



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JONATAS MARTINS NEGREIRO

**ESTUDO *IN SILICO* DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA LIPASE DE *Fusarium*
oxysporum f. sp. *tracheiphilum* NA BIOCONVERSÃO DO DITERPENO
ANNONALIDA E SEUS DERIVADOS ACILADOS**

FORTALEZA

2021

JONATAS MARTINS NEGREIRO

ESTUDO *IN SILICO* DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA LIPASE DE *Fusarium oxysporum*
f. sp. *tracheiphilum* NA BIOCONVERSÃO DO DITERPENO ANNONALIDA E SEUS
DERIVADOS ACILADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira.

Coorientador: Prof. Dr. Geancarlo Zanatta.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N31e Negreiro, Jonatas Martins.

Estudo in silico da atividade catalítica da lipase de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* na bioconversão do diterpeno annonalida e seus derivados acilados / Jonatas Martins Negreiro. – 2021.
84 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira.

Coorientação: Prof. Dr. Geancarlo Zanatta.

1. Annonalida. 2. *Fusarium oxysporum*. 3. Lipase. 4. Ancoramento molecular. 5. Dinâmica molecular. I. Título.

CDD 540

JONATAS MARTINS NEGREIRO

ESTUDO *IN SILICO* DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA LIPASE DE *Fusarium oxysporum*
f. sp. *tracheiphilum* NA BIOCONVERSÃO DO DITERPENÓ ANNONALIDA E SEUS
DERIVADOS ACILADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Maria da Conceição F. Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Geancarlo Zanata
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pedro de Lima Neto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ricardo de Araújo Marques
Faculdade Barão do Rio Branco (UNINORTE)

Dedico este trabalho à minha referência em termos de força, honestidade e sensibilidade, *Maria Joana Martins Negreiro* – minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é demonstrar gratidão com as pessoas que foram essenciais nesta caminhada. Assim, primeiramente agradeço a Deus pelo privilégio de sentir sua presença em minha vida e por todas as oportunidades de conquistas pessoais. A Ele, toda honra e glória.

À minha mãe, Maria Joana Martins Negreiro, minha maior referência em termos de amor e perseverança. Sempre nos momentos mais difíceis me incentivou a nunca desistir.

À minha família: meu pai Sebastião, irmã Renata Lee e irmão Jonas Sales, sempre estiveram ao meu lado tornando os dias mais agradáveis.

À minha família que mora no Pará, minha avó Socorro, meu irmão e sua esposa Josivan e Dayanne, meu tio Fernando e minha prima, esposo e filha: Michele, Chagas e Amanda, só foi possível chegar ao fim dessa jornada graças a vocês, meu muito obrigado!

À Larissa Lara, pela sua amizade, carinho, companheirismo, apoio e compreensão, uma confidente que me acompanhou durante todo esse percurso.

À Naara Fróes, amiga que o mestrado me deu, com você essa jornada se tornou mais agradável. Compartilhamos durante esse percurso gargalhadas, confissões, angústias, medo e principalmente esperança que iríamos chegar até o fim. Obrigado por tudo!

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria da Conceição F. Oliveira, pelo incentivo constante, por ter acreditado em mim, pelo conhecimento transmitido e por todo o apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Geancarlo Zanatta, pelo exemplo de profissional, pela orientação, paciência, colaboração e por todo o conhecimento transmitido ao longo desse período. Abração e meu muito obrigado!

À Profa. Dra. Fátima Miranda, por sempre nos compreender e sempre estar disposta a ajudar.

A todos os companheiros que fizeram ou fazem parte da família Labs, pela amizade, ajuda e apoio. Todos foram importantes nesta conquista.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial ao Programa de Pós-graduação em Química por todo o suporte.

A todo o corpo docente da Química pela dedicação e esforço para ensinar os alunos.

Pesquisa desenvolvida junto ao Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho, instalado na Universidade Federal do Ceará e CESUP-UFRGS.

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

Muito obrigado a todos!

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

*Tudo que Deus faz é bom.
Tudo o que Deus permite é necessário.*
(Jó 2:10)

O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.
Albert Einstein

RESUMO

Estudos previamente realizados no nosso grupo de pesquisa revelaram o potencial enzimático do fungo filamentosso *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (cepa UFCM 0089) na biotransformação do produto natural annonalida (**1**), isolado das raízes da planta *Casimirella ampla* e dos seus derivados semissintéticos *O*-acilados (**4-7**) na cadeia lateral. A formação dos produtos e suas proporções, bem como a atividade enzimática do fungo, mostraram-se dependentes da presença do grupo acila na molécula, bem como do tamanho da cadeia lipofílica. Em todos os casos, a enzima lipase do fungo teve um papel importante na formação dos produtos. Assim, este trabalho envolveu o estudo *in silico* da atividade catalítica da lipase na bioconversão de **1**, **4-7** para auxiliar no entendimento dos resultados experimentais obtidos. Utilizando-se a sequência primária da lipase do fungo *F. oxysporum* e as coordenadas cristalográficas da lipase de TLL (PDB ID: 1EIN), foram utilizadas técnicas de modelagem molecular por homologia para obter-se a estrutura tridimensional da lipase de *F. oxysporum*. A conformação final modelada foi empregada nas etapas de ancoramento molecular, juntamente com as moléculas (substratos) a serem investigadas. Dentre os resultados obtidos, foi possível caracterizar o modo de interação enzima-substrato, selecionando-se as poses que seguiram os critérios do NAC. Por fim, os complexos (enzima-substrato) selecionados passaram pelo processo de acoplamento induzido, o qual permitiu o ajuste complementar entre as conformações da enzima e dos substratos, mimetizando o processo observado *in vitro*. Os resultados teóricos corroboraram os experimentais, evidenciando que o aumento da cadeia carbônica do grupo acila na cadeia lateral dos substratos investigados (**1**, **4-7**) aumenta a atividade da lipase do fungo *F. oxysporum*. As simulações de acoplamento induzido confirmaram a estabilidade de algumas das conformações obtidas no *docking* molecular, revelando as conformações **Lig1_conf1**, **Lig5_conf1**, **Lig6_conf1** e **Lig7_conf1** como sendo as mais estáveis. A conformação **Lig4_conf1** mostrou baixa estabilidade comparada às dos demais substratos. Os cálculos de MM-PBSA permitiram estimar a afinidade dos complexos biomoleculares e mostraram que o aumento da cadeia acila lateral do substrato aumentava a atividade da lipase. Todos estes resultados corroboraram os experimentais de biotransformação dos substratos por células em crescimento do fungo.

Palavras-chave: annonalida; *Fusarium oxysporum*; lipase; ancoramento molecular; dinâmica molecular.

ABSTRACT

Previous studies carried out in our research group revealed the enzymatic potential of the filamentous fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (strain UFCM 0089) in the biotransformation of the natural product annonalide (**1**), isolated from the roots of the plant species *Casimirella ampla*, and its *O*-acyl semi-synthetic derivatives (**4-7**) in the side chain. The formation of the products and their proportions, as well as the enzymatic activity of the fungus, were dependent on the presence of the acyl group in the molecule, besides the size of the lipophilic chain. In all cases, fungal lipase activity played an important role on the product formation. Thus, the *in silico* study on the activity of lipase in the bioconversion of **1**, **4-7** was carried out to help the understanding of the experimental results. Using the primary sequence of the lipase from the fungus *F. oxysporum* and the crystallographic coordinates of the lipase from TLL (PDB ID: 1EIN), molecular homology modeling techniques were used to obtain the three-dimensional structure of the lipase from *F. oxysporum*. The final modeled conformation was used in the molecular anchoring steps, together with the molecules (substrates) to be investigated. Among the obtained results, it was possible to characterize the enzyme-substrate interaction mode, selecting the poses that followed the NAC criteria. Finally, the selected complexes (enzyme-substrate) went through the induced coupling process, which allowed the complementary adjustment between the enzyme and substrate conformations, mimicking the process observed *in vitro*. The theoretical results corroborate the experimental ones, showing that the increase in the carbon chain of the acyl group in the side chain of the investigated substrates (**1**, **4-7**) increases the lipase activity of the fungus *F. oxysporum*. Then, the induced coupling simulations confirmed the stability of some of the conformations obtained in the molecular docking, revealing the **Lig1_conf1**, **Lig5_conf1**, **Lig6_conf1** and **Lig7_conf1** conformations as being the most stable. The **Lig4_conf1** conformation showed low stability compared to the other substrates. The MM-PBSA calculations allowed to estimate the affinity of the biomolecular complexes and showed that the increase in the acyl side chain of the substrate increased the lipase activity. All these results corroborated the experimental biotransformation of substrates by growing cells of the fungus.

Keywords: annonalide; *Fusarium oxysporum*; lipase; molecular docking; molecular dynamic.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diagramas de energia livre de uma reação catalisada por enzimas (E) *versus* o de uma reação não catalisada.....23
- Figura 2 - Representação da estrutura química de um aminoácido (a) e dos níveis da estrutura proteica: primária (b), secundária (c), terciária (d) e quaternária (e).....24
- Figura 3 - Representação dos aminoácidos presentes no sítio ativo de uma enzima hipotética interagindo com o ligante.....24
- Figura 4 - Mecanismo de atuação das lipases.26
- Figura 5 - Duas conformações da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, fechada (a) (código PDB: 1DT3) e aberta (b) (código PDB: 1EIN). As tampas fechada e aberta, bem como a tríade catalítica, foram destacadas pelas cores laranja, magenta e amarelo, respectivamente.26
- Figura 6 - Representação estrutural dos diterpenos pimaranos annonalida (1) e acrenol (2).28
- Figura 7 - Representação estrutural da annonalida (1) e seus derivados semissintéticos.29
- Figura 8 - Biotransformação da annonalida (1) formando a *nor*-annonalida (3)30
- Figura 9 - Biotransformação dos derivados (4) *O*-acetilado, (5) *O*-propanoilado, (6) *O*-hexanoilado e (7) *O*-decanoilado, formando annonalida (1) pela atuação da lipase e formando acrenol (2), pela atuação do álcool desidrogenase (ADH).....30
- Figura 10 - Etapas teóricas da modelagem molecular comparativa para construção de modelos tridimensionais.32
- Figura 11 - Docking molecular: encaixe molecular entre o receptor-ligante.....33
- Figura 12 - Caixa *GridBox* ajustada para conter a tríade catalítica Ser174-Asp228-His287 e os ligantes annonalida (1) e seus derivados *O*-acilados 2-5.40
- Figura 13 - Caixa de simulação contendo as moléculas de água (vermelho), os íons cloreto (verde) e os íons sódio (roxo).41
- Figura 14 - Estruturas tridimensionais da annonalida (1) e seus derivados *O*-acilados (4-7)..44
- Figura 15 - Alinhamento de sequências do modelo N4UBQ9 com a estrutura cristalográfica 1EIN. A tríade catalítica conservada Ser174, Asp228 e His287 é representada com triângulos azuis. Em vermelho são representados os resíduos iguais e em amarelo os resíduos semelhantes.45
- Figura 16 - Sobreposição da estrutura molde da lipase do microrganismo *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* (PDB ID: 1EIN), em azul, e o modelo construído, em

verde. (A) Estruturas totais. (B) Sítio de ligação conservado, em magenta está representado a tríade catalítica.....	46
Figura 17 - Gráfico de Ramachandran da enzima modelada. As regiões favorecidas estão em vermelho (A, B, L), as regiões adicionais mais permissivas estão em amarelo (a, b, l, p), as regiões permissivas aparecem na cor bege (~a, ~b, ~l, ~p) e a região não permitida está representado pela cor branca.	47
Figura 18 - Gráfico de Ramachandran da lipase após otimização de energia em que as regiões favorecidas estão em vermelho (A, B, L), as regiões adicionais mais permissivas estão em amarelo (a, b, l, p), as regiões permissivas aparecem na cor bege (~a, ~b, ~l, ~p) e a região não permitida está representado pela cor branca.	48
Figura 19 - Interações intermoleculares observadas no sítio ativo da lipase modelada, envolvendo os resíduos da tríade catalítica Ser174-His287-Asp228.	49
Figura 20 - Conformação do liganteannonalida (1) no bolsão catalítico da enzima e interações intermoleculares com resíduos de aminoácidos.	50
Figura 21 - Interação do ligante <i>O</i> -acetilado (4) com o sítio ativo da enzima. Linhas pontilhadas verdes representam a ligação de hidrogênio formada com o oxianion Leu175.	51
Figura 22 - Interação do derivado <i>O</i> -propanoilado (5) com o sítio ativo da enzima: (A) Lig5_conf1; (B) Lig5_conf2 e (C) Lig5_conf3.....	52
Figura 23 - Interação do derivado <i>O</i> -hexanoilado (6) com o sítio ativo da enzima: (A) Lig6_conf1 e (B) Lig6_conf2.....	54
Figura 24 - Interação do derivado <i>O</i> -decanoilado (7) com o sítio ativo da enzima: (A) Lig7_conf1 e (B) Lig7_conf2. Linhas pontilhadas verdes representam a ligação de hidrogênio formada com o oxianion.....	55
Figura 25 - RMSD de 400ns para o ligante (1) Annonalida. Linha preta indica o ligante, na conformação Lig1_conf1, linha vermelha a proteína e em azul a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287	57
Figura 26 - Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo entre Ser-O e C19. (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C19/O do ligante 1 e conformação Lig1_conf1.....	58
Figura 27 - RMSD e perfil de distância ao logo da simulação longa de 1000ns. (A) RMSD em que a linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante 4 na conformação Lig4_conf1 e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo, em que a	

	linha vermelha indica a distância entre Ser-O e C21 e a linha preta indica a distância entre Ser-O e C19.	59
Figura 28 -	Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo Ser-O e C21; (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante 4 na conformação Lig4_conf1.....	60
Figura 29 -	RMSD e perfil de distância ao longo da simulação longa de 1000ns. (A) RMSD em que a linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante 5 na conformação Lig5_conf1 e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo, em que a linha vermelha indica a distância entre Ser-O e C21 e a linha preta indica a distância entre Ser-O e C19.	61
Figura 30 -	Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo Ser-O e C21; (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante 5, conformação Lig5_conf1.....	62
Figura 31 -	RMSD e perfil de distância ao longo da simulação longa de 700ns. (A) RMSD em que a linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante 5 na conformação Lig5_conf2 e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo, em que a linha vermelha indica a distância entre Ser-O e C21 e a linha preta indica a distância entre Ser-O e C19.	63
Figura 32 -	Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo Ser-O e C21; (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante 5 e conformação Lig5_conf2.....	64
Figura 33 -	RMSD e perfil de distância ao longo da simulação de 500ns. (A) RMSD em que linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante (5) na conformação Lig5_conf3 e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo, em vermelho indica a distância entre o Ser-O e C21 e em preto a distância entre Ser-O e C19.	65
Figura 34 -	Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo entre Ser-O e C21 (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante 5 e conformação Lig5_conf3.....	66
Figura 35 -	RMSD e perfil de distância ao longo da simulação de 700 ns. (A) RMSD em que linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante 6 na conformação Lig6_conf1 e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos	

	Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo em vermelho indica a distância entre o Ser-O e C21 e em preto a distância entre Ser-O e C19.	67
Figura 36 -	Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo entre Ser-O e C21; (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante 6 e conformação Lig6_conf1.....	68
Figura 37 -	RMSD e perfil de distância ao longo da simulação de 700ns. (A) RMSD em que linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante 6 na conformação Lig6_conf2 e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo em vermelho indica a distância entre o Ser-O e C21 e em preto a distância entre Ser-O e C19.	69
Figura 38 -	Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo entre Ser-O e C21; (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante 6 e conformação Lig6_conf2.....	70
Figura 39 -	RMSD e perfil de distância ao longo da simulação de 700ns. (A) RMSD em que a linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante 7 na conformação Lig7_conf1 e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo, em que a linha vermelha indica a distância entre Ser-O e C21 e a linha preta indica a distância entre Ser-O e C19.	71
Figura 40 -	Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo e (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante 7 e conformação Lig7_conf1.	72
Figura 41 -	RMSD e perfil de distância ao longo da simulação de 700ns. (A) RMSD em que a linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante 7 na conformação Lig7_conf2 e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo, em que a linha vermelha indica a distância entre Ser-O e C21 e a linha preta indica a distância entre Ser-O e C19.	73
Figura 42 -	Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo e (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante 7 e conformação Lig7_conf2.	74
Figura 43 -	Enzima e perfil de distância. (A) Receptor na conformação ativa, cor magenta aminoácidos da tampa (Ile115 e Ala285). (B) Perfil de distância entre os	

aminoácidos Ile115 e Ala285 para acetilado (4) durante simulação longa de 1000
ns.....76

Figura 44 - Perfil de distância entre Ile115 e Ala285 para o derivado *O*-decanoilado (7).....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das enzimas de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB). E.C.= <i>Enzyme Commission</i>	25
Tabela 2 - Resultados do diagrama de Ramachandran da proteína modelada.....	47
Tabela 3 - Resultados do diagrama de Ramachandran da lipase após minimização de energia.....	48
Tabela 4 - Valores de energia de ligação pelo método MM-PBSA para as conformações que teve sua estabilidade confirmada por DM (valores em kJ/mol).	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Asp	Aspartato
C- α	Carbono Alfa
DM	Dinâmica Molecular
EC	<i>Enzyme Commission Numbers</i>
ET	Estado de Trasição
Glu	Glutamato
His	Histidina
NAC	<i>Near Attack Conformation</i>
P	Produto
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RMSD	<i>Root-Mean-Square Desviation</i>
S	Substrato
Ser	Serina
Ser-O	Oxigênio da Serina
UniProt	Banco de dados de sequências primárias de proteínas
$\Delta G^{\ddagger}_{\text{cat}}$	Energia livre de ativação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	ESTADO DA ARTE	22
3.1	Biocatálise e enzimas	22
3.2	Lipases	25
3.3	Fungos como produtores de lipases	27
3.3.1	<i>Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum (Fot) (E.F. Smith) W.C. Snyder & H.N. Hansen</i>	27
3.4	Annonalida e derivados: resultados preliminares do grupo	28
3.5	Técnicas teóricas	31
3.5.1	<i>Modelagem molecular por homologia</i>	31
3.5.2	<i>Ancoramento molecular</i>	32
3.5.3	<i>Dinâmica molecular (DM)</i>	33
3.5.4	<i>MM/PBSA</i>	35
4	METODOLOGIA	38
4.1	Recursos computacionais	38
4.2	Modelagem molecular comparativa	38
4.3	Obtenção das estruturas tridimensionais (3D) dos ligantes	38
4.4	Protonação e minimização da proteína	39
4.5	<i>Docking</i> molecular	39
4.6	Simulação de dinâmica molecular (DM)	40
4.6.1	<i>Preparação</i>	41
4.6.2	<i>Minimização e equilíbrio do sistema</i>	41
4.6.3	<i>Produção da dinâmica molecular</i>	42
4.7	MM/PBSA	42

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Estruturas dos substratos	43
5.2	Modelagem molecular	43
5.3	Minimização de energia para a melhoria da qualidade do modelo	47
5.4	Ancoramento molecular	49
5.4.1	<i>Análise do ancoramento para o liganteannonalida (1)</i>	50
5.4.2	<i>Análise do ancoramento para o ligante O-acetilado (4)</i>	50
5.4.3	<i>Análise do ancoramento para o ligante O-propanoilado (5)</i>	51
5.4.4	<i>Análise do ancoramento para o ligante O-hexanoilado (6)</i>	53
5.4.5	<i>Análise do ancoramento para o ligante O-decanoilado (7)</i>	54
5.5	Dinâmica molecular (DM)	56
5.5.1	<i>Análise da DM para o ligante 1</i>	57
5.5.2	<i>Análise da DM para o ligante 4</i>	58
5.5.3	<i>Análise da DM para o ligante 5</i>	60
5.5.4	<i>Análise da DM para o ligante 6</i>	66
5.5.5	<i>Análise da DM para o ligante 7</i>	70
5.6	Estimativa de energia de interação	74
6	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores muito eficientes e seletivos, que apresentam diversas vantagens em relação aos catalisadores químicos convencionais (CARVALHO, 2012; OTTOSSON, 2001). A partir do conhecimento da estrutura tridimensional desses biocatalisadores, é possível investigar o mecanismo catalítico, bem como propor o emprego de determinadas enzimas em uma dada reação química. Nesse contexto, as ferramentas computacionais, como a bioinformática estrutural, ganham destaque já que permitem explicar quais tipos de conformações, interações e ligações podem estar envolvidas entre a enzima e o substrato (CURADO-CARBALLADA; FEIXAS; OSUNA, 2019).

Durante o estudo de mecanismos catalíticos, a utilização de dados tridimensionais da estrutura enzimática em simulações computacionais é de fundamental importância, pois fornece informações em nível atômico acerca das interações das moléculas com os resíduos de aminoácidos na enzima. Contudo, a utilização de modelos estruturais estáticos, muitas vezes mascaram a interação entre enzima-ligante por tratarem ambos como corpos rígidos. Para contornar esta limitação, técnicas de amostragem estrutural computacional geralmente são empregadas, bem como simulações que mimetizam o processo de acoplamento induzido entre a enzima e o substrato. As coordenadas espaciais de proteínas podem ser obtidas por técnicas experimentais, tais como a difração de raios-X, ressonância magnética nuclear (RMN) e microscopia eletrônica criogênica (CRYO-EM). Alternativamente, na ausência de dados experimentais, técnicas computacionais de modelagem por homologia podem ser empregadas. Na modelagem por homologia, é necessário (i) conhecer-se a sua sequência primária da proteína de interesse, (ii) e identificar a estrutura terciária de outra proteína (com sequência primária similar), para servir de modelo estrutural (ALLAN SVENDSEN, 2016; SILVA, VIVIANE APARECIDA DA, 2017; SOUZA, 2012).

O ancoramento molecular (do inglês, *docking*) é uma das técnicas computacionais mais importantes na bioinformática, pois permite compreender as interações envolvidas no complexo enzima-substrato (BARROS, 2015; SOUZA, 2012). Esta técnica é baseada em algoritmos de busca e funções de pontuação de energia (*scoring*), a última levando em consideração a energia de ligação entre receptor-ligante na busca dos melhores modos de ligação. De acordo com o tratamento dado ao sistema, as simulações de *docking* podem ser classificadas como: (i) *docking* rígido, quando tanto o ligante quanto o receptor são tratados como corpos rígidos; (ii) semi-flexível, quando o ligante é tratado com um corpo flexível e receptor como um corpo rígido; (iii) flexível, quando ambos, o ligante e o receptor, são tratados

de forma flexível (SILVA, 2017). A partir da técnica de *docking* molecular pode-se determinar a melhor conformação que se encaixa no sítio ativo do alvo de interesse, compreendendo as interações envolvidas, tais como interações hidrofóbicas, eletrostática e ligações de hidrogênio, entre outras (BARROS, 2015; SOUZA, 2012).

A partir de simulações de dinâmica molecular (DM), é possível observar que, ao considerar a proteína como rígida, deixa-se de lado as flutuações térmicas dos átomos, as quais levariam a uma infinidade de “subestados conformacionais” da enzima (AMARO *et al.*, 2018). Neste sentido, durante simulações computacionais é fundamental buscar-se o equilíbrio da estrutura representativa da interação entre a enzima e o substrato pela técnica de acoplamento induzido, a qual permite avaliar a estabilidade das interações bem como os estados conformacionais em equilíbrio na presença de solvente. O acoplamento induzido se baseia na forma como o receptor (enzima) e o ligante (substrato) se ajustam entre si durante o reconhecimento molecular. O conceito dos estados conformacionais se baseia no emprego de um conjunto de conformações do receptor, com estruturas e energias similares, para posterior seleção da conformação que apresente menor energia na interação com o substrato (SILVEIRA, 2018).

Outros métodos computacionais podem ser utilizados para prever a afinidade de interação como MM-PBSA que calcula a energia de interação entre receptor-ligante. Esse método é muito utilizado para estudar complexos biomoleculares, permitindo prever a estabilidade relativa desses complexos (KUMARI *et al.*, 2014; SHAO *et al.*, 2021). A partir dos vários frames do sistema em equilíbrio é possível realizar os cálculos de MM/PBSA e estimar a energia de interação entre o receptor com ligante na presença de solvente. (KUMARI *et al.*, 2014):

Neste trabalho, foram empregadas as seguintes técnicas computacionais:

- (i) Modelagem molecular por homologia para o estabelecimento da estrutura tridimensional da lipase a ser investigada;
- (ii) *Docking* molecular para a seleção da melhor interação lipase-substrato;
- (iii) Dinâmica molecular para promover o acoplamento induzido e confirmar a estabilidade estrutural dos complexos obtidos na etapa de *docking* molecular.
- (iv) Cálculos de energia livre de interação através da técnica de MM/PBSA para melhor avaliar a energia de interação de cada complexo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo teórico da atividade catalítica da lipase do fungo *Fusarium oxysporum* na bioconversão do diterpeno annonalida e seus derivados *O*-acilados.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Obter modelos estruturais da lipase do fungo *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* através da técnica de modelagem molecular por homologia;
- ✓ Simular o mecanismo catalítico e a participação das modificações químicas do substrato na catálise;
- ✓ Identificar o potencial de interação entre a lipase do fungo e a annonalida e seus derivados *O*-acilados.

3 ESTADO DA ARTE

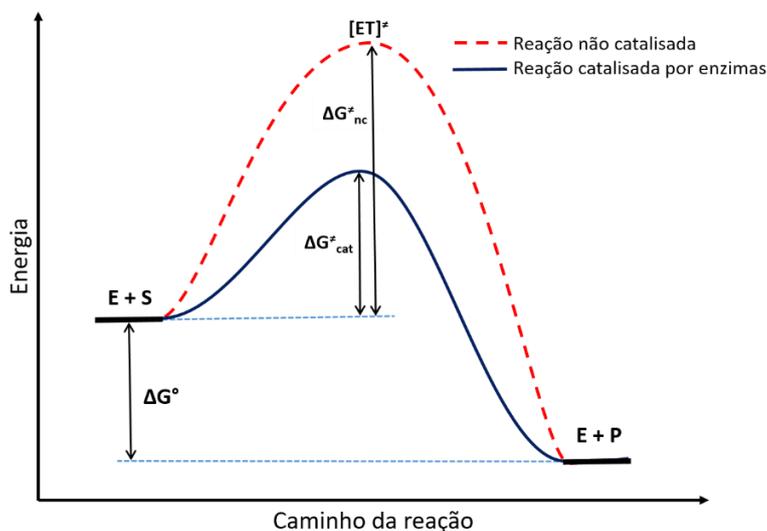
3.1 Biocatálise e enzimas

Nas últimas décadas, têm-se buscado novas estratégias de preparação de compostos químicos, ou até mesmo o aprimoramento das já existentes, visando sempre diminuir os impactos ao meio ambiente e à saúde humana (NASÁRIO, 2017; SOUSA, 2016). Dentre elas destaca-se a biocatálise, que consiste no uso de enzimas isoladas ou células inteiras de bactérias, fungos, microalgas e plantas, entre outras, como catalisadores em reações orgânicas (FERREIRA *et al.*, 2015; GARZÓN-POSSE *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018).

O emprego de enzimas como catalisadores apresenta algumas vantagens reacionais, tais como: formação do produto com alta seletividade (químio-, regio-, enantio- e diastereosseletividade); aceleração da reação em 10^6 a 10^{14} vezes, quando comparada com as reações não enzimáticas; emprego de condições brandas (pH neutro e temperatura ambiente), o que minimiza a ocorrência de reações indesejadas, e ambientalmente aceitáveis (enzimas são biodegradáveis) (CARVALHO, 2012).

