

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Yan Ferraz Ximenes Ladeira

**ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA (*S*)-NORCOCLAURINA SINTASE E
POTENCIAL DE APLICAÇÃO À SÍNTESE DE TETRAIDROISOQUINOLINAS**

Belo Horizonte

2021

UFMG/ICEX/DQ. 1.443

D. 784

Yan Ferraz Ximenes Ladeira

**ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA (S)-NORCOCLAURINA SINTASE E
POTENCIAL DE APLICAÇÃO À SÍNTESE DE TETRAIDROISOQUINOLINAS**

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

Orientador: Prof^o Dr. Adolfo Henrique de Moraes Silva

Coorientadora: Prof^a Dra. Amanda Silva de Miranda

Belo Horizonte

2021

Ficha Catalográfica

L154e Ladeira, Yan Ferraz Ximenes
2021 Estudo de imobilização da enzima (S)-norcocclaurina
D sintase e potencial aplicação à síntese de
tetraidroisoquinolinas [manuscrito] / Yan Ferraz
Ximenes Ladeira. 2021.
118 f. : il.

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

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

1. Química orgânica - Teses. 2. Enzimas - Teses. 3.
Dopamina - Teses. 4. Solventes orgânicos - Teses. 5.
Espectroscopia de ressonância nuclear - Teses. 6.
Espectroscopia visível - Teses. 7. Dicroísmo circular
- Teses. 8. Testes químicos e reagentes - Teses. I.
Silva, Adolfo Henrique de Moraes, Orientador. II.
Miranda, Amanda Silva de, Coorientadora. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Estudos de Imobilização da Enzima (S)-Norcoclaurina Sintase e Potencial de Aplicação à Síntese de Tetraidroisoquinolinas"

Yan Ferraz Ximenes Ladeira

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Adolfo Henrique de Moraes Silva - Orientador
UFMG

Profa. Amanda Silva de Miranda - Coorientadora
UFMG

Prof. Tiago Antônio da Silva Brandão
UFMG

Prof. Gaspar Diaz Muñoz
UFMG

Belo Horizonte, 03 de maio de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Gaspar Diaz Munoz, Professor do Magistério Superior**, em 03/05/2021, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Antonio da Silva Brandao, Professor do Magistério Superior**, em 03/05/2021, às 17:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Silva de Miranda, Professora do Magistério Superior**, em 03/05/2021, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adolfo Henrique de Moraes Silva, Professor do Magistério Superior**, em 03/05/2021, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0698207** e o código CRC **FD723469**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, O Criador de todas as coisas, que por sua infinita bondade me permitiu chegar até aqui. A Ele seja dada a honra e glória por meio de Jesus Cristo.

Também agradeço aos meus pais, Lilian e Geraldo Flávio, por toda a dedicação e apoio que me deram ao longo de toda minha vida.

Agradeço a minha esposa, Rebeca, que além de ser a mulher da minha vida, me deu todo apoio nesses últimos anos.

Sou grato a todos os professores que me ajudaram a trilhar meus passos até aqui, em especial meu professor de Química do Ensino médio, David Abrão, aos meus professores do curso de graduação em Engenharia Química na PUC Minas, Guilherme Pereira, orientador de TCC, Lucilaine Valéria, orientadora de IC e Barbara Ricci, também orientadora de IC e que me indicou o programa de Pós-graduação em Química da UFMG, tornando-se assim uma peça-chave para a minha escolha.

Agradeço a meus colegas de Laboratório: Diego Martins, Mozart Pereira, Philipe Fernandes, Aline Bozzi, Brunno Salvatti e Verônica Valadares, por toda a ajuda, em especial o Brunno e a Verônica que ajudaram em muitas etapas desse projeto.

Sou grato a meu Orientador Dr. Adolfo Moraes e minha co-orientadora Dra. Amanda de Miranda, por todo auxílio, dedicação e orientação na construção desta dissertação.

