office Professional Plus 2016) e em seguida foi submetida ao processamento com o software Ichthus, para o cálculo da razão de afinidade, como citado na seção 3.13.3.

Para as características moleculares que foram identificadas como ligantes da enzima, realizou-se uma verificação manual no perfil químico do extrato da casca do caule de *A. macrocarpon* e na análise do branco, a fim de descartar artefatos do ensaio.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Desenvolvimento de método LC-UV para detecção da reação catalítica de *Sm*MTAP

O ensaio enzimático clássico para MTAP foi proposto entre as décadas de 50-70<sup>67,68</sup>, sendo referendados nos trabalhos mais recentes com pouca ou nenhuma modificação.<sup>54,69</sup> Este ensaio é acoplado, isto é, dependente de outra reação enzimática, o que pode gerar resultados falsos positivos. O esquema do acoplamento destas reações é evidenciado na FIGURA 4.1. O ensaio clássico para a enzima MTAP mede indiretamente a formação da adenina. Neste método, a xantina oxidase (XO) converte a adenina livre de MTA, ou adenosina, em 2,8-dihidroxiadenina, resultando, assim, em um aumento na absorbância a 275 nm.<sup>48</sup> (FIGURA 4.1)

Em ensaios enzimáticos acoplados, a reação da enzima principal ocorre no mesmo meio reacional da reação indicadora. Este acoplamento exige compatibilidade nas reações do meio e os ensaios devem ser realizados sob as melhores condições da enzima. As melhores condições são adquiridas alterando individualmente o pH, concentração de cada componente e a temperatura. Sendo assim, dificilmente ótimas condições são conseguidas simultaneamente para ambas as enzimas.<sup>70</sup>

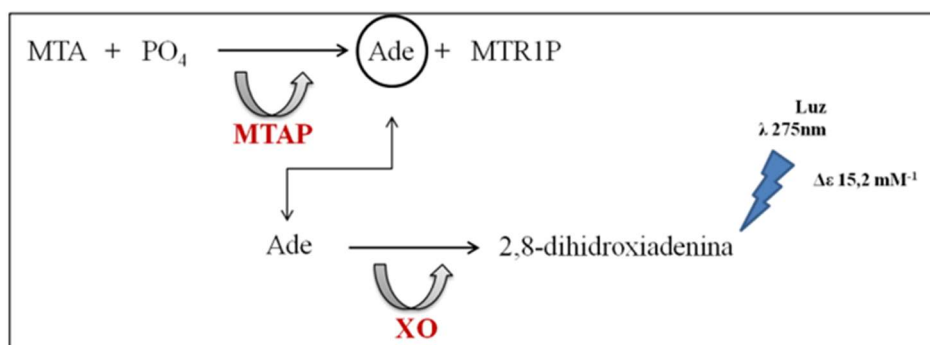


FIGURA 4.1. Esquema do acoplamento das reações para a determinação das constantes catalíticas da *SmMTAP*. O substrato da enzima MTA pode ser substituído por adenosina na primeira reação.

Dessa maneira, foi desenvolvido um método por cromatografia líquida e detecção por UV para o monitoramento da atividade catalisada pela enzima *SmMTAP*, através de medidas diretas da conversão do substrato adenosina para a formação do produto da reação a adenina. Baseado nos parâmetros  $\log P$  obtidos através do *PubChem*, para adenosina (-1,05) e adenina (-0,09) e na análise de suas estruturas químicas, que são altamente polares e ionizáveis, optou-se por desenvolver o método cromatográfico no modo HILIC de eluição.

O acrônimo HILIC foi proposto por Alpert em 1990 (do inglês, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*).<sup>71</sup> A HILIC pode ser caracterizada com o modo de eluição que utiliza uma fase estacionária (FE) polar, característica do modo normal de eluição, em combinação com uma fase móvel (FM) com alto percentual de solvente orgânico em água, característica do modo reverso de eluição.<sup>72</sup> A FIGURA 4.2 evidencia o mecanismo de separação proposto por Alpert, para colunas de FE neutra, onde as interações ocorrem quase exclusivamente por interações hidrofílicas: as moléculas de água presentes na FM adsorvem na superfície da FE polar, formando uma película. O soluto, também polar que está dissolvido na FM sofre então uma partição entre a camada de água adsorvida na FE e com a FM.<sup>72</sup>

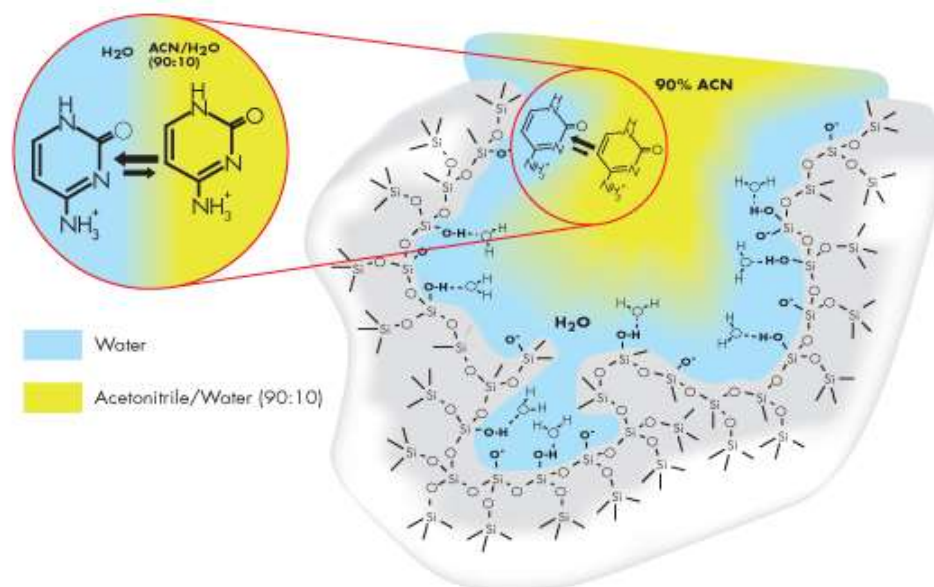


FIGURA 4.2. Mecanismo de separação no modo HILIC de eluição. Fonte: Waters, 2022.<sup>73</sup>

Para não ocorrer efeitos na retenção devido ao pH, ácidos ou bases fracas devem estar presentes na forma ionizada ou não iônica, pois a presença de formas mistas podem causar alargamento ou divisão de pico.<sup>72</sup> Com o valor de  $pK_a$  da adenina igual a 4,15 e da adenosina com valor de 3,60, procurou-se trabalhar com o pH da fase móvel em torno de 1,5 unidade abaixo do menor  $pK_a$ , utilizando-se ácido fórmico em ambas os solventes, ACN e água.<sup>72</sup> O aumento da temperatura geralmente afeta de forma positiva a eficiência cromatográfica, devido a fatores como menor viscosidade e maior difusividade do solvente pela coluna.<sup>71</sup> A temperatura mais eficiente para a separação de adenosina e adenina, sem afetar o tempo de vida útil da coluna cromatográfica, foi à 45 °C.

Para as condições de separação cromatográfica, foi selecionado o modo isocrático de eluição. A fase estacionária selecionada foi a coluna Acquity UPLC BEH Amide (100 × 2.1 mm, 1.7 μm, Waters<sup>TM</sup>), com fase móvel composta por ACN/H<sub>2</sub>O 85:15 (v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico, vazão 0,300 mL min<sup>-1</sup>, forno à 45 °C, detecção em 245 nm com tempo de corrida total de cinco minutos. O cromatograma obtido está apresentado na FIGURA 4.3.

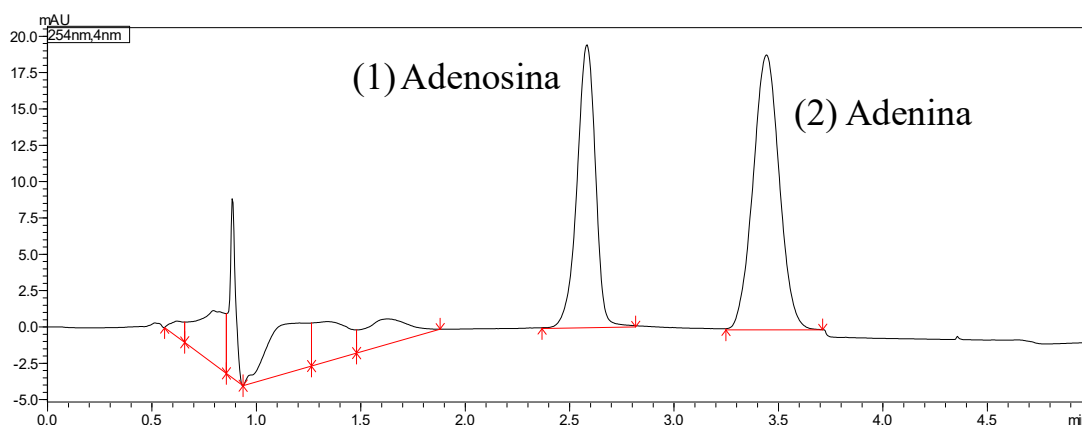


FIGURA 4.3. Cromatograma de LC-UV da mistura de adenosina e adenina  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Coluna Acquity UPLC BEH Amide ( $100 \times 2.1 \text{ mm}$ ,  $1,7 \mu\text{m}$ , Waters), modo de eluição isocrático, com fase móvel composta por ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  85:15 (v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico, vazão  $0,300 \text{ mL min}^{-1}$  e detecção a 254 nm. 1 – adenosina; 2 – adenina.

A TABELA 4.1 evidencia os parâmetros cromatográficos obtidos, como fator de retenção ( $k$ ), resolução (R), fator de separação ( $\alpha$ ) e número de pratos teóricos (NTP), obtidos pelo software *Lab Solutions* - Shimadzu, para a separação de adenosina e adenina no modo HILIC de eluição.

TABELA 4.1. Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação de adenosina e adenina no modo HILIC de eluição.

Composto	Fator de retenção ( $k$ )	Resolução (R)	Fator de Separação ( $\alpha$ )	NTP (USP)
Adenina	4,54	4,39	1,43	3454

Assim, com o desenvolvimento do método cromatográfico para a detecção e separação do substrato e produto da reação enzimática avaliou-se as condições reacionais da *SmMTAP*.

## 4.2. Desenvolvimento das condições reacionais da enzima *SmMTAP* e teste com diferentes tipos de tampões

A atividade da enzima foi testada em solução com diferentes tampões, através do método cromatográfico desenvolvido, descrito no tópico 4.1. Para as reações de atividade catalítica a *SmMTAP* foi dialisada por 8 h contra tampão fosfato de potássio para que fosse retirado todo cloreto de sódio e  $\beta$ -mercaptoetanol presentes na amostra.

Para o ensaio de atividade enzimática realizado em tampão fosfato pH 7,4, como descrito na seção 3.4, a enzima fosfato-dependente consegue converter quase 100% do substrato adenosina ( $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em adenina (FIGURA 4.4).

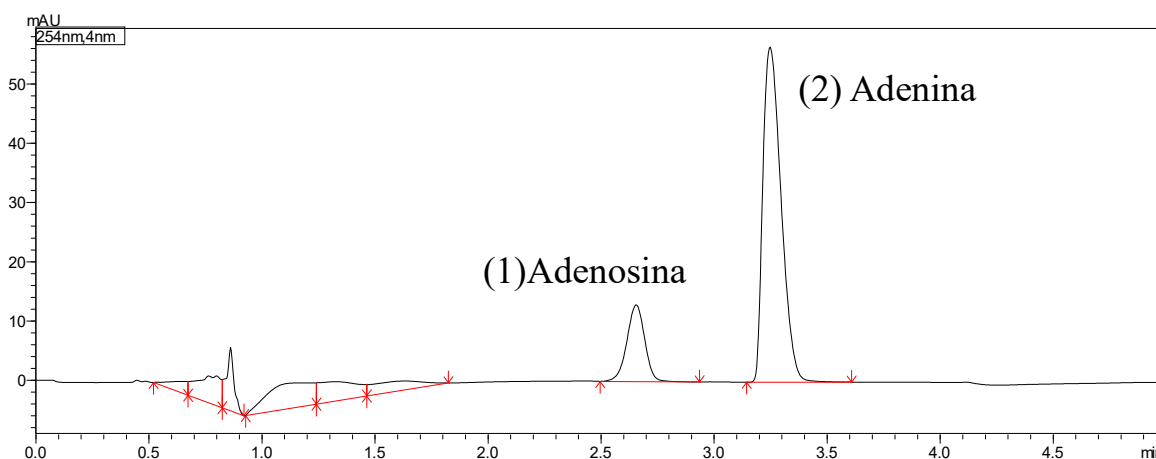


FIGURA 4.4. Cromatograma de LC-UV da reação enzimática catalisada pela *SmMTAP* na conversão direta de adenosina  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  em adenina. Coluna Acquity UPLC BEH Amide ( $100 \times 2.1 \text{ mm}$ ,  $1,7 \mu\text{m}$ , Waters), modo de eluição isocrático, com fase móvel composta por ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  85:15 (v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico, vazão  $0,300 \text{ mL min}^{-1}$  e detecção a 254 nm. 1 – adenosina; 2 – adenina

Em *S. mansoni*, a MTAP pode converter adenosina em adenina, mesmo na ausência de fosfato. Este fato é considerado uma evolução natural da enzima que, dessa maneira, proporciona uma melhor adaptação ao parasita.<sup>48</sup>

Para avaliação da atividade da enzima livre em outros tampões que não fossem o fosfato, foi utilizado os tampões voláteis acetato de amônio no intervalo de pH de 4,2 a 9,2 e bicarbonato de amônio nos intervalos de 6,8 a 7,6, ambos na faixa tamponante do  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ . Tais tampões foram escolhidos visando a compatibilidade do meio reacional com o espectrômetro de massas. As reações foram realizadas como descrito na seção 3.6, em triplicata, e analisadas pelo método LC-UV. A conversão do substrato em produto ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), com seus respectivos desvios, estão mostrados na FIGURA 4.5, em que é possível observar que a enzima apresentou atividade em toda a faixa de pH estudada, com maior atividade em torno de pH 7,6.

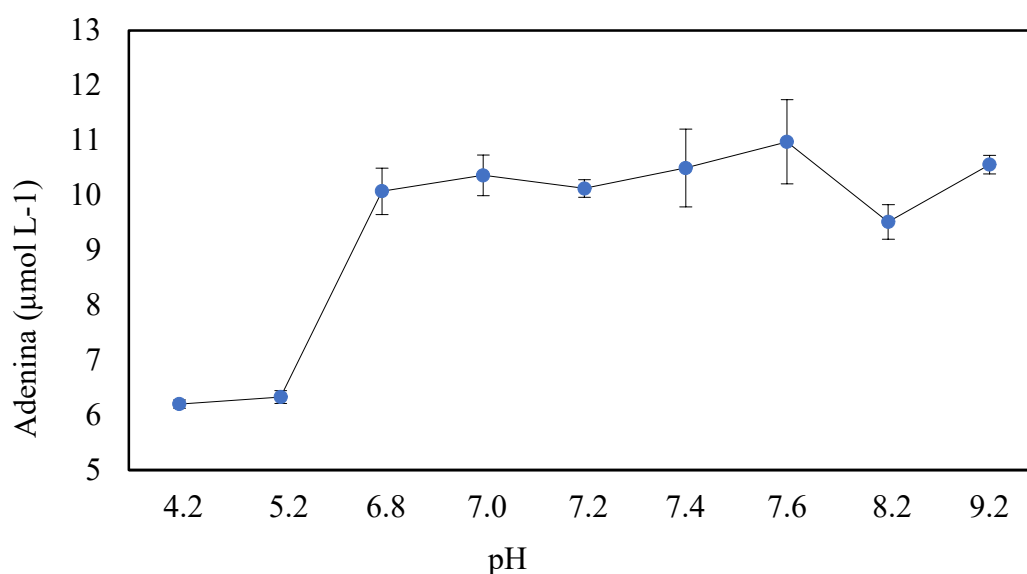


FIGURA 4.5 Curva de pH ótimo para enzima *SmMTAP* utilizando os tampões voláteis acetato e bicarbonato de amônio, analisado por LC-UV.

Apesar de uma diminuição na eficiência enzimática, a *SmMTAP* consegue perfeitamente catalisar seu substrato e apresentar atividade catalítica frente à tampões que não fossem o fosfato.

### 4.3. Qualificação do método de LC-UV para *SmMTAP*

O estudo de linearidade do método foi realizado através da construção de curvas analíticas com adição de padrão externo conforme descrito na seção 3.7, e a curva analítica construída através de regressão linear, a partir da área do pico de adenina em função de sua concentração.

Foram avaliados a seletividade, linearidade, precisão e exatidão intra e inter-lotes. A seletividade foi avaliada através da injeção da matriz isenta do padrão, onde não foi observado a presença de nenhum pico no mesmo tempo de retenção.

As curvas analíticas foram lineares no intervalo estudado, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0,99 para uma amostragem igual a 3, com equação obtida  $y = 8416x - 31870$ .

A precisão do método foi expressa como o coeficiente de variação (CV%) e foram aceitos valores menores ou iguais a 20%. A exatidão foi determinada pelo cálculo de volta e expressa em porcentagem, como a razão do valor médio encontrado e o valor de referência das concentrações preparadas. Para exatidão, foram aceitos valores menores ou iguais a 20% do valor nominal da concentração.

A precisão e exatidão intra e inter-lotes foram mensuradas analisando-se três replicatas dos três níveis de CQs. Os resultados foram valores de precisão entre 0,13 e 2,45%. A exatidão variou entre 95 e 109%, estando dentro dos critérios para validação de método adotado.

A média dos valores encontrados para cada concentração é o valor aceito e o desvio padrão da média é calculado para cada uma separadamente. Portanto, os erros aleatórios não são representativos para a curva de calibração como um todo, pois se trata de incertezas pontuais.

Diante disso, a homoscedasticidade<sup>74,75</sup> dos dados foi avaliada pela análise das variâncias (ANOVA) e os valores se encontram dispostos na TABELA 4.2. Os testes foram realizados para analisar a qualidade do modelo para qualificação do método desenvolvido.

TABELA 4.2. Dados de análise de variância (ANOVA) para a validação do método desenvolvido. Valores obtidos através da rotina computacional regression2 no software Octave (versão 4.2.1).<sup>75</sup>

	Somas quadráticas	Grau de liberdade	Médias Quadráticas	F Calculado (95%)	F Tabelado (95%)	R <sup>2</sup>
Regressão (R)	$8,04 \times 10^{13}$	1,0	$8,04 \times 10^{13}$	24764,00	4,31	0,9999
Resíduo (r)	$7,15 \times 10^{10}$	22,0	$3,25 \times 10^9$			
Erro puro (EP)	$3,80 \times 10^{10}$	16,0	$2,38 \times 10^9$	2,75	2,35	
Falta de ajuste (Faj)	$3,35 \times 10^{10}$	6,0	$5,58 \times 10^9$			
Total (R + r)	$8,05 \times 10^{13}$	23,0	$3,50 \times 10^{12}$			

Os resultados apresentados evidenciam que a MQFaj (média quadrática da falta de ajuste) e MQEP (média quadrática do erro puro) foram estatisticamente iguais com um F2 calculado < F2 tabelado, demonstrando que o modelo não apresentou falta de ajuste, com a razão  $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$  menor que 1, como exemplificado na FIGURA 4.6, pelas barras vermelhas. Além disso, as

MQR (média quadrática da regressão) e MQr (média quadrática do resíduo) se mostraram estatisticamente diferentes, ou seja, o modelo foi significativo com o  $F_1$  calculado  $>$   $F_1$  tabelado, com disposto na FIGURA 4.6, pelas barras azuis, com a razão  $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$  muito superior a 1.