A Figura 1 apresenta o diagrama de energia livre de uma reação realizada sob catálise enzimática *versus* o de uma reação não catalisada, onde é possível observar a coordenada das reações de conversão do substrato (S) em produto (P). É no estado de transição $[ET]^\ddagger$, pico máximo de energia, que ocorre o processo de quebra e formação de ligações. Assim, nas reações biocatalisadas, observa-se uma diminuição da energia livre de ativação (ΔG_{cat}^\ddagger) do $[ET]^\ddagger$, que leva ao aumento da velocidade da reação (FABER, 2011; PUNEKAR, 2018; SILVA, THIAGO BARCELLOS DA, 2011).

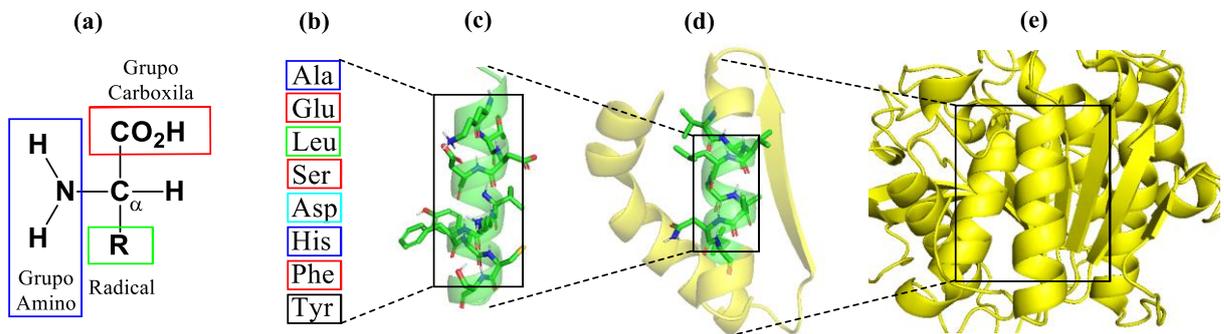
Figura 1 - Diagramas de energia livre de uma reação catalisada por enzimas (E) *versus* o de uma reação não catalisada.



Fonte: Adaptado de FABER, 2011; PUNEKAR, 2018.

Sendo em sua maioria proteínas, as enzimas são formadas por aminoácidos e têm massas molares de aproximadamente 15.000 a 1.000.000 Da (FABER, 2011). Exatamente 20 aminoácidos proteicos diferentes são encontrados nas suas estruturas, todos eles contendo os grupos carboxila e amino ligados ao mesmo átomo de carbono (C- α) da cadeia principal, variando-se apenas o grupo substituinte R ligado ao C- α (Figura 2a). Os aminoácidos, diferentes em estrutura, tamanho, carga elétrica e solubilidade em água, são unidos por ligações peptídicas, formando a estrutura proteica. A sequência exata de α -aminoácidos formando uma cadeia é chamado de estrutura primária (Figura 2b). Essa cadeia de aminoácidos se dobra formando arranjos estáveis, que é denominada estrutura secundária (Figura 2c). Já os arranjos tridimensionais, formados através de elementos estruturais secundários, são denominados de estrutura terciária (Figura 2d). Por fim, tem-se a estrutura quaternária, que é obtida a partir do agregado de duas ou mais subunidades polipeptídicas (Figura 2e) (NELSON; COX, 2002; SELZER; MARHÖFER; KOCH, 2018; SOLOMONS; FRYHLE, 2015).

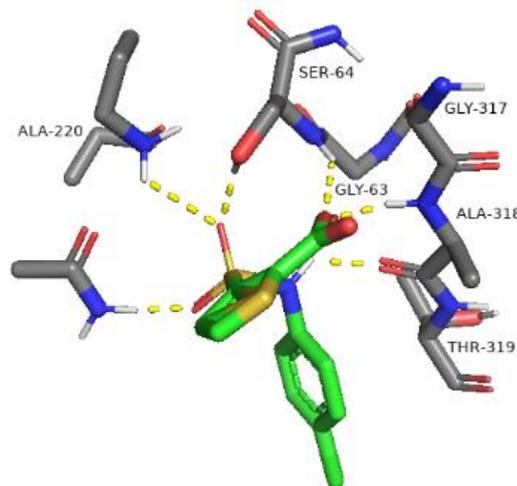
Figura 2 - Representação da estrutura química de um aminoácido (a) e dos níveis da estrutura proteica: primária (b), secundária (c), terciária (d) e quaternária (e).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A estrutura terciária da enzima apresenta pequenas regiões onde irá ocorrer a catalise. Elas estão localizadas próximo ou na superfície da enzima e são denominadas de sítio ativo. A forma como os aminoácidos presentes no sítio ativo (Figura 3) se rearranjam é determinante na interação da enzima com o substrato a ser transformado (ASSUNÇÃO, 2008; SOUSA, 2016).

Figura 3 - Representação dos aminoácidos presentes no sítio ativo de uma enzima hipotética interagindo com o ligante.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) definiu um sistema de nomenclatura e classificação para as enzimas, o qual emprega a classificação E.C. (*Enzyme Commission*), seguida por números (ex.: creatina fosfotransferase que tem número de

classificação EC 2.7.3.2). Existem seis categorias gerais para classificar as enzimas (Tabela 1), de acordo com o tipo de reações que catalisam (PUNEKAR, 2018).

Tabela 1 - Classificação das enzimas de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB). E.C.= *Enzyme Commission*

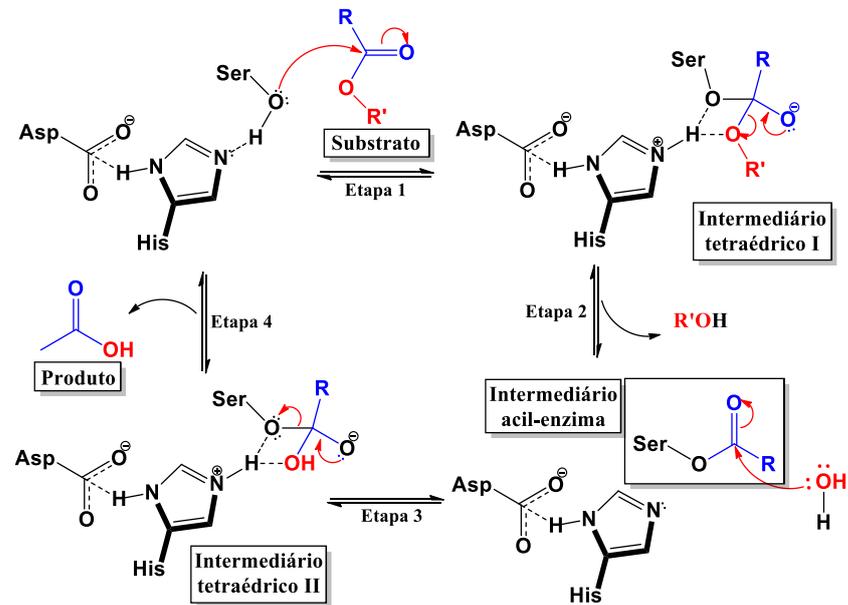
E.C.	Classes	Tipo de reação catalisada	Subclasse
1	Oxidoredutases	Oxidação-redução	Hidrogenases, oxidases, peroxidases e redutases
2	Transferases	Transferência de grupos de uma molécula à outra	Transaldolases e transcetolases
3	Hidrolases	Hidrólise ou formação de ésteres, amidas, lactonas, entre outros	Esterases, lipases, peptidases, fosfatases
4	Liasas	Quebra de ligação através da adição e eliminação em C=C, C=N e C=O	Descarboxilases, efosfatases
5	Isomerases	Isomerização (racemização, epimerização e rearranjo)	Racemases e epimerases
6	Ligases	Formação de ligações C-O, C-S, C-N e C-C	Sintetases

Fonte: PUNEKAR, 2018.

3.2 Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3), que são uma subclasse das hidrolases, são responsáveis pela hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa, formando glicerol e ácidos graxos (ERICSSON *et al.*, 2008; TUANGPORN PANUTHAI *et al.*, 2012). Também conhecidas como serina hidrolases, as lipases apresentam uma dobra comum α/β -hidrolase e o mecanismo de atuação dessas enzimas envolve a participação da tríade catalítica serina (Ser), histidina (His) e aspartato (Asp) (ou glutamato, Glu) presente no sítio ativo (ANOBOM *et al.*, 2014; OTTOSSON, 2001; ZORN *et al.*, 2018). A catálise ocorre em quatro etapas, pelo mecanismo apresentado na Figura 4. Inicialmente, há a desprotonação da hidroxila da serina pela atuação da histidina e do aspartato, gerando o ânion Ser-O⁻ que ataca o carbono da carboxila do substrato (Figura 4, etapa 1). O intermediário tetraédrico formado, que é estabilizado por ligações de hidrogênio, é posteriormente convertido no intermediário acil-enzima (Figura 4, etapa 2) através da regeneração da ligação π (C=O) e liberação do álcool (R'OH). Na etapa 3 (Figura 4) ocorre a desacilação do intermediário acil-enzima, mediada pelo ataque nucleofílico da H₂O presente no meio e ocorre a formação do segundo intermediário tetraédrico. Por fim, ocorre a formação do produto de hidrólise (ácido carboxílico) através da regeneração da ligação π (C=O) e liberação da tríade catalítica (Figura 4, Etapa 4) (ANOBOM *et al.*, 2014; FONSECA *et al.*, 2020; REIS *et al.*, 2009).

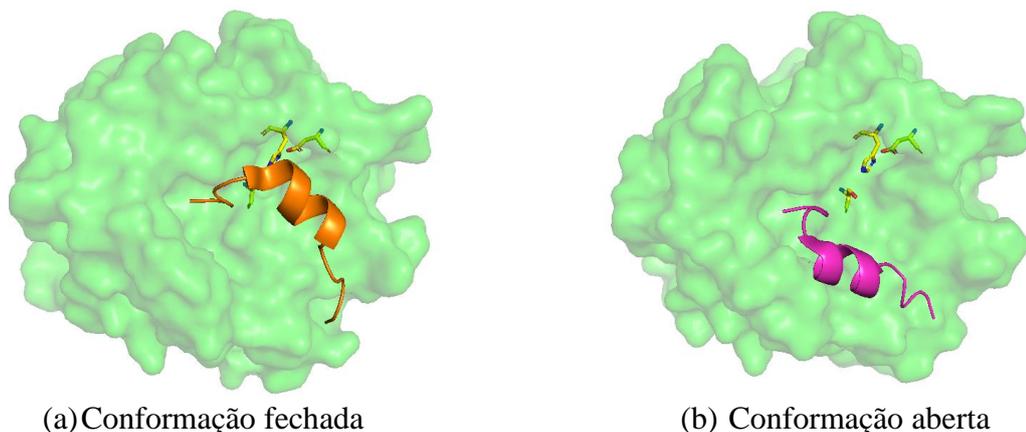
Figura 4 - Mecanismo de atuação das lipases.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As lipases apresentam um subdomínio localizado sobre o sítio ativo, chamado de tampa, que pode se apresentar de duas formas: (i) tampa fechada (lipase inativa) - conformação em que o sítio ativo está protegido do meio ambiente, sendo incapaz do substrato interagir com a triáde catalítica; (ii) tampa aberta (lipase ativa) - conformação que permite que o substrato entre em contato com os aminoácidos do sítio ativo (KHAN *et al.*, 2017). A Figura 5 apresenta as estruturas resolvidas da lipase do micro-organismo *Thermomyces lanuginosus*, com conformação fechada (a) (PDB: 1DT3) e conformação aberta (b) (PDB: 1EIN).

Figura 5 - Duas conformações da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, fechada (a) (código PDB: 1DT3) e aberta (b) (código PDB: 1EIN). As tampas fechada e aberta, bem como a triáde catalítica, foram destacadas pelas cores laranja, magenta e amarelo, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor

Esta é uma característica da maioria das lipases, que levou ao fenômeno conhecido como catálise interfacial. Esse fenômeno pode ser observado em lipases presentes em meios ausentes de uma interface aquosa/lipídica, em que prevalece a conformação fechada e a lipase apresenta-se como inativa, pois o sítio ativo é coberto por uma α -hélice móvel (FABER, 2011). Já em contato com uma interface de um sistema bifásico de óleo-água, pode-se perceber a conformação aberta, o que acontece porque a α -hélice se move tornando a lipase ativa (KHAN *et al.*, 2017; REHM; TRODLER; PLEISS, 2010).

3.3 Fungos como produtores de lipases

As lipases podem ser encontradas em diversos micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SILVA, 2015). Dentre estes, destacam-se os fungos como os principais produtores dessas enzimas, de forma extracelular (MORAES, 2014; TUANGPORN PANUTHAI *et al.*, 2012). Exemplos de fungos produtores de lipases são *Aspergillus awamori* (NAVVABI *et al.*, 2018), *A. sydowii* (ABDEL-FATTAH; HAMMAD, 2002), *A. niger* (CURADO-CARBALLADA; FEIXAS; OSUNA, 2019; RAMOS *et al.*, 2011) *Penicillium citrinum* (FERREIRA *et al.*, 2015) e *Fusarium oxysporum* (GOMES, Akenaton O C V *et al.*, 2020; TUANGPORN PANUTHAI *et al.*, 2012).

3.3.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (Fot) (E.F. Smith) W.C. Snyder & H.N. Hansen

O gênero *Fusarium* foi relatado pela primeira vez pelo micologista alemão Link, em 1809, e atualmente recebe a seguinte classificação: reino Fungi, filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Nectriaceae (VELOSO, 2013). As espécies desse gênero encontram-se amplamente distribuídas em todo o mundo, muitas delas sendo reconhecidas como fitopatogênicas, causando grande prejuízos para a agricultura. Além disso, por serem produtores de micotoxinas, também são um problema para indústrias de alimentos e pecuária, por causarem infecção de animais e humanos devido a ingestão de alimento contaminado (LESLIE; SUMMERELL, 2007).

O fungo *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (Fot) (E.F. Smith) W.C. Snyder & H.N. Hansen é o causador de uma das doenças com maior incidência no nordeste brasileiro, a murcha-de-fusário (PIO-RIBEIRO; FILHO, 1997). Este micro-organismo foi isolado do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), uma espécie de feijão originada da África e introduzida no Brasil pelos portugueses (VELOSO, 2013). O fungo se encontrada na forma clamidósporos,

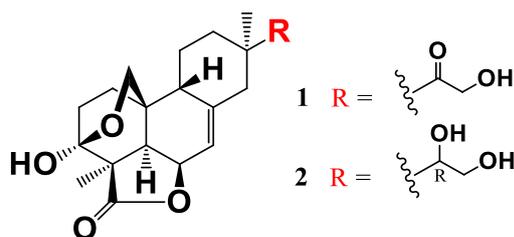
causando redução do crescimento das plantas, clorose, murcha e queda das folhas, além de podridão e morte das culturas infectadas (BERGER *et al.*, 2016; RODRIGUES; NETO; COELHO, 2006).

O potencial enzimático de espécies de *F. oxysporum* foi relatado na literatura, destacando a espécie como produtoras de lipases, cutinases, esterase, entre outras (MORAES, 2014; SIQUEIRA, 2017). Recentemente, um isolado de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (cepa UFCM 0089) foi empregado na biotransformação do produto natural annonalida, e o produto formado na reação sugeriu a participação das enzimas lipase, descarboxilase e alcodisidrogenase produzidas pelo fungo (GOMES, Akenaton O C V *et al.*, 2020).

3.4 Annonalida e derivados: resultados preliminares do grupo

A annonalida (**1**, Figura 6), 15-oxo-16-ol, 3 β ,20-epóxi-3 α -hidroxi-9-epi-7-pimarano-19,6 β -olida, é um diterpeno do tipo pimarano, isolado como metabólito secundário das raízes da planta *Casimirella ampla* (anteriormente *Humirianthera ampla*). Outros diterpenos análogos de **1**, também foram isolados da mesma planta (GRAEBNER *et al.*, 2000). Dentre eles, destaca-se o acrenol (**2**), que se distingue de **1** pela presença de uma hidroxila no carbono 15 da cadeia lateral, ao invés do grupo carbonila presente na annonalida. As configurações absolutas de **1** e **2** já foram estabelecidas na literatura (BRITO, Maria V. *et al.*, 2018) e encontram-se apresentadas na Figura 6.

Figura 6 - Representação estrutural dos diterpenos pimaranos annonalida (1) e acrenol (2).

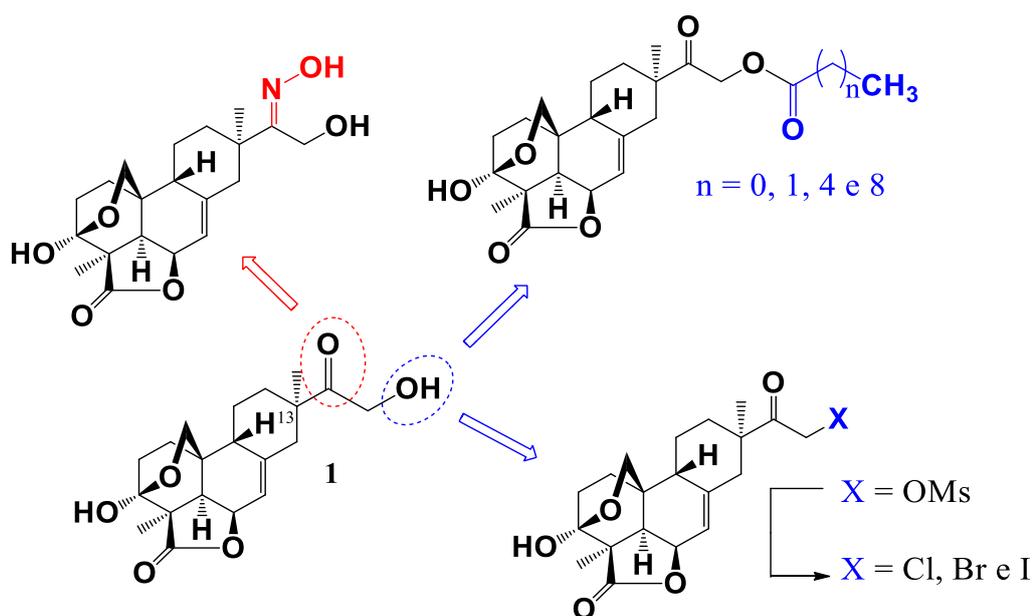


Fonte: Elaborado pelo autor.

A annonalida (**1**) também foi isolada de *C. ampla* (coletada no Acre) pelo nosso grupo de pesquisa (BRITO, Maria V. *et al.*, 2018; MARQUES, Ricardo A *et al.*, 2018) e avaliada quanto ao seu potencial citotóxico contra linhagem de células tumorais HL-60 (leucemia), COLO-205 (carcinoma de cólon humano), SW-260 (carcinoma de cólon humano), MDA-MB 435 (mama – humano), SF-295 (glioblastoma) e B-16-F-10 (melanoma murinho) (MARQUES, Ricardo de Araújo, 2011). Os resultados de citotoxicidade foram promissores e motivaram a semissíntese de derivados, através de transformações químicas na cadeia lateral

da molécula (Figura 7), para o estudo da relação estrutura-atividade (BRITO, Maria Vieira de, 2016; BRITO, Maria V. *et al.*, 2018; GOMES, Akenaton Onassis Cardoso Viana, 2014; MARQUES, Ricardo A *et al.*, 2018). As modificações envolveram a conversão da carbonila (em C-15) da cadeia lateral em oxima, além da acilação da hidroxila em C-16 e substituição da mesma hidroxila por halogênios.

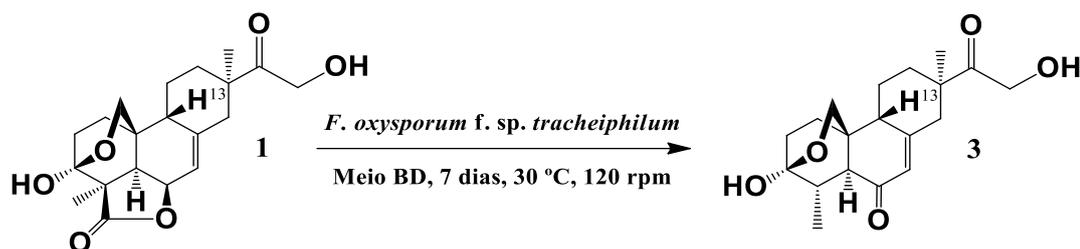
Figura 7 - Representação estrutural da annonalida (**1**) e seus derivados semissintéticos.



Fonte: Adaptado de MARQUES *et al.*, 2018.

Nosso grupo de pesquisa também submeteu a annonalida (**1**) à transformação enzimática por células em crescimento do fungo filamentoso *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (cepa UFCM 0089) (GOMES, Akenaton O C V *et al.*, 2020). Esta biotransformação resultou como produto a *nor*-annonalida (**3**), sugerindo a atuação de três enzimas, lipase, descarboxilase e álcool desidrogenase (ADH), do fungo (Figura 8).

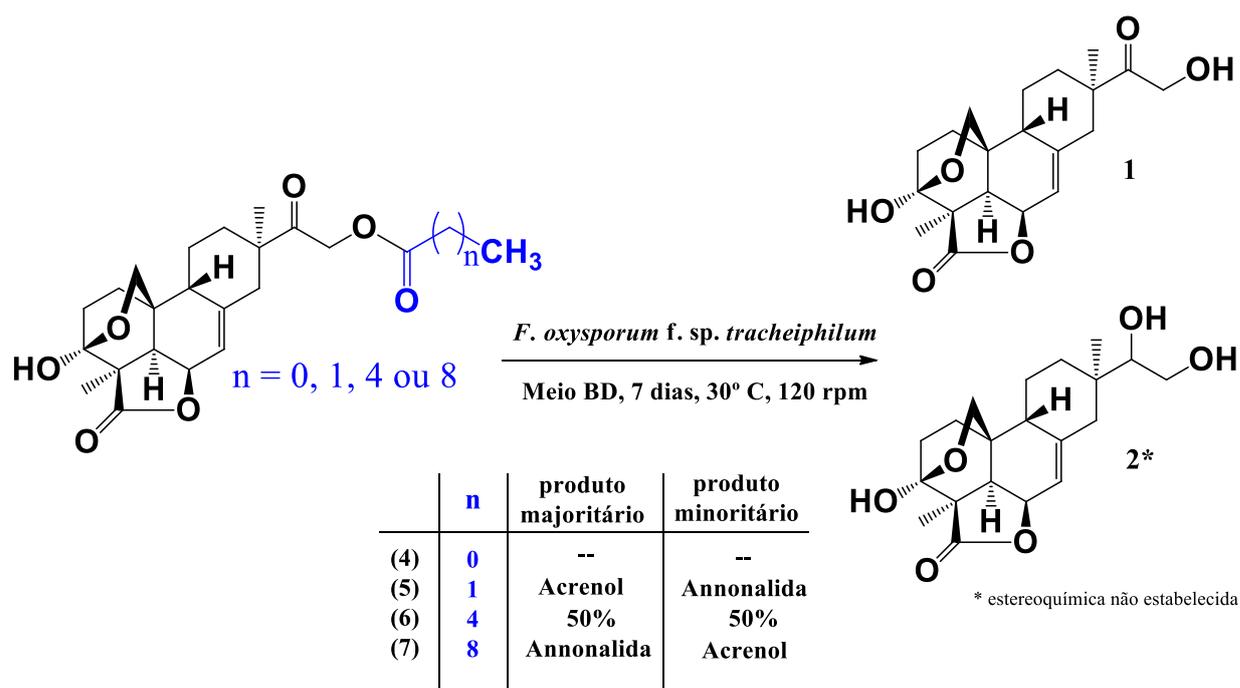
Figura 8 - Biotransformação da annonalida (**1**) formando a *nor*-annonalida (**3**)



Fonte: GOMES *et al.*, 2020.

Posteriormente, os derivados *O*-acilados da annonalida também foram submetidos à biotransformação pelo mesmo fungo e os produtos não purificados (bruto reacional) da reação foram analisados por espectrometria de massas de alta resolução (resultados não publicados). Diferentemente do que foi observado na biotransformação da annonalida (**1**), os produtos obtidos (exceto para o *O*-acetilado que não sofreu transformação) foram resultados apenas da hidrólise do grupo acila, gerando **1**, e da redução da carbonila da cadeia lateral, formando o acrenol (**2**) (ou seu diastereoisômero). Estes resultados sugeriram a participação das enzimas lipase (hidrólise do grupo acila) e ADH (redução da carbonila) do fungo e mostraram a influência do tamanho da cadeia acila na biotransformação.

Figura 9 - Biotransformação dos derivados (**4**) *O*-acetilado, (**5**) *O*-propanoilado, (**6**) *O*-hexanoilado e (**7**) *O*-decanoilado, formando annonalida (**1**) pela atuação da lipase e formando acrenol (**2**), pela atuação do álcool desidrogenase (ADH).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Além disso, a comparação dos resultados dos experimentos de biotransformação do produto natural **1** (Figura 8) e dos seus derivados *O*-acilados (Figura 9), revelaram que a região de atuação da enzima lipase do fungo na molécula é dependente da presença/ausência do grupo acila na cadeia lateral. Dessa forma, vislumbrou-se o estudo teórico da atividade catalítica da lipase do fungo *F. oxysporum* na bioconversão do diterpenoannonalida e seus derivados *O*-acilados para melhor estabelecer a relação entre a interação das lipases e os substratos e associar esta interação/bioconversão às funções desempenhadas pelos produtos da catálise.

3.5 Técnicas teóricas

3.5.1 Modelagem molecular por homologia

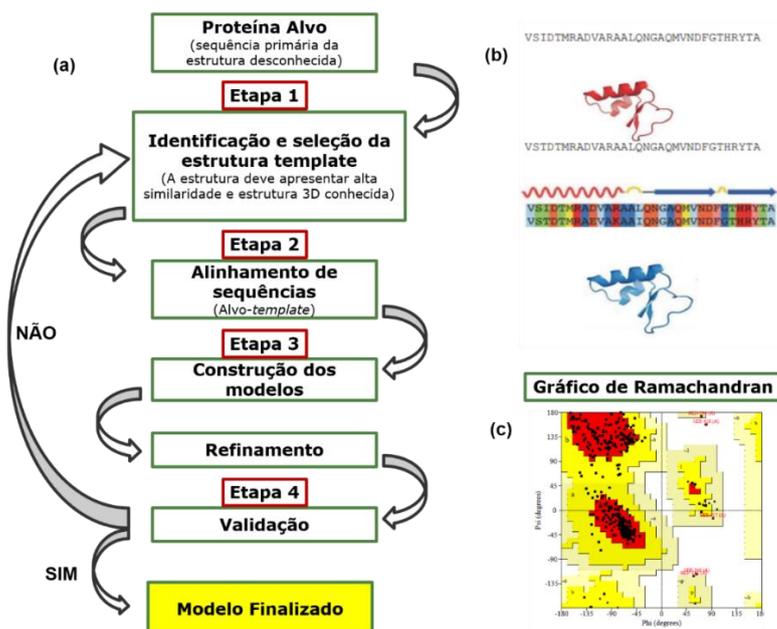
A modelagem molecular é uma ferramenta que permite a construção de modelos tridimensionais de proteínas/enzimas a partir de um conjunto de ferramentas gráficas que permite a construção, edição e visualização, análise e armazenamento de moléculas complexas. Esta ferramenta é amplamente empregada na análise das variações conformacionais das enzimas, permitindo prever como a estrutura se comporta com uma variedade de compostos (BARREIRO *et al.*, 1997; SOUZA, 2012).

Quando a estrutura tridimensional de uma proteína de interesse não está resolvida, é possível recorrer à cálculos assistidos por computador para fornecer tal estimativa, em que se pode fazer uma comparação de partes da enzima de interesse com outras enzimas cuja a estrutura tridimensional é resolvida, empregando uma técnica conhecida como modelagem molecular comparativa ou por homologia (APWEILER, 2004; BATEMAN *et al.*, 2017; FABER, 2011; SILVEIRA, 2018). Esta técnica parte do princípio que existe certa similaridade entre sequências de aminoácidos entre duas proteínas. Cerca de 60 % de similaridade é considerada suficiente para apresentar bons resultados; valores menores podem gerar modelos tridimensionais não confiáveis (FABER, 2011). O SWISS-MODEL é um servidor da web que se destaca por superar, de maneira significativa, outros servidores de modelagem, devido a seu menor tempo de resposta, qualidade na previsão de estrutura quaternária e confiança no modelo. Além disso, ele foi continuamente desenvolvendo-se ao longo dos anos (aprimorou-se desde o seu surgimento há 25 anos) e atualmente destaca-se entre os servidores de modelagem comparativa totalmente automatizados (WATERHOUSE *et al.*, 2018).

A construção de modelos tridimensionais por modelagem molecular comparativa segue 4 etapas, conforme apresentada na Figura 10. Após a modelagem, através da análise do gráfico de Ramachandran (Figura 10c) (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968) é

possível encontrar aminoácidos em regiões que apresentam energia favorecidas, permitidas ou proibidas. Neste trabalho, para refinar a estrutura modelada, foi realizada uma minimização energética (otimização estrutural) em caixa d'água utilizando-se o pacote Gromacs (LINDAHL *et al.*, 2018). A análise de Ramachandran foi realizada após a modelagem por homologia e repetida após as etapas de minimização energética do sistema.

Figura 10 - Etapas teóricas da modelagem molecular comparativa para construção de modelos tridimensionais.



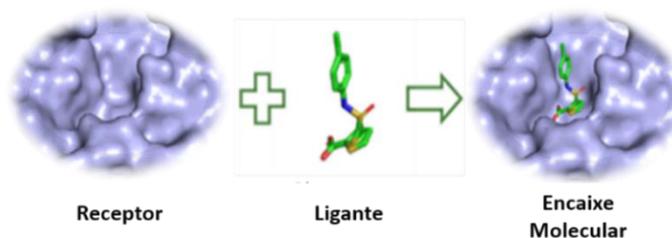
Fonte: Adaptado de (NISHI, 2016)

3.5.2 Ancoramento molecular

Mais conhecido entre a comunidade científica pelo seu nome em inglês, *docking*, o ancoramento molecular é uma técnica da bioinformática importante, que auxilia na predição de mecanismos envolvidos nas interações entre uma macromolécula (receptor) e um ligante (substrato) (BARRETO, 2017). Assim, a técnica pode ser usada para identificar e validar as interações entre a enzima e o substrato num estudo de biocatálise. Isso só é possível porque essa técnica de encaixe molecular permite a realização de simulações de todas as orientações envolvidas na interação receptor-ligante (SELZER; MARHÖFER; KOCH, 2018).

O encaixe molecular fornece informações importantes sobre as interações intermoleculares que ocorrem entre os aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima e o substrato (SOUZA, 2012), tais como van der Waals, hidrofóbicas, iônicas, ligações de hidrogênio, cátion- π , dentre outras (VERLI, 2014). A Figura 11 representa um encaixe molecular entre o receptor-ligante.

Figura 11 - Docking molecular: encaixe molecular entre o receptor-ligante.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Atualmente, vários programas são empregados para realização de *Docking* molecular. Dentre eles, destacam-se os programas gratuitos, como GOLD, FlexX, AutoDock, AutoDock Vina Glide e Molegro Virtual Docker (SOUZA, 2012).

Os resultados obtidos nos ensaios computacionais são dados em termos da energia de ligação necessária para que a provável molécula bioativa se ligue ao sítio ativo do alvo molecular selecionado. Assim, a molécula que apresentar menor quantidade de energia ao se ligar ao sítio ativo, será aquela que, teoricamente, apresentará melhor resultado de atividade biológica (FORLI *et al.*, 2016).

Existe outro fator bastante significativo que deve ser analisado; é o caso da diminuição da energia livre de ativação (ΔG^\ddagger), que está atrelado a uma organização das interações eletrostáticas e favorece o estado de transição (ET). Fonseca e colaboradores (2020), afirmam que existem conformações mais próximas ao ataque (do inglês *Near Attack Conformation* (NAC)), nas quais ocorre uma diminuição da barreira energética para formação do produto quando o complexo receptor-ligante adquire conformação compatível para que o oxigênio da serina catalítica (Ser-O) esteja próximo o suficiente (com poucos Angstroms de distância) do carbono eletrofílico do ligante para a catalise enzimática. Além da distância que deve ser entre 3,0 e 3,2 Å, o ângulo deve estar entre 84 e 112° (BOROWIECKI *et al.*, 2016). É possível encontrar na literatura a informação de que esse ataque só seria afetado com distâncias maiores que 4,0 Å (BRUICE; LIGHTSTONE, 1999; FONSECA *et al.*, 2020) e ângulo de próximo a 90°.

3.5.3 *Dinâmica molecular (DM)*

Um conjunto estrutural da proteína pode ser obtido por simulações de Dinâmica Molecular (DM), que é uma técnica que estuda a dinâmica dos átomos ou partículas em um sistema biomolecular. Tais simulações permitem se obter informações detalhadas de como ocorre a interação receptor-ligante, elucidando a mudança conformacional que é fundamental

para o entendimento dos mecanismos subjacente em processos biológicos (ALLAN SVENDSEN, 2016; ELLINGSON *et al.*, 2015).

As simulações de DM são uma extensão da Mecânica Molecular, esta última baseada na equação de movimento de Newton. Fundamentada no princípios da Mecânica Clássica, a DM busca entender o comportamento dinâmico de um sistema molecular, permitindo observar a evolução dos átomos durante sua trajetória e extrair suas propriedades (SHARMA; KUMAR; CHANDRA, 2019; SILVEIRA, 2018). Assim, esta técnica computacional pode ser aplicada em fenômenos físicos de equilíbrio e não equilíbrio. A equação do movimento pode ser descrita para um sistema atômico simples, como mostrando a seguir, onde F_i é a força que atua sobre cada átomo do sistema no instante t e a_i é a aceleração do átomo i de massa m_i :

$$F_i(t) = m_i \cdot a_i \quad (\text{Equação 1})$$

Após definido o campo de força, pode-se calcular a derivada primeira de primeira ordem da energia potencial:

$$F_i(t) = -\frac{\partial V(r_i)}{\partial \vec{r}_i} \quad (\text{Equação 2})$$

Assim, obtém-se:

$$-\frac{\partial V(r_i)}{\partial \vec{r}_i} = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (\text{Equação 3})$$

Em DM, utilizam-se algoritmos integradores, onde a integração é feita com a variação do tempo Δt , permitindo tratar todos os movimentos de maior frequência, como as vibrações das ligações (CARVALHO, 2015).

A trajetória do cálculo da dinâmica molecular ocorre partindo-se de uma estrutura inicial, para a qual calcula-se as forças que agem sobre cada átomo. Assim, é possível se obter as acelerações, velocidades e novas posições dos átomos utilizando a Equação 3. Em seguida, o cálculo é repetido (SHARMA; KUMAR; CHANDRA, 2019).

Os principais passos para condução das simulações de DM (GONÇALVES, 2012; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008; SHARMA; KUMAR; CHANDRA, 2019) são:

- i. Obtenção das configurações iniciais do sistema, as quais podem ser obtidas de duas maneiras: (a) em banco de dados especializados em armazenar dados experimentais; (b) através de modelagem molecular, quando não se dispõe da estrutura cristalográfica;
- ii. Escolha de campo de força adequado ao sistema, o qual será empregado nos cálculos das forças exercidas sobre cada partícula da molécula, uma vez que estão presentes forças interatômicas;
- iii. Otimização e minimização das estruturas com objetivo de remover possíveis maus contatos entre os átomos. Essa etapa consiste em encontrar um conjunto de coordenadas que minimizem a energia potencial do sistema levando a um mínimo de energia local;
- iv. Termalização e equilíbrio para busca da conformação ideal em uma determinada temperatura e pressão;
- v. Produção da dinâmica molecular em si, onde a trajetória das partículas no sistema buscará estados acessíveis termicamente;
- vi. Avaliação dos resultados através da análise das propriedades de equilíbrio.

3.5.4 MM/PBSA

Algumas técnicas computacionais podem ser utilizadas com objetivo de calcular a energia de ligação entre enzima-substrato. Um exemplo é a MM-PBSA (do inglês *Molecular Mechanics (MM) – Poisson-Boltzmann Surface Area (PBSA)*), que é uma das mais utilizadas para estudar complexos biomoleculares, permitindo prever a estabilidade relativa desses complexos (KUMARI *et al.*, 2014; SHAO *et al.*, 2021).

O cálculo de MM/PBSA pode ser executado através de diversos programas, como por exemplo o GROMACS (LINDAHL *et al.*, 2018). Cálculos de MM/PBSA utilizam-se de um conjunto amostral de conformações do sistema em equilíbrio e são extraídos de simulações de dinâmica molecular que, normalmente, ocorre em uma caixa periódica contendo água e contra íons. Neste caso, deve-se também levar em consideração os efeitos eletrostáticos de longo alcance e, ao final, deve-se obter um conjunto de estruturas representativas. É possível estimar a energia de ligação entre o receptor com ligante na presença de solvente, através da Equação 4 descrita a seguir (KUMARI *et al.*, 2014):

$$\Delta G_{\text{ligação}} = G_{\text{complexo}} - (G_{\text{proteína}} + G_{\text{ligante}}) \quad (\text{Equação 4})$$

Nessa equação, $G_{complexo}$ representa a energia do sistema formado pela interação receptor-ligante, enquanto que os termos entre parênteses ($G_{proteína}$ e $G_{ligante}$) representam a energia livre total da proteína isolada e a do ligante no solvente, respectivamente. A energia livre individual de cada termo ($G_{complexo}$, $G_{proteína}$ e $G_{ligante}$) pode ser calculada através da Equação 5 (KOLLMAN *et al.*, 2000; KUMARI *et al.*, 2014):

$$G = E_{MM} + G_{solvação} - TS_{MM} \quad (\text{Equação 5})$$

Nesse caso, G é a energia livre média calculada; E_{MM} é a energia potencial mecânica molecular; $G_{solvação}$ representa as contribuições polares (G_{polar}) e apolares (G_{apolar}) para as energias livres de solvação; os últimos termos da equação representam a temperatura absoluta (T) e a entropia (S), referindo-se à contribuição entrópica para energia livre no vácuo.

A energia potencial mecânica molecular (E_{MM}) da Equação 5 pode ser calculada pelo emprego da Equação 6, onde E_{Lig} representa a energia de ligação; E_{vdw} representa a energia de van der Waals; E_{elet} representa a energia eletrostática.

$$E_{MM} = E_{Lig} + E_{vdw} + E_{elet} \quad (\text{Equação 6})$$

Uma maneira de aproximar as interações soluto-solvente apolar, é através do emprego do modelo computacional de solvente implícito SASA (*solvent accessible surface area*), que é linearmente dependente do termo G_{apolar} (solvente apolar) e que pode ser calculado através da Equação 7:

$$G_{apolar} = YA + b \quad (\text{Equação 7})$$

Nessa equação, Y representa a tensão superficial do solvente; A representa o SASA; b é uma constante que representa o parâmetro de ajuste (KUMARI *et al.*, 2014; NGUYEN; WEI, 2017).

Através do SASA, pode-se avaliar a energia de solvação de forma simples e rápida, uma vez que, a energia livre de solvação do soluto é estimada levando-se em consideração a soma das contribuições atômicas, que são proporcionais à área de superfície exposta ao solvente. Dessa forma, a partir do coeficiente de superfície de cada átomo, pode-se

entender sua contribuição, que irá refletir na hidrofobicidade e hidrofiliidade do tipo de átomo em questão (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008; ZHANG *et al.*, 2017).

Outro modelo que é linearmente proporcional à energia de solvatação apolar (G_{apolar}) é o SAV (volume acessível ao solvente), podendo ser calculado pela Equação 8 a seguir:

$$G_{apolar} = pV + b \quad (\text{Equação 8})$$

Nessa equação, p representa a pressão do solvente; V representa o SAV; b é uma constante que representa o parâmetro de ajuste (KUMARI *et al.*, 2014).

4 METODOLOGIA

4.1 Recursos computacionais

Para o estudo teórico da biotransformação daannonalida (**1**) e dos derivados *O*-acilados (**4-7**) utilizou-se um computador Intel® Core™ i7-3820 CPU @ 3.60 GHz com Sistema Operacional de 64bits durante as etapas de modelagem, ancoramento molecular e análise dos resultados. As simulações de dinâmica molecular foram realizadas no cluster Fermi (CESUP-UFRGS-RS) e no cluster CENAPAD-UFC. Os cálculos de MM/PBSA foram realizados em computadores AMD Ryzen contendo 16 núcleos e 32 MB de memória RAM.

4.2 Modelagem molecular comparativa

Os modelos tridimensionais de homologia da lipase foram geradas pelo servidor da web SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (BIASINI *et al.*, 2014; WATERHOUSE *et al.*, 2018). Foi usada a sequência alvo (N4UBQ9) do fungo *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raça 1 recuperada do UniProt (APWEILER, 2004; BATEMAN *et al.*, 2017), uma vez que a sequência primária de aminoácidos da lipase do *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (UFCM 0089) ainda não foi descrita na literatura. O template teve como base a estrutura de raios-X (resolução de 3,00 Å) da lipase extracelular da espécie congênere *Thermomyces lanuginosus* (PDB ID: 1EIN) (BRZOZOWSKI *et al.*, 2000). O alinhamento de sequência baseado em estrutura foi realizado utilizando-se o programa Clustal W e a imagem do alinhamento de sequência foi feita através do programa ESPript 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014).

A validação do melhor modelo seguiu fatores estereoquímicos e estrutural global. O gráfico de Ramachandran foi gerado usando o programa ProCheck (LASKOWSKI *et al.*, 1993) e permitiu analisar fatores estereoquímicos do modelo. A estrutura global foi analisada pelos valores de RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*), calculados (The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 2.3.4 Schrodinger, LLC) através da sobreposição estrutural entre os átomos das cadeias principais da estrutura *template* e do modelo construído da técnica de modelagem molecular por homologia.

4.3 Obtenção das estruturas tridimensionais (3D) dos ligantes

As estruturas químicas e tridimensionais daannonalida (**1**) e seus derivados *O*-acilados (**4-7**) foram desenhadas usando o programa *ChemDraw* Ultra 12.0 e *Chem3D* Pro 12.0. As estruturas passaram por etapas de minimização de energia usando o campo de força

MMFF94 e a protonação das moléculas em meio biológico (pH 5,1) foi realizada através do programa Avogadro versão 1.2 (<http://avogadro.cc/>) (HANWELL *et al.*, 2012).

4.4 Protonação e minimização da proteína

O modelo obtido através da modelagem molecular comparativa teve seu estado de protonação geral ajustado para pH 5,1 com o auxílio do código PROPKA, presente no *webservice* PDB2PQR (DOLINSKY *et al.*, 2007). Após a etapa de protonação, iniciou-se a minimização de energia em água, através do pacote GROMACS v.2019 (LINDAHL *et al.*, 2018). A enzima foi colocada em caixa d'água cúbica de volume igual a 437 nm³, seguida pela adição de contra-íons sódio e cloreto na concentração de 0,15 mol L⁻¹ com objetivo de neutralizar as cargas do sistema. Também utilizou-se o campo de força CHARMM36 (HUANG *et al.*, 2017) e o modelo de água TIP3P. Após minimização da enzima modelada, sua qualidade geral e contatos ruins foram avaliados através do gráfico de Ramachandran gerado pelo programa ProCheck (LASKOWSKI *et al.*, 1993). A enzima minimizada foi utilizada nas etapas seguintes.

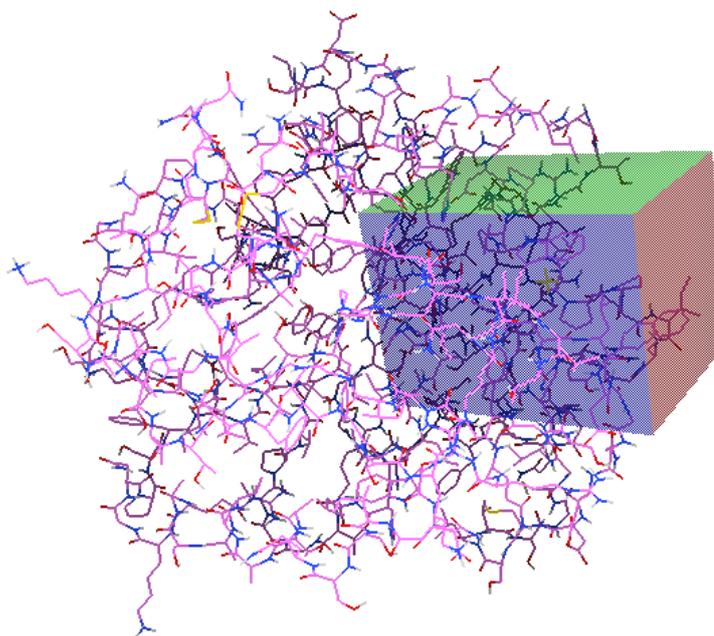
4.5 Docking molecular

O *docking* molecular foi realizado utilizando o programa Autodock 4.2 (FORLI *et al.*, 2016; MORRIS *et al.*, 2009), que contém um conjunto de algoritmos computacionais que permitem representar a melhor interação entre a macromolécula (receptor) e a molécula pequena (ligante). Nesse estudo, considerou-se a anonalida (**1**) e seus derivados *O*-acilados **4-7** como flexíveis e a enzima minimizada como rígida.

A preparação dos arquivos envolveu o uso do *AutoDock Tools* (ADT) (MORRIS *et al.*, 2009), que teve como objetivo manipular os arquivos na interface gráfica. As cargas de Gasteiger foram adicionadas gerando o input .pdbqt, seguindo-se da mesclagem dos hidrogênios não polares. O algoritmo de busca das melhores conformações usado foi o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) (MORRIS *et al.*, 1998), o qual apresenta os melhores resultados de busca global. Através do programa Autogrid4, que faz parte do conjunto de programas Autodock 4.2, determinou-se a área do receptor. Ela foi analisada no momento da interação ligante-macromolécula, gerando o mapa de grade (ou *grids*). Definidos os parâmetros, criou-se um arquivo de formato .gpf (GPF; *Grid Parameter File*), que é reconhecido pelo *autogrid* e fornece informações, como tipo de ligante e receptor extraído do arquivo PDBQT. Em seguida, o *autogrid* foi executado para a geração dos mapas do receptor. O *GridBox* foi

ajustado para incluir todos os aminoácidos do sítio ativo. Assim, a *grid* foi proporcional ao tamanho dos ligantes, de forma a incluir os aminoácidos da tríade catalítica Serina (Ser174), Aspartato (Asp228) e Histidina (His287). A Figura 12 mostra a caixa utilizada com as seguintes dimensões: $size_x = 54$; $size_y = 40$; $size_z = 40$; $center_x = 24,685$; $center_y = 40,532$; $center_z = 42,169$; e espaço de grade de $0,375 \text{ \AA}$.

Figura 12 - Caixa *GridBox* ajustada para conter a tríade catalítica Ser174-Asp228-His287 e os ligantesannonalida (1) e seus derivados *O*-acilados 2-5.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As simulações de *docking* molecular foram repetidas dez vezes para cada substrato testado, gerando um total de 2500 conformações (500 para cada substrato), os quais foram agrupadas usando-se uma tolerância de RMSD de $2,0 \text{ \AA}$ através o pacote *Autodock Tool*. Foram realizadas 2500000 avaliações de energia por corrida (GA), o tamanho da população de conformações foi definido para 150 e empregou-se um máximo de 27000 gerações por corrida. Para extrair a melhores conformações, realizou-se uma inspeção visual das poses produtivas, de acordo com *Near Attack Conformation* (NAC).

4.6 Simulação de dinâmica molecular (DM)

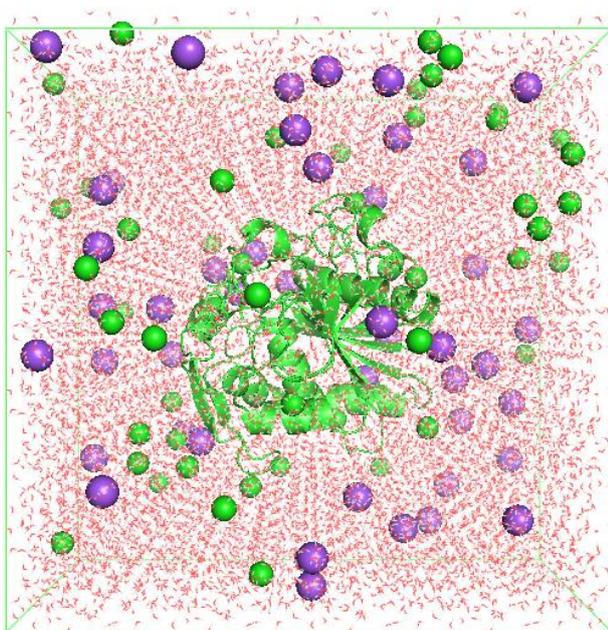
Neste trabalho, as simulações de dinâmica molecular foram realizadas com o auxílio do pacote Gromacs v.2019 (LINDAHL *et al.*, 2018). Tais simulações tiveram por

finalidade reproduzir o fenômeno de acoplamento induzido e análise a estabilidade estrutural após o ancoramento molecular.

4.6.1 Preparação

As simulações de DM utilizaram o campo de força AMBER99SB (HORNAK *et al.*, 2006). O complexo receptor-substrato foi colocado em uma caixa d'água cúbica de volume igual a 437 nm^3 , solvatado por 15730 moléculas de água (modelo TIP3P) em condições periódicas de contorno. Em seguida foram adicionados contra-íons sódio e cloreto na concentração de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ com objetivo de neutralizar as cargas do sistema. A Figura 13 apresenta a caixa construída nessa simulação.

Figura 13 - Caixa de simulação contendo as moléculas de água (vermelho), os íons cloreto (verde) e os íons sódio (roxo).



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6.2 Minimização e equilíbrio do sistema

Todo o sistema foi minimizado usando o algoritmo de descida mais íngreme para remover possíveis choques estéricos ou geometria inadequada (GOMES, Akenaton O C V *et al.*, 2020). Após minimização de todo o sistema, seguiu-se para etapa de equilíbrio com objetivo de estabilizar a temperatura (de 273,15 a 303,15 K) e estabilizar a pressão em 1 atm. Para cada conjunto, o primeiro isotérmico-isocórico (NVT), manteve-se constante o número de partículas,

o volume e a temperatura. Essa primeira etapa teve duração de 500 ps, com intervalo de tempo de 1 fs. Para segunda etapa, também executada em 500 ps, com intervalo de tempo de 1 fs, manteve-se constante o número de partículas, a pressão e a temperatura, sendo um conjunto isotérmico-isobárico (NPT). Para ambas as simulações, manteve-se uma restrição de posição para todos os átomos pesados, que foi gradualmente sendo removida durante a simulação de 1 ns e intervalo de 2 fs.

4.6.3 Produção da dinâmica molecular

As corridas de produção da DM foram realizadas com intervalos de tempo de 2 fs e 50×10^6 etapas. Para as interações eletrostáticas de longo alcance das simulações, usou-se o algoritmo de malha de partículas Ewald (PME), e a temperatura e pressão foram controladas a 303,15 K e 1 atm, respectivamente. Para controle de saída, salvou-se as coordenadas e velocidades a cada 10 ps, atualizando-se o arquivo de registro e salvando as coordenadas compactadas a cada 10 ps. As figuras foram geradas através dos programas PyMol Molecular Graphics System, versão 2.3.2 Schrödinger, LLC e Discovery Studio.

4.7 MM/PBSA

Neste trabalho, o cálculo da energia de interação do sistema complexo (receptor-ligante) foi realizado após a dinâmica molecular, com o sistema em equilíbrio (KOLLMAN *et al.*, 2000). Foram usadas as estruturas representativas do conjunto em equilíbrio, extraído-se frames dos últimos 10 ns de simulação. Inicialmente, este conjunto representativo passou por um processamento, com objetivo de remover todas as moléculas de solvente e contra-íons. Em seguida, foi possível calcular a energia de ligação (G), conforme Equação 5, utilizando-se o pacote Gromacs v.2019.

Para os cálculos, utilizou-se a metodologia proposta por Kumari e colaboradores (2014). Calculou-se, separadamente, os valores de ΔE_{MM} , ΔG_{polar} e ΔG_{apolar} e, em seguida, realizou-se a soma dos mesmos. Para estimar as energias de solvatação apolar (G_{apolar}), usou-se o método de rede cúbica dupla, com os modelos SASA e SAV, que fazem parte do programa `g_sas` do Gromacs.

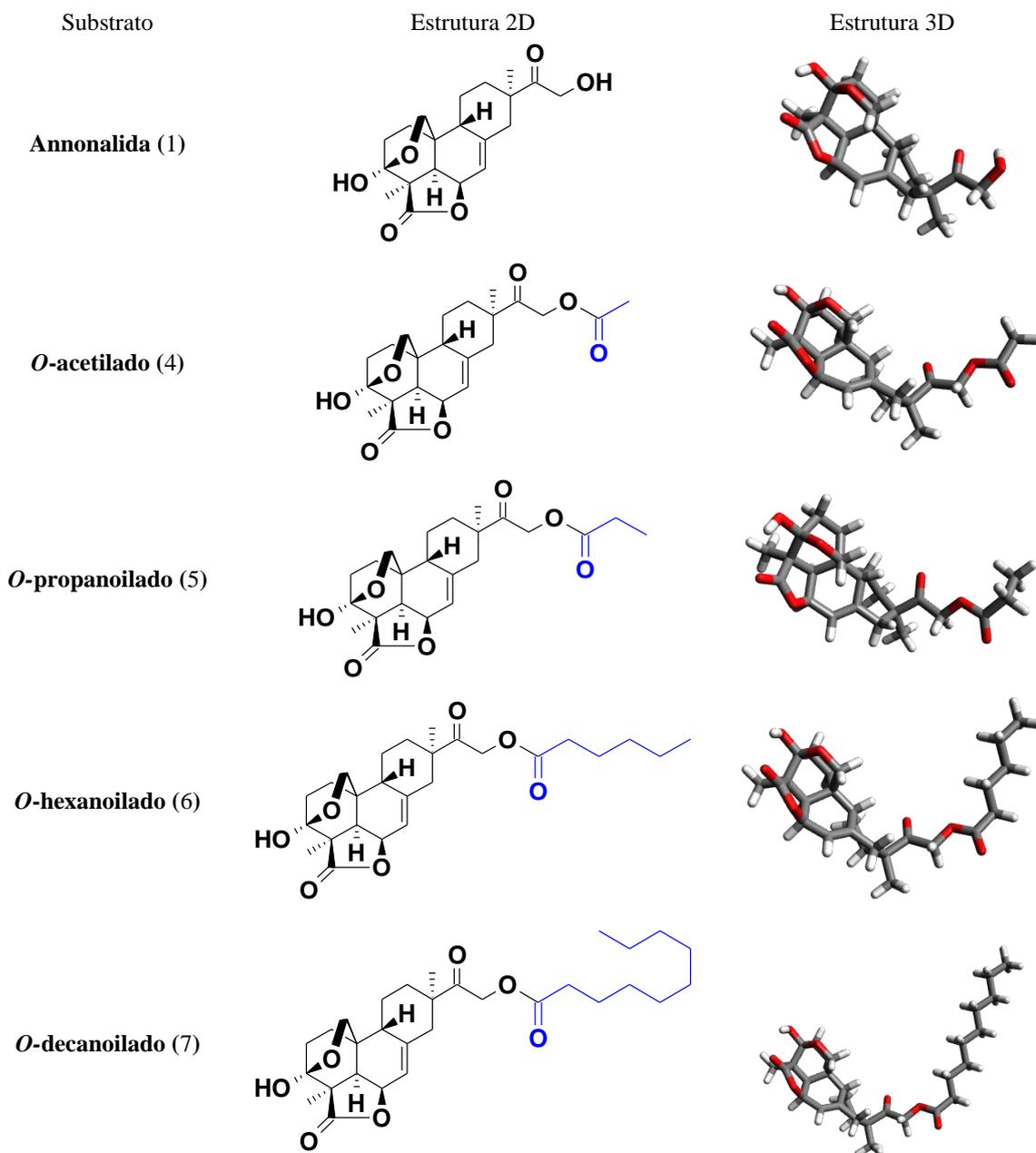
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estruturas dos substratos

Os substratos empregados foram o produto naturalannonalida (**1**) e de seus derivados semissintéticos *O*-acilados no carbono C-16, *O*-acetilado (**4**), *O*-propanoilado (**5**), *O*-hexanoilado (**6**) e *O*-decanoilado (**7**). As moléculas foram protonadas em meio biológico (pH 5,1), uma vez que este foi o valor de pH identificado durante o procedimento experimental de biotransformação dos substratos pelo fungo. As estruturas dos substratos estão mostradas na Figura 14.