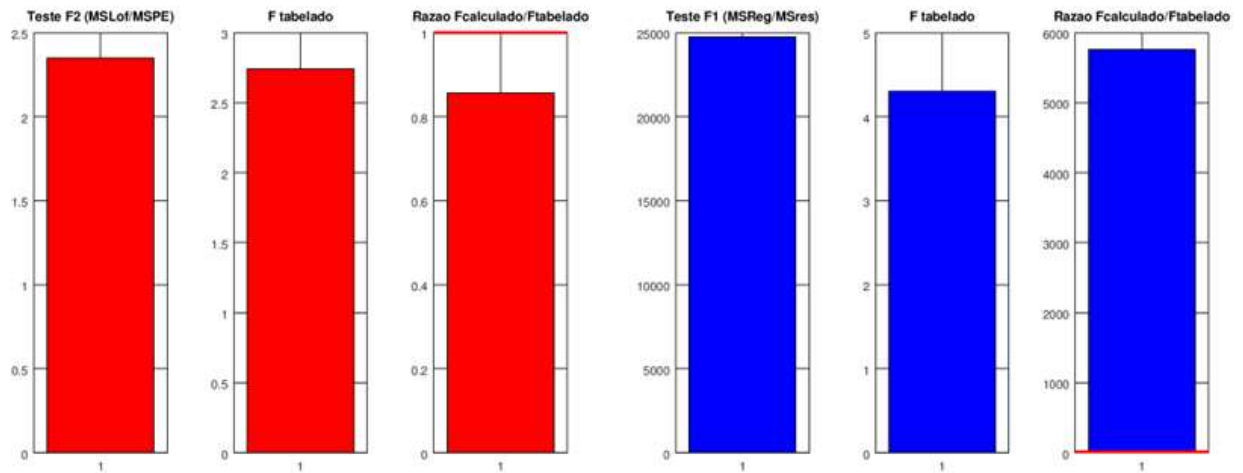


FIGURA 4.6. Gráficos com o teste F obtidos através da rotina computacional *regression2* no software Octave (versão 4.2.1).<sup>75</sup>

O valor de  $R^2$  foi igual a 0,999 (razão entre as SQR e SQT), apresentado na FIGURA 4.7, indicando um ajuste adequado do modelo às respostas observadas, uma vez que quanto mais próximo de 1 estiver o  $R^2$  melhor é o ajuste ao modelo matemático proposto. Em todos os cálculos o nível de confiança utilizado foi de 95%.

Como o modelo foi extremamente significativo e não apresentou falta de ajuste, utilizando a MQR e o valor de  $t$  correspondente (2,079) foi gerado o gráfico apresentado na FIGURA 4.7, que evidencia o valor experimental versus o valor previsto pelo modelo. Analisando o gráfico, é possível observar uma boa concordância entre esses valores.

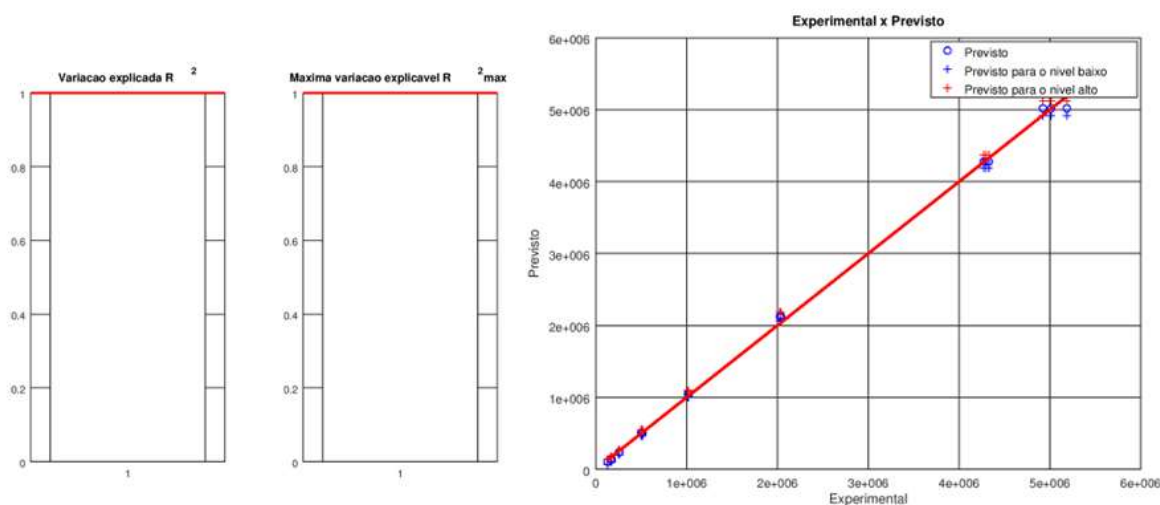


FIGURA 4.7. Variação explicada ( $R^2$ ) e explicável ( $R^2_{max}$ ) e valor experimental *versus* o valor previsto no modelo. Gráficos obtidos através da rotina computacional regression2 no software Octave (versão 4.2.1).<sup>75</sup>

#### 4.4. Caracterização cinética de *SmMTAP* em solução

Após a qualificação do método, os parâmetros cinéticos da *SmMTAP* em solução foram determinados na presença e ausência de fosfato, seu substrato natural.<sup>48</sup>

A caracterização cinética da enzima é importante para que seja possível compreender o seu comportamento frente a presença e ausência de fosfato, bem como a afinidade pelo substrato adenosina nos diferentes tampões. Além disso, particularmente neste trabalho, para o conhecimento da enzima livre e posteriormente avaliar a atividade da enzima imobilizada.

A constante de Michaelis-Menten,  $K_M$ , é definida como a concentração de substrato na qual se obtém uma velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima de catálise. Essa constante foi determinada para o substrato adenosina variando sua concentração separadamente, nos tampões fosfato e

bicarbonato, até que se atingisse o patamar de saturação, onde o aumento da concentração de adenosina não alterasse a taxa de formação do produto, a adenina.

Nesse intuito, a concentração de adenosina para a determinação do  $K_M$  no tampão fosfato de potássio variou entre 8 e 600  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , enquanto para a determinação do  $K_M$  em tampão bicarbonato de amônio a concentração de adenosina variou entre 0,5 e 10000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

As reações foram feitas e injetadas em triplicata de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas anteriormente, descritas nas seções 3.4 e 3.5. O método de regressão não-linear de melhor ajuste foi aplicado aos dados coletados no estudo cinético, gerando as curvas de Michaelis-Menten em função da concentração do substrato adenosina, sendo assim determinados os valores de  $K_M$  como ilustrados, nas FIGURAS 4.8 e 4.9.

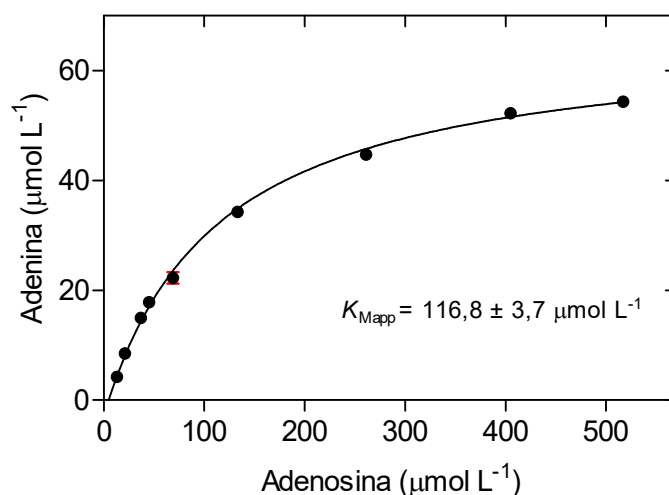


FIGURA 4.8. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de adenina pela enzima *SmMTAP* em solução tampão fosfato, nas condições do ensaio padrão, variando-se a concentração de adenosina.

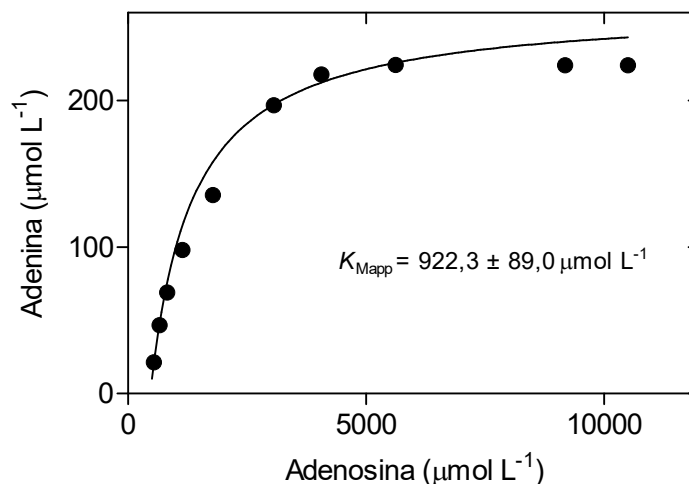


FIGURA 4.9. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de adenina pela enzima *Sm*MTAP em solução tampão bicarbonato, nas condições do ensaio padrão, variando-se a concentração de adenosina.

As curvas obtidas estão de acordo com a equação de Michaelis-Menten onde, em baixas concentrações de substrato ( $[S] \ll K_M$ ) a velocidade da reação  $V_0$  é diretamente proporcional à concentração do substrato. No entanto, em elevadas concentrações do substrato ( $[S] \gg K_M$ )  $V_0$  se aproxima do seu valor máximo e a velocidade da reação independe da concentração do substrato. A enzima MTAP se mostrou Michaeliana para o substrato adenosina em ambos os tampões testados com um valor de  $K_{Mapp}$  de  $116,8 \pm 3,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato e  $922,3 \pm 89,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão de bicarbonato. Esses valores evidenciam uma maior afinidade pelo substrato adenosina na presença do tampão fosfato, revelado pelo valor de  $K_M$  mais baixo.

#### 4.5. Imobilização de *Sm*MTAP em partículas magnéticas

Dentre os vários métodos de imobilização existentes, o procedimento de imobilização a partir da ligação covalente entre os resíduos de amina da

partícula magnética com o grupo carbonila do glutaraldeído para a formação de grupos imina para, em seguida, a ligação da enzima suceder-se da mesma maneira, via resíduos de aminoácidos básicos, é um protocolo bem estabelecido pelo nosso grupo de pesquisa, Separare – Núcleo de Pesquisa em Cromatografia.<sup>38,66,76–80</sup> (FIGURA 4.10).

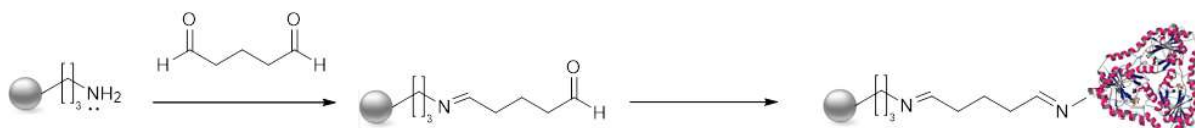


FIGURA 4.10. Esquematização do processo de imobilização da enzima *SmMTAP* em partículas magnéticas amino-terminadas.

No entanto, MTAP-MB produzido através do protocolo padrão em uso no Separare não apresentou atividade catalítica frente ao substrato adenosina.

À vista disso, algumas modificações foram realizadas no protocolo e o procedimento foi avaliado com duas diferentes concentrações de glutaraldeído (2,5 e 5%) e no tempo de reação da enzima com a partícula magnética (4 e 8 h). (seção 3.9). A concentração de glutaraldeído é um parâmetro muito importante, visto que depende da estrutura da enzima, pois se esta possuir muitos resíduos de aminoácidos básicos, pode se ligar de maneira muito rígida a partícula e, assim, perder sua estrutura ativa.<sup>81,82</sup> As atividades catalíticas dos diferentes biorreatores de MTAP-MB produzidos foram testadas frente ao substrato adenosina, conforme descrito na seção 3.10.

Os ensaios de atividade catalítica dos biorreatores foram realizados no primeiro dia de imobilização (0 h), após 24 h, 48 h, 72 h e 8 dias. Os valores foram obtidos através de atividade relativa, onde o maior valor de área observado foi considerado 100% da reação. Os resultados das atividades obtidas nos ensaios estão apresentados na FIGURA 4.11.

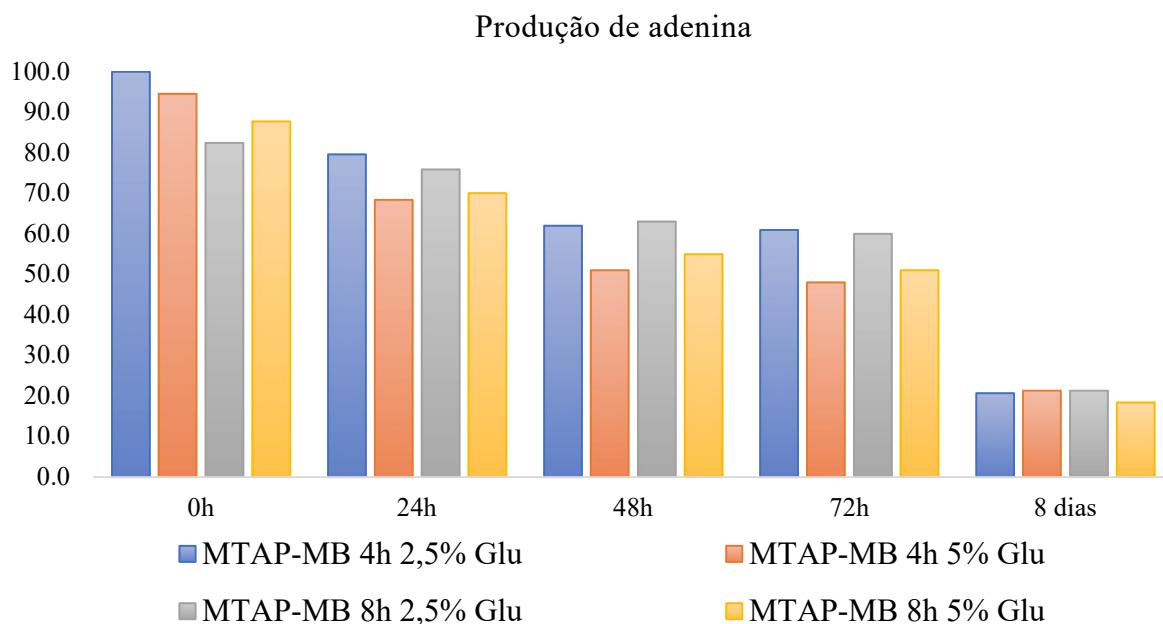


FIGURA 4.11. Gráfico da atividade enzimática após processo de imobilização da enzima SmMTAP para a produção de MTAP-MB, do primeiro dia (0 h) até 8 dias, variando o tempo de imobilização (4 e 8 h) e % de glutaraldeído (2,5 e 5%).

A partir dos ajustes no protocolo, a condição mais efetiva de imobilização para a produção do MTAP-MB foi encontrada. Desta forma, foi possível imobilizar a *SmMTAP* em partículas magnéticas por resíduos de aminoácidos básicos, utilizando o glutaraldeído como espaçador para a formação de iminas.

A enzima imobilizada armazenada na sua forma ativa em tampão fosfato  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,4, apresentou um decréscimo em atividade catalítica, como observado na FIGURA 4.11. Com isso, todos os biorreatores produzidos após estes ensaios foram armazenados em tampão TRIS-HCl.

O protocolo de imobilização da *SmMTAP* em partículas magnéticas foi então estabelecido com 2,5% de glutaraldeído e 4 horas reação .

Para avaliar a influência do tipo de partícula magnética, variou-se o fabricante das partículas magnéticas: Bioclone (MTAP-MB bioclone) e Sigma Aldrich (MTAP-MB sigma). As atividades catalíticas das MTAP-MB, foram monitoradas acompanhado a conversão do substrato adenosina, conforme descrito na seção 3.10.

Os ensaios de atividade foram realizados no primeiro dia de imobilização (0 h), após 24 h, 48 h, 72 h e 8 dias. Os resultados da produção de adenina obtidas nos ensaios estão apresentados na FIGURA 4.12, abaixo.

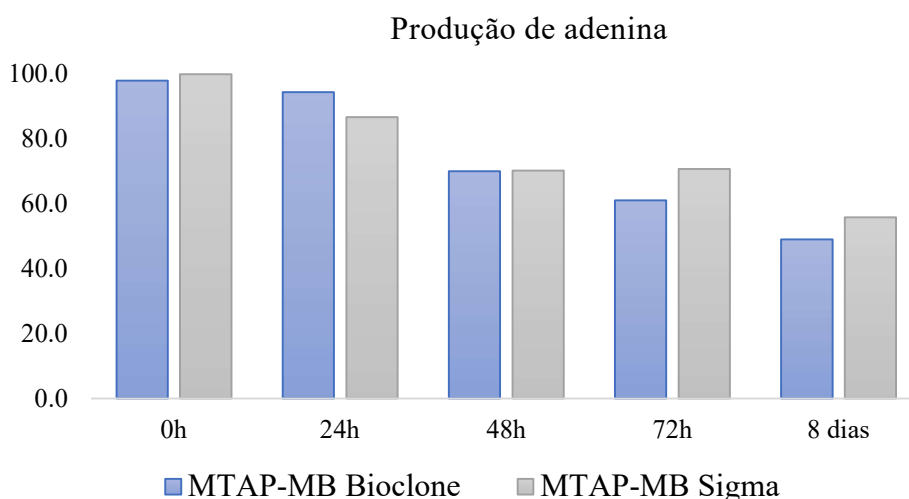


FIGURA 4.12. Gráfico da atividade enzimática após processo de imobilização da enzima SmMTAP do primeiro dia (0 h) até 8 dias, variando o fabricante de partículas magnéticas (Bioclone e Sigma), com 2,5% de glutaraldeído e 4 horas de imobilização.

Através da análise do gráfico da FIGURA 4.12, é possível observar uma pequena melhor estabilidade para MTAP-MB sigma e sabendo-se da maior adsorvidade das partículas da bioclone<sup>38</sup> em ensaios de *ligand fishing*, o procedimento adotado foi o esquematizado na FIGURA 4.13 com as partículas magnéticas da Sigma Aldrich.