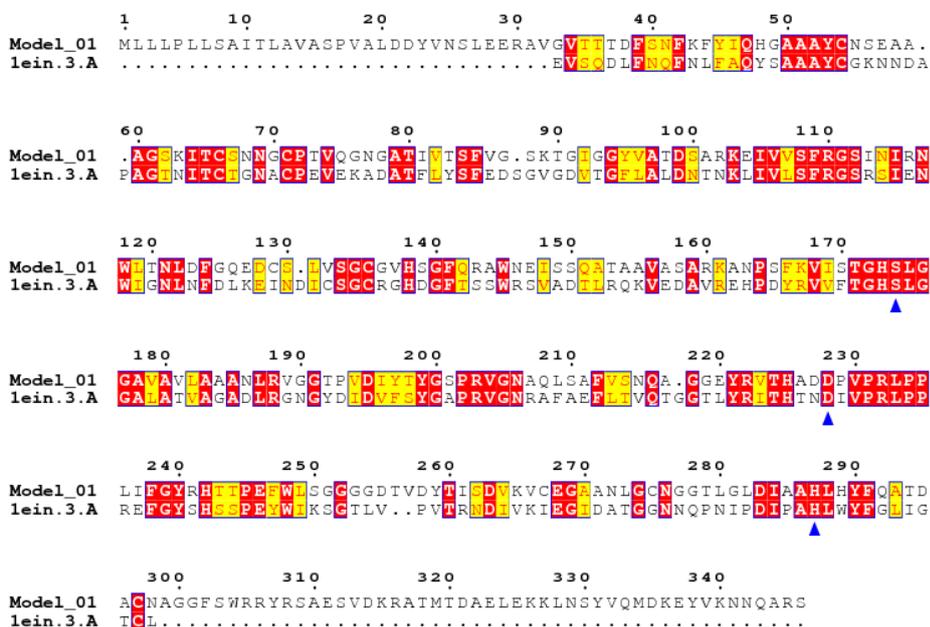
5.2 Modelagem molecular

Ainda não foi relatado na literatura a estrutura elucidada da lipase do fungo em estudo, sendo necessária a construção do modelo computacional. Assim, empregou-se a técnica de modelagem molecular por homologia, na qual utilizou-se como template a enzima lipase do organismo *Thermomyces lanuginosus* depositada no PDB ID: 1EIN. O alinhamento da sequência foi realizado com o auxílio do programa ClustalW, e apresentou uma identidade de 40,91 %. Vale ressaltar que, modelos confiáveis possuem 30% ou mais de identidade entre as sequências de aminoácidos (SOUZA, 2012). A Figura 15 apresenta o alinhamento de sequências do modelo N4UBQ9 com a estrutura cristalográfica 1EIN, onde pode-se identificar que a tríade catalítica (Ser174-Asp228-His287) foi conservada.

Figura 14 - Estruturas tridimensionais da annonalida (**1**) e seus derivados *O*-acilados (**4-7**).

Fonte: Elaborado pelo autor.

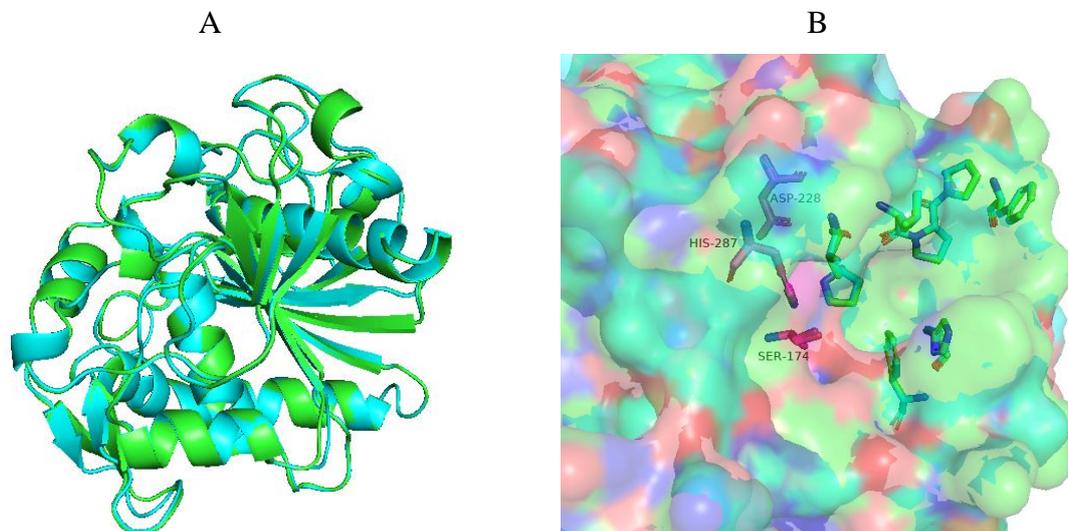
Figura 15 - Alinhamento de seqüências do modelo N4UBQ9 com a estrutura cristalográfica 1EIN. A tríade catalítica conservada Ser174, Asp228 e His287 é representada com triângulos azuis. Em vermelho são representados os resíduos iguais e em amarelo os resíduos semelhantes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 16A apresenta o alinhamento molecular da estrutura molde (PDB: 1EIN) e o modelo construído, com valor de RMSD = 0,118 Å entre os C α das estruturas. Garcia (2017) afirma que esses valores sugerem que a estrutura construída é muito similar à estrutura molde, sendo, portanto, um modelo de boa qualidade. Além disso, o modelo selecionado apresentou cavidade de ligação com a tampa aberta, assim como o *template*, conforme mostrado na Figura 16B.

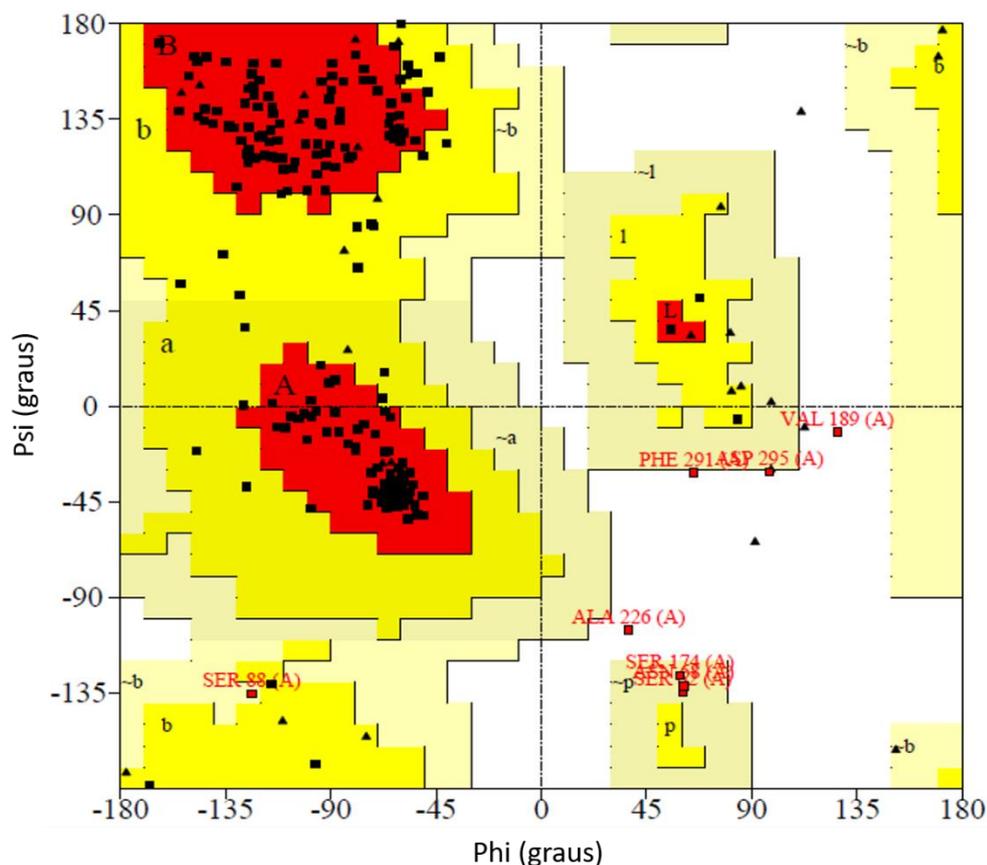
Figura 16 - Sobreposição da estrutura molde da lipase do microrganismo *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* (PDB ID: 1EIN), em azul, e o modelo construído, em verde. (A) Estruturas totais. (B) Sítio de ligação conservado, em magenta está representado a tríade catalítica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A escolha do modelo através do servidor da web *SWISS-MODEL* levou em consideração a qualidade estereoquímica visualizada através do gráfico de Ramachandran (Figura 17). É possível observar que 85,6 % (190) de resíduos estão localizados em regiões favorecidas; 10,8 % (24) de resíduos estão em regiões adicionais mais permissivas; 1,8 % (4) de resíduos estão em regiões permissivas; 1,8 % (4) dos aminoácidos estão em regiões proibidas (Tabela 2).

Figura 17 - Gráfico de Ramachandran da enzima modelada. As regiões favorecidas estão em vermelho (A, B, L), as regiões adicionais mais permissivas estão em amarelo (a, b, l, p), as regiões permissivas aparecem na cor bege (~a, ~b, ~l, ~p) e a região não permitida está representado pela cor branca.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 - Resultados do diagrama de Ramachandran da proteína modelada.

Regiões	Siglas	Nº de resíduos	%
Mais favoráveis	[A, B, L]	190	85,6
Adicionais mais permissivas	[a, b, l, p]	24	10,8
Permissivas	[~a, ~b, ~l, ~p]	4	1,8
Não permitidas	[XX]	4	1,8

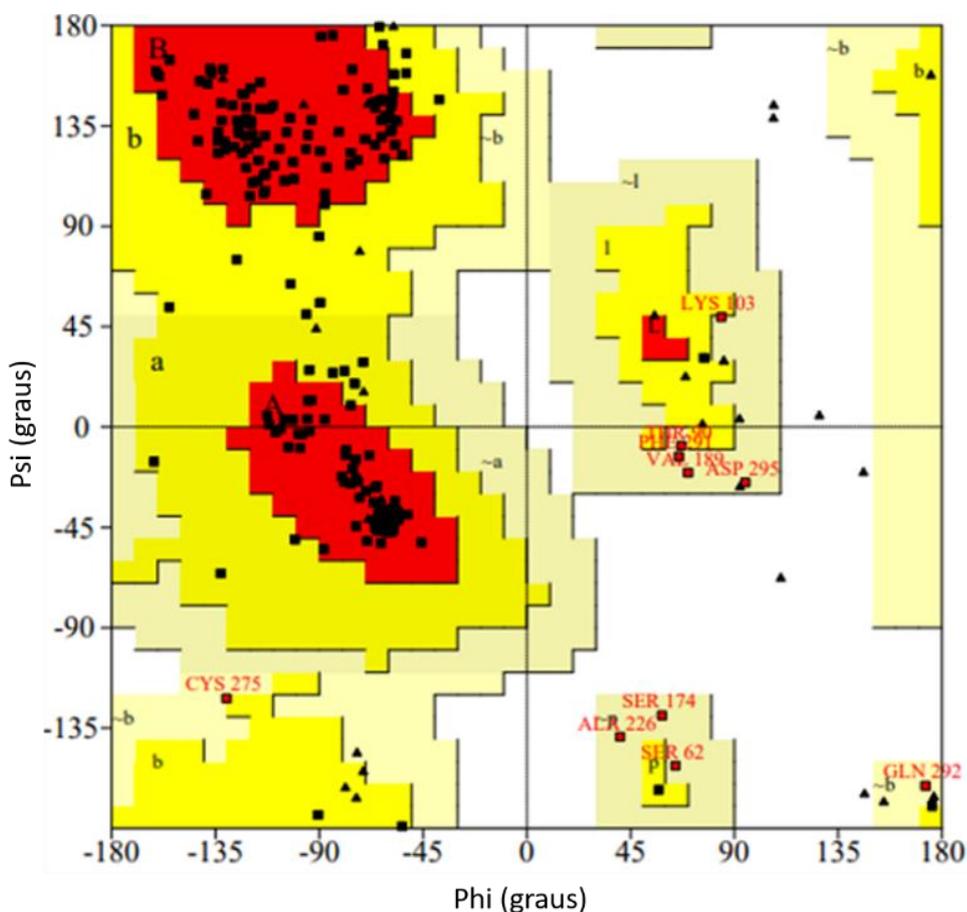
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Minimização de energia para a melhoria da qualidade do modelo.

Ahmad e colaboradores (2021), afirmam que conformações de alta energia podem estar associadas a choques estéricos, o que gera uma perturbação física do sistema e posterior instabilidade da simulação. Assim, a estrutura tridimensional da lipase do fungo foi minimizada para posterior estudo de ancoragem molecular. Para isso, utilizou-se o Gromacs v.2019 e

obteve-se uma estrutura de equilíbrio. A lipase otimizada atingiu seu estado de energia mínimo, com 86 % de resíduos em regiões favorecidas e nenhum aminoácido (0,0 %) em regiões não permitida (Figura 18 e Tabela 3). Antes de otimizada (Tabela 2), observava-se 85,6 % dos resíduos em regiões favorecidas e 4 (1,8 %) aminoácido em regiões não permitida.

Figura 18 - Gráfico de Ramachandran da lipase após otimização de energia em que as regiões favorecidas estão em vermelho (A, B, L), as regiões adicionais mais permissivas estão em amarelo (a, b, l, p), as regiões permissivas aparecem na cor bege (~a, ~b, ~l, ~p) e a região não permitida está representado pela cor branca.



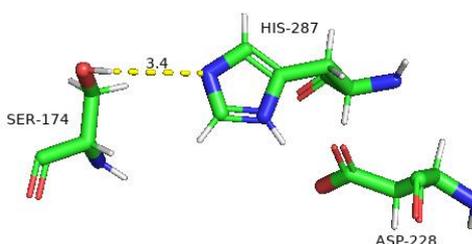
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 - Resultados do diagrama de Ramachandran da lipase após minimização de energia.

Regiões	Siglas	Nº de resíduos	%
Mais favoráveis	[A, B, L]	191	86,0
Adicionais mais permissivas	[a, b, l, p]	21	9,5
Permissivas	[~a, ~b, ~l, ~p]	10	4,5
Não permitidas	[XX]	0	0,0

A Figura 19 mostra a tríade catalítica da enzima minimizada, na qual é possível observar que o nitrogênio da posição 2 do anel imidazol da His287 está protonado e interagindo através de forças eletrostáticas (1,9 Å de distância) com o grupo carboxílico do Asp228. Observa-se ainda que o nitrogênio da posição 4 da His287 está formando ligação de hidrogênio (3,4 Å de distância) com a Ser174, deixando a Ser-O reativa para que ocorra o ataque nucleofílico ao substrato (ALLAN SVENDSEN, 2016; FABER, 2011; FONSECA *et al.*, 2020; PUNEKAR, 2018).

Figura 19 - Interações intermoleculares observadas no sítio ativo da lipase modelada, envolvendo os resíduos da tríade catalítica Ser174-His287-Asp228.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Ancoramento molecular

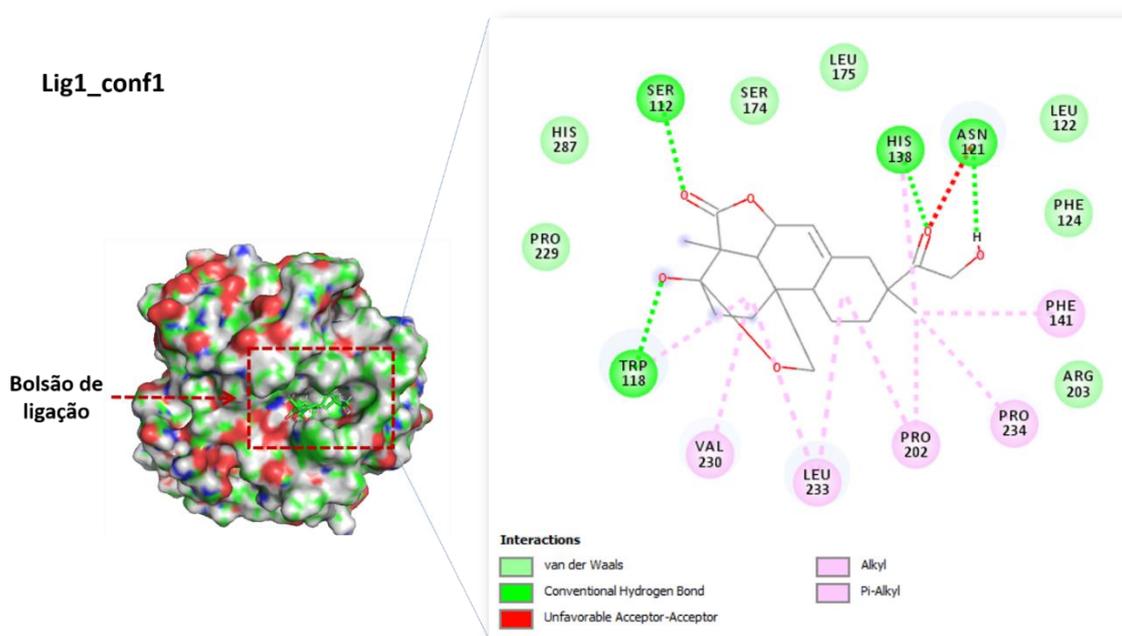
Para cada substrato analisado, realizou-se o procedimento de ancoramento molecular. Para cada conjunto enzima-substrato, o ancoramento molecular foi repetido 10 vezes, de forma a obter-se um total de 500 poses para o substrato (50 poses por ancoramento). Buscou-se extrair conformações adequadas (*Near Attack Conformation* - NAC) para a reação de hidrólise (BRUICE; LIGHTSTONE, 1999). Dessa forma, foi possível selecionar as melhores poses (melhor proximidade de átomos e orientação adequada) ao ataque da serina catalítica ao carbono eletrofílico do grupo acila dos derivados *O*-acilados (4-7). No caso da annonalida (1), que não apresenta o grupo *O*-acila na sua estrutura, a posição de ataque da serina foi estabelecida como sendo a carboxila do anel lactônico. Vale ressaltar que, a biotransformação desse produto natural envolveu a hidrólise desse anel (GOMES, Akenaton O C V *et al.*, 2020). Borowiecki e colaboradores (2016), sugerem que distâncias menores que 4,0 Å são aceitáveis, uma vez que, acima desse valor a velocidade de reação é prejudicada. As

simulações de ancoramento molecular de cada complexo enzima-substrato geraram conformações com NAC adequados, conforme discutido a seguir:

5.4.1 Análise do ancoramento para o liganteannonalida (1)

A afinidade de ligação para aannonalida (1) no sítio catalítico enzimático foi de -7,66 kcal mol⁻¹. Os requisitos NAC foram adequados, com distância de ataque da serina catalítica ao carbono eletrofílico (carboxila) da lactona de 3,2 Å e ângulo de ataque de 85,3°. A Figura 20 apresenta as principais interações envolvidas no bolsão catalítico. Observa-se uma ligação de hidrogênio entre o resíduo Ser112 e o oxigênio carboxílico da lactona, deixando-o mais eletrofílico para o ataque nucleofílico da Ser174. Essa conformação foi denominada de **Lig1_conf1**.

Figura 20 - Conformação do liganteannonalida (1) no bolsão catalítico da enzima e interações intermoleculares com resíduos de aminoácidos.



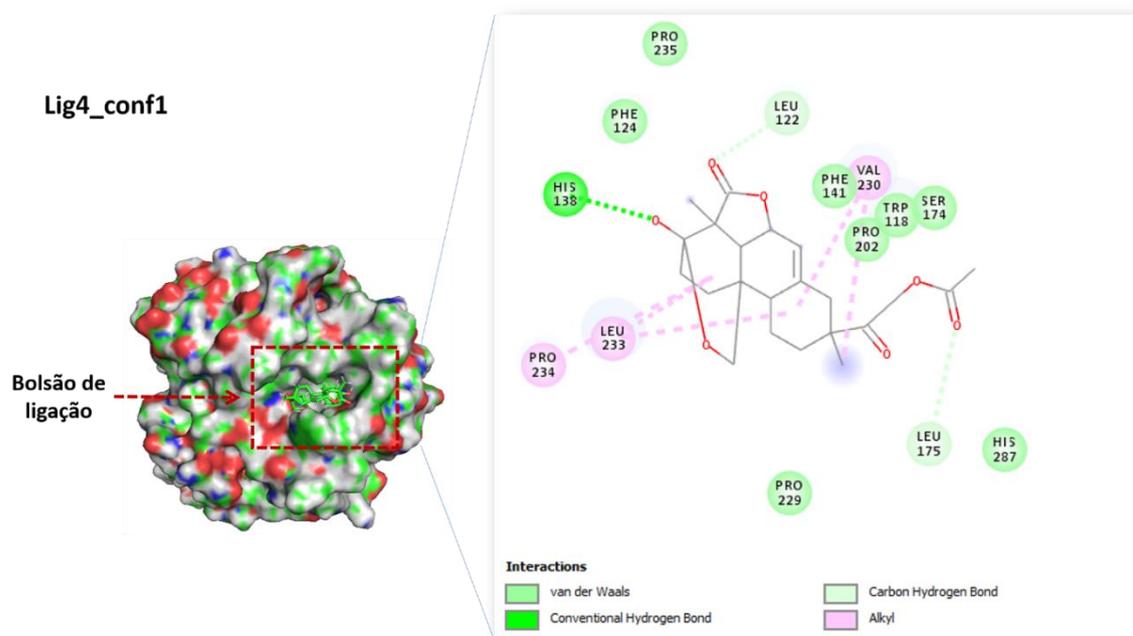
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.2 Análise do ancoramento para o ligante O-acetilado (4)

O encaixe molecular do derivado 4 no sítio ativo da enzima mostrou-se possível (Figura 21), uma vez que se observa a interação do resíduo Leu175 com oxigênio carboxílico do grupo acila da cadeia lateral. O *docking* molecular apresentou energia de ligação baixa, na média de -8,50 kcal mol⁻¹. A conformação (**Lig4_conf1**) mostrou NAC apropriado, com 3,3 Å

de distância entre a serina catalítica e o carbono eletrofílico do grupo acila da cadeia lateral, além de ângulo de 111,2°.

Figura 21 - Interação do ligante *O*-acetilado (**4**) com o sítio ativo da enzima. Linhas pontilhadas verdes representam a ligação de hidrogênio formada com o oxianion Leu175.



Fonte: Elaborado pelo autor.

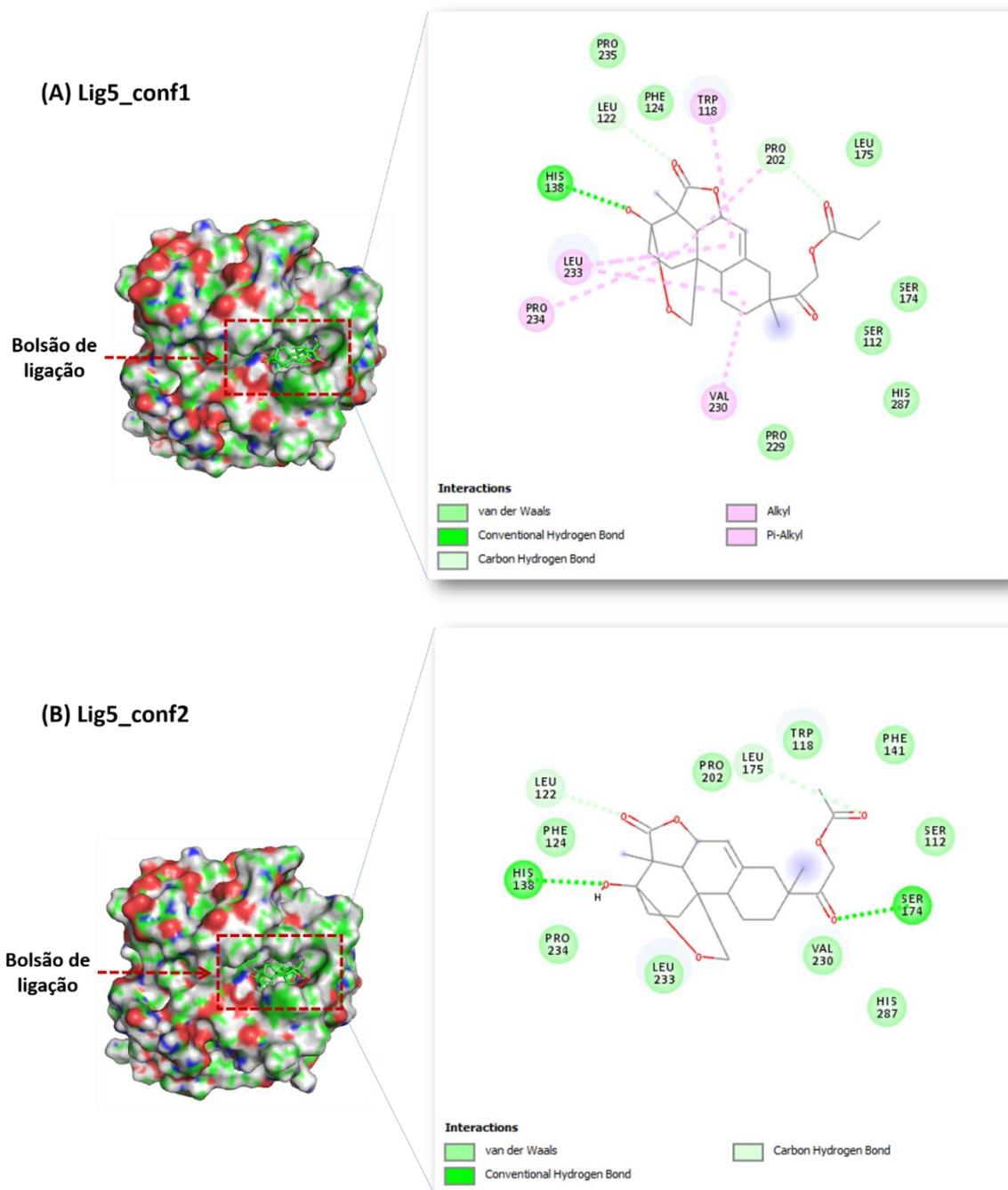
Os resultados discutidos acima não estão de acordo com os observados experimentalmente, uma vez que não foi observada a biotransformação de **4** pelo fungo. Fonseca e colaboradores (2020) , explicam que pode ocorrer divergências entre estudos computacionais e experimentais, pois deve-se levar em consideração que na análise computacional o ligante é colocado dentro no sítio ativo, sem considerar o percurso do mesmo no meio reacional. Assim, deixa-se de observar aspectos físicos como solubilidade, acessibilidade ao local ativo e transferência de massa.

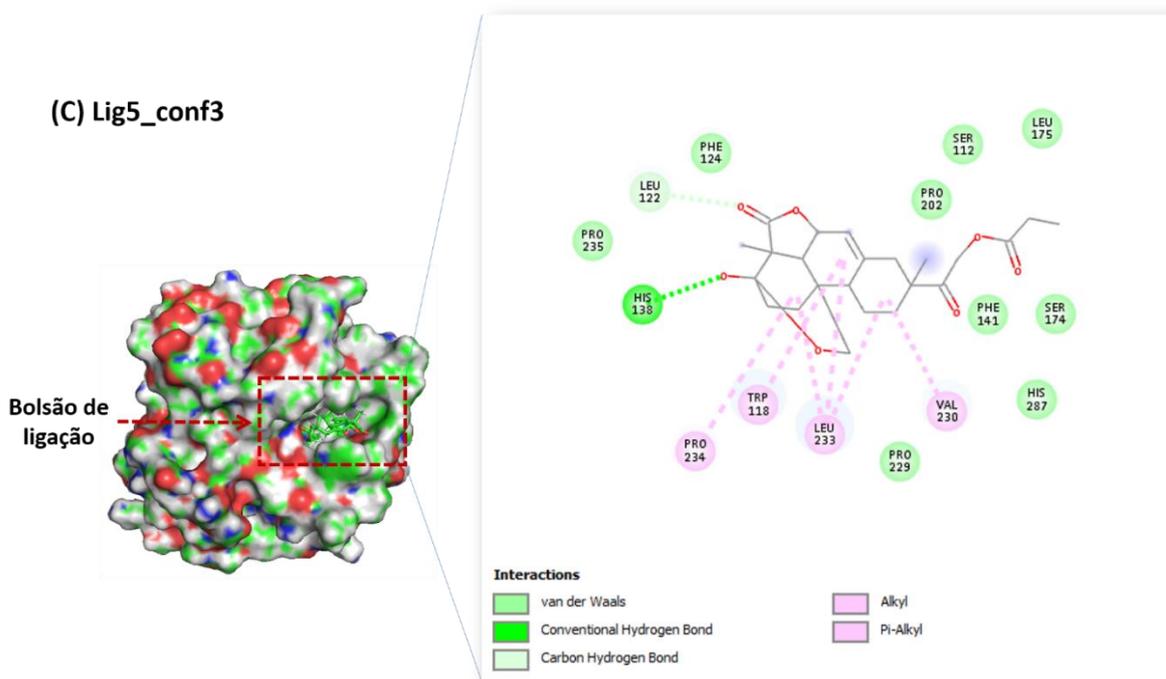
5.4.3 Análise do ancoramento para o ligante *O*-propanoilado (**5**)

Para esse ligante, a simulação de *docking* molecular gerou 3 conformações que apresentaram NAC adequado, denominadas **Lig5_conf1**, **Lig5_conf2** e **Lig5_conf3** (Figura 22). A ancoragem molecular formada entre o substrato **5** e a enzima apresentou energia de ligação média, distâncias e ângulos, respectivamente, de -8,45 kcal mol⁻¹, 2,9 Å e 108,8° para **Lig5_conf1**; -8,06 kcal mol⁻¹, 3,0 Å e 106° para **Lig5_conf2**; -8,05 kcal mol⁻¹, 2,9 Å e 106° para

Lig5_conf3. Estes valores mostram que o derivado *O*-propanoilado (**5**) se encaixa bem no sítio ativo da enzima, facilitando a interação com os aminoácidos do sítio ativo.

Figura 22 - Interação do derivado *O*-propanoilado (**5**) com o sítio ativo da enzima: (A) **Lig5_conf1**; (B) **Lig5_conf2** e (C) **Lig5_conf3**.





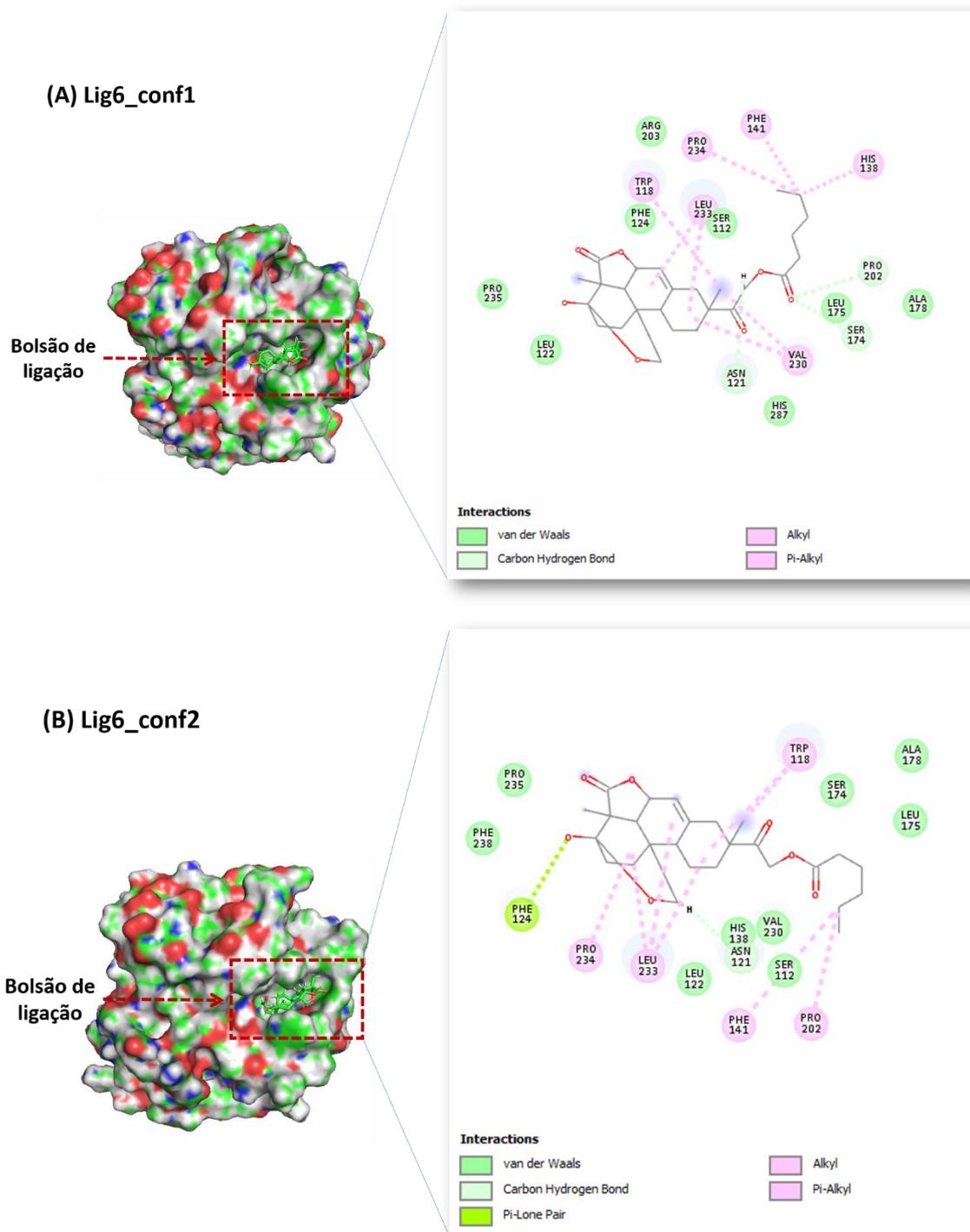
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.4 Análise do ancoramento para o ligante *O*-hexanoilado (6)

O ancoramento molecular do substrato **6** apresentou duas conformações com NAC adequados, denominadas de **Lig6_conf1** e **Lig6_conf2**. A energia de ligação variou entre -7,6 e -7,53 kcal mol⁻¹, com distancias NAC de 3,2 e 3,0 Å, respectivamente. Os dados experimentais de biotransformação desse derivado, assim como do derivado **5**, mostraram que o aumento da cadeia carbônica melhorou a atividade lipolítica.

Na Figura 23 (A e B), pode-se observar as principais interações envolvidas com os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da enzima, os quais podem atuar como oxianion, importante componente da catalise.

Figura 23 - Interação do derivado *O*-hexanoilado (**6**) com o sítio ativo da enzima: (A) **Lig6_conf1** e (B) **Lig6_conf2**.



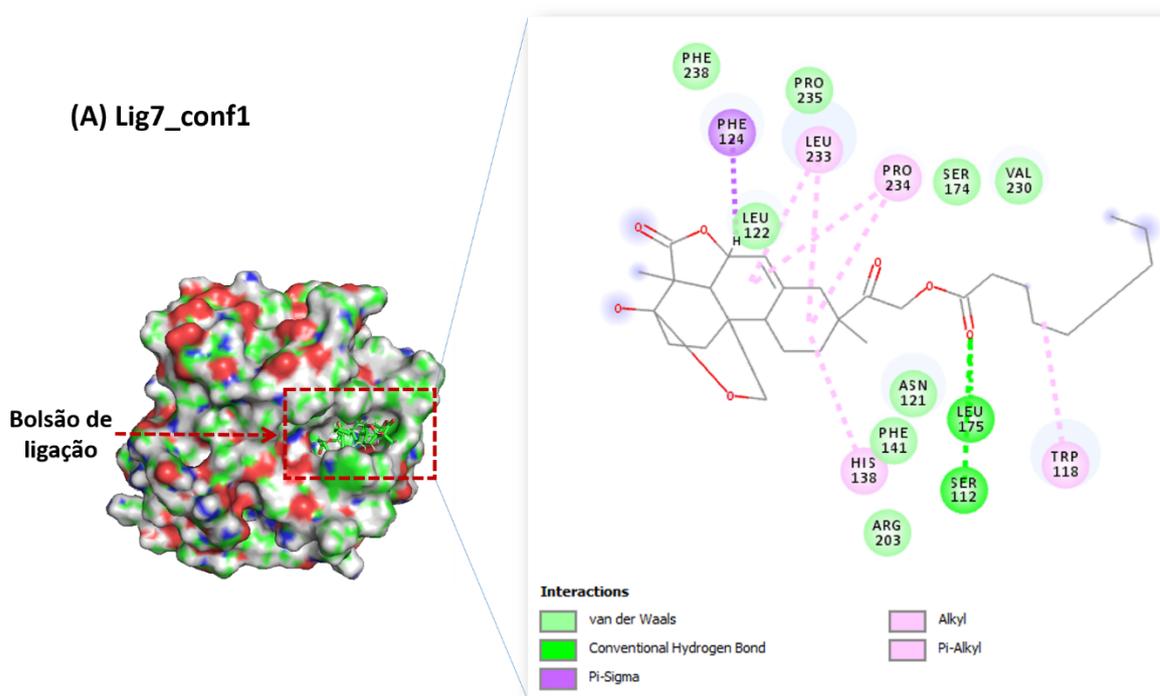
Fonte: Elaborado pelo autor.

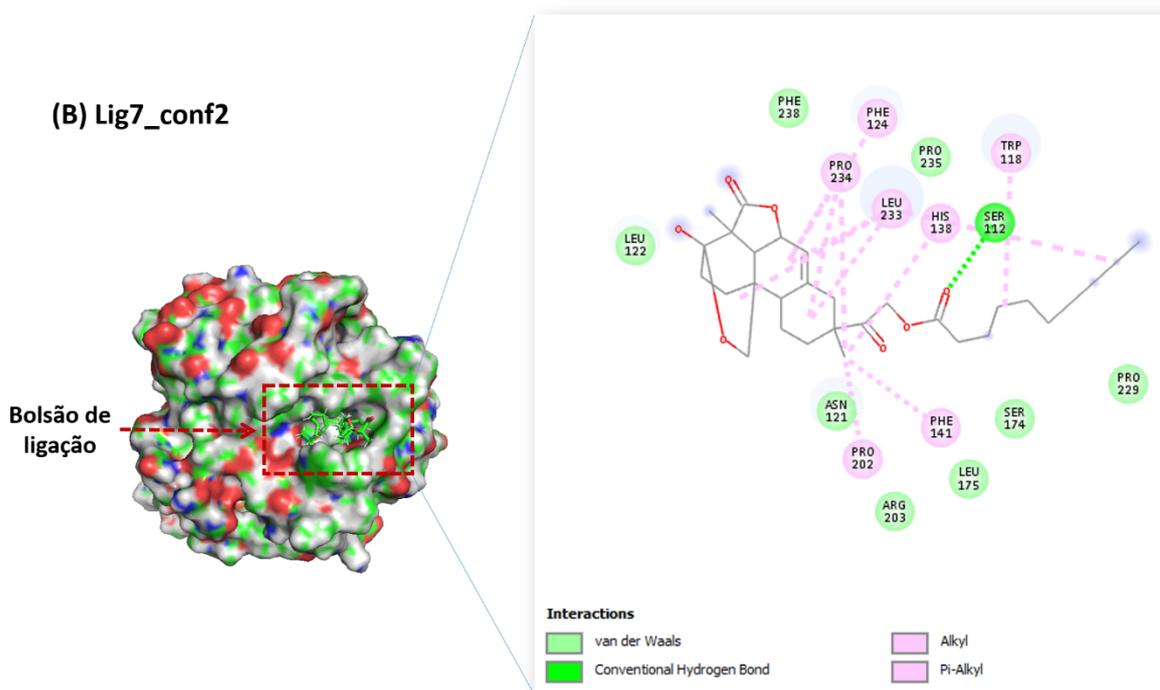
5.4.5 Análise do ancoramento para o ligante *O*-decanoilado (**7**)

O ancoramento molecular do substrato **7** apresentou duas conformações adequadas, denominadas de **Lig7_conf1** e **Lig7_conf2**, com NACs de energia livre de ligação de -7,48 e -

6,37 kcal mol⁻¹ e distância de 3,1 Å e 3,5 Å, respectivamente, Figura 24 (A e B). Para **Lig7_conf1** (Figura 24A) foi observada a presença de duas ligações de hidrogênio, formadas entre os resíduos Ser112 e Leu175 com o oxigênio carboxílico da cadeia lateral. Para **Lig7_conf2** (Figura 24B), observou-se uma ligação de hidrogênio entre a Ser112 e o oxigênio carboxílico. Vale ressaltar que, o derivado **7** foi o que produziu majoritariamente aannonalida (**1**) como produto da atividade lipase do fungo.

Figura 24 - Interação do derivado *O*-decanoilado (**7**) com o sítio ativo da enzima: (A) **Lig7_conf1** e (B) **Lig7_conf2**. Linhas pontilhadas verdes representam a ligação de hidrogênio formada com o oxianion.





Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Dinâmica molecular (DM)

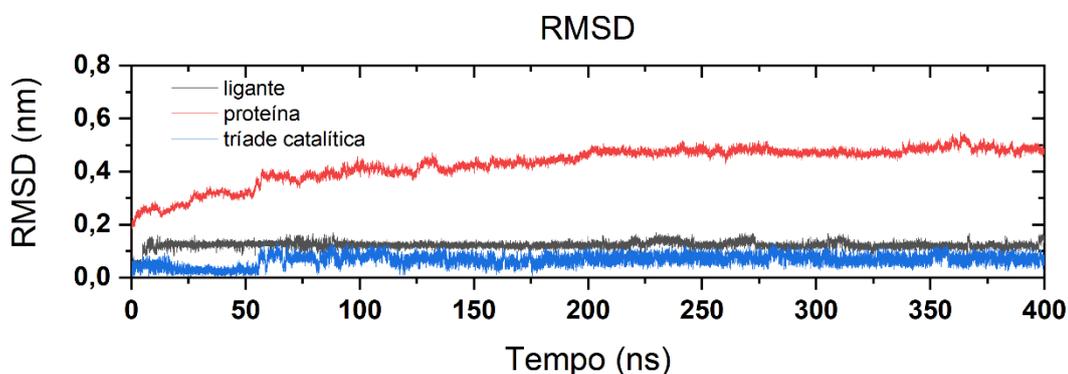
Conforme discutido no Item 5.4, as simulações de *docking* molecular apresentaram conformações que atendiam os critérios estabelecidos pelo NAC, como distância de até 4,0 Å e ângulos que variam de 60 a 112°. Embora essas condições favoreçam o ataque nucleofílico da serina catalítica ao carbono carboxílico do substrato e, portanto, a catalise enzimática (ALLAN SVENDSEN, 2016; BOROWIECKI *et al.*, 2016; BRUICE; LIGHTSTONE, 1999; FONSECA *et al.*, 2020), os resultados obtidos não justificavam os dados experimentais de biotransformação dos substratos pelo fungo, conforme mencionado anteriormente (Item 3.4; Figura 9).

Assim, foram realizados os estudos de dinâmica molecular (DM), com objetivo de confirmar a estabilidade conformacional dos ligantes no sítio ativo da enzima, realizando-se ensaios de simulações de DM longas, observando-se a trajetória do sistema através de parâmetros estatísticos estruturais. Durante as análises, foram obtidos gráficos dos desvios quadrado médio da raiz (RMSD) para a proteína, o ligante e a tríade catalítica. Outro critério analisado foi a distância entre o oxigênio da serina catalítica e do carbono eletrofílico do substrato, revelando uma orientação próxima dos átomos durante quase todo o ensaio.

5.5.1 Análise da DM para o ligante 1

A Figura 25 apresenta o gráfico de RMSD para a proteína, o ligante e a tríade catalítica, sendo possível comparar o quanto a estrutura flutuou ao longo do tempo em relação a estrutura inicial. Essa análise é muito importante para simulações de DM, uma vez que, é possível observar a trajetória da simulação através das oscilações de RMSD. Uma baixa variação mostra que o sistema entrou em equilíbrio, ao passo que, oscilações elevadas indicam variações bruscas no sistema (SEGANTINE, 2019).

Figura 25 - RMSD de 400ns para o ligante (1) Annonalida. Linha preta indica o ligante, na conformação **Lig1_conf1**, linha vermelha a proteína e em azul a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287

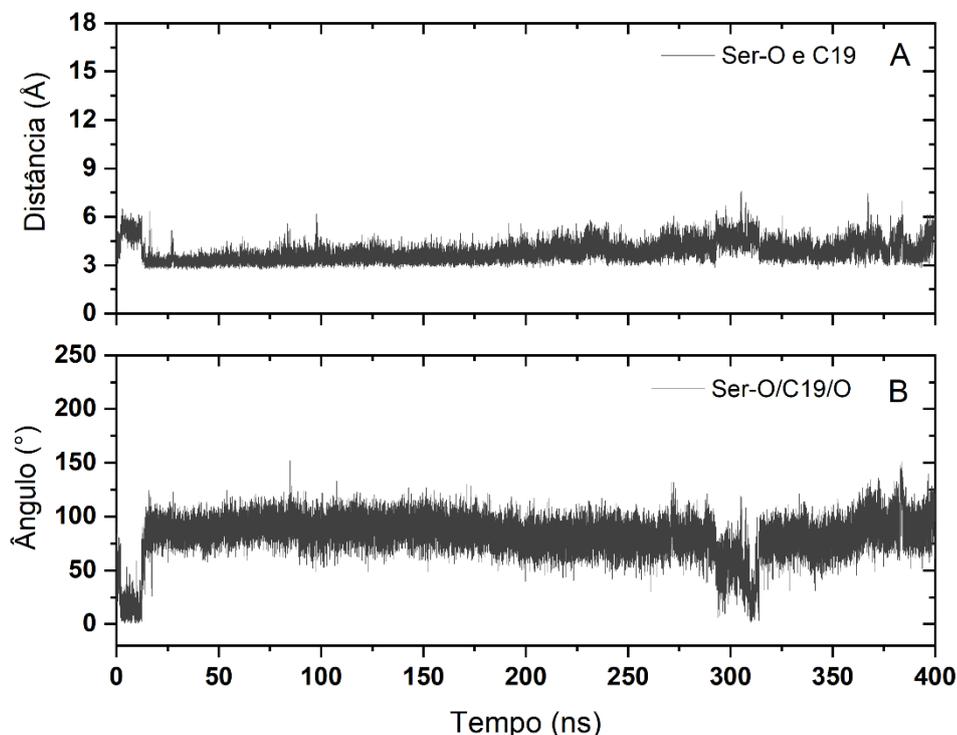


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nesse caso, a proteína apresentou um salto no início da simulação, atingindo 0,5 nm em 200 ns, mantendo-se assim durante todo o restante da simulação. Para o ligante 1 (somente uma conformação), houve um pequeno salto, ficando em 0,12 nm durante toda simulação. Já para tríade catalítica, não foram observadas mudanças conformacionais. Assim, pode-se afirmar que ocorreu poucas oscilações para o ligante e para tríade catalítica.

Os perfis de distância-tempo e ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catalise estão sendo mostradas na Figura 26. A distância entre a serina catalítica e carbono eletrofílico (carboxila) da lactona (C19) está dentro dos critérios NAC, ficando entre 3,0 a 3,5 Å durante quase todo os 400 ns de simulação, apresentando um leve salto nos primeiros 15 ns (Figura 26A). O ângulo de ataque Ser-O/C19/O (Figura 26B) ficou em torno de 100° durante quase toda a simulação. Foi observado um ângulo, bem como uma distância, não favoráveis ao ataque nucleofílico nos primeiros 15 ns.

Figura 26 - Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo entre Ser-O e C19. (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C19/O do ligante **1** e conformação **Lig1_conf1**.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, os resultados discutidos acima mostram que aannonalida (**1**) permanece estável no sítio catalítico da lipase do fungo, com distâncias e ângulos adequados para que ocorra a hidrólise da carboxila da lactona, e corroboram os resultados experimentais (GOMES, Akenaton O C V *et al.*, 2020) da biotransformação pelo fungo.

5.5.2 Análise da DM para o ligante 4

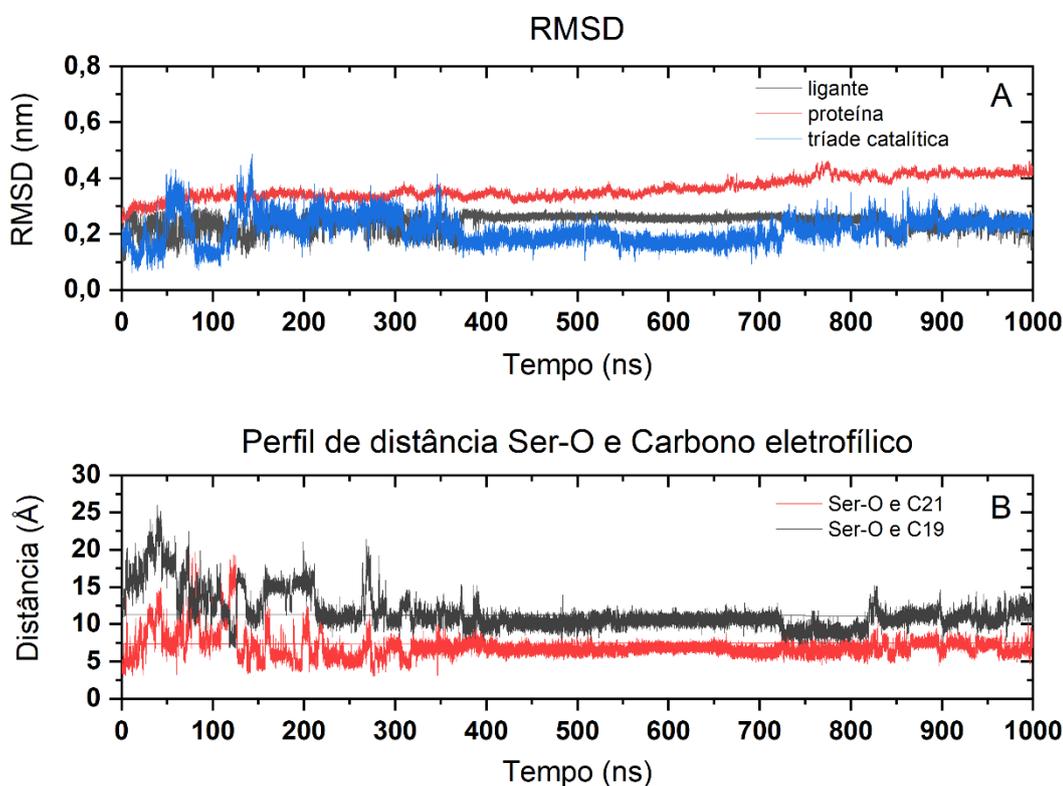
O *docking* molecular para o ligante **4** (*O*-propanoilado) mostrou que é possível a catalise, uma vez que, apresentou conformações que seguem os critérios do NAC com 3,3 Å de distância entre a serina catalítica (Ser-O) e o carbono eletrofílico (C21) do grupo acila da cadeia lateral, e ângulo de 111,2°. No entanto, tais resultados não corroboram os experimentais, que mostraram ausência de biotransformação pelo fungo para este substrato.

A fim de confirmar a estabilidade desta conformação, submeteu a mesma a ensaios de simulações longas de DM. A Figura 27A mostra o RMSD ao longo da simulação longa de 1000 ns para o ligante **4** (linha preta), a enzima (linha vermelha) e tríade catalítica (linha azul).

Foi observado um salto logo no começo da simulação para a enzima e sua estabilização em 0,4 nm. Já para os aminoácidos da tríade catalítica (Ser174, Asp228 e His287), observou-se variação nos primeiros 360 ns e estabilização em 0,28 nm. O ligante **4** se apresentou estável em 0,28 nm a partir de 730 ns.

Analisando o gráfico da Figura 27B, em que é apresentado o perfil de distância-tempo entre a Ser-O e C21 (carbono eletrofílico), observa-se que, até 360 ns, há momentos em que a distância chega a 3,0 Å. Entretanto, houve momentos em que o ligante e a tríade catalítica estavam estabilizados (Figura 27A), mas a distância entre Ser-O e C21 (carbono eletrofílico) estava fora dos limites do NAC (*ca.* 6,0 Å; linha preta). A distância entre Ser-O e C19 (carbono eletrofílico – carboxila - da lactona) ficaram distante durante toda a simulação, embora ocorresse aproximação, não o suficiente para o ataque nucleofílico.

Figura 27 - RMSD e perfil de distância ao longo da simulação longa de 1000ns. (A) RMSD em que a linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante **4** na conformação **Lig4_conf1** e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo, em que a linha vermelha indica a distância entre Ser-O e C21 e a linha preta indica a distância entre Ser-O e C19.

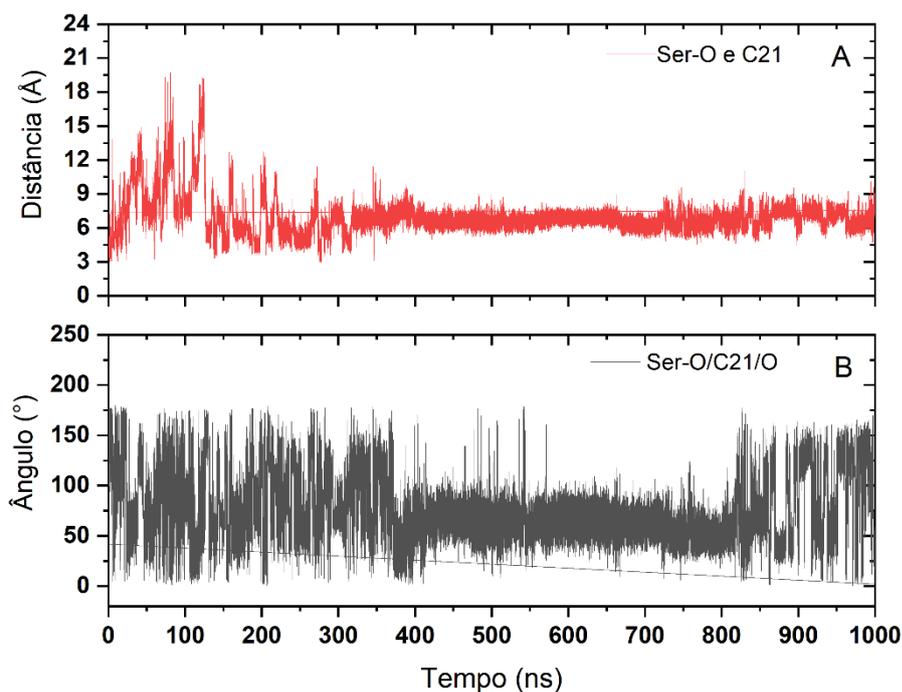


Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao acompanhar o perfil de distância-tempo (Figura 28A) e ângulo-tempo (Figura 28B), percebe-se que, nos momentos de estabilidade dessa conformação, o ângulo de ataque era 50° , diferindo, significativamente, do ângulo observado ($111,2^\circ$) no início da simulação, que tinha distância entre Ser-O e C21 próxima a $3,3 \text{ \AA}$.