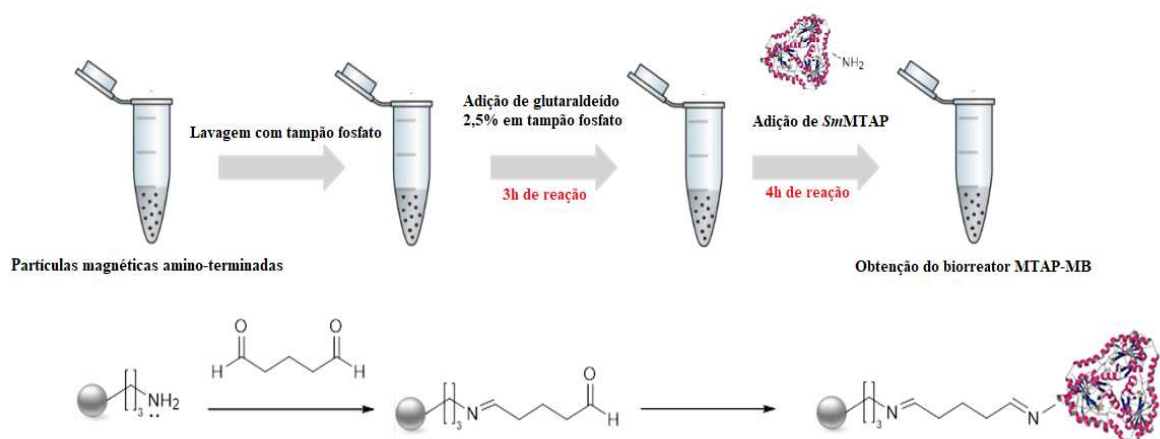


FIGURA 4.13. Esquemática do processo de imobilização da enzima *SmMTAP* em partículas magnéticas amino-terminadas.

#### 4.6. Estudo cinético do biorreator MTAP-MB

O conhecimento do comportamento cinético da enzima imobilizada é uma ferramenta muito útil para avaliar possíveis modificações estruturais, visto que o processo de imobilização através de ligação covalente entre a enzima e o suporte pode resultar na distorção na estrutura terciária alterando a afinidade da ligação enzima/substrato, ou em modificações na estrutura terciária da enzima.<sup>81,83</sup> Além disso, o estudo cinético auxilia na avaliação da eficiência catalítica do biorreator, bem como a afinidade da enzima pelo seu substrato.<sup>84,85</sup> Comparando-se os valores obtidos com a enzima livre em solução pode-se analisar como o método de imobilização afetou as propriedades da enzima.

A constante de Michaelis-Menten foi determinada para o substrato adenosina em tampão fosfato, visto que em tampão bicarbonato não foi observada atividade catalítica do biorreator. Nesse intuito, a concentração de adenosina para determinação do  $K_{Mapp}$  em tampão fosfato 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,4 variou entre 8 e

400  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , monitorando a atividade enzimática do biorreator conforme o método de LC-UV desenvolvido.

O método de regressão não-linear de melhor ajuste foi aplicado aos dados coletados no estudo cinético, gerando a curva de Michaelis-Menten em função da concentração do substrato adenosina como ilustrado a seguir, na FIGURA 4.14.

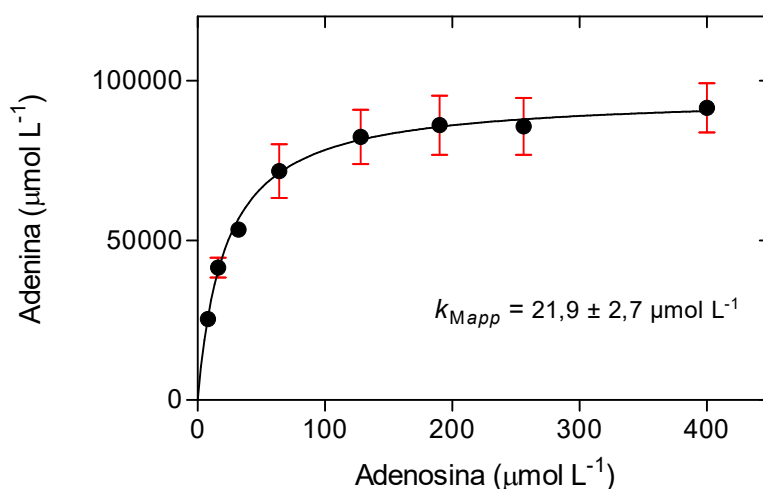


FIGURA 4.14. Hipérbole de Michaelis-Menten para a produção de adenina pelo biorreator MTAP-MB, nas condições do ensaio padrão, variando-se a concentração de adenosina.

Como evidenciado, a curva obtida está de acordo com a equação de Michaelis-Menten onde, em baixas concentrações de substrato ( $[S] \ll K_M$ ) a velocidade da reação  $V_0$  é diretamente proporcional à concentração do substrato. No entanto, em elevadas concentrações do substrato ( $[S] \gg K_M$ )  $V_0$  se aproxima do seu valor máximo e a velocidade da reação independe da concentração do substrato.

O MTAP-MB se mostrou Michaeliano para o substrato adenosina com um valor de  $K_{Mapp}$  de  $21,9 \pm 2,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ , assim como a enzima livre em solução. No entanto, MTAP-MB apresentou um menor valor de  $K_{Mapp}$  quando

comparado à enzima livre ( $116 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), evidenciando uma maior afinidade pelo seu substrato quando imobilizada.

Uma possível explicação para o menor valor de  $K_{Mapp}$  obtido para a enzima imobilizada, baseia-se no aumento da partição do substrato entre o meio reacional e o sítio ativo, devido a rigidez que o processo de imobilização causa na estrutura da enzima.<sup>85</sup>

#### 4.7. Triagem de inibidores para MTAP-MB

A *Sm*MTAP só possui um inibidor indicado na literatura a 5-DCIFormicina (FIGURA 4.15), sendo que o mesmo não está disponível comercialmente<sup>86</sup>.

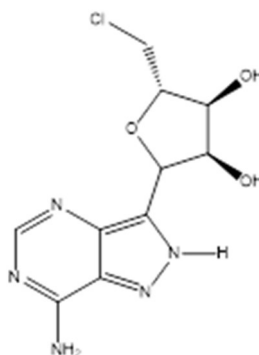
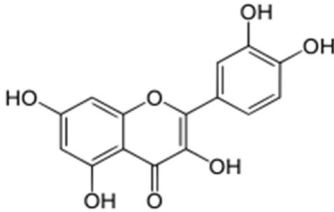
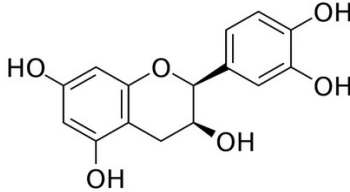
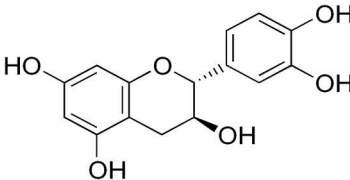
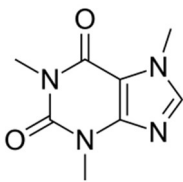
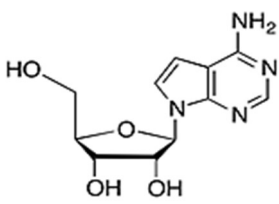
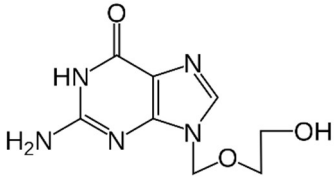


FIGURA 4.15. Estrutura do inibidor reportado na literatura para MTAP, a 5-DCIFormicina.

Para estudos de triagem com MTAP-MB, avaliou-se a atividade inibitória de uma série com seis compostos, onde duas dessas moléculas são reportadas na literatura como sendo inibidores da classe das adenosinas fosforilases, a tubercidina e a cafeína<sup>48</sup>. Além disso, foram avaliadas frente ao potencial de inibição as moléculas de quercetina, catequina, epicatequina e aciclovir. As estruturas dos compostos testados são apresentadas na TABELA 4.3.

TABELA 4.3. Estruturas moleculares dos compostos para triagem em ensaio de inibição.

Composto	Estrutura
1 Quercetina	 The structure shows a flavonol core with hydroxyl groups at positions 3, 5, 7, and 3', 4', and 5'.
2 Epicatequina	 The structure shows a flavan-3-ol core with hydroxyl groups at positions 2, 3, and 5, and a catechol B-ring.
3 Catequina	 The structure shows a flavan-3-ol core with hydroxyl groups at positions 2, 3, and 7, and a catechol B-ring.
4 Cafeína	 The structure shows a purine ring system with methyl groups at positions 1, 3, and 7, and a carbonyl group at position 6.
5 Tubercidina	 The structure shows a pyrimidopyrimidine core with a hydroxymethyl group at position 5 and hydroxyl groups at positions 2 and 3.
6 Aciclovir	 The structure shows a guanine core with an acyclopropyl group at position 9 and amino groups at positions 2 and 6.

Os ensaios foram realizados nas condições descritas na (seção 3.12). As concentrações de 20 e 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foram baseados no  $K_{Mapp}$  da MTAP-MB, sendo 1 e 1,5 vezes a concentração desses compostos em relação ao  $K_{Mapp}$  do biorreator. Portanto, todas as triagens foram realizadas com 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  do substrato adenosina.

O efeito da co-eluição dessas moléculas foi avaliado no método desenvolvido para a detecção da atividade catalítica da enzima (seção 3.10). Para isso, o inibidor foi solubilizado na presença de adenosina e adenina e injetado separadamente. Nenhum composto dentre os seis apresentou o mesmo tempo de retenção no cromatograma do substrato e do produto da reação enzimática. Portanto, a reação de atividade catalítica da enzima frente a estes compostos e posterior análise cromatográfica, seguiram como citado na seção 3.10 e 3.5.

O percentual de inibição foi obtido comparando-se a atividade do MTAP-MB na presença da molécula em triagem com a sua atividade inicial. A FIGURA 4.16 apresenta o cromatograma obtido no ensaio de atividade inicial do MTAP-MB enquanto os cromatogramas das FIGURAS 4.17 e 4.18 demonstram o efeito de inibição causado pela presença de quercetina nas concentrações de 1,5 e  $1,0 \times$  o  $K_{Mapp}$ , respectivamente.

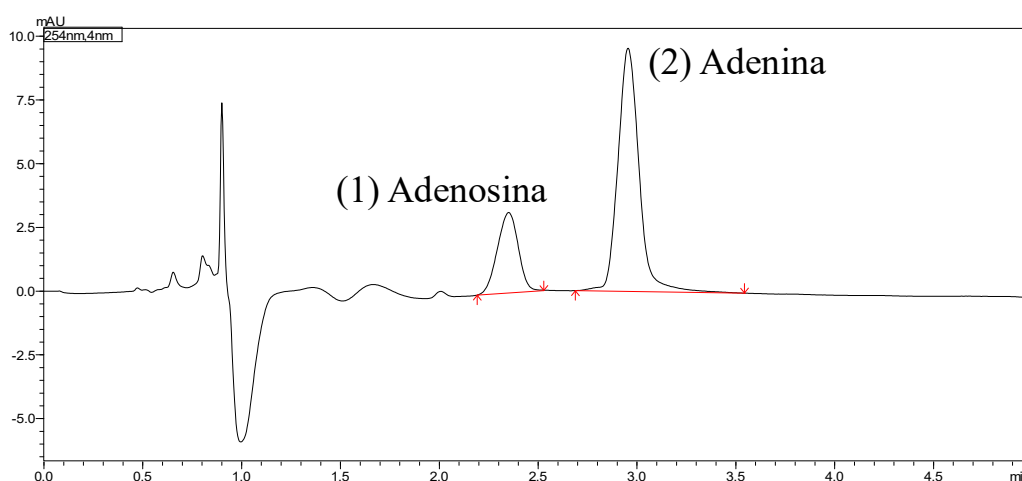


FIGURA 4.16. Cromatograma de LC-UV do ensaio de atividade de MTAP-MB, com tampão fosfato para conversão de adenosina (1) em adenina (2). Coluna Acquity UPLC BEH Amide (100  $\times$  2.1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters), modo de eluição

isocrático, com fase móvel composta por ACN/H<sub>2</sub>O 85:15 (v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico, vazão 0,300 mL min<sup>-1</sup>, forno a 45 °C, detecção em 245 nm e tempo de corrida de 5 min.

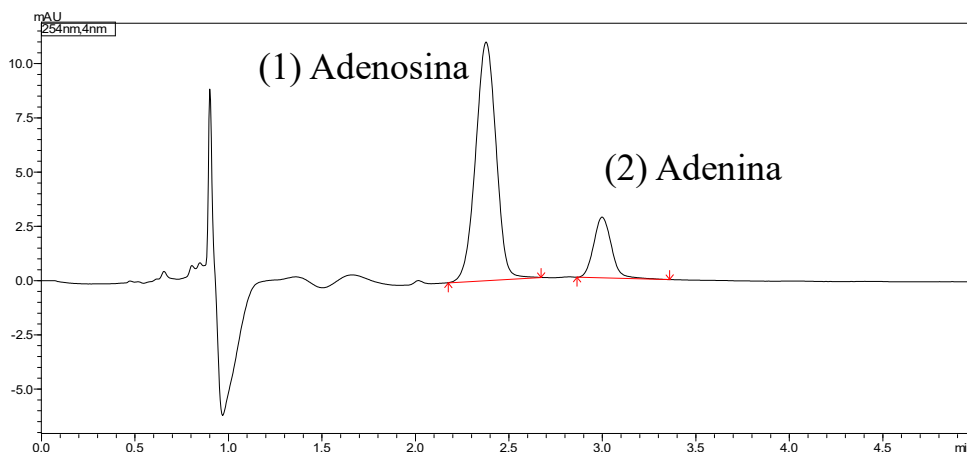


FIGURA 4.17. Cromatograma de LC-UV do ensaio de atividade de MTAP-MB para conversão de adenosina em adenina, na presença da quercetina 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (1,5 x o  $K_{Mapp}$ ). Coluna Acquity UPLC BEH Amide (100  $\times$  2.1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters), modo de eluição isocrático, com fase móvel composta por ACN/H<sub>2</sub>O 85:15, (v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico, vazão 0,300 mL min<sup>-1</sup>, forno a 45 °C, detecção em 245 nm e tempo de corrida de 5 min.

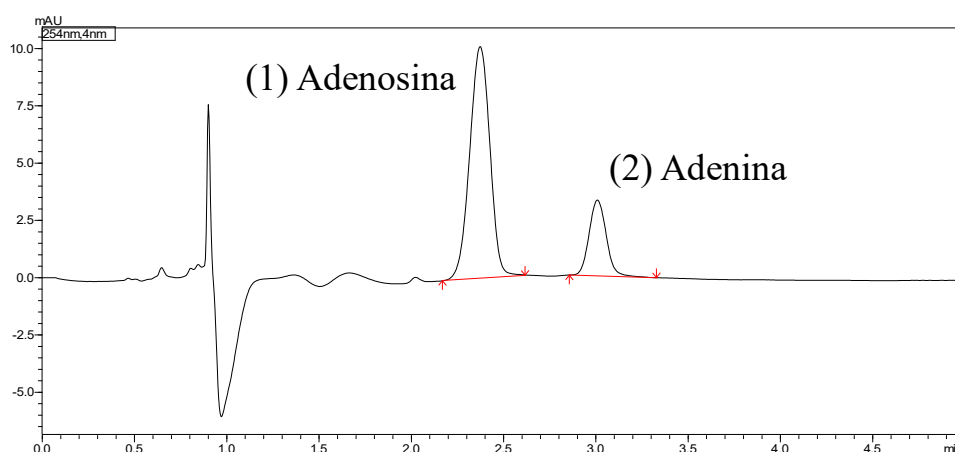


FIGURA 4.18. Cromatograma de LC-UV do ensaio de atividade de MTAP-MB na presença da quercetina 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (1,0 x o  $K_{Mapp}$ ). Coluna Acquity UPLC BEH Amide (100  $\times$  2.1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters), modo de eluição isocrático, com fase móvel composta por ACN/H<sub>2</sub>O 85:15, contendo 0,1% de ácido fórmico,

vazão  $0,300 \text{ mL min}^{-1}$ , forno a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , detecção em  $245 \text{ nm}$  e tempo de corrida de  $5 \text{ min}$ .

Apesar de serem baixos, todos os compostos testados apresentaram inibição, onde os valores obtidos estão dispostos nas FIGURAS 4.19 e 4.20, para as concentrações dos inibidores a  $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

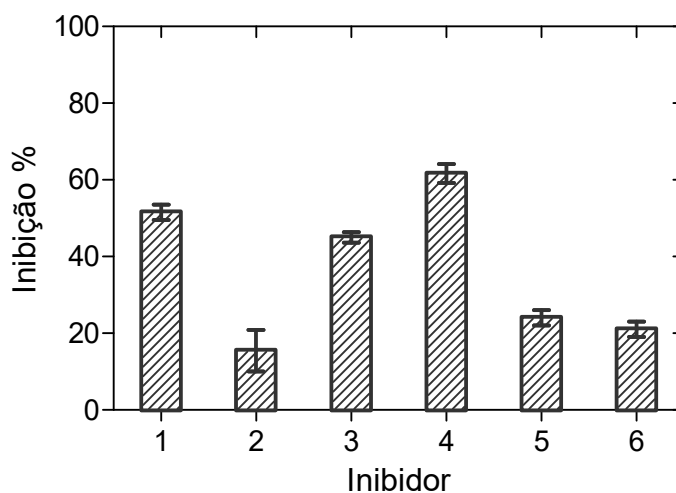


FIGURA 4.19. Valores de inibição ( $n = 2$ ) das moléculas triadas com  $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  e o substrato adenosina a  $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , sendo (1) quercetina; (2) epicatequina; (3) catequina; (4) cafeína; (5) tubercidina; (6) aciclovir

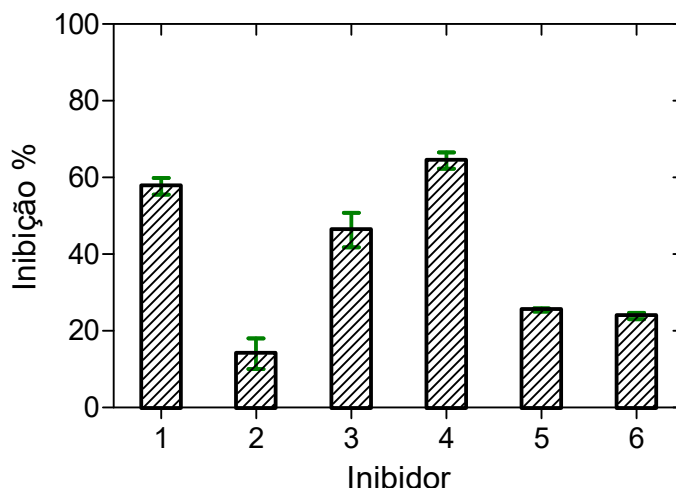


FIGURA 4.20. Valores de inibição ( $n = 2$ ) das moléculas triadas com  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  e o substrato adenosina a  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ , sendo (1) quercetina; (2) epicatequina; (3) catequina; (4) cafeína; (5) tubercidina; (6) aciclovir

A despeito do baixo percentual de inibição obtido para a série de moléculas triadas, o ensaio demonstrou que o MTAP-MB pode ser usado em triagem de inibidores baseado na atividade da enzima imobilizada.