Com base nos resultados obtidos nos estudos de dinâmica molecular com o ligante **4** (derivado *O*-acetilado), é possível inferir que este ligante não permanece estável no sítio catalítico da lipase do fungo, com distâncias e ângulos inadequados para que ocorra a hidrólise da carboxila da lactona, corroborando os resultados experimentais da biotransformação pelo fungo.

Figura 28 - Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo Ser-O e C21; (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante **4** na conformação **Lig4_conf1**.



Fonte: Elaborado pelo autor.

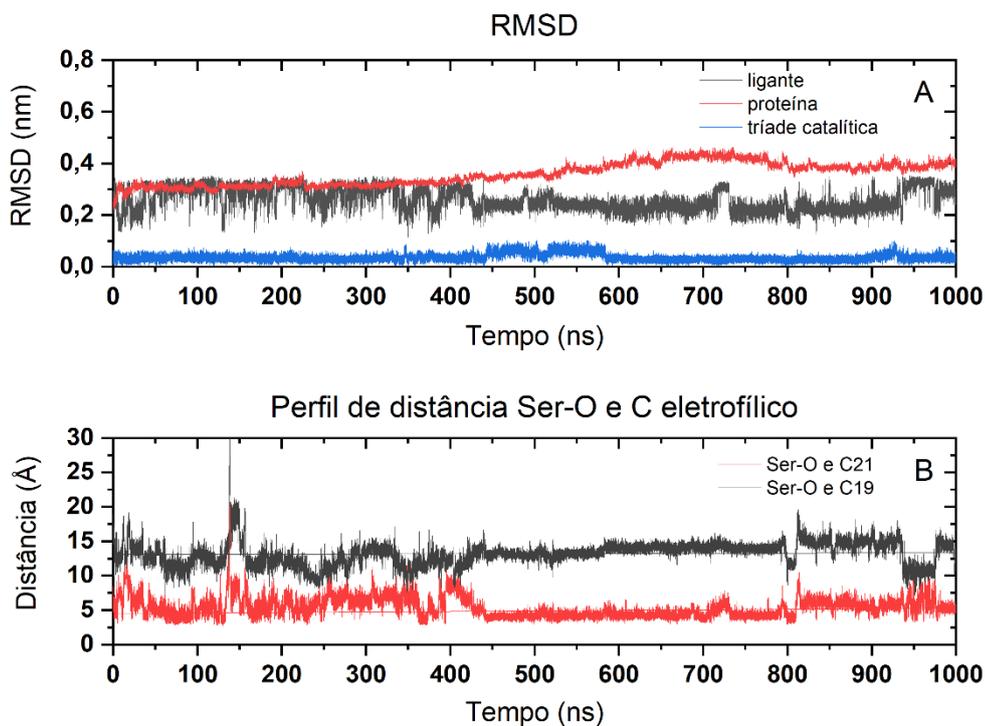
5.5.3 Análise da DM para o ligante 5

Os ensaios de simulações longas de DM para o ligante **5** (*O*-propanoilado) mostrou três conformações, **Lig5_conf1**, **Lig5_conf2** e **Lig5_conf3**, que atendiam os critérios estabelecidos pelo NAC.

No caso do ensaio com a conformação **Lig5_conf1** (Figura 29A), observou-se que o RMSD para a enzima apresentou uma pequena elevação, em torno de 550 ns, ficando em 0,4 nm. O ligante (**Lig5_conf1**) apresentou pequenas oscilações, diferentemente da tríade catalítica, que se manteve estável durante toda a simulação de 1000 ns.

O perfil de distância-tempo (Figura 29B) entre a Ser-O e C21 (carbono eletrofílico) mostrou que, até 400 ns havia momentos em que a distância chegava a 3,0 Å, permanecendo-se estável nesta distância entre 450 e 800 ns. Foi ainda observado que os átomos Ser-O e C-19 (carbono eletrofílico – carboxila - da lactona; linha vermelha) ficaram distante durante toda a simulação, mostrando que ocorreu uma preferência pelo grupo carboxila da cadeia lateral e não pela carboxila do anel lactônico da molécula.

Figura 29 - RMSD e perfil de distância ao longo da simulação longa de 1000ns. (A) RMSD em que a linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante 5 na conformação Lig5_conf1 e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo, em que a linha vermelha indica a distância entre Ser-O e C21 e a linha preta indica a distância entre Ser-O e C19.

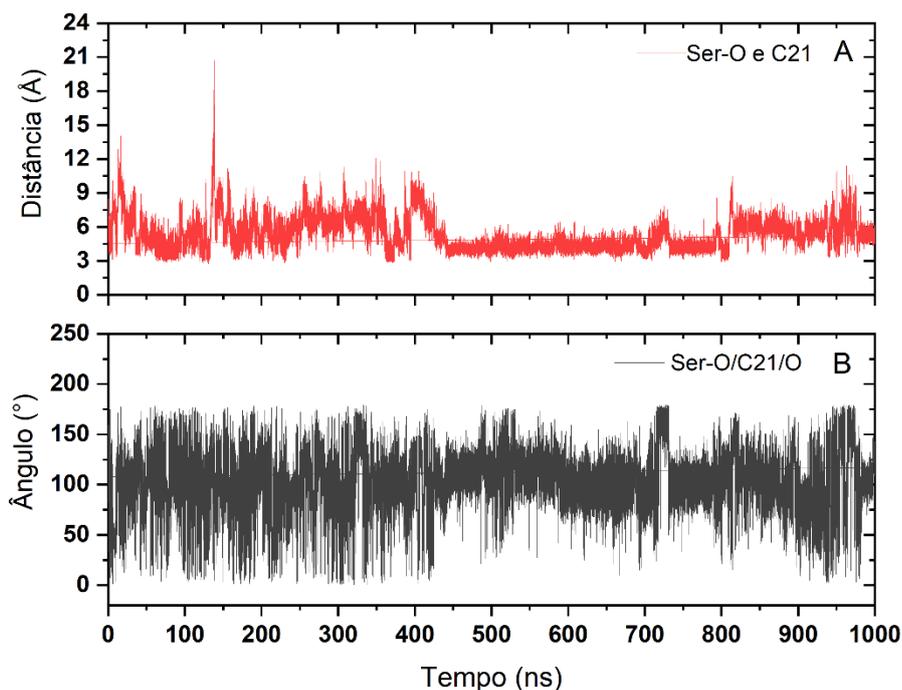


Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao acompanhar o perfil de distância-tempo (Figura 30A) e ângulo-tempo (Figura 30B), observou-se grande oscilação no ângulo até 400 ns. Após 450 ns, ambos ângulo e

distância mostraram-se adequados para o ataque nucleofílico da serina catalítica ao carbono eletrofílico do grupo carboxila.

Figura 30 - Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo Ser-O e C21; (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante **5**, conformação **Lig5_conf1**.

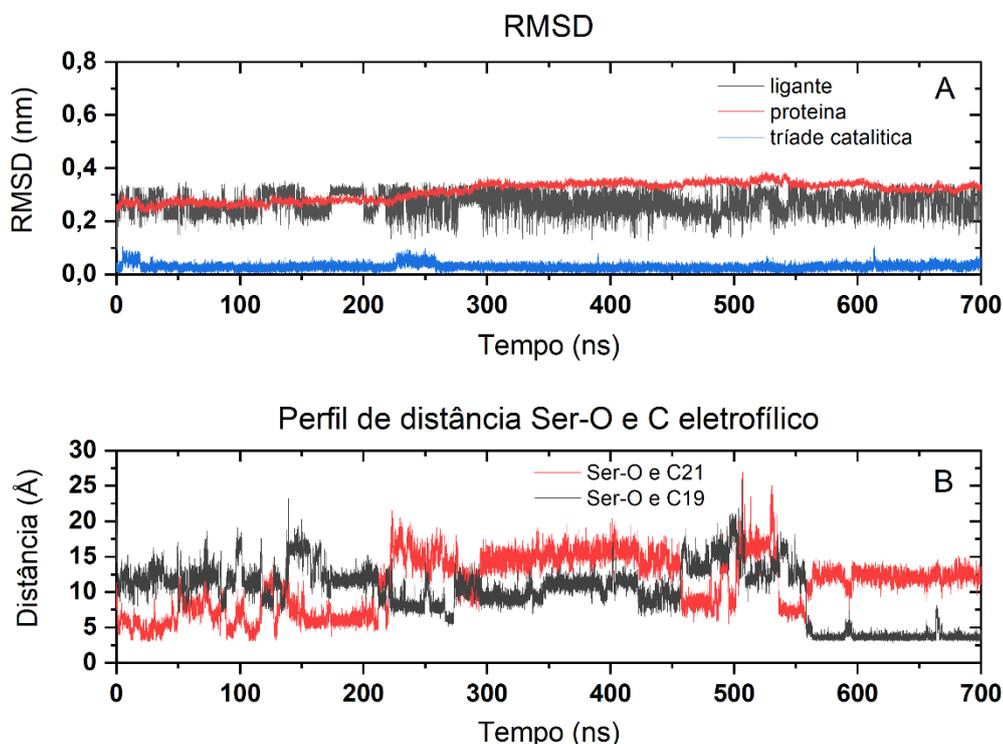


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a conformação **Lig5_conf2** do ligante **5** (*O*-propanoilado), Figura 31A, foi possível observar que no RMSD para uma simulação longa de 700 ns, a enzima não apresentava oscilações significativas, ficando por volta de 0,3 nm. A tríade catalítica também não apresentou mudanças significativas, diferentemente do ligante que apresentou algumas oscilações.

O perfil de distância-tempo (Figura 31B) entre a Ser-O e C21 (carbono carboxílico) mostrou que havia momentos em que a distância atendia aos critérios NAC, ficando por volta de 3,0 Å. No entanto, foram observados saltos significativos entre 230 e 450 ns, observando-se uma mudança conformacional em 550 ns, com o C19 (carbono eletrofílico – carboxila - da lactona) do ligante se aproximando bastante da serina catalítica.

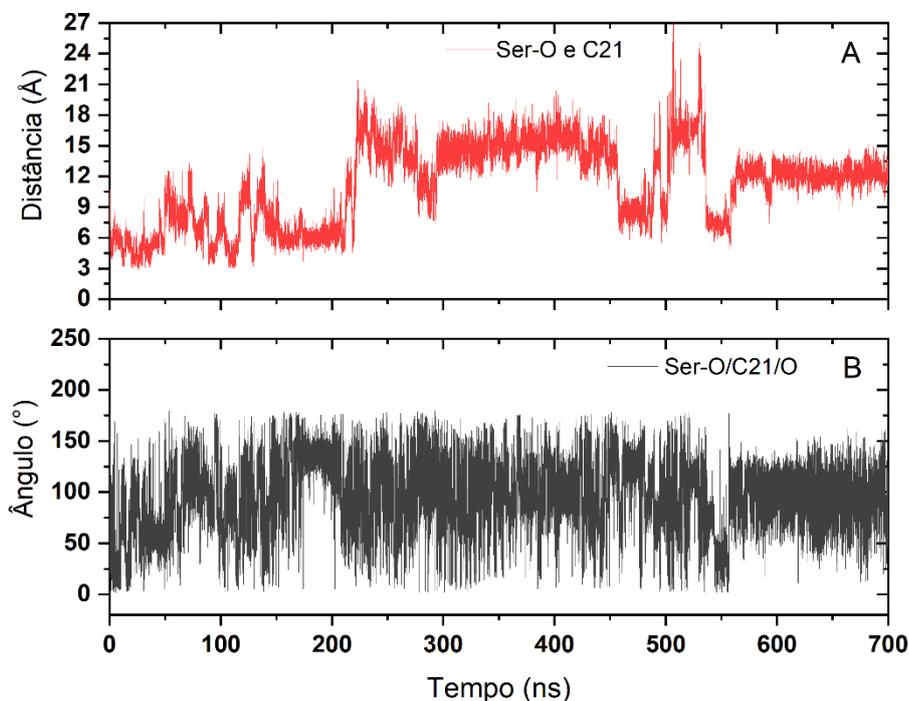
Figura 31 - RMSD e perfil de distância ao longo da simulação longa de 700ns. (A) RMSD em que a linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante **5** na conformação **Lig5_conf2** e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo, em que a linha vermelha indica a distância entre Ser-O e C21 e a linha preta indica a distância entre Ser-O e C19.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao acompanhar o perfil de distância-tempo (Figura 32A) e ângulo-tempo (Figura 32B) para a conformação **Lig5_conf2**, percebe-se que, nos momentos em que a serina catalítica estava perto o suficiente do C21 do substrato (carbono eletrofílico), o ângulo de ataque não era compatível com o NAC, dificultando assim o ataque da Ser-O ao C21 do substrato (BRUICE; LIGHTSTONE, 1999; FONSECA *et al.*, 2020).

Figura 32 - Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo Ser-O e C21; (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante **5** e conformação **Lig5_conf2**.



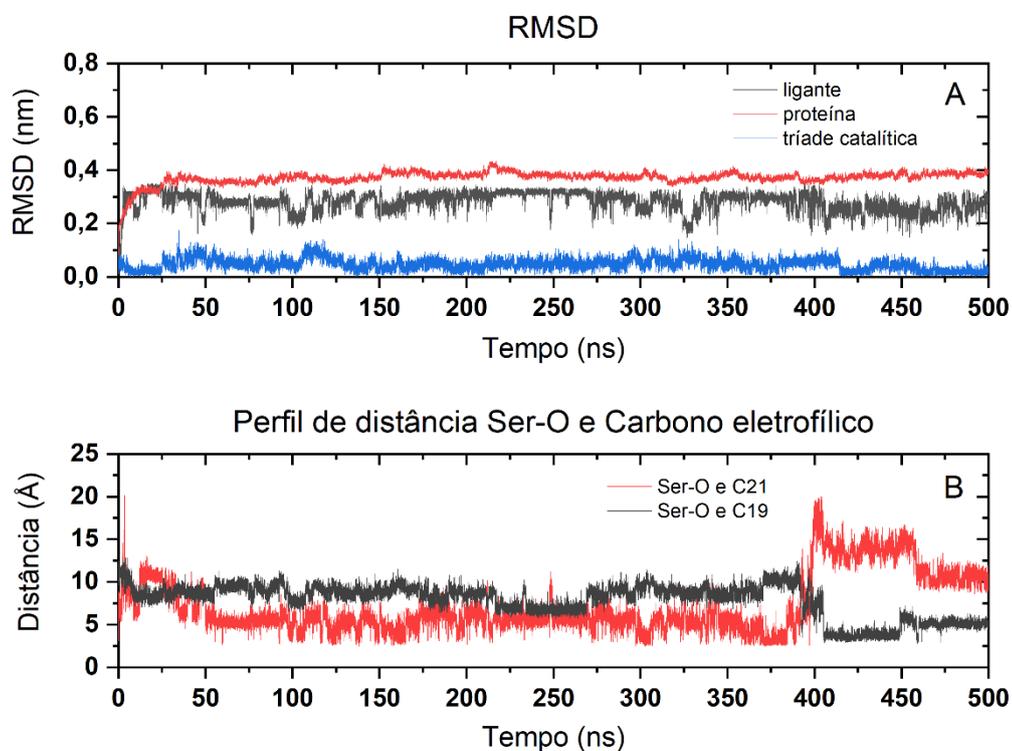
Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, os resultados discutidos para a conformação 2 (**Lig5_conf2**) do ligante **5** (*O*-propanoilado), revelam que esta conformação não é a adequada para que ocorra a catálise enzimática observada na carboxila C-21.

Para a conformação 3 (**Lig5_conf3**) do ligante **5** (*O*-propanoilado), foi observado (Figura 33A) que no RMSD para uma simulação longa de 500 ns, a enzima (linha vermelha) apresentou salto nos primeiros 25 ns e pequenas oscilações ao longo do ensaio de DM. Talvez, estas pequenas oscilações estejam associadas às oscilações da tríade catalítica (linha azul), formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287. O ligante **5** nessa conformação (**Lig5_conf3**) também apresentou oscilações, ficando por volta de 0,30 nm.

O perfil de distância-tempo (Figura 33B) entre a Ser-O e C21 (linha preta) mostrou que eles estavam bastante distantes nos primeiros 50 ns, permanecendo oscilando até 400 ns. Houve momentos em que a distância atingiu 3,0 e 5,0 Å. Após 400 ns, percebe-se uma inversão de conformação, com o C19 (carbono eletrofílico – carboxila - da lactona) se aproximando da serina catalítica, e o distanciamento do C21.

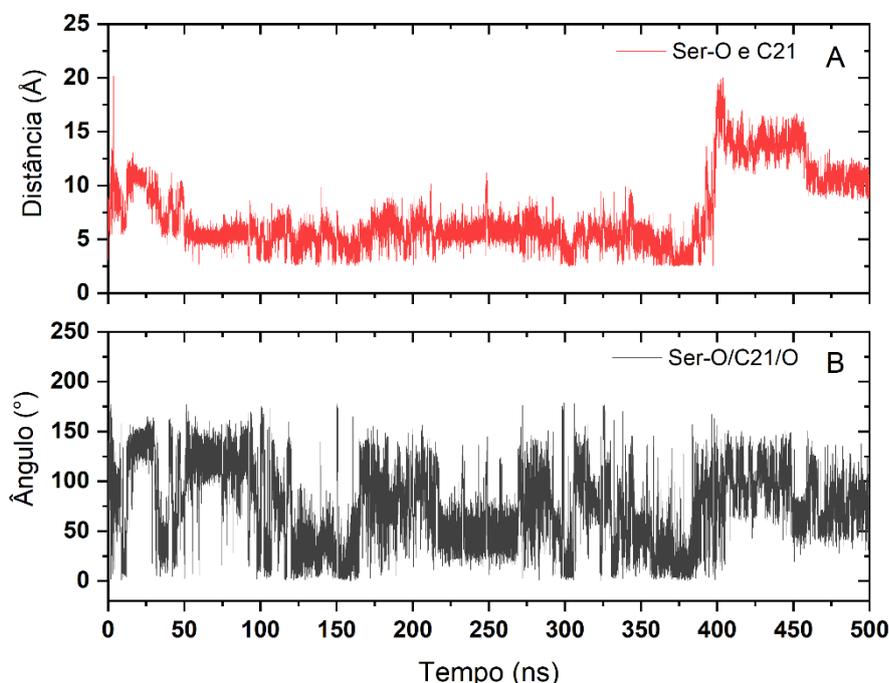
Figura 33 - RMSD e perfil de distância ao longo da simulação de 500ns. (A) RMSD em que linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante (**5**) na conformação **Lig5_conf3** e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo, em vermelho indica a distância entre o Ser-O e C21 e em preto a distância entre Ser-O e C19.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O perfil de distância-tempo (Figura 34A) e ângulo-tempo (Figura 34B) na análise da conformação **Lig5_conf3**, revelou que ambos, distância e ângulo, variaram bastante, não configurando uma conformação favorável para a hidrólise enzimática em C21.

Figura 34 - Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo entre Ser-O e C21 (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante **5** e conformação **Lig5_conf3**.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, os resultados discutidos para as três conformações do ligante **5** (*O*-propanoilado), revelam que somente a conformação **Lig5_conf1** era adequada para a catálise enzimática observada na carboxila C21, conforme observado nos dados experimentais.

5.5.4 Análise da DM para o ligante 6

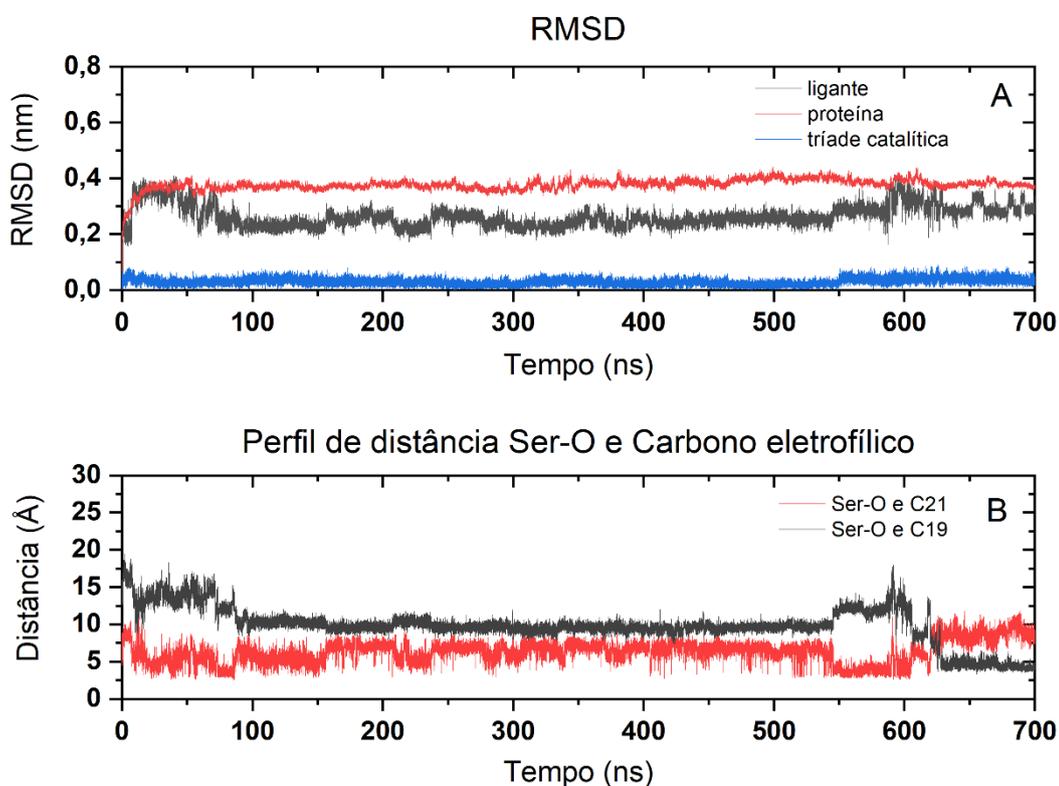
Os ensaios de simulações longas de DM para o ligante **6** (*O*-hexanoilado) mostrou duas conformações, **Lig6_conf1** e **Lig6_conf2**, que atendiam os critérios estabelecidos pelo NAC. Assim, estas duas conformações foram empregadas nos ensaios.

Os gráficos da Figura 35 (A e B) mostram o RMSD e o perfil de distâncias na simulação de DM para conformação **Lig6_conf1**. O RMSD (Figura 35A) para a enzima (linha vermelha) e para o ligante (linha preta) apresentou um salto logo nos primeiros nanossegundos de simulação, com a enzima estabilizando-se por volta de 0,4 nm e o ligante em 0,25 nm. A tríade catalítica manteve-se estável durante toda a simulação longa (700 ns).

A Figura 35B mostra o perfil de distância do C21 (linha vermelha) e C19 (linha preta) para a serina catalítica, onde percebe-se que o C21 do substrato entrou distante da serina catalítica na etapa de produção, mas no decorrer da simulação apresentou vários momentos em

que essa distância estava dentro dos critérios do NAC, ficando em 3,0 Å. De 550 a 600 ns a distância da Ser-O e C21 ficou estável em 3,0 Å (embora poucas vezes) e após esse período ocorreu inversão de conformação, com o C19 se aproximando da serina catalítica.

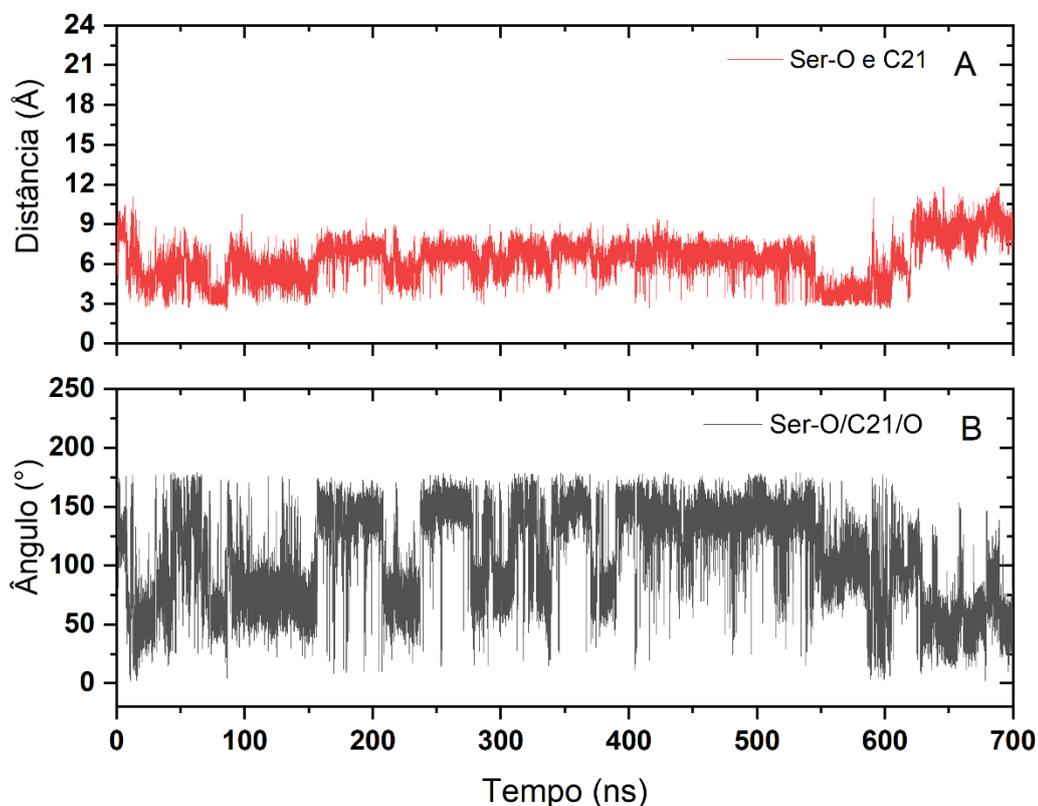
Figura 35 - RMSD e perfil de distância ao longo da simulação de 700 ns. (A) RMSD em que linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante **6** na conformação **Lig6_conf1** e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo em vermelho indica a distância entre o Ser-O e C21 e em preto a distância entre Ser-O e C19.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando o ângulo de ataque da serina catalítica ao carbono eletrofílico (C21) do substrato (Figura 36B), percebe-se que o ângulo está dentro dos critérios NAC no momento em que a distância (Figura 36A) é 3,0 Å, sendo, dessa forma, favorável ao ataque nucleofílico.

Figura 36 - Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo entre Ser-O e C21; (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante **6** e conformação **Lig6_conf1**.

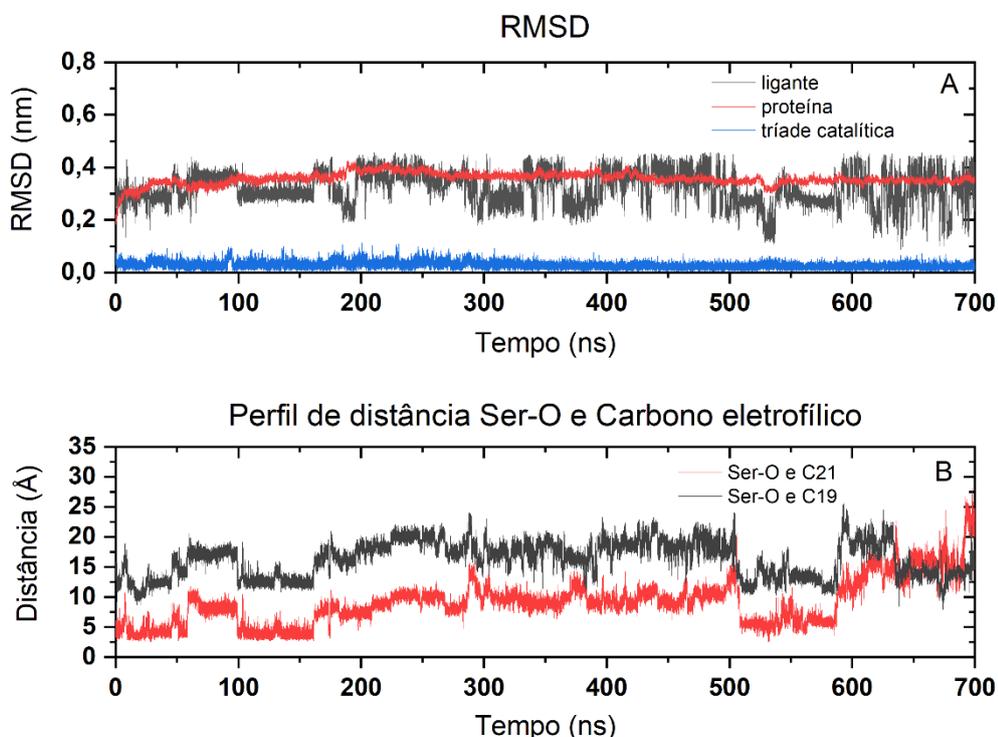


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os gráficos da Figura 37 (A e B) mostram o RMSD e o perfil de distâncias na simulação de DM para conformação **Lig6_conf2**. Na Figura 37A, o RMSD para a enzima (linha vermelha) apresentou estabilidade durante toda a simulação, ao passo que o ligante **6** (linha preta) apresentou saltos significativos durante toda a simulação de 700 ns.

A variação de RMSD no ligante é sentida ao analisar o perfil de distância através da Figura 37B, que mostra a distância do C21 (linha preta) e C19 (linha vermelha) para a serina catalítica. Foi possível observar, através da linha vermelha, que o C21 do substrato entrou na etapa de produção próximo à serina catalítica. Entretanto, em 60 ns, este carbono apresentou um salto significativo, voltando a se aproximar em 100 ns e permanecendo assim até 170 ns. A partir desse tempo, o sistema não apresentou estabilidade, indicando que a conformação **Lig6_conf2** não é estável.

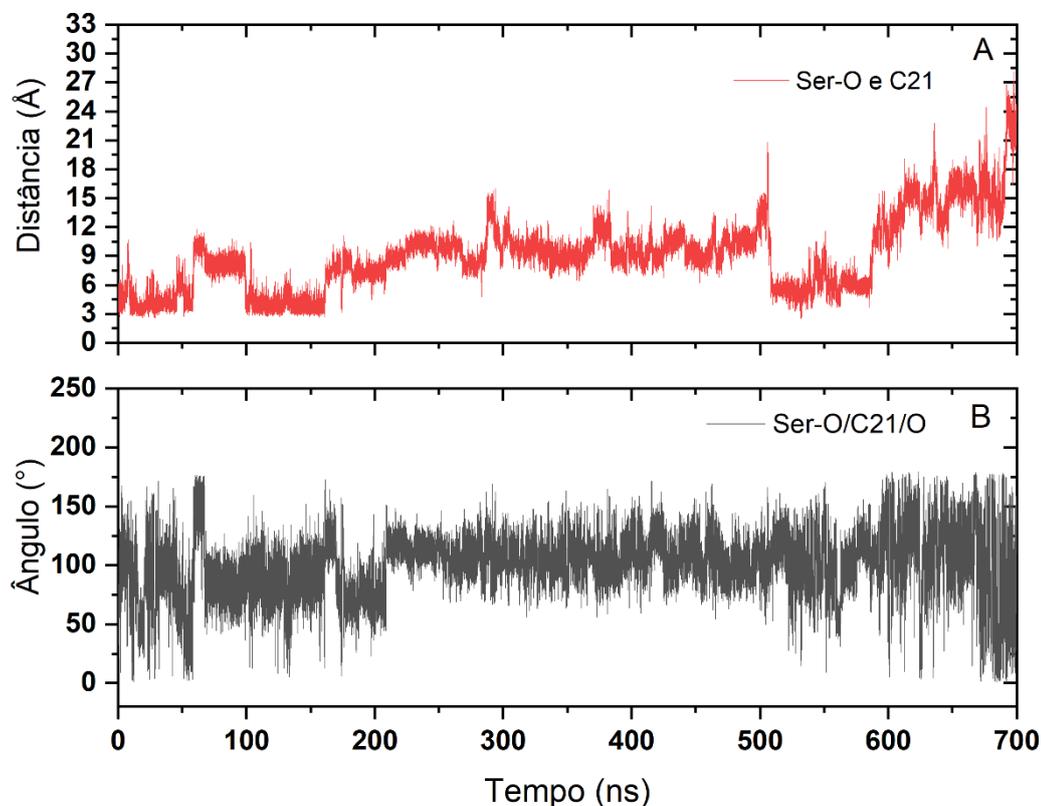
Figura 37 - RMSD e perfil de distância ao longo da simulação de 700ns. (A) RMSD em que linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante **6** na conformação **Lig6_conf2** e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo em vermelho indica a distância entre o Ser-O e C21 e em preto a distância entre Ser-O e C19.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando o ângulo de ataque da serina catalítica ao carbono eletrofílico (C21) do substrato (Figura 38B), percebe-se que este está dentro dos critérios NAC somente nos intervalos de tempo de 100 a 170 ns. A Figura 38A mostra que a distância está entre 3,0 e 4,0 Å neste intervalo de tempo (100 a 170 ns). Dessa forma, a conformação **Lig6_conf2** não é favorável ao ataque nucleofílico.

Figura 38 - Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo entre Ser-O e C21; (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante **6** e conformação **Lig6_conf2**.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, os resultados discutidos para as duas conformações (**Lig6_conf1** e **Lig6_conf2**) do ligante **6** (*O*-hexanoilado), mostraram que a conformação **Lig6_conf1** é a mais adequada para a catálise enzimática observada na carboxila C21, conforme observado nos dados experimentais.

5.5.5 *Análise da DM para o ligante 7*

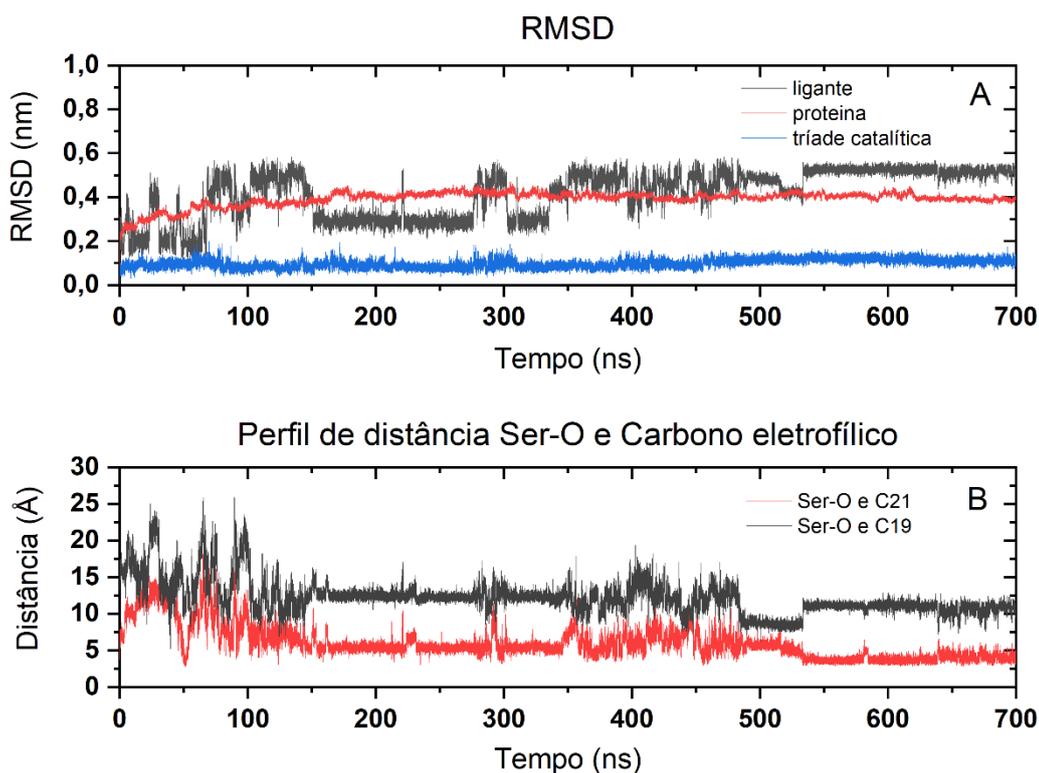
Os ensaios de simulações longas de DM para o ligante **7** (*O*-decanoilado) mostrou duas conformações, **Lig7_conf1** e **Lig7_conf2**, que atendiam os critérios estabelecidos pelo NAC. Dessa forma, estas duas conformações foram empregadas nos ensaios.

A Figura 39A mostra o RMSD para a enzima, o ligante na conformação **Lig7_conf1** e a tríade catalítica, formada pelos aminoácidos S174, D228 e H287. O RMSD para enzima (linha vermelha) apresentou oscilação, se estabilizando em 0,4 nm. Para o ligante (linha preta), o RMSD apresentou oscilações bastante significativas, atingindo o equilíbrio em 540 ns, e

ficando em 0,5 nm. Já a tríade catalítica manteve-se estável durante toda a simulação de 700 ns.

A Figura 39B mostra o perfil de distância para o carbono 21 (carbono eletrofílico do grupo carboxila; linha vermelha) e para o carbono 19 (carbono eletrofílico da lactona; linha preta) até o oxigênio da serina catalítica. Foi possível observar, logo nos primeiros 150 ns, a ocorrência de saltos significativos, corroborando o que foi observado nos primeiros 150 ns do gráfico de RMSD (Figura 39A). Após esse período, o sistema apresentou-se estável entre 150 ns e 350 ns, voltando a oscilar até 480 ns. Por volta de 530 ns, observou-se a estabilização do sistema em 3,0 Å entre Ser-O e C21 e 10,0 Å entre Ser-O e C19.

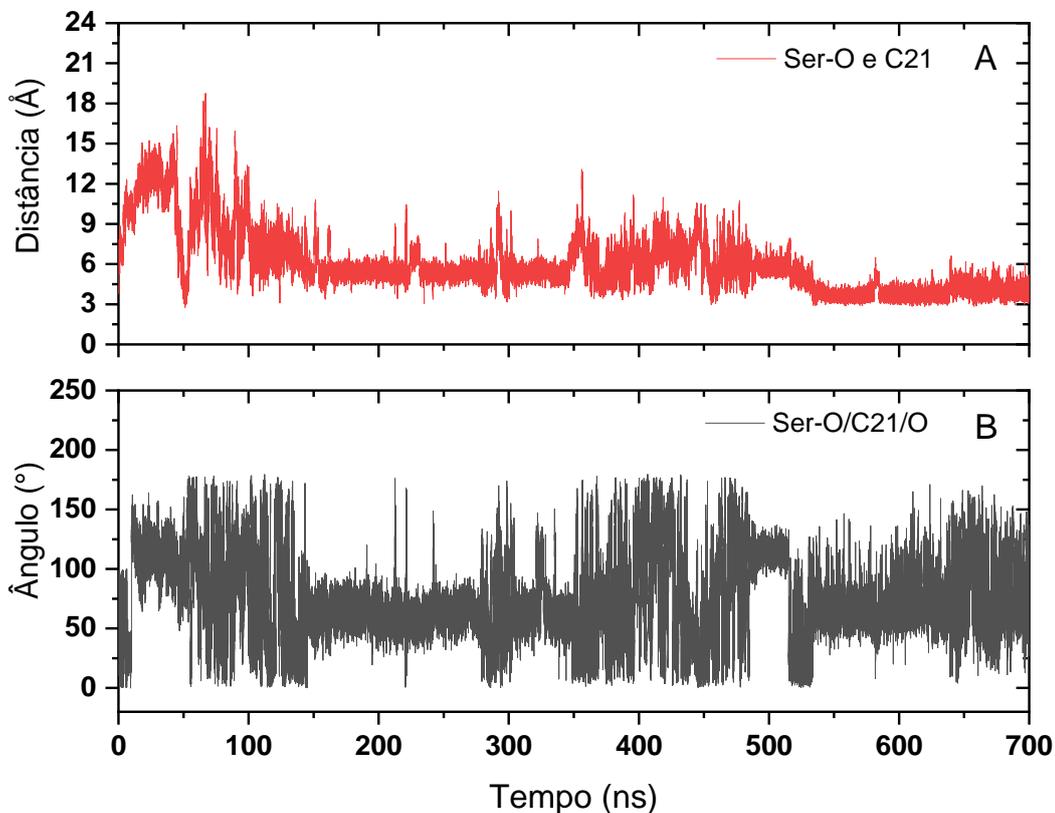
Figura 39 - RMSD e perfil de distância ao longo da simulação de 700ns. (A) RMSD em que a linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante **7** na conformação **Lig7_conf1** e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo, em que a linha vermelha indica a distância entre Ser-O e C21 e a linha preta indica a distância entre Ser-O e C19.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando a distância (Figuras 40A) e o ângulo (Figuras 40B) de ataque da serina catalítica ao carbono eletrofílico do grupo carboxila (C21) do ligante **7**, observou-se que o ambos, distância e ângulo, estão dentro dos critérios NAC a partir de 540 ns, sendo, dessa forma favorável ao ataque nucleofílico.

Figura 40 - Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo e (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante **7** e conformação **Lig7_conf1**.

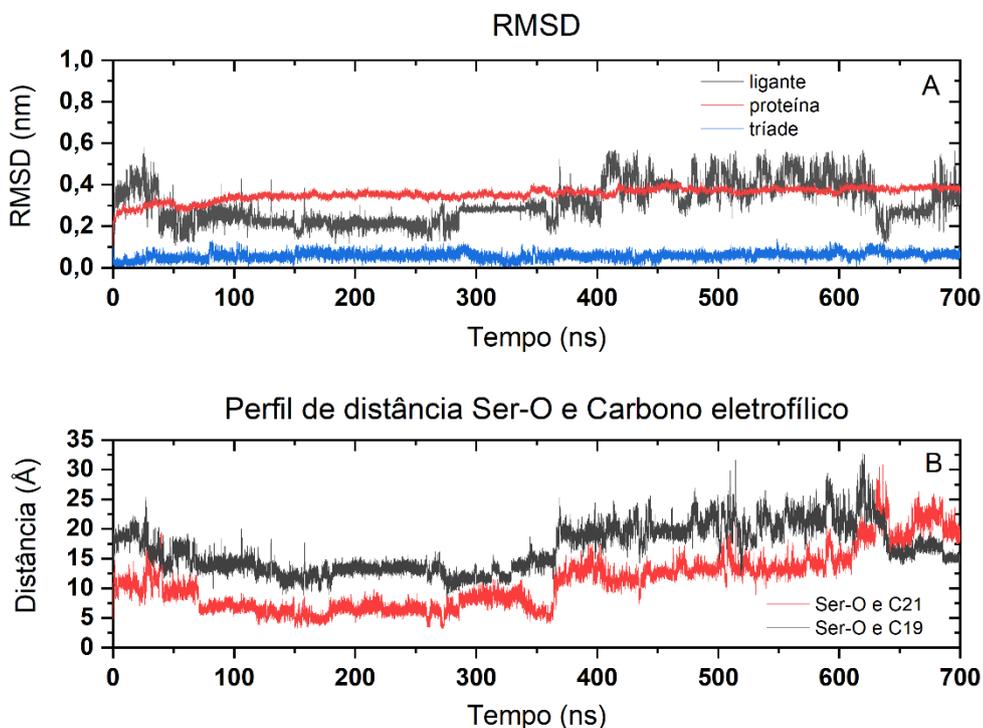


Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 41A apresenta o RMSD para a enzima, o ligante na conformação **Lig7_conf2** e a tríade catalítica. Observou-se que a enzima apresentou pequenos saltos, estabilizando-se a partir de 100 ns em 0,3 nm. Além disso, foi possível observar que a tríade catalítica se manteve estabilizada durante quase toda a simulação. Já o RMSD para o ligante **7** (linha preta) apresentou vários saltos durante toda a simulação de 700 ns.

A Figura 41B mostra o perfil de distância para o carbono 21 (carbono eletrofílico do grupo carboxila; linha vermelha) e para o carbono 19 (carbono eletrofílico da lactona; linha preta) até o oxigênio da serina catalítica.

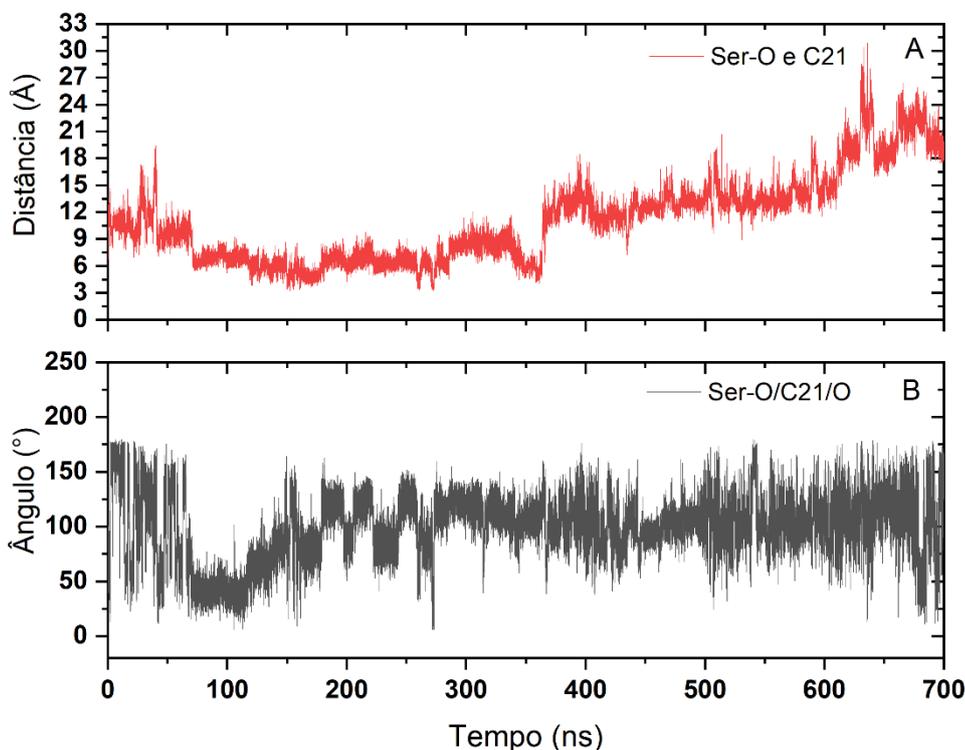
Figura 41 - RMSD e perfil de distância ao longo da simulação de 700ns. (A) RMSD em que a linha vermelha indica proteína, linha preta indica o ligante **7** na conformação **Lig7_conf2** e linha azul indica a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287; (B) Perfil de distância-tempo, em que a linha vermelha indica a distância entre Ser-O e C21 e a linha preta indica a distância entre Ser-O e C19.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A simulação de DM revelou que a conformação **Lig7_conf2** não é estável, uma vez que os momentos em que o C21 (Figura 42) atingiu distância e ângulo de ataque favoráveis ao ataque nucleofílico foram muito pequenos.

Figura 42 - Gráfico de distância e ângulo obtidos por dinâmica molecular. (A) Distância-tempo e (B) Ângulo-tempo para os átomos envolvidos na catálise Ser-O/C21/O do ligante **7** e conformação **Lig7_conf2**.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base nos resultados discutidos para as duas conformações (**Lig7_conf1** e **Lig7_conf2**) do ligante **7** (*O*-decanoilado), foi possível identificar a conformação **Lig7_conf1** com sendo a mais adequada para a catálise enzimática observada na carboxila C21, conforme observado nos dados experimentais.

5.6 Estimativa de energia de interação

Através do cálculo de MM-PBSA pode-se obter estimativas da energia de interação para o complexo receptor-ligante, da diferença de energia entre eles e, consequentemente, da afinidade do ligante com o receptor (AHMAD *et al.*, 2021).

A Tabela 4 apresenta as energias de ligação de van der Waals de cada complexo receptor-ligante, sendo -173,2 kJ/mol para annonalida (**1**) na conformação **Lig1_conf1**; -167,3 kJ/mol para o derivado *O*-acetilado (**4**) na conformação **Lig4_conf1**; -211,8 kJ/mol para o substrato *O*-propanoilado (**5**) na conformação **Lig5_conf1**; -243,6 kJ/mol para o derivado *O*-hexanoilado (**6**) na conformação **Lig6_conf1**; -280,0 kJ/mol para o *O*-decanoilado (**7**) na conformação **Lig7_conf1**. Para Segantine (2019), as interações de van der Waals são

importantes na estabilização dos complexos e de reconhecimento molecular, principalmente quando as moléculas estão próximas. A energia eletrostática de cada complexo **Lig1_conf1**, **Lig4_conf1**, **Lig5_conf1**, **Lig6_conf1** e **Lig7_conf1** foi de -55,5; -24,2; -28,3; -67,1 e -51,2 kJ/mol, respectivamente.

Analisando a energia de ligação (ΔG_{Lig}) no modelo de superfície acessível ao solvente (SASA) e no modelo de volume acessível ao solvente (SAV) de cada complexo, percebe-se que o aumento da afinidade entre receptor-ligante está associado ao aumento da hidrofobicidade da cadeia lateral do grupo acila. Estes resultados se assemelham aos experimentais e aos disponíveis na literatura (FABER, 2011; KHAN *et al.*, 2017), que afirmam que as lipases atuam melhor em interface hidrofóbica por se apresentarem na conformação ativa, aumentando significativamente sua atividade lipolítica.

Tabela 4 - Valores de energia de ligação pelo método MM-PBSA para as conformações que teve sua estabilidade confirmada por DM (valores em kJ/mol).

	E_{vw}	$E_{eletro.}$	E_{polar}	E_{SAV}	E_{SASA}	$\Delta G_{Lig(SAV)}$	$\Delta G_{Lig(SASA)}$
Lig1_conf1	-173,2	-55,5	121,6	-140,9	-17,8	-248,1	-124,9
Lig4_conf1	-167,3	-24,2	114,3	-129,7	-17,6	-206,9	-94,9
Lig5_conf1	-211,8	-28,3	118,2	-160,3	-19,4	-282,3	-141,4
Lig6_conf1	-243,6	-67,1	189,4	-201,8	-24,9	-323,2	-146,3
Lig7_conf1	-280,0	-51,2	156,7	-219,4	-27,8	-393,8	-202,3

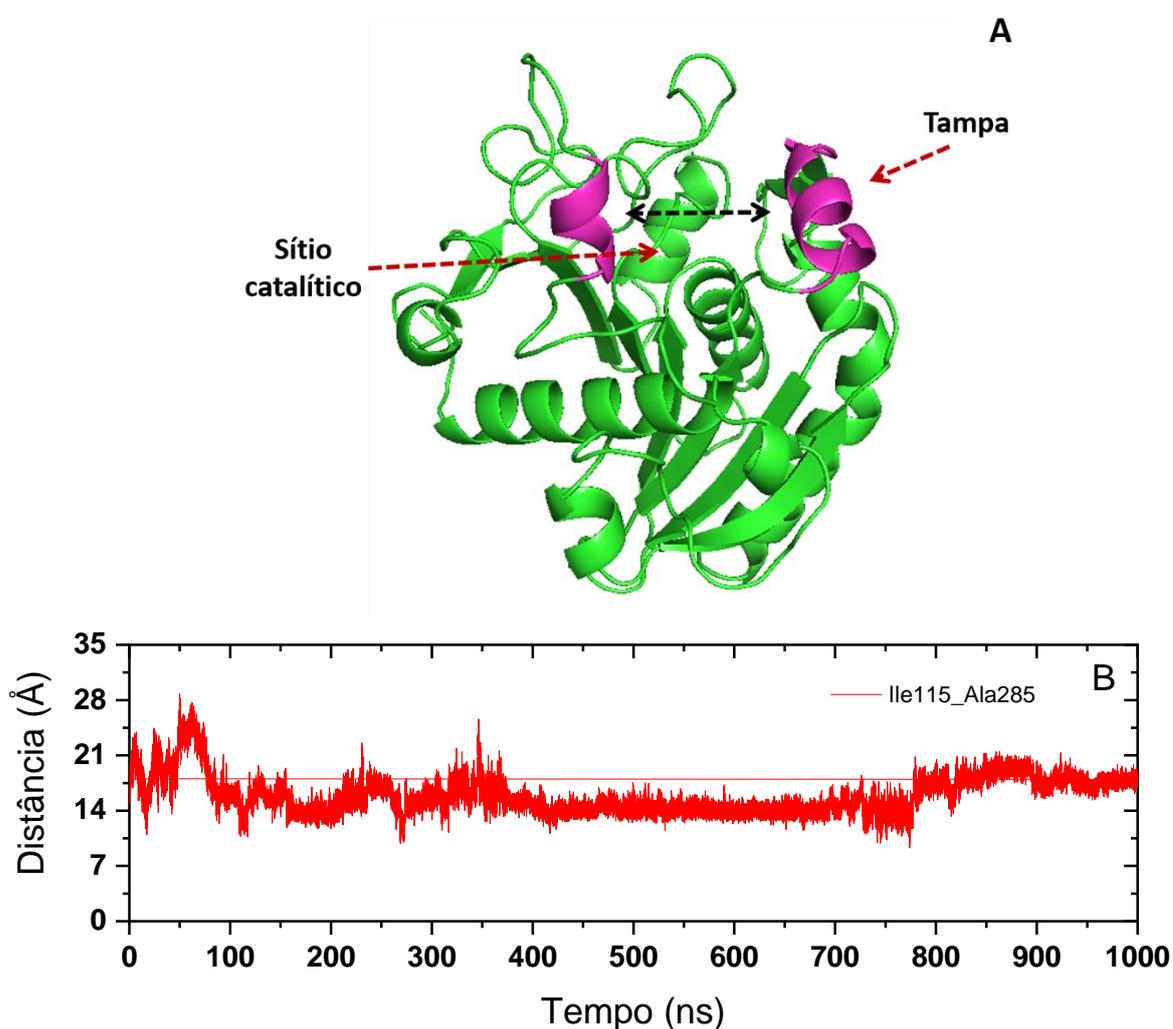
Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 43A mostra a lipase do fungo na conformação ativa, onde dois aminoácidos (cor magenta) encontram-se na tampa do bolsão de ligação. A Figura 43B apresenta o gráfico com perfil de distância entre dois aminoácidos na tampa do bolsão, Ile115 e Ala285, para o *O*-acetilado (**4**). Foi possível observar que estes resíduos de aminoácidos estavam distantes no início da etapa de produção da DM. Dessa forma, a enzima encontrava-se na conformação com a tampa aberta (conformação ativa), mas no decorrer da simulação de 1000 ns percebeu-se uma aproximação desses aminoácidos, sugerindo um fechamento da tampa. Este fator afeta, significativamente, a catalise do substrato, o que também foi constatado pela baixa afinidade de ligação apresentada na Tabela 4.