#### 4.8. Ensaio de *ligand fishing* com MTAP-MB para o extrato de *Topsentia ophiraphidites* (FN 031)

O extrato da esponja marinha *T. ophiraphidites* que foi coletado em pontos distintos de Fernando de Noronha foi selecionado como coleção natural para triagem de ligantes em mistura para a *SmMTAP*. A seleção foi feita baseada nos resultados do projeto de tese da Dra. Larissa R. G. da Silva da Universidade Federal Fluminense desenvolvido no Núcleo de Pesquisa em Cromatografia – SEPARARE.<sup>87</sup>

Os produtos naturais marinhos apresentam alta relevância para a comunidade científica, visto o elevado potencial químico-biológico da

biodiversidade marinha ainda pouco explorada. É estimado que apenas 10% dos organismos aquáticos foram descritos, sendo que, ao serem comparados com as plantas terrestres, que são tradicionalmente estudadas e utilizadas há muitos anos, os produtos naturais marinhos se destacam pela ampla variedade química-biológica e pela novidade estrutural.<sup>88,89</sup>

Pertencente à família de esponjas Halichondriidae Gray, na classe Demospongiae, ordem Suberitida. O gênero *Topsentia* compreende, atualmente, 36 espécies válidas, sendo que a única espécie taxonomicamente caracterizada na costa brasileira é a *Topsentia ophiraphidites*. O gênero *Topsentia* foi estudado quanto ao seu perfil químico, sendo reconhecido por biossintetizar metabólitos de diferentes classes, como alcaloides, oxilipinas, bases nitrogenadas, terpenos e esteróis.<sup>87</sup>

O processo de desreplicação por LC-HRMS usando redes moleculares na plataforma GNPS desenvolvido Dra. Larissa Ramos da Silva permitiu a inferência de diversos metabólitos (cerca de 150 moléculas), pertencentes às classes de dipeptídeos lineares, dicetopiperazinas, aminoácidos halogenados ou não, nucleosídeos, policetídeos e glicerofosfolipídeos, fenólicos, alcaloides, amônios quaternários e acilcarnitinas. Dentre o perfil químico da esponja marinha, a classe de substâncias conhecidas como nucleosídeos são relevantes por apresentarem diversas funções biológicas. Ademais, a atividade catalítica da enzima MTAP é catalisar a fosforilação reversível do nucleosídeo adenosina.<sup>87</sup> A fim de investigar a afinidade dos diversos metabólitos presentes, foi selecionada uma das oito amostras de *T. ophiraphidites*, o extrato sob o código FN 031, para ser aplicado na triagem de ligantes com o biorreator MTAP-MB.

O protocolo do ensaio *ligand fishing* está ilustrado na FIGURA 4.21. O ensaio foi aplicado a MTAP-MB ativo e ao MTAP-MB controle.

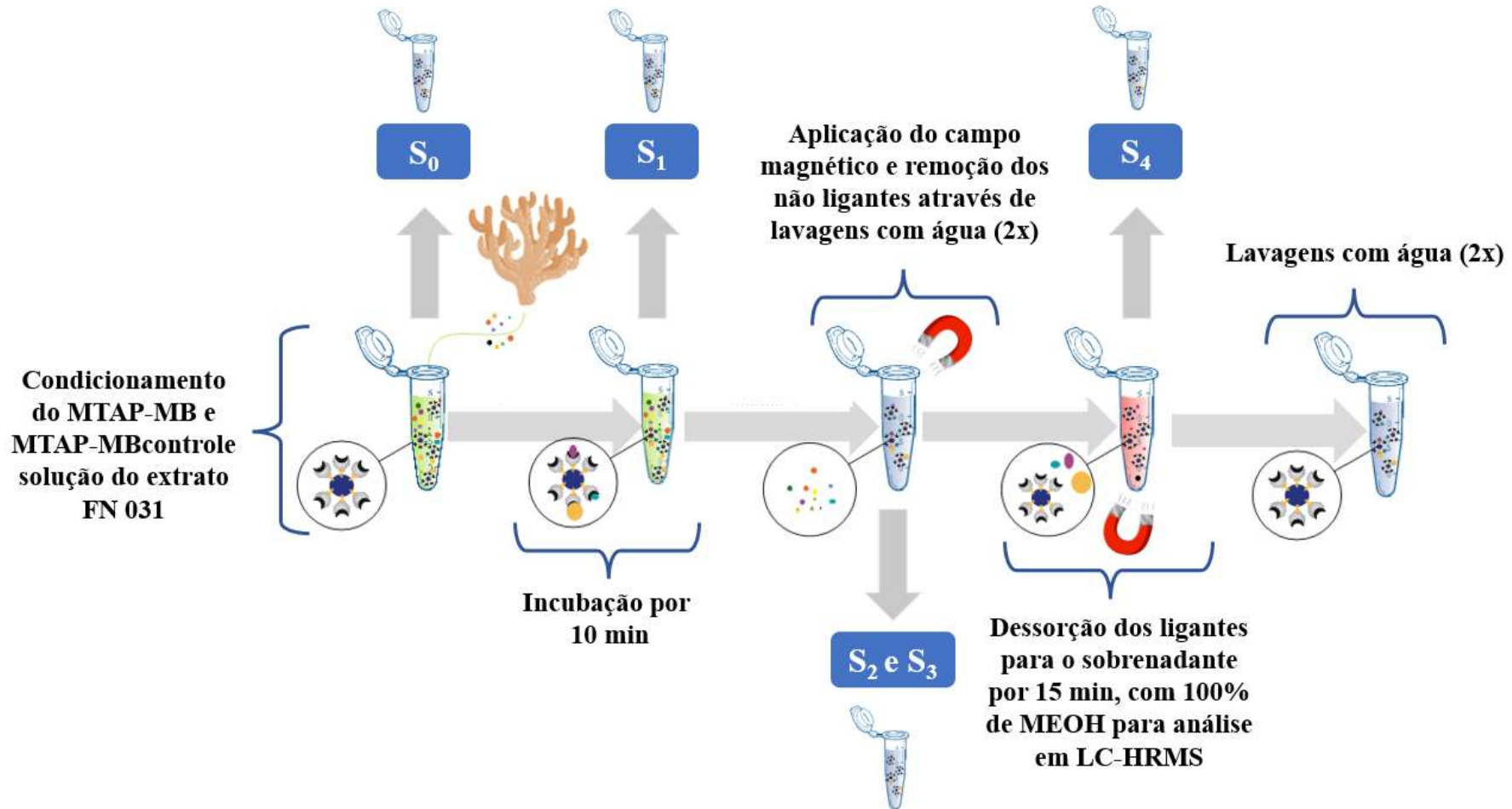


FIGURA 4.21. Fluxograma do ensaio de *ligand fishing* com MTAP-MB e extrato de *Topsentia ophiraphidites* (FN 031).

Os sobrenadantes da etapa S<sub>4</sub> (dessorção dos ligantes) foram analisados por LC-HRMS, com ACN contendo 0,1% de ácido fórmico como modificador orgânico, em eluição gradiente de 2-100% e o HRMS em modo positivo *full scan*, conforme descrito na seção 3.13.2.

Os cromatogramas de pico base do perfil cromatográfico de *T. ophiraphidites* e da etapa S<sub>4</sub> do ensaio *ligand fishing* estão apresentados nas FIGURAS 4.22 e 4.23, respectivamente.

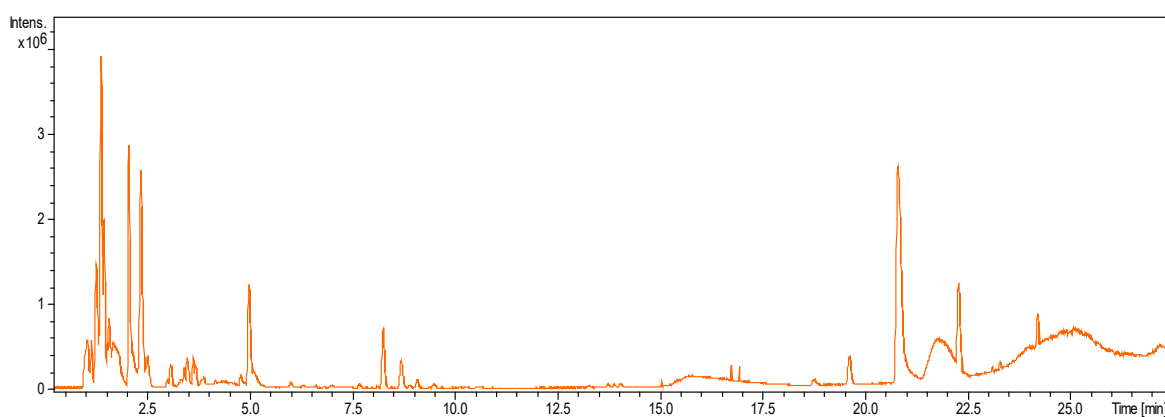


FIGURA 4.22. Cromatograma de pico base obtido por análise de LC-HRMS para o extrato de *Topsentia ophiraphidites* (FN 031). Coluna Acquity HSS T3 (100 × 2,1 mm, 1,8 μm), fase móvel (A) solução de 0,1% de ácido fórmico em água e (B) de 0,1% de ácido fórmico em ACN, em eluição gradiente de 2 a 100% de B em 25 min, seguido de etapa isocrática 100% de B de 25 a 27,5 min e acondicionamento na condição inicial por 7 min, vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 30 °C.

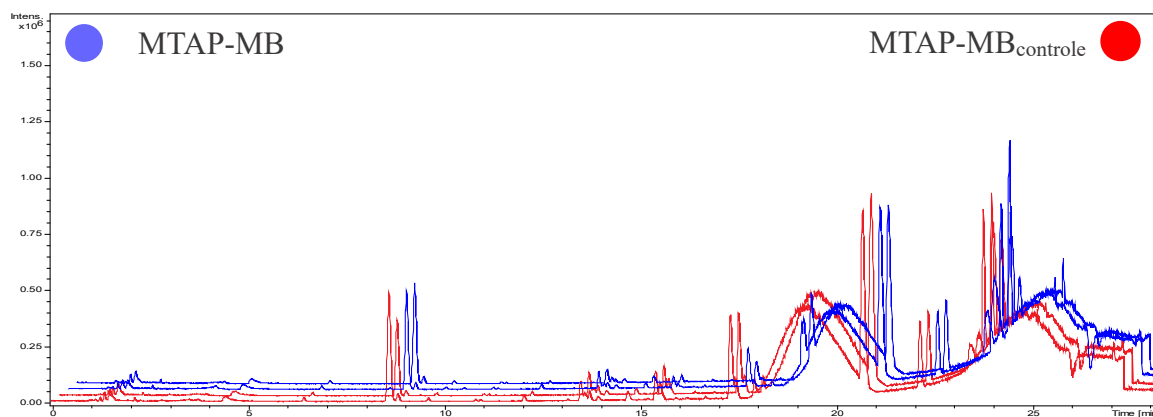


FIGURA 4.23. Cromatogramas de pico base obtidos por análise de LC-HRMS para etapa S<sub>4</sub> do ensaio *ligand fishing* (Etapa de dessorção dos ligantes). Coluna Acquity HSS T3 (100 × 2,1 mm, 1,8 μm), fase móvel (A) solução de 0,1% de ácido fórmico em água e (B) de 0,1% de ácido fórmico em ACN, em eluição gradiente de 2 a 100% de B em 25 min, seguido de etapa isocrática 100% de B de 25 a 27,5 min e recondicionamento na condição inicial por 7 min, vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 30 °C. Em azul, duplicata do ensaio para o MTA-MB ativo. Em vermelho, duplicata do ensaio para o MTAP-MB controle.

Tendo em vista a descoberta de novos produtos naturais bioativos, através de procedimentos eficientes e hábeis, o desenvolvimento de ferramentas computacionais que auxiliassem a organização e visualização de grandes conjuntos de dados foi impulsionada e a abordagem por redes moleculares (do inglês, *Molecular Networking*) surge nesse contexto com um os grandes avanços aplicados a química de produtos naturais no século XXI.<sup>24,90</sup>

A partir de dados de espectrometria de massas, a rede molecular facilita a identificação de padrões através de similaridade ou diferenças espectrais entre conjuntos amostrais. Essa abordagem permite reconhecer classes metabólicas e funções orgânicas em estruturas complexas de produtos naturais.

O pré-processamento para dados de LC-HRMS requer funções robustas e reprodutivas para as três dimensões dos dados: tempo de retenção, *m/z* e intensidade para que os dados sejam convertidos em informações moleculares

(do inglês, *feature*). Com o modo de análise chamado *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN), a ferramenta de pré-processamento desses dados mais divulgada e utilizada pela comunidade de espectrometria de massas é o MZmine.

24

Para tratamento dos dados, os cromatogramas de pico base do perfil cromatográfico da etapa S<sub>4</sub> foram processados no software MZmine, conforme descrito na seção 3.13.3. Os parâmetros foram definidos para deconvolução do maior número de informações moleculares, com bom alinhamento dos cromatogramas.

A tabela com os dados gerados a partir do MZmine, convertida e importada para o Excel<sup>®</sup>, dispunha de 1052 informações moleculares. Posteriormente, esses dados foram submetidos ao processamento com o software Ichthus (<https://github.com/MHBrito/IchthusSoftware>), que atribui tolerância para desvios nos parâmetros de *m/z*, tempo de retenção, sinal/ruído e intensidade da banda. Esse software filtra as informações, alinha os dados e calcula a razão de afinidade (AR), descrita na seção 3.13.3. Através do processamento com o Ichthus, foram obtidas 264 informações moleculares.

Para que um íon seja considerado ligante, ele precisa apresentar razão de afinidade maior que 1, que indica que a afinidade pela enzima ativa imobilizada é maior que qualquer interação inespecífica. Para descartar qualquer variabilidade dos dados do ensaio e/ou a caracterização de compostos extraídos por interações adsorptivas, foram selecionados os íons que apresentaram razão de afinidade maior ou igual a 1,3.

Desse modo, 21 informações moleculares foram selecionadas e, então, foi realizada uma análise manual considerando tempo de retenção, *m/z* e MS/MS no perfil químico do extrato de *T. ophiraphidites* bem como na análise do branco, a fim de descartar artefatos do ensaio.

O processo investigativo através de todas as etapas descritas identificou 16 ligantes para MTAP-MB com razão de afinidade entre 1,32 e 8,03. A FIGURA 4.24 evidencia a dispersão dos ligantes, na qual é possível notar a distribuição das informações moleculares ao longo do perfil cromatográfico, simultaneamente com a razão de afinidade.

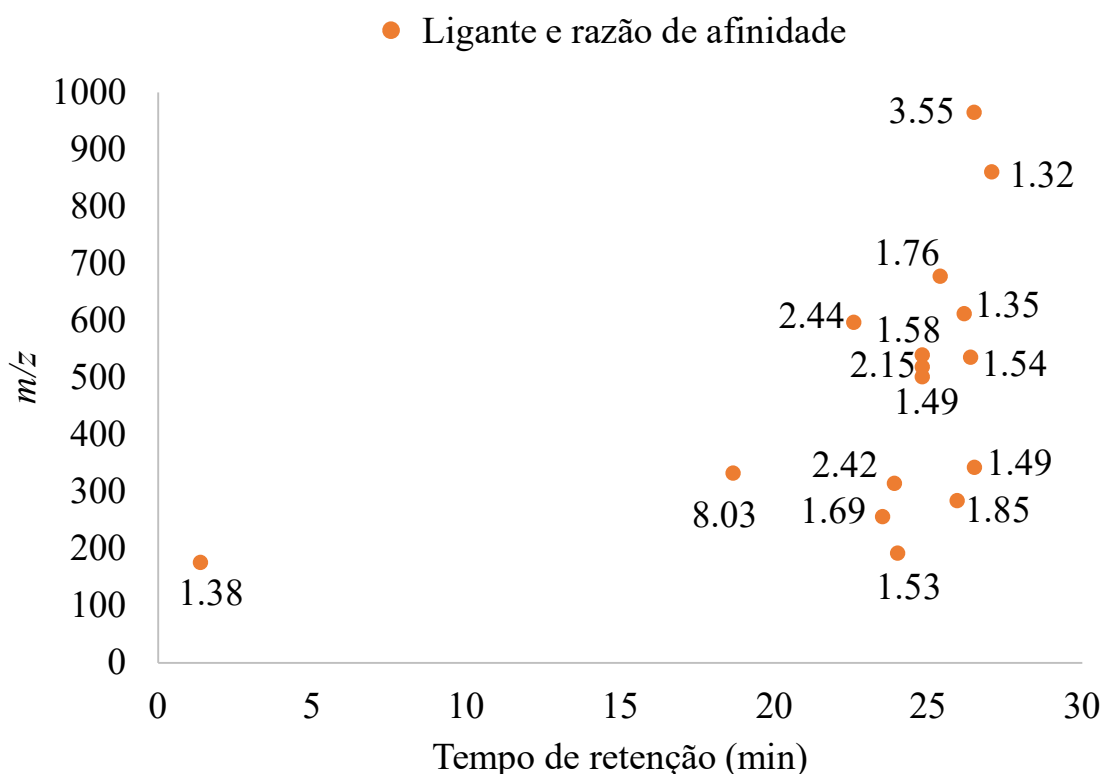


FIGURA 4.24. Gráficos de dispersão dos ligantes identificados no ensaio de *ligand fishing* com MTAP-MB no extrato FN 031 da *Topsentia ophiraphidites*.

Após os ligantes serem identificados pelo valor de  $m/z$  e razão de afinidade, vários experimentos de LC-MS/MS necessários para desrepliação dessas substâncias foram realizados, na tentativa de obter o perfil de fragmentação mais adequado para cada íon. Além disso, considerando a massa exata monoisotópica, no modo de ionização positivo, as propostas de fórmula molecular com os adutos  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M-H_2O+H]^+$ ,  $[M+H-CO_2]^+$  fornecidos pelo

DataAnalysis, foram investigados com o auxílio das bases de dados *Dictionary of Natural Products* (DNP), *Dictionary of Marine Natural Products* (DMNP), *Human Metabolome Database* (HMDB), *KNAPSAcK Core System*, *LIPID MAPS*, *MassBank*, *PubChem* e *SciFinder*<sup>®</sup>.

De forma semiautomatizada, a investigação também foi realizada utilizando redes moleculares para o experimento de LC-MS/MS do extrato no modo positivo de ionização. Ademais, foi feita uma curadoria nos dados de desreplicação para *Topsentia* realizada anteriormente pela Dra. Larissa Ramos da Silva.

Os ligantes apresentaram AR na faixa de 1,32 a 8,03 e a maioria apresentou retenção cromatográfica superior a 15 min, indicando hidrofobicidade.

A despeito do trabalho de curadoria manual feita nas bases de dados e na tese da Dra Larissa Ramos da Silva, não foi possível desreplicar a maioria dos ligantes identificados pelo MTAP-MB no extrato FN 031 da *Topsentia ophiraphidites*. Dois dos ligantes, no entanto puderam ser inferidos através do *MassBank*, *Dictionary of Marine Natural Products* e do *LIPID MAPS*: a primeira estrutura, o ácido 2-amino-9,13-dimetil heptadecanóico com AR= 2,42, apresentou um baixo erro em ppm, igual a 0,63. A estrutura já foi descrita para um organismo marinho<sup>91</sup>, mas não foi descrita até o momento para *Topsentia*. No trabalho, os autores isolaram e caracterizaram alguns metabólitos secundários produzidos pela cepa de *Streptomyces* 1010, isolada na região do mar da Antártica.<sup>91</sup> Dentre os metabólitos caracterizados, a estrutura do ácido 2-amino-9,13-dimetil heptadecanóico foi inferida com base em experimentos de MS, RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, COSY, HSQC e HMBC. Os dados dos autores indicaram que a estrutura do composto apresentava 3 resíduos metílicos (sendo dois grupos metil para o C-9 e C-13 e um metil terminal), um carbono carboxílico COOH e um grupo amino primário.<sup>91</sup>

Nas FIGURAS 4.25 e 4.26 estão dispostos o espectro de MS<sup>2</sup> obtido para o íon  $m/z$  314,3056 e a proposta de fragmentação para a substância, respectivamente.