Khan e colaboradores (2017), em seu trabalho sobre o domínio da tampa em lipases, afirmam que a tampa flexível próxima ao sítio ativo da lipase pode contribuir tanto para

diminuição da estabilidade quanto para as propriedades catalíticas do biocatalisador. Devido à natureza anfipática da tampa, na sua conformação fechada, a região hidrofílica fica voltada para o solvente e a região hidrofóbica fica voltada para o sítio ativo. Assim, devido à baixa hidrofobicidade do substrato **4**, é possível sugerir que este, provavelmente, está direcionado para o lado hidrofílico da tampa (voltada para o solvente) e não para o sítio catalítico da enzima.

Figura 43 - Enzima e perfil de distância. (A) Receptor na conformação ativa, cor magenta aminoácidos da tampa (Ile115 e Ala285). (B) Perfil de distância entre os aminoácidos Ile115 e Ala285 para acetilado (**4**) durante simulação longa de 1000 ns.

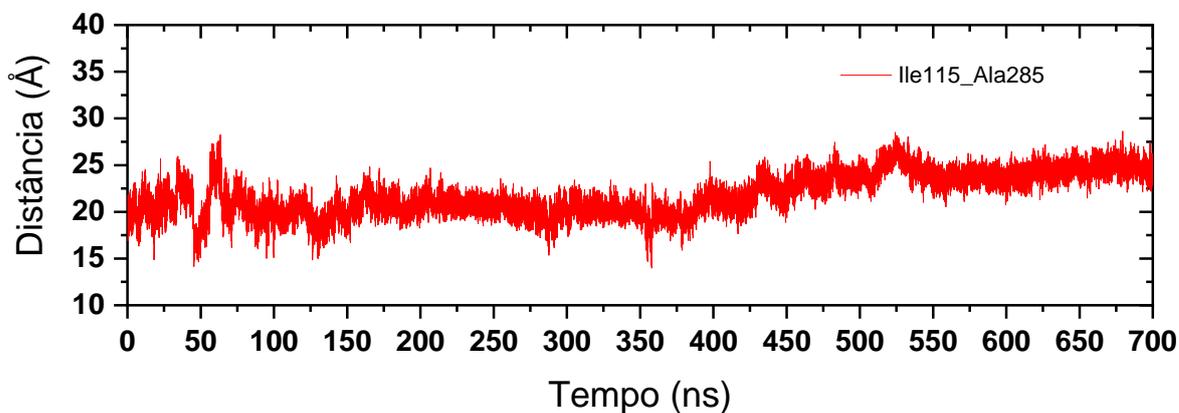


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o derivado *O*-decanoilado (**7**), a análise do perfil distância para os resíduos Ile115 e Ala285 do complexo (Figura 44) mostrou que estes aminoácidos se afastaram ao longo da simulação, mantendo a enzima com a tampa aberta (conformação ativa) durante toda a simulação longa de 700 ns. As energias de ligação apresentadas na Tabela 4 corroboram esses

resultados, apresentando $\Delta G_{\text{Lig(SAV)}}$ de -393,8 kJ/mol e $\Delta G_{\text{Lig(SASA)}}$ de -202,3 kJ/mol para Lig7_conf1.

Figura 44 - Perfil de distância entre Ile115 e Ala285 para o derivado *O*-decanoilado (**7**).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos esses resultados estão de acordo com os experimentais da biotransformação da annonalida (**1**) e seus derivados *O*-acilados (**4-7**) (Item 3.4 – Figura 9). Nestes, o derivado **7** produziu a annonalida como produto majoritário, formada pela hidrólise do grupo carboxila do éster da cadeia lateral. O substrato **7** apresentou elevada atividade lipolítica, provavelmente devido à alta hidrofobicidade, fazendo com que não fosse expulso do sítio ativo da enzima após o início da etapa de produção da DM, e se mantivesse estável durante toda a simulação.

6 CONCLUSÃO

O estudo teórico da atividade catalítica da lipase do fungo *Fusarium oxysporum* na bioconversão do diterpenoannonalida e seus derivados *O*-acilados foi realizado empregando-se as seguintes etapas: (i) modelagem molecular por homologia para obtenção da lipase do fungo a ser investigada; (ii) avaliação e refinamento do modelo enzimático; (iii) obtenção das estruturas tridimensionais dos ligantes; (iv) identificação do potencial de interação entre a lipase do fungo e aannonalida e seus derivados *O*-acilados.

Os estudos teóricos empregados, mostraram-se eficientes para explicar a influência do grupo acila na cadeia lateral dos substratos investigados (**1**, **4-7**) na hidrólise enzimática destes compostos pela lipase modelada do fungo *F. oxysporum*. As simulações de *docking* molecular permitiram identificar conformações mais susceptíveis ao ataque da serina catalítica da enzima ao carbono 19 (carbono carboxila) do anel lactona daannonalida (**1**) e ao carbono 21 (carbono carboxila) da cadeia lateral dos derivados *O*-acilados (**4-7**), segundo os critérios NAC. Contudo, as simulações de ancoramento molecular, sozinhas, não foram suficientes para explicar os dados experimentais.

As simulações de dinâmica molecular (DM) confirmaram a estabilidade de algumas das conformações obtidas no *docking* molecular, através da análise dos valores de RMSD para a enzima, o ligante (conformações indicadas pelo *docking*) e para a tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser174, Asp228 e His287. Também foi analisada a distância entre a serina catalítica (Ser-O) para o C19 (carbono eletrofílico do anel lactona) e C21 (carbono eletrofílico da cadeia lateral) e o ângulo de ataque entre Ser-O/C21/O. Os resultados obtidos nas simulações de DM revelaram a estabilidade das conformações **Lig1_conf1**, **Lig5_conf1**, **Lig6_conf1** e **Lig7_conf1**. A conformação **Lig4_conf1** mostrou baixa estabilidade comparada às dos demais substratos.

Por fim, após as simulações de acoplamento induzido, a realização de cálculos de MM/PBSA permitiu estimar-se a energia de interação entre enzima-substrato. Os resultados mostraram que o aumento da cadeia acila, associada ao aumento da hidrofobicidade, apresenta geometria compatível ao processo catalítico. Estes resultados corroboraram os resultados experimentais analisados por LC/MS.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, G.M.; HAMMAD, Ibtisam. Production of lipase by certain soil fungi. I: optimization of cultural conditions and genetic characterization of lipolytic strains of *Aspergilli* using protein patterns and random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Journal of Biological Sciences**, v. 2, p. 639–644, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.3923/jbs.2002.639.644>. Acesso em: 01 ago. 2021.
- AHMAD, Sajjad; WAHEED, Yasir; ISMAIL, Saba; NAJMI, Muzammil Hasan; ANSARI, Jawad Khaliq. Rational design of potent anti-COVID-19 main protease drugs: an extensive multi-spectrum *in silico* approach. **Journal of Molecular Liquids**, v. 330, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115636>. Acesso em: 01 ago. 2021.
- ALLAN SVENDSEN. **Understanding enzymes function, design, engineering, and analysis**. 1 st. [S. l.]: Jenny Stanford Publishing, 2016. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b19951>. Acesso em: 08 set. 2021.
- AMARO, Rommie E; BAUDRY, Jerome; CHODERA, John; OZLEM DEMIR; MCCAMMON, J. Andrew; MIAO, Yinglong; SMITH, Jeremy C. Ensemble docking in drug discovery. **Biophysical**, , p. 2271–2278, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.038>. Acesso em: 01 ago. 2021.
- ANOBOM, Cristiane D.; PINHEIRO, Anderson S.; DE-ANDRADE, Rafael A.; AGUIEIRAS, Erika C.G.; ANDRADE, Guilherme C.; MOURA, Marcelo V.; ALMEIDA, Rodrigo V.; FREIRE, Denise M. From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/684506>. Acesso em: 01 ago. 2021.
- APWEILER, R. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. D115–D119, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh131>. Acesso em: 05 jul. 2021.
- ASSUNÇÃO, João Carlos da Costa. **Reações de biocatálise utilizando sistemas de células íntegras e de nezimias imobilizadas de *Saccharum officinarum* Linn (cana de açúcar)**. 2008. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- BARREIRO, Eliezer J.; RODRIGUES, Carlos Rangel; ALBUQUERQUE, Magaly Girão; SANT'ANNA, Carlos Mauricio Rabello de; ALENCASTRO, Ricardo Bicca de. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 300–310, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-40421997000300011>. Acesso em: 05 jul. 2021.
- BARRETO, Adolph Annderson Gonçalves Costa. **Caracterização físico-química, modelagem molecular e investigação da ação da lectina CRLII em processos inflamatórios e do potencial antitumoral das Lectinas CRLI e CRLII**. 2017. Dissertação (Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- BARROS, Maria Ester de Sá Barreto. **Estudos de docking molecular, síntese e atividade biológica de análogos da (-)-massoialactona e da combretastatina A-4**. 2015. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- BATEMAN, Alex; MARTIN, Maria Jesus; O'DONOVAN, Claire; MAGRANE, Michele; ALPI, Emanuele; ANTUNES, Ricardo; BELY, Benoit; BINGLEY, Mark; BONILLA, Carlos; BRITTO, Ramona; BURSTEINAS, Borisas; BYE-AJEE, Hema; COWLEY, Andrew; DA SILVA, Alan; DE

GIORGI, Maurizio; DOGAN, Tunca; FAZZINI, Francesco; CASTRO, Leyla Garcia; FIGUEIRA, Luis; ... ZHANG, Jian. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. D158–D169, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>. Acesso em: 16 mai. 2021.

BERGER, Lúcia Raquel Ramos; STAMFORD, Newton Pereira; WILLADINO, Lilia Gomes; LARANJEIRA, Delson; DE LIMA, Marcos Antonio Barbosa; MALHEIROS, Samuel Marcus Montarroyos; DE OLIVEIRA, Wanderson José; STAMFORD, Thayza Christina Montenegro. Cowpea resistance induced against *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* by crustaceous chitosan and by biomass and chitosan obtained from *Cunninghamella elegans*. **Biological Control**, v. 92, p. 45–54, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.006>. Acesso em: 16 mai. 2021.

BIASINI, Marco; BIENERT, Stefan; WATERHOUSE, Andrew; ARNOLD, Konstantin; STUDER, Gabriel; SCHMIDT, Tobias; KIEFER, Florian; CASSARINO, Tiziano Gallo; BERTONI, Martino; BORDOLI, Lorenza; SCHWEDE, Torsten. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 252–258, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>. Acesso em: 16 mai. 2021.

BOROWIECKI, Paweł; PAPROCKI, Daniel; DUDZIK, Agnieszka; PLENKIEWICZ, Jan. Chemoenzymatic synthesis of proxiphylline enantiomers. **Journal of Organic Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 380–395, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b01840>. Acesso em: 23 set. 2020.

BRITO, Maria Vieira de. **Preparação e avaliação da atividade citotóxica de derivados do diterpenoannonalida**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

BRITO, Maria V.; MARQUES, Ricardo A.; MATTOS, Marcos C.; ALVARENGA, Meiry E.; VALDO, Ana Karoline S. M.; OLIVEIRAA, Maria C. F.; MARTINS, Felipe T. Semisynthesis and absolute configuration of a novel rearranged 19, 20 - δ - lactone (9 β H) - pimarane diterpene. **Acta Cryst.**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1107/S2053229618009452>. Acesso em: 28 jan. 2020.

BRUICE, Thomas C.; LIGHTSTONE, Felice C. Ground state and transition state contributions to the rates of intramolecular and enzymatic reactions. **Accounts of Chemical Research**, v. 32, p. 127–136, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ar960131y>. Acesso em: 28 set. 2021.

BRZOWSKI, A. M.; SAVAGE, H.; VERMA, C. S.; TURKENBURG, J. P.; LAWSON, D. M.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. **Biochemistry**, v. 39, n. 49, p. 15071–15082, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi0013905>. Acesso em: 28 set. 2021.

CARVALHO, ANA CAROLINE LUSTOSA DE MELO. **Biorredução de cetonas pró-quirais empregando *Pseudomonas* sp isolada na *Nopalea cochenellífera* (L .) Salm-Dyck**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

CARVALHO, André. **Dinâmica molecular aplicada à análise estrutural da hipoxantina-guanina-xantina fosforibosil transferase de *Plasmodium falciparum***. 2015. Dissertação (Mestre em Biologia Experimental) - Departamento de Medicina - Núcleo de Saúde, Universidade Federal de Rondônia, 2015.

CURADO-CARBALLADA, Christian; FEIXAS, Ferran; OSUNA, Sílvia. Molecular dynamics simulations on *Aspergillus niger* monoamine oxidase: conformational dynamics and inter-monomer communication essential for its efficient catalysis. **Adv. Synth. Catal.**, v. 361, p. 2718–2726, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adsc.201900158>. Acesso em: 13 out. 2020.

DOLINSKY, Todd J; CZODROWSKI, Paul; LI, Hui; NIELSEN, Jens E; JENSEN, Jan H; KLEBE, Gerhard; BAKER, Nathan A. PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. **Nucleic acids research**, v. 35, p. W522-5, Jul. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm276>. Acesso em: 28 set. 2021.

ELLINGSON, Sally R; MIAO, Yinglong; BAUDRY, Jerome; SMITH, Jeremy C. Multi-conformer ensemble docking to difficult protein targets. **Physical Chemistry B**, v. 119, p. 1026–1034, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp506511p>. Acesso em: 01 ago. 2021.

ERICSSON, Daniel J.; KASRAYAN, Alex; JOHANSSON, Patrik; BERGFORS, Terese; SANDSTRÖM, Anders G.; BÄCKVALL, Jan-E.; MOWBRAY, Sherry L. X-ray Structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, p. 109–119, 8 Feb. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2007.10.079>. Acesso em: 01 ago. 2021.

FABER, Kurt. **Biotransformations in organic chemistry**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-97423-6>. Acesso em: 01 ago. 2021.

FERREIRA, Irlon M.; MEIRA, Eloá B.; ROSSET, Isac G.; PORTO, André L.M. Chemoselective biohydrogenation of α,β - and $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -unsaturated ketones by the marine-derived fungus *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 in a biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 59–65, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.01.017>. Acesso em: 01 ago. 2021.

FONSECA, Thiago de Sousa; VEGA, Kimberly Benedetti; DA SILVA, Marcos Reinaldo; DE OLIVEIRA, Maria da Conceição Ferreira; DE LEMOS, Telma Leda Gomes; CONTENTE, Martina Letizia; MOLINARI, Francesco; CESPUGLI, Marco; FORTUNA, Sara; GARDOSSI, Lucia; DE MATTOS, Marcos Carlos. Lipase mediated enzymatic kinetic resolution of phenylethyl halohydrins acetates: a case of study and rationalization. **Molecular Catalysis**, v. 485, p. 110819, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2020.110819>. Acesso em: 01 ago. 2021.

FORLI, Stefano; HUEY, Ruth; PIQUE, Michael E; SANNER, Michel F; GOODSSELL, David S; OLSON, Arthur J. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the autodock suite. **Nature Protocols**, v. 11, p. 905–919, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/pj.2016.37>. Acesso em: 01 ago. 2021.

GARCIA, Mariana Lopes. **Estudos coputacionais da enzima N-miristoiltransferase de *Plasmodium falciparum* e seus inibidores como candidatos a agentes antimaláricos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

GARZÓN-POSSE, Fabián; BECERRA-FIGUEROA, Liliana; HERNÁNDEZ-ARIAS, José; GAMBÁ-SÁNCHEZ, Diego. Whole cells as biocatalysts in organic transformations. **Molecules**, v. 23, n. 6, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23061265>. Acesso em: 01 ago. 2021.

GOMES, Akenaton Onassis Cardoso Viana. **Semi-síntese e avaliação da atividade citotóxica e antimicrobiana de derivados da annonalida, diterpeno isolado de *Humirianthera ampla***. 2014. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

GOMES, Akenaton O C V; BRITO, Maria V; MARQUES, Ricardo A; LIMA, Leandro B; NUNES, M; LIMA, Mary A S; CAVALCANTE, Igor M; VIEIRA, Tellin D N; LIMA, Cristiano S; SILVA, Gisele S; UCH, Daniel E; LIMA-NETO, Pedro; MATTOS, Marcos C; OLIVEIRA, Francisco L S De; ZANATTA, Geancarlo; OLIVEIRA, Maria C F. Multi-step bioconversion of annonalide by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* and theoretical investigation of the decarboxylase pathway. **Journal**

of **Molecular Structure journal**, v. 1204, 2020. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127514>. Acesso em: 17 jun. 2021.

GONÇALVES, Reinaldo Bellini. **Modelagem teórica e computacional de dendrímeros para o transporte de tuberculostáticos**. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) - Departamento de Engenharia Elétrica, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

GRAEBNER, Ilmar B; MOSTARDEIRO, Marco A; ETHUR, Eduardo M; BURROW, Robert A; DESOY, C S; MOREL, Ademir F. Diterpenoids from *Humirianthera ampla*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 955–959, 2000. .

HANWELL, Marcus D.; CURTIS, Donald E.; LONIE, David C.; VANDERMEERSCHD, Tim; ZUREK, Eva; HUTCHISON, Geoffrey R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 8, p. 1–17, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>. Acesso em: 17 jun. 2021.

HORNAK, Viktor; ABEL, Robert; OKUR, Asim; STROCKBINE, Bentley; ROITBERG, Adrian; SIMMERLING, Carlos. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 3, p. 712–725, 2006. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/prot.21123>. Acesso em: 17 jun. 2021.

HUANG, Jing; RAUSCHER, Sarah; NAWROCKI, Grzegorz; RAN, Ting; FEIG, Michael; DE GROOT, Bert L; GRUBMÜLLER, Helmut; MACKERELL, Alexander D. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature Methods**, v. 14, n. 1, p. 71–73, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.4067>. Acesso em: 17 jun. 2021.

KHAN, Faez Iqbal; LAN, Dongming; DURRANI, Rabia; HUAN, Weiqian; ZHAO, Zexin; WANG, Yonghua. The lid domain in lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016>. Acesso em: 17 jun. 2021.

KOLLMAN, Peter A; MASSOVA, Irina; REYES, Carolina; KUHN, Bernd; HUO, Shuanghong; CHONG, Lillian; LEE, Matthew; LEE, Taisung; DONINI, Oreola; CIEPLAK, Piotr; CASE, David A; CHEATHAM, Thomas E. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 12, p. 889–897, 2000. .

KUMARI, Rashmi; KUMAR, Rajendra; SOURCE, Open; DISCOVERY, Drug; LYNN, Andrew. g_mmpbsa - A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. **Chemical Information and Modeling**, v. 54, p. 1951–1962, 2014. .

LASKOWSKI, R A; MACARTHUR, M W; MOSS, D S; THORNTON, J M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>. Acesso em: 17 jun. 2021.

LESLIE, John F.; SUMMERELL, Brett A. The *Fusarium* laboratory manual. **Blackwell Publishing**, p. 1–388, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470278376>. Acesso em: 17 dez. 2019.

LINDAHL; ABRAHAM; HESS; SPOEL, van der. GROMACS 2019 source code. Dec. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5281/ZENODO.2424363>. Acesso em: 17 jun. 2021.

LIU, Hui; DE SOUZA, Fayene Zeferino Ribeiro; LIU, Lan; CHEN, Bi Shuang. The use of marine-derived fungi for preparation of enantiomerically pure alcohols. **Applied Microbiology and**

Biotechnology, v. 102, p. 1317–1330, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8707-5>. Acesso em: 17 jun. 2021.

MARQUES, Ricardo A; GOMES, Akenaton O C V; BRITO, Maria V De; ANA, L P; GLADYANE, S; LIMA, Leandro B De; NUNES, Fátima M; MATTOS, Marcos C De; FRANCO, Lucas L; SILVA, Marina De M; DAYANNE, Maria; DANTAS, De A; SANTOS, Josué C C; FIGUEIREDO, Isis M; SILVA-JÚNIOR, Edeildo F; AQUINO, Thiago M De; ARAÚJO-JÚNIOR, João X De; OLIVEIRA, Maria C F De; GUNATILAKA, A A Leslie. Annonalide and derivatives: semisynthesis, cytotoxic activities and studies on interaction of annonalide with DNA. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 179, p. 156–166, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.01.016>. Acesso em: 17 jun. 2021.

MARQUES, Ricardo de Araújo. **Estudo químico e avaliação quimiopreventiva de *Humirianthera ampla* Miers, *Simarouba versicolor* e cinco espécies do gênero *Lippia***. 2011. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MORAES, Mirian Regina de. **Caracterização da lipase de *Fusarium solani* para aplicação em biocatálise**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

MORRIS, GARRETT M.; HUEY, RUTH; LINDSTROM, WILLIAM; SANNER, MICHEL F.; BELEW, RICHARD K.; GOODSSELL, DAVID S.; OLSON, ARTHUR J. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, p. 2785–2791, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc>. Acesso em: 17 jun. 2021.

MORRIS, Garrett M; GOODSSELL, David S; HALLIDAY, Robert S; HUEY, Ruth; HART, William E; BELEW, Richard K; OLSON, Arthur J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of computational chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998. .

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. da; SILVA, C. H.T.P. da. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecletica Química**, v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-46702008000400002>. Acesso em: 17 jun. 2021.

NASÁRIO, Fábio Domingues. **Reações redox em biocatálise: desracemização de álcoois secundários e reações multi-enzimáticas em cascata com álcoois alílicos**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

NAVVABI, Azita; RAZZAGHI, Mozghan; FERNANDES, Pedro; KARAMI, Leila; HOMAEI, Ahmad. Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. **Process Biochemistry**, v. 70, p. 61–70, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.04.018>. Acesso em: 17 jun. 2021.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NGUYEN, Duc D.; WEI, Guo Wei. The impact of surface area, volume, curvature, and Lennard–Jones potential to solvation modeling. **Journal of Computational Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 24–36, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.24512>. Acesso em: 17 jun. 2021.

NISHI, Beatriz Caroline. **Osmotina de *Plumeria rubra*: identificação, clonagem molecular, modelamento tridimensional e possível efeito mimético da adiponectina**. 2016. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará,

Fortaleza, 2016.

OTTOSSON, Jenny. **Enthalpy and entropy in enzyme catalysis: a study of lipase enantioselectivity** KTH; 2001. Stockholm: KTH, 2001. Disponível em: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:kth:diva-3216>. Acesso em: 04 mai. 2021.

PIO-RIBEIRO, G.; FILHO, F. M. Assis. Doenças do Caupi. *In*: KIMATI, H.; AMORIM, L.; FILHO, A. Bergamin; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1997. p. 222–232.

PUNEKAR, N.S. **Enzymes: catalysis, kinetics and mechanisms**. 1. ed. [S. l.]: Springer, Singapore, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-13-0785-0_17. Acesso em: 28 set. 2021.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Adv Protein Chem**, v. 23, p. 283–438, 1968. .

RAMOS, Aline De Souza; RIBEIRO, Joyce Benzaquem; LOPES, Raquel De Oliveira; LEITE, Selma Gomes Ferreira; SOUZA, Rodrigo Octavio Mendona Alves De. Highly enantioselective bioreduction of ethyl 3-oxohexanoate. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 46, p. 6127–6129, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.09.023>. Acesso em: 28 set. 2021.

REHM, Sascha; TRODLER, Peter; PLEISS, Jürgen. Solvent-induced lid opening in lipases: a molecular dynamics study. **Protein Science**, v. 19, p. 2122–2130, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.493>. Acesso em: 28 set. 2021.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147–148, p. 237–250, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.06.001>. Acesso em: 28 set. 2021.

ROBERT, Xavier; GOUET, Patrice. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. W320–W324, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>. Acesso em: 28 set. 2021.

RODRIGUES, Antonia Alice C.; NETO, Egídio B.; COELHO, Rildo S.B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 492–499, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000500009>. Acesso em: 28 set. 2021.

SEGANTINE, Arieli Santos de Andrade. **Estudo por modelagem e dinâmica molecular de polímeros carreadores de antibióticos**. 2019. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Sustentáveis) - Instituto Federal do Espírito Santo, Vitória, 2019.

SELZER, Paul M; MARHÖFER, Richard J; KOCH, Oliver. **Applied bioinformatics**. 2. ed. Gewerbestrasse: Springer International Publishing AG, 2018.

SHAO, Guangfeng; BAO, Jingxiao; PAN, Xiaolin; HE, Xiao; QI, Yifei; ZHANG, John Z. H. Computational analysis of residue-specific binding free energies of androgen receptor to ligands. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, n. March, p. 1–9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.646524>. Acesso em: 28 set. 2021.

SHARMA, Sumit; KUMAR, Pramod; CHANDRA, Rakesh. Introduction to molecular dynamics. *In*: SHARMA LAMMPS AND GROMACS, Sumit B T - Molecular dynamics simulation of nanocomposites using BIOVIA materials studio (ed.). **Micro and Nano Technologies**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 1–38. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128169544000012>. Acesso em: 24 jun. de 2021

- SILVA, Patrícia Mota da. **Produção de lipases por fungos isolados de amostras de solo da floresta amazônica**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.
- SILVA, THIAGO BARCELLOS DA. **Resolução cinética enzimática de álcoois e amins quirais contendo boro e biorredução de cetonas contendo boro**. 2011. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- SILVA, VIVIANE APARECIDA DA. **Estudo, por modelagem molecular, da inibição da enzima acetohidroxiácido sintase utilizando diferentes derivados pirimidinilsalicilatos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.
- SILVEIRA, Cleverton Oliveira Cavalcanti da. **Estudos computacionais do modelo de mucina 2 e sua interação com quitosanas tioladas : uma nova estratégia para o estudo da mucoadesão e retenção de fármacos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.
- SIQUEIRA, Ana Claudia Rodrigues de. **Produção de peptidase e lipase nativas por *Fusarium oxysporum* e obtenção de uma quimera recombinante de peptidase e lipase expressa em *Pichia pastoris***. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.
- SOLOMONS, T. W. Graham; FRYHLE, Craig B. **Química orgânica**. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015. v. 2, .
- SOUSA, Emerson Yvay Almeida de. **Biorredução de cetonas aromáticas pró-quirais e outros compostos carbonilados utilizando as sementes de *Sinapis alba* L. (mostarda amarela)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- SOUZA, Simone Decembrino de. **Estudo de inibidores de colinesterases aplicando técnicas de QSAR-2D (HQ SAR) e docking molecular**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- TUANGPORN PANUTHAI; SIHANONTH, Prakitsin; PIAPUKIEW, Jitra; SOOKSAI, Sarintip; SANGVANICH, Polkit; KARNCHANATAT, Aphichart. An extracellular lipase from the endophytic fungi *Fusarium oxysporum* isolated from the thai medicinal plant, croton oblongifolius roxb. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 2622–2638, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/ajmr11.965>. Acesso em: 28 set. 2021.
- VELOSO, Josiene Silva. **Diversidade genética, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium oxysporum* associados à murcha em feijão-caupi**. 2013. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>. Acesso em: 28 set. 2021.
- VERLI, Hugo. **Bioinformática da biologia à flexibilidade molecular**. 1. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>. Acesso em: 28 set. 2021.
- WATERHOUSE, Andrew; BERTONI, Martino; BIENERT, Stefan; STUDER, Gabriel; TAURIELLO, Gerardo; GUMIENNY, Rafal; HEER, Florian T.; DE BEER, Tjaart A.P.; REMPFER, Christine; BORDOLI, Lorenza; LEPORE, Rosalba; SCHWEDE, Torsten. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, p. W296–

W303, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>. Acesso em: 28 set. 2021.

ZHANG, Jin; ZHANG, Haiyang; WU, Tao; WANG, Qi; VAN DER SPOEL, David. Comparison of implicit and explicit solvent models for the calculation of solvation free energy in organic solvents. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 3, p. 1034–1043, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00169>. Acesso em: 28 set. 2021.

ZORN, Katja; OROZ-GUINEA, Isabel; BRUNDIEK, Henrike; DO, Mark; BORNSCHEUER, Uwe T. Alteration of chain length selectivity of *Candida antarctica* lipase A by semi-rational design for the enrichment of erucic and gondoic fatty acids. **Adv. Synth. Catal.** v. 360, p. 4115–4131, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adsc.201800889>. Acesso em: 28 set. 2021.