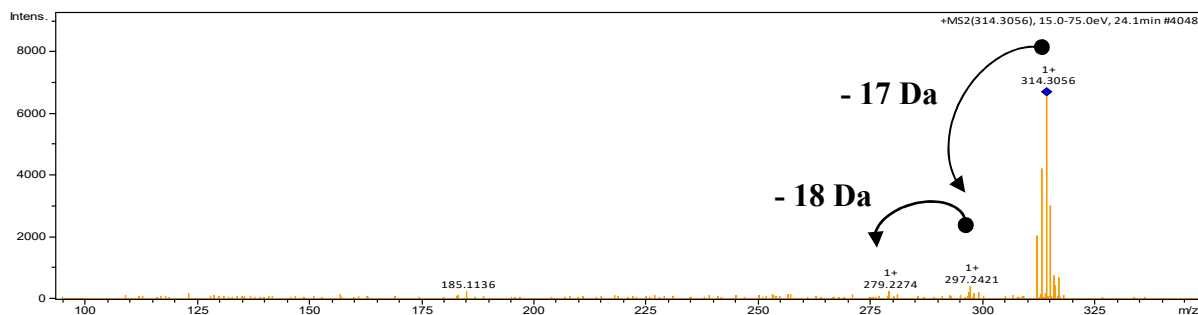


FIGURA 4.25. Espectro de MS<sup>2</sup> do íon  $m/z$  314,3056, correspondente ao ácido 2-amino-9,13-dimetil heptadecanóico.

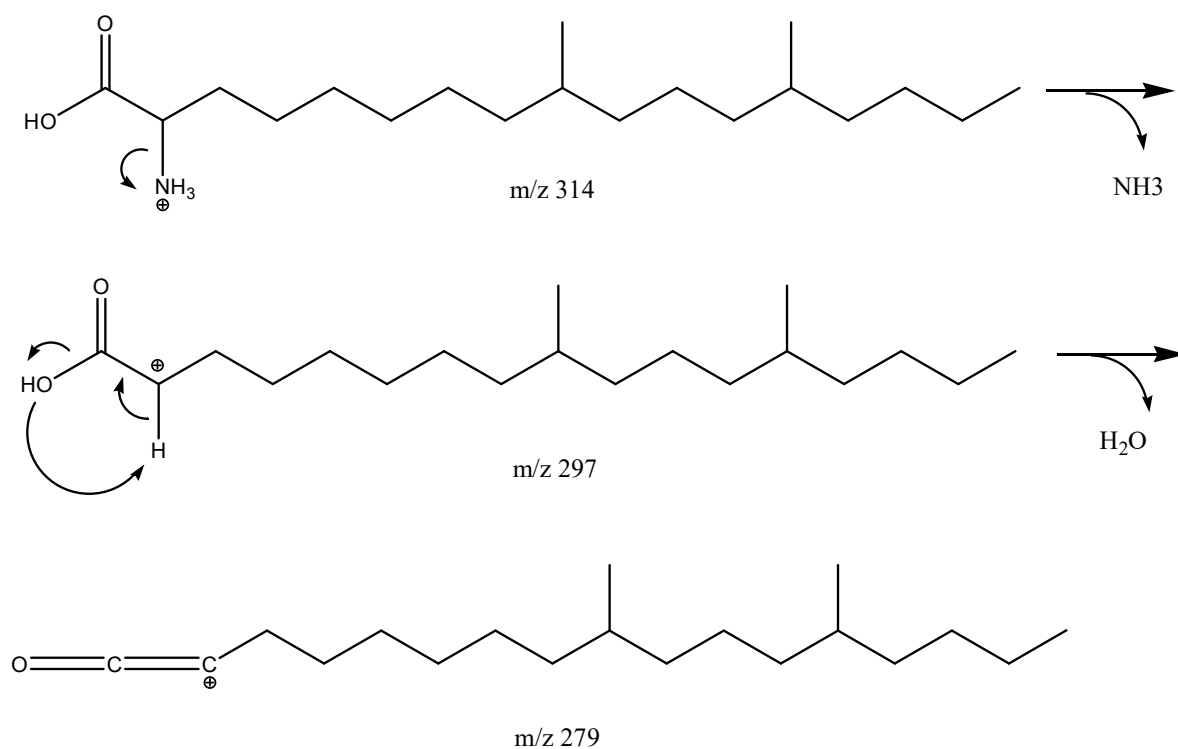


FIGURA 4.26. Mecanismo de fragmentação proposto para íon  $m/z$  314,3056, correspondente ao ácido 2-amino-9,13-dimetil heptadecanóico.

A segunda estrutura é um esteroide polioxigenado, o gorgostano 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,12 $\beta$ -pentol-12-acetato<sup>92</sup>, inferido através do *Dictionary of Marine Natural Products* e do *LIPID MAPS*. Uma característica marcante de fontes marinhas, é a riqueza de esteroides incomuns com anéis, cadeias laterais e padrões de oxigenação diversificados em seus anéis. Um exemplo é o gorgosterol, que foi o primeiro esteroide relatado contendo um ciclopropano. Desde então, diversos esteroides com variações da cadeia lateral foram relatados, principalmente de esponjas.<sup>92,93</sup>

A origem dos esteroides marinhos é complexa, pois eles podem ser formados a partir de fontes alimentares ou sintetizados por um simbiote e posteriormente serem modificados bioquimicamente pelo organismo marinho.<sup>93</sup> Ainda que, até o momento, não tenha sido proposto um modelo de fragmentação para essa substância na literatura, a classe dos esteroides é a mais representativa para o gênero *Topsentia*, especialmente para a espécie *T. ophiraphidites*.<sup>87</sup> Ademais, a estrutura proposta pelo *LIPID MAPS*, foi relatada em uma espécie de coral<sup>92-94</sup> a *Isis hippuris*, e no trabalho publicado<sup>92</sup> os autores isolaram e determinaram as estruturas de onze novos esteroides polioxigenados através de análises de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e estudos de difração de raios X. Através das análises e comparações com as estruturas anteriormente deduzidas, os autores mostraram que a estrutura do esteroide gorgostano 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,12 $\beta$ -pentol-12-acetato, o único esteroide com a fórmula molecular C<sub>32</sub>H<sub>54</sub>O<sub>6</sub> (*m/z* 535,3996) descrito no trabalho, possui um grupo acetoxi, quatro grupos hidroxilas e uma cadeia lateral com um ciclopropil. A estereoquímica foi inferida por comparação dos dados de RMN.<sup>92</sup>

Na FIGURA 4.27 está proposta a estrutura química para o ligante de *m/z* 535,3996, o gorgostano 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,12 $\beta$ -pentol-12-acetato com AR = 1,54 e um baixo erro em ppm = 0,56. Na FIGURA 4.28 está disposto o espectro de MS<sup>2</sup> obtido para o íon *m/z* 535,3996.

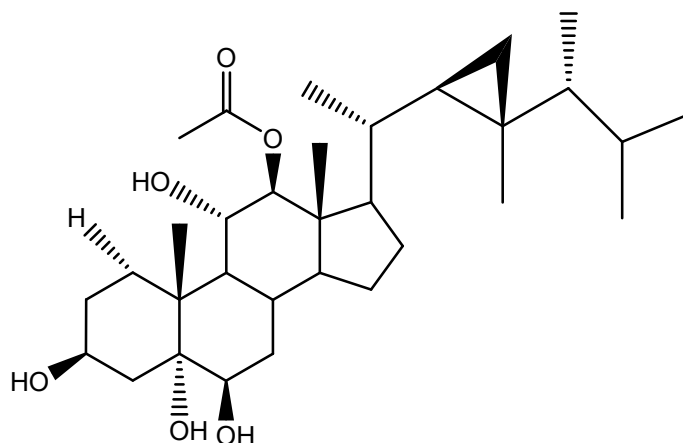


FIGURA 4.27. Estrutura com estereoquímica do esteroide gorgostano 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,12 $\beta$ -pentol-12-acetato sugerida pelo *LIPID MAPS* para o ligante com o [M+H]<sup>+</sup> 535,3996.

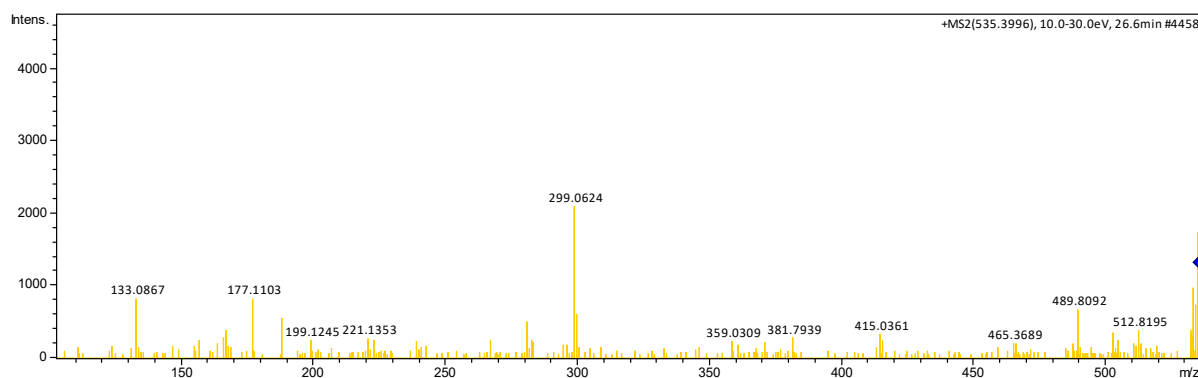


FIGURA 4.28. Espectro de MS<sup>2</sup> do íon  $m/z$  535,3996.

Os ligantes aqui apontados e os que não foram desreplcados evidenciam o enorme potencial deste ensaio para descoberta de moléculas bioativas que não foram ainda caracterizadas, salientando a ampla biodiversidade química ainda inexplorada, apesar do enorme avanço obtido na obtenção e processamento das análises de forma automatizada.

#### 4.9. Perfil químico de *Aspidosperma macrocarpon* por análises de LC-HRMS e redes moleculares

Na família Apocynaceae, as espécies do gênero *Aspidosperma* são encontradas apenas na América. As cascas de *Aspidosperma* são comumente usadas na forma de infusões pela medicina popular na região Amazônica. Como exemplos, a espécie *A. polineuron* é usada no tratamento da malária e *A. ramiflorum* é empregada no tratamento de leishmaniose, fatores que evidenciam a importância do conhecimento químico do gênero *Aspidosperma*.<sup>95</sup>

A espécie *Aspidosperma macrocarpon* Mart. (FIGURA 4.29), é popularmente conhecida como guatambu-do-cerrado, peroba-do-campo e orelha-de-elefante, com ocorrência no Brasil, Bolívia, Peru e Venezuela.<sup>96</sup>



FIGURA 4.29. Partes de *Aspidosperma macrocarpon*. Da esquerda para direita e de cima para baixo: Caule, folhas, árvore, frutos e flores.<sup>96</sup>

O perfil químico dos extratos de *A. macrocarpon* foi explorado através da desreplicação por LC-HRMS, guiado pela construção das redes moleculares e por comparação dos espectros de MS/MS obtidos com os

disponíveis na plataforma GNPS. Além disso, a comparação dos espectros de MS/MS da literatura com os espectros experimentais também pode ser feita.

A rede molecular é gerada a partir do alinhamento dos espectros de MS/MS. Os agrupamentos entre os nodos são definidos por uma pontuação de cosseno que determina a semelhança entre dois espectros de MS/MS, variando o valor de cosseno entre zero e um, sendo um, os espectros completamente idênticos. Quanto maior o escore de cosseno entre dois espectros, mais semelhantes são os espectros de MS/MS e mais semelhantes são as moléculas.<sup>30</sup>

A FIGURA 4.30 dispõe a rede molecular construída a partir de todas as análises realizadas por LC-HRMS para os extratos de *A. macrocarpon* no modo positivo de ionização, com ácido fórmico com aditivo na fase móvel. Os dados foram importados para o Cytoscape e são exibidos como uma rede de nós e bordas. Para evitar qualquer interpretação errônea de contaminantes, a injeção em branco (fase móvel) foi introduzida na rede de espectros como um grupo de amostra distinto identificadas no Cytoscape e removidas da rede molecular.

A estrutura da rede gerada consistiu em 677 nodos, distribuídos em 47 famílias moleculares e 359 self loops.

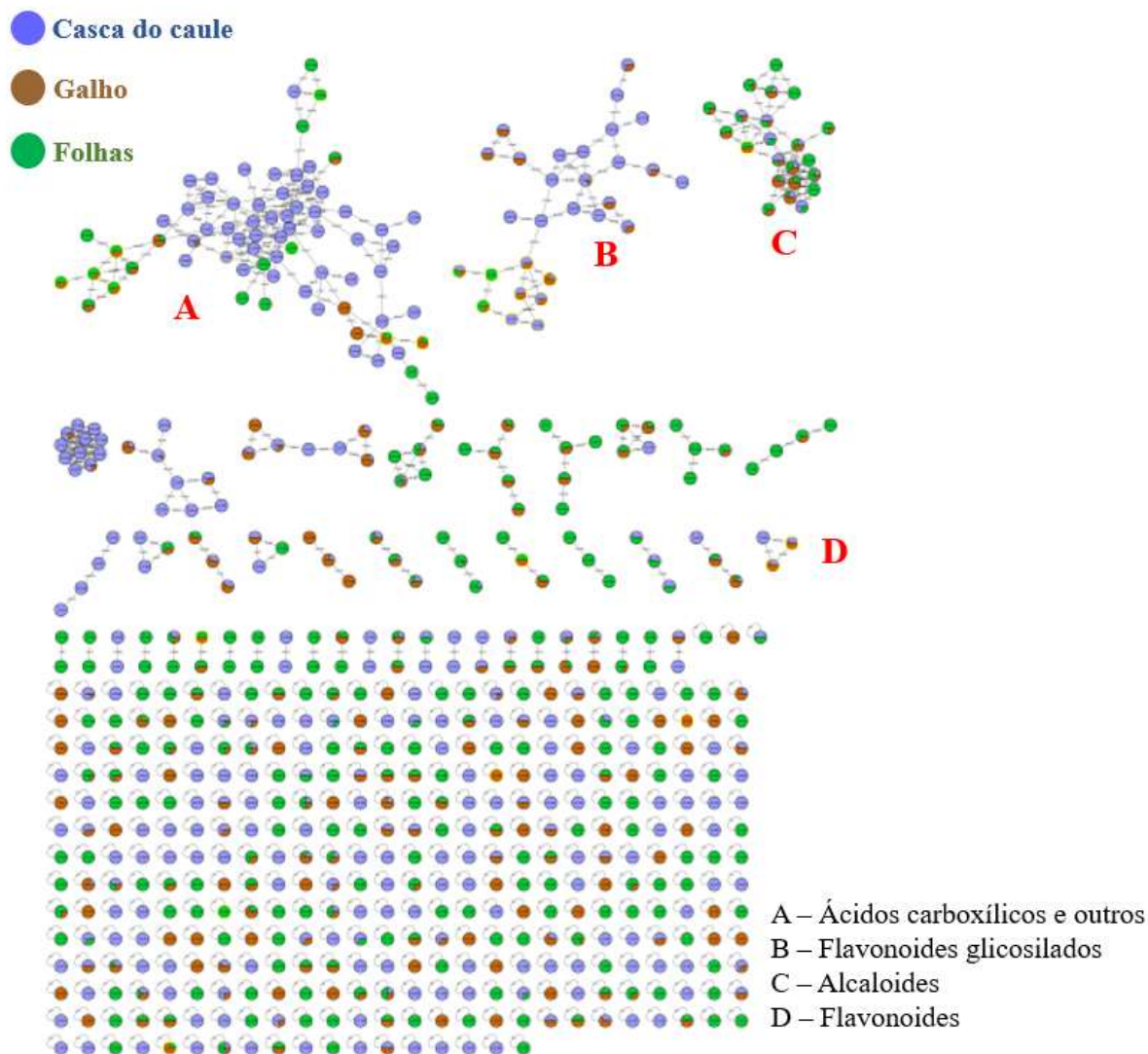


FIGURA 4.30. Visão geral da rede molecular das amostras de *Aspidosperma macrocarpon* com as classes de substâncias anotadas no processo de desreplicação (A, B, C e D).

A plataforma GNPS permitiu a desreplicação de metabólitos pertencentes às classes de flavonoides glicosilados, alcaloides, flavonoides, ácidos carboxílicos e outros, listadas na TABELA 4.4. As substâncias desreplicadas foram inferidas por correlação dos espectros obtidos experimentalmente com a biblioteca de espectros MS/MS, além do baixo erro de massa exata e com o perfil do mecanismo de fragmentação.<sup>97–99</sup>

TABELA 4.4. Perfil químico dos extratos de *Aspidosperma macrocarpon*: informações dos compostos desreplcados.

Nome	<i>m/z</i> experimental	<i>m/z</i> teórico	Erro ppm	Aduto do íon	Fórmula molecular	Tempo de retenção (min)	Precursor e demais íons do espectro MS/MS	Casca do caule	Folhas	Galho
Flavonoides glicosilados										
Rutina	611,1608	611,1607	0,1	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	6,30	611,1608, 465,1027, 303,0498, 229,0489, 137,0224	sim	sim	sim
Ramnetina 3-soforosídeo	641,1705	641,1712	-1,0	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>17</sub>	6,47	641,1705, 479,1237, 317,0648, 229,0472, 151,0367	sim	-	-
Quercetina 3,4'-diglucosídeo	627,1555	627,1556	0	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	6,41	627,1555, 465,1028, 303,0506, 257,0469, 151,0401	sim	-	-
Isoramnetina 3-O-glucosídeo	479,1181	479,1184	- 0,6	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	7,23	479,1181, 317,0661, 273,0392, 229,0486, 153,0182	sim	-	sim

**Continuação da TABELA 4.4**

Quercetina galactosídeo	3-	465,1026	465,1028	0	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	6,55	465,1026, 303,0502, 229,0491, 153,0181	sim	-	sim
Taxifolina-3- glucosídeo		467,1880	467,1184	0,8	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	4,49	467,1880, 305,0656, 185,0669, 153,0173	sim	-	sim
Kaempferol beta-D- galactosídeo	3-O-	449,1080	449,1078	0,4	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	7,32	449,1080, 287,0549, 229,0484, 153,0177	sim	-	sim
Kaempferol rutinosídeo	3-O-	595,1655	595,1657	-0,3	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	6,68	595,1655, 449,1038, 287,0534 163,0371	-	sim	-
Isoramnetina alpha- ramnopiranosil-(1- 2)-beta- galactopiranosídeo	3-O-	625,1755	625,1763	-1,2	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	6,90	625,1755, 479,1164, 317,0648, 229,0487, 153,0172	-	sim	sim

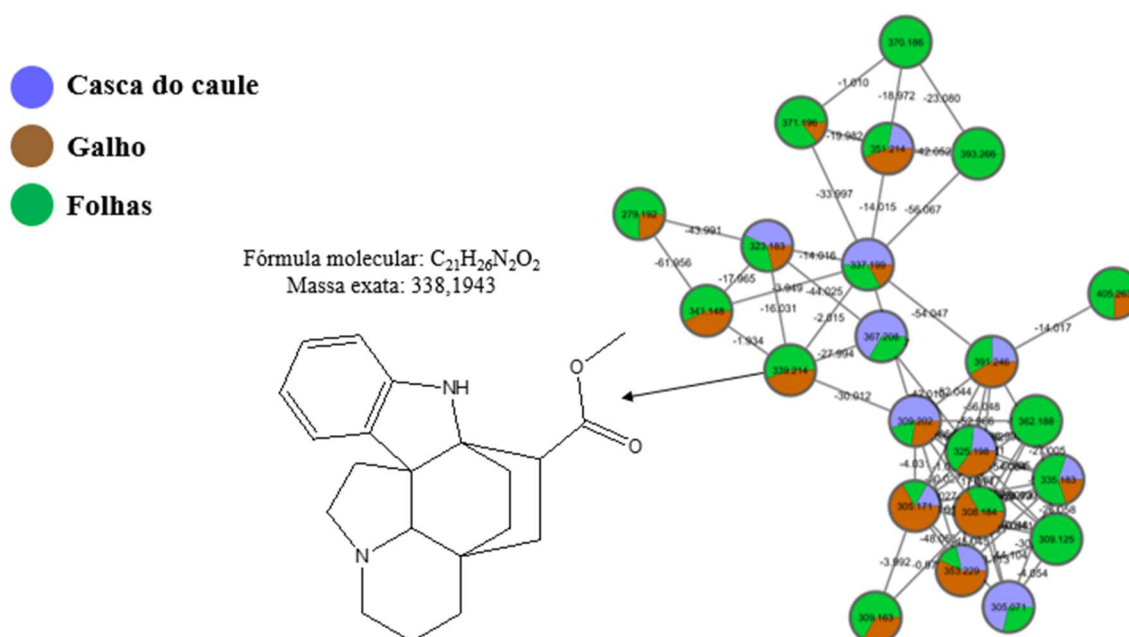
**Continuação da TABELA 4.4**

Nome	<i>m/z</i> experimental	<i>m/z</i> teórico	Erro ppm	Aduto do íon	Fórmula molecular	Tempo de retenção (min)	Precursor e demais íons do espectro MS/MS	Casca do caule	Folha	Galho
Família dos ácidos carboxílicos e outros compostos										
Ácido trans-5- <i>O</i> - Cafeoilquinico	355,1008	355,1024	-4	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	3,89	355,1008, 163,0385, 117,0334	-	sim	sim
Ácido 12,13- Diidroxioctadec-9- enoico	315,2530	315,2530	0	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	17,91	315,2530, 279,2302, 233,2239, 177,1656, 143,1044	sim	-	-
1-Monolinolenina	353,2682	353,2686	-1,1	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	15,86	353,2682, 261,2214, 243,2107, 117,0690	-	sim	-
Sacarose	360,1503	360,1506	-0,8	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	1,25	360,1503, 163,0591, 145,0484, 127,0386	-	sim	sim
Ácido trans-5- <i>O</i> - Cafeoilquinico	372,1287	372,1295	-2,1	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	4,60	372,1287, 355,1005, 163,0385, 135,0435, 117,0331	-	sim	sim

**Continuação da TABELA 4.4**

Ácido 3,5-Dicafeoilquinico	517,1342	517,1341	0,1	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	7,28	517,1342, 337,0909, 163,0385, 135,0432	-	sim	sim
Família dos alcaloides										
Kopsinina	339,2066	339,2067	-0,2	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5,81	339,2066, 223,1232, 196,1118, 180,0803, 167,0729, 130,0645, 96,0802	-	sim	sim
Família dos flavonoides										
Taxifolina	305,0651	305,0656	0,3	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	6,89	305,0651, 287,0544, 259,0595, 195,0285, 153,0175	sim		sim
Diidrokaempferol	289,0706	289,0707	-0,3	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	6,90	289,0706, 271,0587, 243,0650, 195,0269, 153,0185, 107,0485	sim	-	sim

Há diversos trabalhos reportados na literatura sobre estudos químicos com espécies do gênero *Aspidosperma* que são conhecidas majoritariamente por exibirem uma grande variedade de alcaloides indólicos, os quais são considerados marcadores quimiotaxonômicos das espécies do gênero.<sup>95,100–102</sup> A FIGURA 4.31 ilustra a família molecular dos alcaloides. A partir da TABELA 4.4 pode-se notar que o alcaloide indólico kopsinina<sup>103</sup> foi ionizado na forma de  $[M+H]^+$  no espectro de MS<sup>1</sup>. A FIGURA 4.32 ilustra o mecanismo de fragmentação para a kopsinina, onde é possível perceber, dentre outros mecanismos, as classes de reações de fragmentação do tipo Retro-Diels-Alder (RDA).<sup>104</sup>



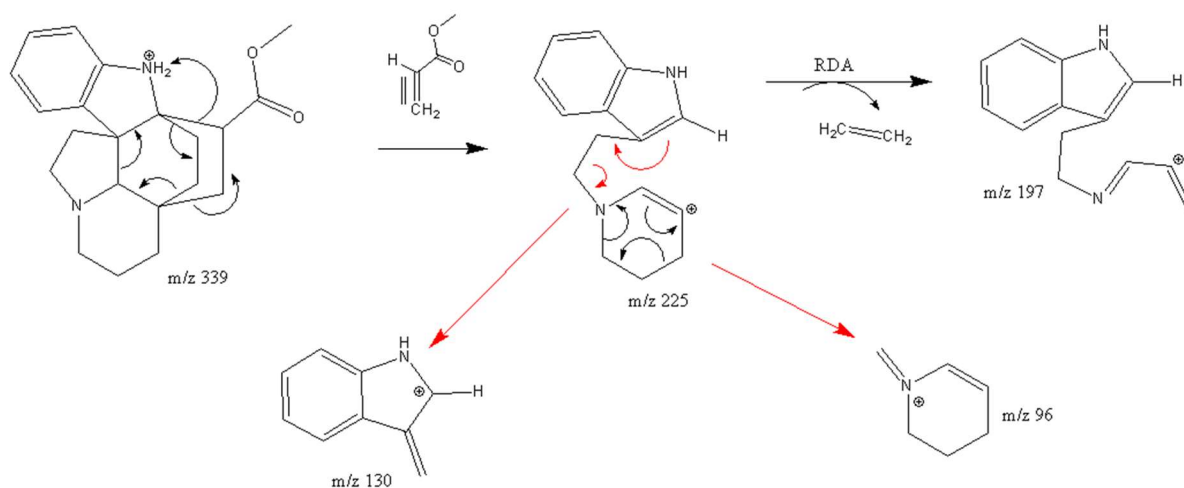


FIGURA 4.31. Mecanismo de fragmentação proposto para a kopsinina ( $m/z$  339,2142).

Dentre os constituintes químicos, os flavonoides são uma das principais classes de compostos orgânicos em plantas e muitos são encontrados como glicoconjugados.<sup>105</sup> As FIGURAS 4.33 e 4.34, ilustram as duas famílias moleculares de flavonoides, sendo a família dos flavonoides glicosilados e dos flavonoides, respectivamente.

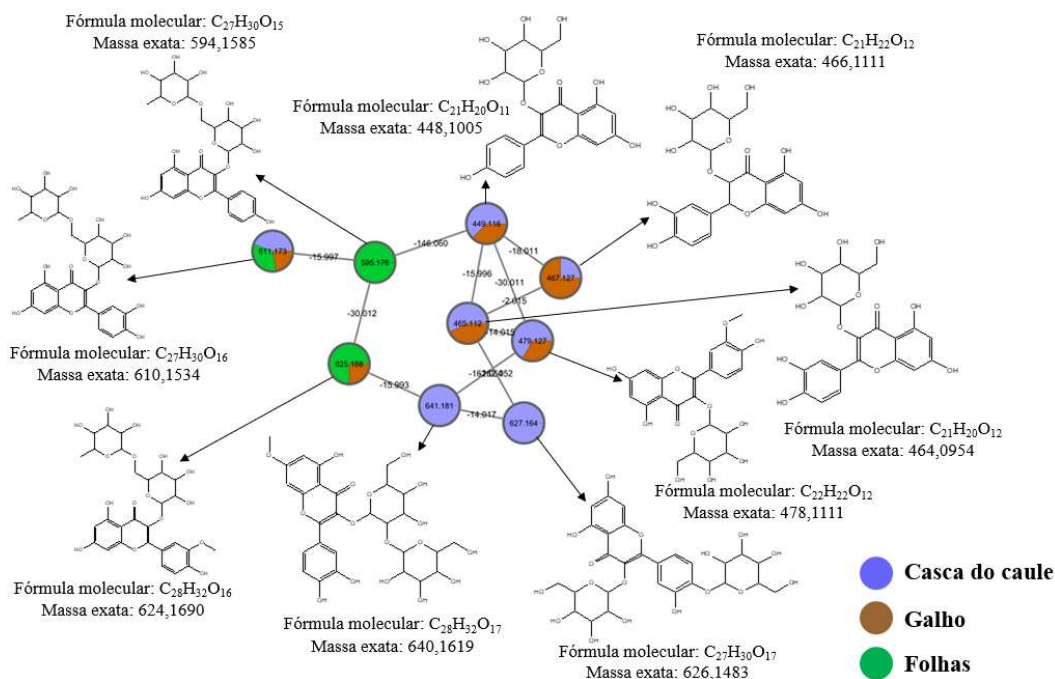


FIGURA 4.32. Família molecular de flavonoides glicosilados, desreplicados nos extratos de *Aspidosperma macrocarpon*.

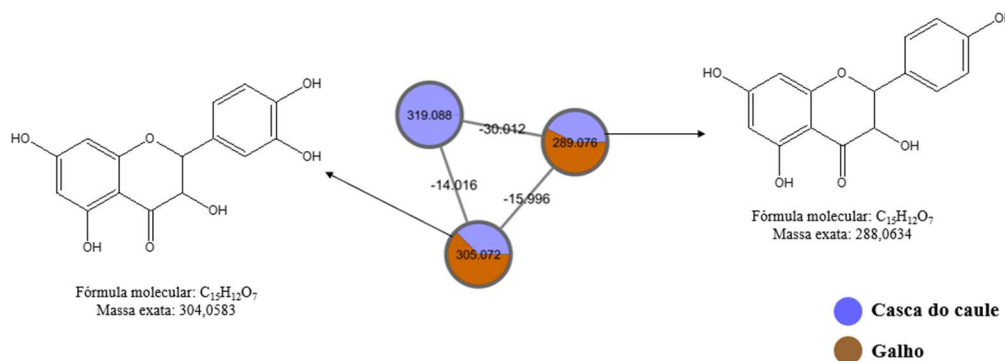


FIGURA 4.33. Família molecular de flavonoides, desreplicados nos extratos de *Aspidosperma macrocarpon*.

A partir da TABELA 4.4 pode-se notar que esses metabólitos foram ionizados na forma de  $[M+H]^+$  no espectro de  $MS^1$ . As análises de  $MS^2$  permitiram observar o padrão de fragmentação dos flavonoides glicosilados, na forma de eliminações 1,3 subsequentes de 162, 146 ou de 132 u, perdas neutras

de hexose, desoxihexose ou pentose, respectivamente.<sup>97,98,105</sup> De forma exemplificada, a FIGURA 4.35 ilustra o mecanismo de fragmentação para o íon  $m/z$  595,1644, o kaempferol 3-*O*-rutinosídeo. A FIGURA 4.36 ilustra o mecanismo de fragmentação para o Diidrokaempferol, o íon  $m/z$  289,0706 que gerou o íon  $m/z$  243,0650 através da perda neutra de  $H_2O$ , seguido de um rearranjo intramolecular para a perda neutra de  $CO$ .<sup>98,104</sup>

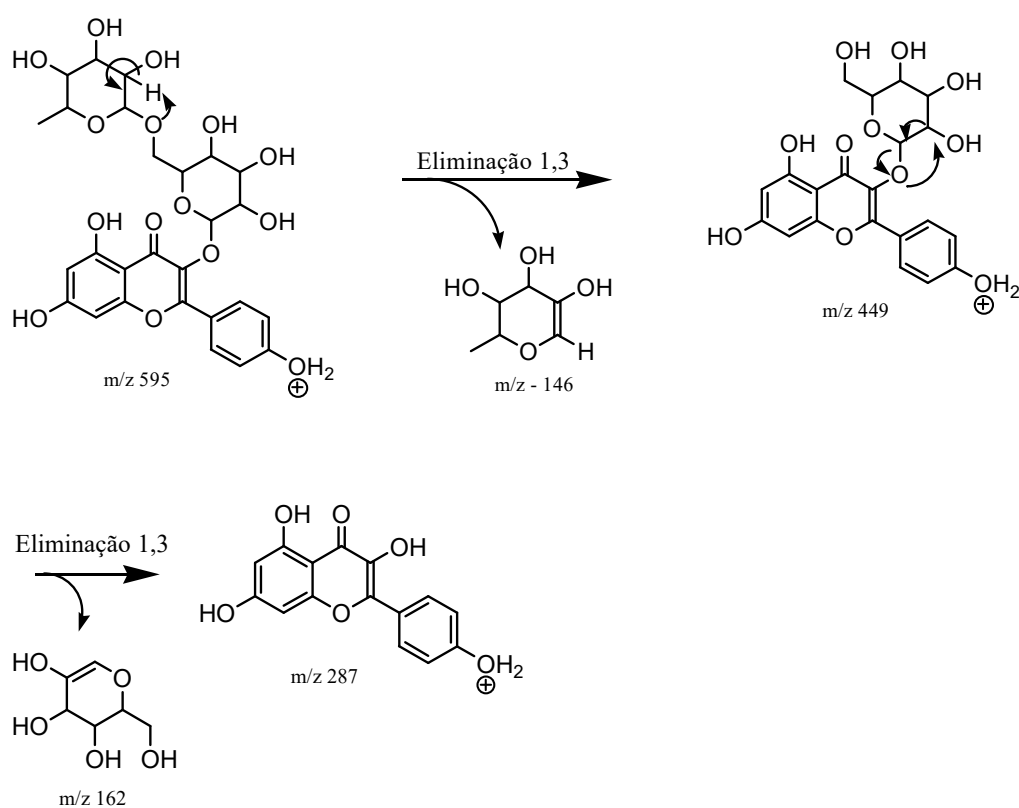


FIGURA 4.34. Mecanismo de fragmentação proposto para o kaempferol 3-*O*-rutinosídeo ( $m/z$  595,1644).

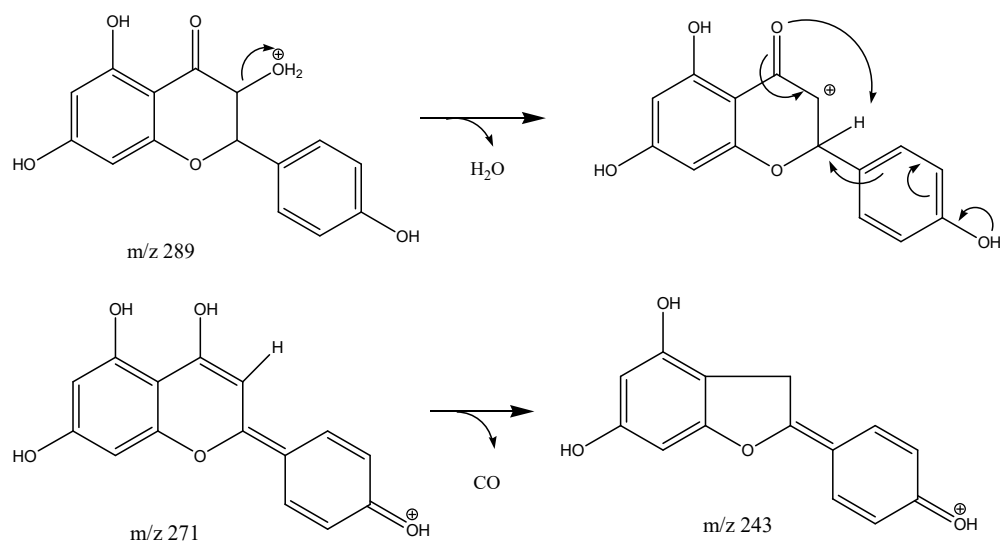


FIGURA 4.35. Mecanismo de fragmentação proposto para o Diidrokaempferol, ( $m/z$  289,0706).

A FIGURA 4.37 traz a rede molecular da família de compostos como ácidos carboxílicos, açúcares e ácidos cafeoilquínicos que foram ionizados na forma de  $[\text{M}+\text{H}]^+$  e  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  no espectro de  $\text{MS}^1$ . A FIGURA 4.38 evidencia o mecanismo de fragmentação para o íon  $m/z$  354,0951 o ácido 3-*O*-cafeoilquínico, na forma  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , onde nota-se as perdas neutras do ácido quínico,  $\text{CO}$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Os ácidos cafeoilquínicos já foram relatados para *A. macrocarpon*.<sup>106</sup>

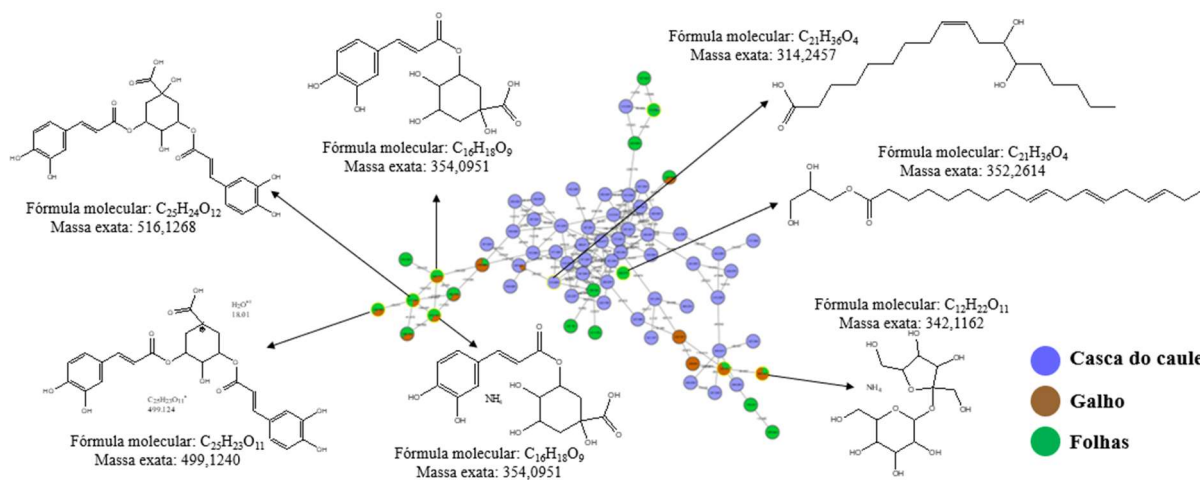


FIGURA 4.36. Família molecular dos ácidos carboxílicos e outros compostos (TABELA 4.4), desreplcados nos extratos de *Aspidosperma macrocarpon*.

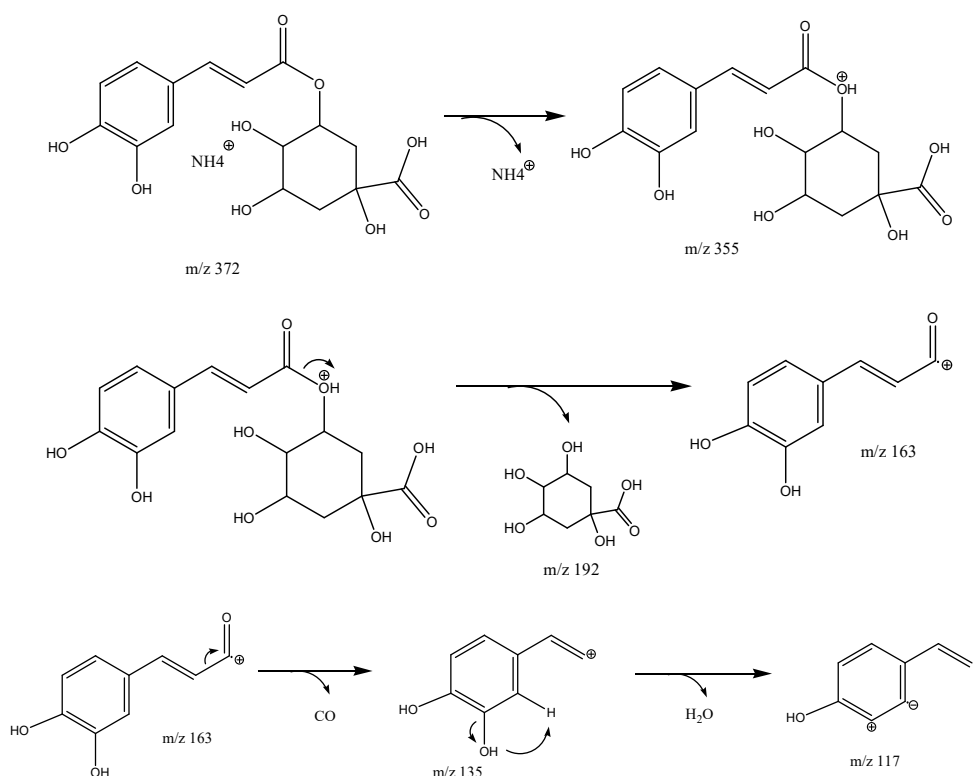


FIGURA 4.37. Mecanismo de fragmentação proposto para o ácido 3-O-caffeoilquínico ( $m/z$  354,0951).

Através da plataforma GNPS, foi possível desreplcar 18 substâncias nos extratos de *Aspidosperma macrocarpon*, o que contribui para o conhecimento das classes de metabólitos presentes nesta espécie.

#### 4.10. Ensaio de ligand fishing com MTAP-MB para o extrato casca do caule de *Aspidosperma macrocarpon*

Após a desreplicação das amostras de *A. macrocarpon*, o extrato da casca do caule foi selecionado para ser aplicado na triagem de ligantes com o MTAP-MB. O protocolo do ensaio de *ligand fishing* foi realizado conforme descrito anteriormente, na seção 4.8 e FIGURA 4.18. O ensaio foi realizado em duplicata tanto com MTAP-MB ativo, quanto o MTAP-MB controle.

Os sobrenadantes da etapa S<sub>4</sub> (dessorção dos ligantes) foram analisados por LC-HRMS, com ACN contendo 0,1% de ácido fórmico como modificador orgânico, em eluição gradiente de 2-100% e o HRMS em modo positivo *full scan* conforme descrito na seção 3.15.2.

Os cromatogramas de pico base do perfil cromatográfico da casca do caule de *A. macrocarpon* e da etapa S<sub>4</sub> do ensaio *ligand fishing* estão apresentados nas FIGURAS 4.39 e 4.40, respectivamente.

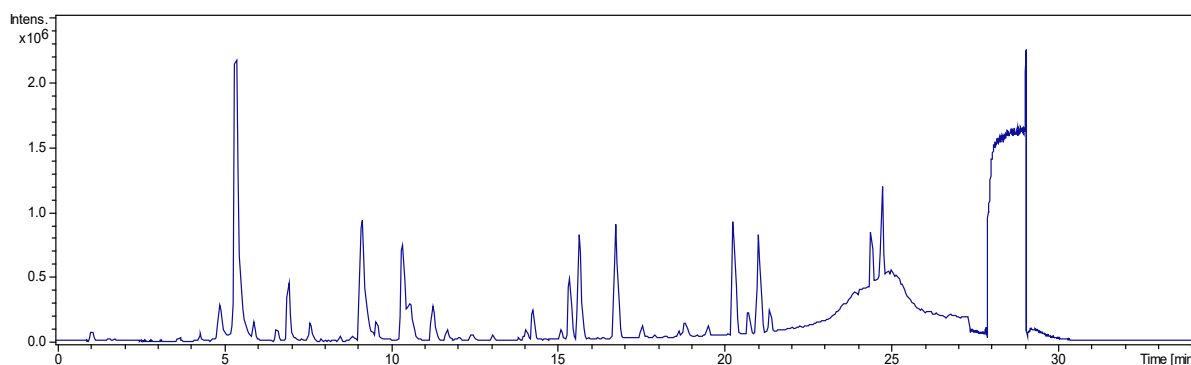


Figura 4.38. Cromatograma de pico base obtido por análise de LC-HRMS para o extrato de casca do caule *Aspidosperma macrocarpon*. Coluna Ascentis Express C18 (100 × 2,1 mm, 1,8 μm), fase móvel (A) solução de 0,1% de ácido fórmico em água e (B) de 0,1% de ácido fórmico em ACN, em eluição gradiente de 2 a 100% de B em 25 min, seguido de etapa isocrática 100% de B de 25 a 27,5 min e

recondicionamento na condição inicial por 7 min, vazão  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

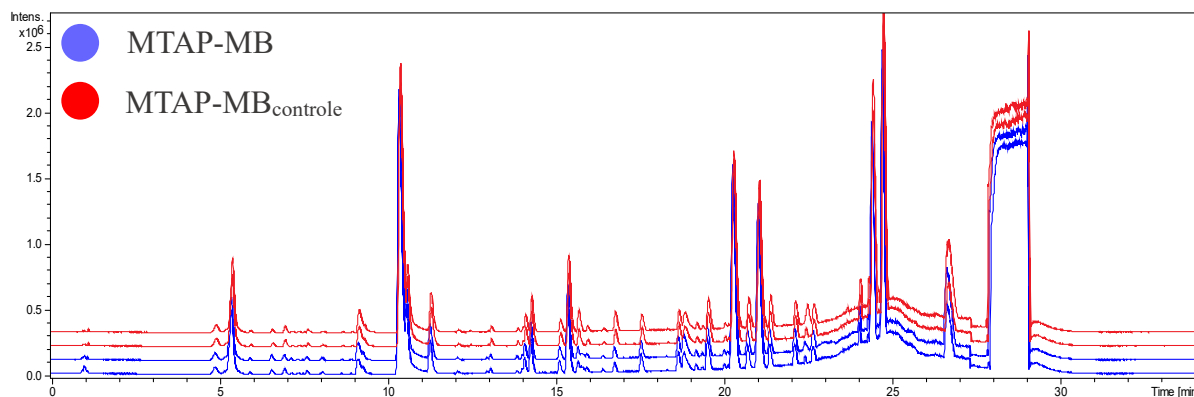


FIGURA 4.39. Cromatogramas de pico base obtidos por análise de LC-HRMS para etapa  $S_4$  do ensaio *ligand fishing* (Etapa de dessorção dos ligantes). Coluna Ascentis Express C18 ( $100 \times 2,1 \text{ mm}$ ,  $1,8 \mu\text{m}$ ), fase móvel (A) solução de 0,1% de ácido fórmico em água e (B) de 0,1% de ácido fórmico em ACN, em eluição gradiente de 2 a 100% de B em 25 min, seguido de etapa isocrática 100% de B de 25 a 27,5 min e recondicionamento na condição inicial por 7 min, vazão  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em azul, duplicata do ensaio para o biorreator ativo MTA-MB. Em vermelho, duplicata do ensaio para o biorreator controle MTAP-MBcontrole.

Conforme mencionado e discutido na seção 4.8 para o ensaio de *ligand fishing* com o extrato da esponja marinha *T. ophiraphidites*, a mesma metodologia foi aplicada para interpretação dos resultados do ensaio *ligand fishing* com o extrato das cascas do caule de *A. macrocarpon*. Os cromatogramas de pico base do perfil do perfil cromatográfico da etapa  $S_4$  foram processados no software MZmine, conforme descrito na seção 3.15.3. Os parâmetros foram definidos para deconvolução do maior número de informações moleculares, com bom alinhamento dos cromatogramas.

A tabela com os dados gerados a partir do MZmine, convertida e importada para o software Excel<sup>®</sup>, dispunha de 4200 informações moleculares. Posteriormente, esses dados foram submetidos ao processamento com o software Ichthus (<https://github.com/MHBrito/IchthusSoftware>), que atribui tolerância para desvios nos parâmetros de  $m/z$ , tempo de retenção, sinal/ruído e intensidade da banda. O software filtra as informações, alinha os dados e calcula a razão de afinidade, descrita na seção 3.13.3. Através do processamento com o Ichthus, foram obtidas 320 informações moleculares.

Para que um íon seja considerado ligante, ele precisa apresentar razão de afinidade maior que 1, que indica que a afinidade pela enzima ativa imobilizada é maior que qualquer interação inespecífica. Para descartar qualquer variabilidade dos dados do ensaio e/ou a caracterização de compostos extraídos por interações adsorptivas, foram selecionados os íons que apresentaram razão de afinidade maior ou igual a 1,5.

Desse modo, 70 informações moleculares foram selecionadas e então foi realizada uma análise manual considerando tempo de retenção,  $m/z$  e MS/MS no perfil químico do extrato das cascas do caule *A. macrocarpon* bem como na análise do branco, a fim de descartar artefatos do ensaio.

O processo investigativo através de todas as etapas descritas identificou 48 ligantes para MTAP com razão de afinidade entre 1,5 e 11,5. As FIGURAS 4.41 e 4.42 (Para visualização dos valores de AR *zoom* entre 21,5 min e 27,5 min), evidenciam a dispersão dos ligantes, onde é possível notar a distribuição das informações moleculares ao longo do perfil cromatográfico, simultaneamente com a razão de afinidade.



Após os ligantes serem localizados pelo valor de  $m/z$  e razão de afinidade, vários experimentos de LC-MS/MS necessários para desreplicação dessas substâncias foram realizados, na tentativa de obter o perfil de fragmentação mais adequado para cada íon. Além disso, considerando a massa exata monoisotópica, no modo de ionização positivo, as propostas de fórmula molecular com os adutos  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M-H_2O+H]^+$ ,  $[M+H-CO_2]^+$  fornecidos pelo DataAnalysis, foram investigados com o auxílio das bases de dados *Dictionary of Natural Products* (DNP), *Dictionary of Marine Natural Products* (DMNP), *Human Metabolome Database* (HMDB), *KNAPSAcK Core System*, *LIPID MAPS*, *MassBank*, *PubChem* e *SciFinder*®.

De forma semiautomatizada, a investigação também foi realizada utilizando redes moleculares para o experimento de LC-MS/MS do extrato no modo de ionização positivo. Ademais, foi feita uma curadoria nos dados de desreplicação para *Aspidosperma*, realizada anteriormente neste trabalho.

Apesar dos esforços para desreplicação dos ligantes seletivos da enzima, alguns não apresentaram um perfil de fragmentação que pudesse ser investigado com o auxílio de bases de dados ou redes moleculares. Ademais, embora tenha sido desreplicado algumas substâncias para a espécie neste trabalho, o MTAP-MB apresentou afinidade por moléculas que ainda não foram apontadas aqui, ou na literatura para os extratos de *Aspidosperma macrocarpon*.

Através do ensaio de *ligand fishing*, foi possível apontar ligantes para MTAP, presentes no extrato da casca do caule de *A. macrocarpon*. Os ligantes não desreplicados evidenciam o enorme potencial deste ensaio para descoberta de novos compostos bioativos que não foram identificados, salientando a ampla biodiversidade química ainda inexplorada, apesar do enorme avanço obtido na obtenção e processamento das análises de forma automatizada.

## 5. CONCLUSÕES

Para o monitoramento da atividade da enzima heteróloga MTAP, foi desenvolvido um método direto por LC-UV para quantificação de adenina, que apresentou rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade e, dessa maneira, foi possível minimizar os problemas dos ensaios acoplados. O método validado foi utilizado para a caracterização cinética da enzima em solução com diferentes tampões, obtendo os valores de  $K_{Mapp}$  determinados para o substrato adenosina. O menor valor de  $K_{Mapp}$  em tampão fosfato evidenciou a maior afinidade da enzima por adenosina na presença deste tampão.

A MTAP foi imobilizada em partículas magnéticas onde foi obtido o biorreator MTAP-MB que foi caracterizado cineticamente a partir do método de LC-UV. Através dos conhecimentos cinéticos do biorreator, foi aplicado um ensaio de triagem por atividade com algumas moléculas, que revelaram baixos valores de inibição (menor que 60% a 20 e 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) para a enzima imobilizada.

O MTAP-MB foi aplicado no ensaio *ligand fishing* com extratos da esponja marinha *Topsentia ophiraphidites* e casca do caule de *Aspidosperma macrocarpon*, Visando procedimentos eficientes e hábeis para o pré-processamento dos dados de LC-HRMS obtidos do ensaio de *ligand fishing*, foi utilizado o *software* MZmine para interpretação dos resultados obtidos. As tabelas foram submetidas posteriormente ao processamento com o *software* Ichthus, que atribuiu diversos parâmetros para filtrar as informações e calcular a razão da afinidade para cada informação molecular. Para o ensaio *ligand fishing* com o extrato de *T. ophiraphidites*, foram selecionados 16 ligantes para enzima, onde 1 deles teve sua estrutura inferida a partir do espectro de massas de alta resolução com o auxílio de bases de dados. Para o ensaio com o extrato das cascas do caule de *A. macrocarpon*, foram apontados 48 ligantes seletivos para enzima. Apesar

dos esforços em desreplicar os ligantes durante o tempo deste projeto, não foi possível inferir mais estruturas, sendo este fato um indicativo de que os ligantes que apresentaram afinidade pela enzima provavelmente ainda não foram relatados para as espécies, ou não estão inseridos nos bancos de dados disponíveis.

Concomitantemente ao ensaio de *ligand fishing* foi obtido o perfil químico das amostras de casca do caule, galho e folhas de *A. macrocarpon* e com o auxílio da plataforma GNPS foi possível desreplicar metabólitos pertencentes às classes de flavonoides glicosilados, alcaloides, flavonoides, ácidos carboxílicos e outros.

Em conclusão, a espectrometria de massas de alta resolução juntamente com as ferramentas computacionais como as redes moleculares, os *softwares* MZmine e Ichthus, auxiliaram na organização e visualização dos grandes conjuntos de dados obtidos, mas evidenciaram a grande limitação com a falta de compostos nos bancos de dados. Isso demonstra que apesar de todos os avanços, a identificação de componentes de produtos naturais continua sendo um enorme desafio. Ademais, o ensaio de *ligand fishing* demonstra um enorme potencial para ser usado não só como um ensaio de afinidade, mas também no auxílio para desreplicação de metabólitos em baixas concentrações em extratos de produtos naturais e até mesmo compostos raros que ainda não foram isolados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERNAL, C., RODRÍGUEZ, K. & MARTÍNEZ, R. "Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts". *Biotechnol. Adv.*, **36**, 1470–1480, 2018.
2. CHENG, M. & CHEN, Z. "Recent advances in screening of enzymes inhibitors based on capillary electrophoresis". *J. Pharm. Anal.*, **8**, 226–233, 2018.
3. TRESINA, P. S., SELVAM, M. S. & MOHAN, V. R. "Natural Products in Drug Discovery : Approaches and Development". **33**, 93–110, 2021.
4. TEHREEM, S. *ET AL.* "A UPLC-DAD-Based Bio-Screening Assay for the Evaluation of the Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Potential of Plant Extracts and Compounds : Pyrroquinazoline Alkaloids from *Adhatoda vasica* as a Case Study". 1–15, 2021.
5. BARTOLINI, M., CAVRINI, V. & ANDRISANO, V. "Choosing the right chromatographic support in making a new acetylcholinesterase-micro-immobilised enzyme reactor for drug discovery". *J. Chromatogr. A*, **1065**, 135–144, 2005.
6. ZHUO, R., LIU, H., LIU, N. & WANG, Y. "Ligand fishing: A remarkable strategy for discovering bioactive compounds from complex mixture of natural products". *Molecules*, **21**, 2016.
7. CIEŚLA, Ł. & MOADDEL, R. "Comparison of analytical techniques for the identification of bioactive compounds from natural products". *Nat. Prod. Rep.*, **33**, 1131–1145, 2016.
8. WUBSHET, S. G., BRIGHENTE, I. M. C., MOADDEL, R. & STAERK, D. "Magnetic Ligand Fishing as a Targeting Tool for HPLC-HRMS-SPE-NMR:  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Ligands and Alkylresorcinol Glycosides from *Eugenia catharinae*". *J. Nat. Prod.*, **78**, 2657–2665, 2015.
9. PRUDENT, R., ANNIS, D. A., DANDLIKER, P. J., ORTHOLAND, J. Y. & ROCHE, D. "Exploring new targets and chemical space with affinity selection-mass spectrometry". *Nat. Rev. Chem.*, **5**, 62–71, 2021.
10. FERREIRA, R. S., OLIVA, G. & ANDRICOPULO, A. D. "Integrating Virtual and High-Throughput Screening: Opportunities and Challenges in Drug Research and Development". *Quim. Nova*, **34**, 1770–1778, 2011.
11. HOUSTON, J. G. & BANKS, M. "The chemical-biological interface: Developments in automated and miniaturised screening technology". *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8**, 734–740, 1997.

12. MUCHIRI, R. N. & VAN BREEMEN, R. B. "Affinity selection–mass spectrometry for the discovery of pharmacologically active compounds from combinatorial libraries and natural products". *J. Mass Spectrom.*, **56**, 2021.
13. QING, L. SEN *ET AL.* "Ligand fishing from *Dioscorea nipponica* extract using human serum albumin functionalized magnetic nanoparticles". *J. Chromatogr. A*, **1217**, 4663–4668, 2010.
14. MAITRA, U., STEPHEN, C. & CIESLA, L. M. "Drug discovery from natural products – Old problems and novel solutions for the treatment of neurodegenerative diseases". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **210**, 114553, 2022.
15. CHOPRA, B. "Natural products : A lead for drug discovery and development Bhawna Chopra". 4660–4702, 2021 doi:10.1002/ptr.7099.
16. ATANASOV, A. G. *ET AL.* "Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products : A review". *Biotechnol. Adv.*, **33**, 1582–1614, 2015.
17. NAJMI, A. ., JAVES, S. A., BRATTY, M. AL & ALHAZMI, H. A. "Modern Approaches in the Discovery and Development of Plant-Based Natural Products and Their Analogues as Potential Therapeutic Agents". *Molecules*, **27**, 349, 2022.
18. DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.* (2009).
19. BERNARDINI, S., TIEZZI, A., MASCI, V. L. & OVIDI, E. "Natural products for human health : an historical overview of the drug discovery approaches". *Nat. Prod. Res.*, **6419**, 1–25, 2018.
20. DECORTE, B. L. "Underexplored Opportunities for Natural Products in Drug Discovery". 2016 doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00473.
21. HOU, X., SUN, M., BAO, T., XIE, X. & WEI, F. "Recent advances in screening active components from natural products based on bioaffinity techniques". *Acta Pharm. Sin. B*, **10**, 1800–1813, 2020.
22. RAMATAPA, T. *ET AL.* "Identification of Plant-Derived Bioactive Compounds Using Affinity Mass Spectrometry and Molecular Networking". *Metabolites*, **12**, 2022.
23. WANG, Z. *ET AL.* "Comprehensive TCM molecular networking based on MS/MS in silico spectra with integration of virtual screening and affinity MS screening for discovering functional ligands from natural herbs". *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 5785–5797, 2019.
24. PILON, A. C. *ET AL.* "Quim. Nova,". **44**, 1168–1179, 2021.

25. ALLARD, P. M., GENTA-JOUVE, G. & WOLFENDER, J. L. "Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification". *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **36**, 40–49, 2017.
26. SILVA, E. *ET AL.* "Untargeted Metabolomics Analysis by UHPLC-MS / MS of Soybean Plant in a Compatible Response to *Phakopsora pachyrhizi* Infection". 2021.
27. ID, M. M. P. T. *ET AL.* "Metabolomic study of marine *Streptomyces* sp .: Secondary metabolites and the production of potential anticancer compounds". 1–19, 2020 doi:10.1371/journal.pone.0244385.
28. WOLFENDER, J. L., NUZILLARD, J. M., VAN DER HOOFT, J. J. J., RENAULT, J. H. & BERTRAND, S. "Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography-High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in Silico Databases, and Chemometrics". *Anal. Chem.*, **91**, 704–742, 2019.
29. CORTELO, C. *ET AL.* "A Molecular Networking Strategy : High-Throughput Screening and Chemical Analysis of Brazilian Cerrado Plant Extracts against Cancer Cells". 1–13, 2021.
30. WANG, M. *ET AL.* "Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking". *Nat. Biotechnol.*, **34**, 828–837, 2016.
31. BREEMEN, R. B. VAN *ET AL.* "Cannabinoids Block Cellular Entry of SARS-CoV-2 and the Emerging Variants". 2022.
32. GURARD-LEVIN, Z. "How ASMS offers more than seeing what sticks - Drug Discovery World (DDW)". 3–15, 2022.
33. MCLAREN, D. G. *ET AL.* "High-Throughput Mass Spectrometry for Hit Identification: Current Landscape and Future Perspectives". *SLAS-DISCOVERY*, **26**, 168–191, 2021.
34. BURTON, T. C. J. *ET AL.* "Phytochemistry Letters Isolation and elucidation of two isoflavonoids from an American Indian plant , *Amorpha canescens* Pursh , using Magnetic Microbead Affinity Selection Screening ( MagMASS ) for estrogen receptor alpha ligands". *Phytochem. Lett.*, **45**, 110–116, 2021.
35. LI, D., XU, L., QI, J. & YU, B. "Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Screening and analysis of cyclooxygenase-2 inhibitors from the complex matrix: A case study to illustrate the important effect of immobilized enzyme activity in magnetic ligand fishing". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **175**, 112795, 2019.

36. YUAN, Y., BAI, X., LIU, Y., TANG, X. & YUAN, H. "Analytica Chimica Acta Ligand fishing based on cell surface display of enzymes for inhibitor screening". *Anal. Chim. Acta*, **1156**, 338359, 2021.
37. FARIA, R. A. DE *ET AL.* "High-resolution inhibition profiling and ligand fishing for screening of nucleoside hydrolase ligands in *Moringa oleifera* Lamarck". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **211**, 114614, 2022.
38. LIMA, J. M. DE, FURLANI, L., GUIMAR, R., VALVERDE, L. & BEZERRA, Q. "Analytical Methods beads in a ligand fishing assay". 4116–4122, 2020 doi:10.1039/D0AY01269F.
39. YE, L., ZHANG, R. & CAO, J. "Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Screening of  $\alpha$ -secretase inhibitors from *Dendrobii Caulis* by covalently enzyme-immobilized magnetic beads coupled with ultra-high-performance liquid chromatography". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **195**, 113845, 2021.
40. ZHANG, Y. *ET AL.* "Rapid screening and identification of monoamine oxidase-A inhibitors from *Corydalis Rhizome* using enzyme-immobilized magnetic beads based method". *J. Chromatogr. A*, **1592**, 1–8, 2019.
41. DE MORAES, M. C., VANZOLINI, K. L., CARDOSO, C. L. & CASS, Q. B. "New trends in LC protein ligand screening". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **87**, 155–166, 2014.
42. HUI, G. *ET AL.* "Screening of lipase inhibitors from bamboo leaves based on the magnetic ligand fishing combined with HPLC / MS". **153**, 2–6, 2020.
43. GKANTZOU, E., PATILA, M. & STAMATIS, H. "Magnetic Microreactors with Immobilized Enzymes — From Assemblage to Contemporary Applications". 2018 doi:10.3390/catal8070282.
44. FIRER, M. A. "Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography". 433–442, 2001.
45. BILAL, M., ZHAO, Y., RASHEED, T. & IQBAL, M. N. "International Journal of Biological Macromolecules Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization : A review". **120**, 2530–2544, 2018.
46. JOÃO, B. C. P. *ET AL.* *Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4* (2017). doi:10.5151/9788521211150-15.
47. GIOVANNA CACCIAPUOTI; COSTANZO BERTOLDO; ASSUNTA BRIO; VINCENZO ZAPPIA; MARINA PORCELLI. "Purification and characterization of 5'-methylthioadenosine phosphorylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*". *Extremophiles*, **7**, 159–168, 2003.
48. SOUZA, J. R. T. DE. "Determinação estrutural e funcional da enzima 5'-

- deoxi-5'-metiltioadenosina Fosforilase de Schistosoma mansoni.". (2012).
49. PAGIATTO, L. *ET AL.* "MODULAÇÃO DA INFECÇÃO MURINA PELAS ENZIMAS RECOMBINANTES MTAP E APRT DE Schistosoma mansoni". (2016).
  50. ABID, H., HARIGUA-SOUAI, E., MEJRI, T., BARHOUMI, M. & GUIZANI, I. "Leishmania infantum 5'-Methylthioadenosine Phosphorylase presents relevant structural divergence to constitute a potential drug target". *BMC Struct. Biol.*, **17**, 1–17, 2017.
  51. TORINI, J. R., BRANDÃO-NETO, J., DEMARCO, R. & PEREIRA, H. D. M. "Crystal Structure of Schistosoma mansoni Adenosine Phosphorylase/5'-Methylthioadenosine Phosphorylase and Its Importance on Adenosine Salvage Pathway". *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **10**, 1–25, 2016.
  52. PHAM, K. *ET AL.* "Acta Tropica Effects of Schistosoma mansoni and praziquantel treatment on the lower gastrointestinal mucosa : A cohort study in Tanzania". *Acta Trop.*, **238**, 106752, 2023.
  53. ABOU-EL-NAGA, I. F. *ET AL.* "Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases Biological and proteomic studies of Schistosoma mansoni with decreased sensitivity to praziquantel". *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **66**, 101341, 2019.
  54. SOUZA, J. R. T. DE. "Caracterização estrutural e funcional de duas Nucleosídeo Fosforilases de Schistosoma mansoni". (2016).
  55. MAN, C. "European Journal of Medicinal Chemistry Reports The use of heterocyclic-based azo compounds bearing pyrrolidine , imidazole , triazole , and thiazole moieties for the treatment of neglected tropical disease caused by Schistosoma mansoni". **1**, 2021.
  56. MIRANDA, G. S. *ET AL.* "New challenges for the control of human schistosomiasis: The possible impact of wild rodents in Schistosoma mansoni transmission". *Acta Trop.*, **236**, 106677, 2022.
  57. JEFFERSON A. ROCHA, NAYRA C. S. REGO, BRUNA T. S. CARVALHO, FRANCISCO I. SILVA, JOSE A. SOUSA, RICARDO M. RAMOS, IONARA N. G. PASSOS, JOSUÉ DE MORAES, JOSE R. S. A. LEITE, F. C. A. L. "Computational quantum chemistry, molecular docking, and ADMET predictions of imidazole alkaloids of Pilocarpus microphyllus with schistosomicidal properties". *PLoS One*, **13**, e0198476, 2018.
  58. CRABTREE, G. W. & SENFT, A. W. "Pathways of nucleotide metabolism in Schistosoma mansoni-V Adenosine cleavage enzyme and effects of purine analogues on adenosine metabolism in vitro". *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 649–660, 1974.

59. SENFT, A. W. & CRABTREE, G. W. "Pathways of nucleotide metabolism in schistosoma mansoni-VII. Inhibition of adenine and guanine nucleotide synthesis by purine analogs in intact worms". *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 1847–1856, 1977.
60. SENFT, A. W., C. G. W. "PURINE METABOLISM IN THE SCHISTOSOMES: POTENTIAL TARGETS FOR CHEMOTHERAPY A". *Pharmac. Ther.*, **20**, 341–356, 1983.
61. SENFT, A. W. *ET AL.* "Pathways of nucleotide metabolism in Schistosoma mansoni-III. Identification of enzymes in cell-free extracts". *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 449–458, 1973.
62. SENFT, A. W., MIECH, R. P., BROWN, P. R. & SENFT, D. G. "Purine metabolism in Schistosoma mansoni". *Int. J. Parasitol.*, **2**, 249–260, 1972.
63. ALFRED W. SENFT, DEBORAH G. SENFT, R. P. M. "Pathways of nucleotide metabolism in schistosoma mansoni—VII". *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 437–447, 1973.
64. J. R. STEGMAN, ALFRED W. SENFT, PHYLLIS R. BROWN, ROBERT E. PARKS, J. "INCORPORATION OF ADENOSINE ANALOGS IN VITRO". *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 459–468, 1973.
65. HARRY F. DOVEY, JAMES H. MCKERROW, C. C. W. "PURINE SALVAGE IN SCHISTOSOMA MANSONI SCHISTOSOMULES". *Mol. Biochem. Parasitol.*, **11**, 157–167, 1984.
66. VANZOLINI, K. L., VIEIRA, L. C. C., CORRÊA, A. G., MOADDEL, R. & CASS, Q. B. "Acetylcholinesterase immobilized on modified magnetic beads as a tool for screening a compound library". *Microchim. Acta*, **182**, 2209–2213, 2015.
67. KLENOW, H. "The enzymic oxidation and assay of adenine". *Biochem. J.*, **50**, 404–407, 1951.
68. PEGG, A. E. & WILLIAMS-ASHMAN, H. G. "Phosphate-stimulated breakdown of 5'-methylthioadenosine by rat ventral prostate". *Biochem. J.*, **115**, 241–247, 1969.
69. BUCKOREELALL, K., WILSON, L. & PARKER, W. B. "Identification and characterization of two adenosine phosphorylase activities in *Mycobacterium smegmatis*". *J. Bacteriol.*, **193**, 5668–5674, 2011.
70. KRUGER, N. J. "Errors and artifacts in coupled spectrophotometric assays of enzyme activity". *Phytochemistry*, **38**, 1065–1071, 1995.
71. CASS, QUEZIA B.; CASSIANO, N. M. *Cromatografia Líquida - Novas Tendências e Aplicações*. (2015).

72. JANDERA, P. "Analytica Chimica Acta Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography : a review". **692**, 1–25, 2011.
73. WATERS. "No Title". [https://www.waters.com/waters/pt\\_BR/Retenção-de-compostos-polares/nav.htm?cid=513211&locale=pt\\_BR](https://www.waters.com/waters/pt_BR/Retenção-de-compostos-polares/nav.htm?cid=513211&locale=pt_BR).
74. CASSIANO, N. M. *ET AL.* "Revisão". **32**, 1021–1030, 2009.
75. PEREIRA, FABIOLA MANHAS VERBI; PEREIRA-FILHO, E. R. "APLICAÇÃO DE PROGRAMA COMPUTACIONAL LIVRE EM PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS: UM TUTORIAL". *Quim. Nov.*, **41**, 1061–1071, 2018.
76. ANDRICOPULO, A. D., CASS, Q. B. & OLIVA, G. "Structural Insights into the Molecular Basis Responsible for the Effects of Immobilization on the Kinetic Parameters of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from". **21**, 1845–1853, 2010.
77. AMARAL, B. S. *ET AL.* "Phosphoenolpyruvate carboxykinase from *T. cruzi* magnetic beads affinity-based screening assays on crude plant extracts from Brazilian Cerrado". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 113710, 2020 doi:10.1016/j.jpba.2020.113710.
78. IZIDORO, J. *ET AL.* "Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors". **73**, 44–52, 2013.
79. MANUSCRIPT, A. *ET AL.* "RSC Advances". doi:10.1039/x0xx00000x.
80. CARDOSO, C. L. *ET AL.* "Development and characterization of an immobilized enzyme reactor ( IMER ) based on human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for on-line enzymatic studies". **1120**, 151–157, 2006.
81. MODENEZ, I. A., SASTRE, D. E., MOARES, F. C. & MARQUES NETTO, C. G. C. "Influence of dlutaraldehyde cross-linking modes on the recyclability of immobilized lipase b from *Candida antarctica* for transesterification of soy bean oil". *Molecules*, **23**, 2018.
82. WAN, W., LIN, Y., PRAKASH, A. & ZHOU, Y. "Three-dimensional carbon-based architectures for oil remediation: from synthesis and modification to functionalization". *J. Mater. Chem. A*, **4**, 18687–18705, 2016.
83. CHUI, W. K. & WAN, L. S. C. "Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres". *J. Microencapsul.*, **14**, 51–61, 1997.
84. RISSO, F. V. A. *ET AL.* "Comparative studies of the stability of free and immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* nr11 y-7571 in aqueous-organic solutions". *Brazilian J. Chem. Eng.*, **27**, 507–516, 2010.

85. RODRIGUES, R. C., ORTIZ, C., BERENQUER-MURCIA, Á., TORRES, R. & FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. "Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization". *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 6290–6307, 2013.
86. SAVARESE, T. M. & EL KOUNI, M. H. "Isolation and substrate specificity of an adenine nucleoside phosphorylase from adult *Schistosoma mansoni*". *Mol. Biochem. Parasitol.*, **194**, 44–47, 2014.
87. DA SILVA, L. R. G. "LC-HRMS E MODELOS QUIMIOMÉTRICOS COMO FERRAMENTAS PARA TRIAGEM DE AMOSTRAS DE *Topsentia ophiraphidites*". (UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, 2022).
88. LEAL, M. C. & CALADO, R. "Marine Natural Products : Biodiscovery , Biodiversity , and Bioproduction". 2015.
89. SNELGROVE, P. V. R. "An Ocean of Discovery : Biodiversity Beyond the Census of Marine Life".
90. PILON, A. C. *ET AL.* "METABOLÔMICA DE PLANTAS: MÉTODOS E DESAFIOS". *Quim. Nov.*, **43**, 329–354, 2020.
91. IVANOVA, V., ORIOL, M., MONTES, M.-J., GARCÍA, A. & GUINEA, J. "Secondary Metabolites from a *Streptomyces* Strain Isolated from Livingston Island , Antarctica". *Z Naturforsch C J Biosci.*, **56**, 4–8, 2001.
92. TANAKA, J. *ET AL.* "New polyoxygenated steroids exhibiting reversal of multidrug resistance from the gorgonian *Isis hippuris*". **58**, 6259–6266, 2002.
93. ABDELKAREM, F. M. *ET AL.* "Chemical Review of Gorgostane-Type Steroids Isolated from Marine Organisms and Their <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopic Data Characteristics". *Mar. Drugs*, **20**, 2022.
94. UDDIN, M. H. *ET AL.* "Four new polyoxygenated gorgosterols from the gorgonian *Isis hippuris*". *Nat. Prod. Res.*, **6419**, 2011.
95. PEREIRA, M. DE M., JÁCOME, R. L. R. P., ALCÂNTARA, A. F. DE C., ALVES, R. B. & RASLAN, D. S. "ALCALÓIDES INDÓLICOS ISOLADOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Aspidosperma* (APOCYNACEAE)". *Quim. Nov.*, **30**, 970–983, 2007.
96. CONSOLARO, H., ALVES, M., FERREIRA, M. & VIEIRA, D. *Sementes, plântulas e restauração do sudeste goiano*. (2019).
97. KACHLICKI, P., PIASECKA, A., STOBIECKI, M. & MARCZAK, Ł. "Structural Characterization of Flavonoid Glycoconjugates and Their Derivatives with Mass Spectrometric Techniques". 1–21, 2016 doi:10.3390/molecules21111494.

98. CHEN, Y. *ET AL.* "Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen Typhae for Transformation". 18352–18366, 2015 doi:10.3390/molecules201018352.
99. FABRE, N. & RUSTAN, I. "Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry". **0305**, 2001.
100. PEIXOTO, M. A. *ET AL.* "Kopsanone and N-oxide isolated from *Aspidosperma macrocarpon* Mart . ( Apocynaceae ) leaves and their MAO-A inhibitory activity". *Nat. Prod. Res.*, **0**, 1–5, 2020.
101. OLIVEIRA, V. B., FREITAS, M. S. M., MATHIAS, L., BRAZ-FILHO, R. & VIEIRA, I. J. C. "Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* ( Apocynaceae ): uma revisão". **11**, 92–99, 2009.
102. PESSINI, G. L. "ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ESTUDO QUÍMICO BIOGUIADO DE ESPÉCIES DE ASPIDOSPERMA". (Universidade Federal do Alagoas, 2015).
103. LAYNE, T. H., ROACH, J. S. & TINTO, W. F. "Review of  $\beta$  -carboline Alkaloids from the Genus *Aspidosperma*". 1990–1993, 2015 doi:10.1177/1934578X1501000139.
104. DEMARQUE, D. P., CROTTI, A. E. M., VESSECCI, R., LOPES, J. L. C. & LOPES, N. P. "Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products". **33**, 2016.
105. LOPES, N. P., CASTRO-GAMBOA, I., NETO, F. C., ESTADUAL, U. & UNESP, P. "Mass Spectral Similarity Networking and Gas-Phase Fragmentation Reactions in the Structural Analysis of Flavonoid Glycoconjugates". *Anal. Chem.*, **91**, 10413–10423, 2019.
106. BANNWART, G. *ET AL.* "Antiproliferative Activity and Constituents of *Aspidosperma macrocarpon* ( Apocynaceae ) Leaves". **2**, 137–140, 2013.