Agradeço a Profa. Dra. Maria Helena Araújo, subcoordenadora do Programa de Pós-graduação em Química da UFMG, pelo imenso auxílio e dedicação para que essa dissertação pudesse ser defendida. Sem a ajuda dela seria impossível que essa defesa ocorresse.

Agradeço ao Departamento de Química da UFMG e a própria UFMG, além dos órgãos de fomento: CAPES, CNPq e FAPEMIG por fornecer toda infraestrutura e financiamento que possibilitaram a execução do presente trabalho, em especial a CAPES que me forneceu a bolsa de mestrado.

Por fim, dedico este trabalho a Deus e a meu pequeno filhinho, Levi, que está sendo gerado neste exato momento, previsto para nascer em outubro de 2021.

“As coisas encobertas pertencem ao Senhor, nosso Deus, mas as reveladas pertencem a nós e aos nossos filhos” (Dt 29:29).

RESUMO

Enzimas são macromoléculas capazes de catalisar reações químicas em condições brandas e com elevada quimio-, régio- e estereosseletividade, proporcionando vantagens em relação a muitos métodos não enzimáticos convencionais. A enzima (*S*)-norcoclaurina sintase ((*S*)-NCS), catalisa, na natureza, a reação cujo mecanismo químico foi proposto por Pictet-Spengler. A reação catalisada pela (*S*)-NCS, ocorre entre a dopamina e compostos carbonílicos, como aldeídos e cetonas, formando tetraidroisoquinolinas, uma importante classe de compostos com diversas aplicações farmacêuticas. O presente trabalho teve por objetivo, realizar um estudo de imobilização da (*S*)-NCS, aplicadas a síntese de uma tetraidroisoquinolina resultante da reação entre dopamina e hexanal. Para isso, a enzima foi produzida via expressão heteróloga de proteínas, purificada e imobilizada em uma série de matrizes, resultando em biocatalisadores avaliados quanto ao reuso e desempenho em diferentes temperaturas. Foram usadas técnicas de cromatografia, para purificação, espectroscopia no UV/Visível e espectroscopia de dicroísmo circular no UV distante, para análise estrutural da (*S*)-NCS e espectroscopia de RMN para mapear a reação através da quantificação da concentração de reagentes e produto. De todas as matrizes, a Diaion HP-2MG apresentou o maior valor de rendimento de imobilização (99%) seguido da Celite 545 (86%), Ni-NTA (65%), Caolin (64%) e por último Dowex 1X4 (53%). Por outro lado, quanto a reação entre a dopamina e hexanal, a amostra de Diaion HP-2MG apresentou desempenho inferior as demais, enquanto a Ni-NTA, Celite 545 e Caolin, se mostraram superiores neste aspecto, além de apresentarem bom desempenho no que se refere a reusabilidade. Por fim, foi identificada a possibilidade de realizar experimentos posteriores envolvendo temperaturas de reação superiores e maiores concentrações de co-solvente orgânico na reação visando avaliar o ganho de estabilidade proporcionado pela imobilização nas matrizes usadas nesse trabalho.

Palavras-chave: (*S*)-Norcoclaurina sintase, tetraidroisoquinolinas, imobilização de enzimas, reação de Pictet-Spengler, biocatálise.

ABSTRACT

Enzymes are macromolecules capable of catalyzing chemical reactions in mild conditions and with high chemo-, regio- and stereoselectivity, providing advantages over many conventional non-enzymatic methods. The enzyme (*S*)-norcoclaurine synthase ((*S*)-NCS), catalyzes, in nature, the reaction whose chemical mechanism was proposed by Pictet-Spengler. The reaction catalyzed by (*S*)-NCS occurs between dopamine and carbonyl compounds, such as aldehydes and ketones, forming tetrahydroisoquinolines, an important class of compounds with diverse pharmaceutical applications. The objective of the present work was to carry out an immobilization study of (*S*)-NCS, applied to the synthesis of a tetrahydroisoquinoline resulting from the reaction between dopamine and hexanal. For this, the enzyme was produced via heterologous protein expression, purified and immobilized in a series of matrices, resulting in biocatalysts evaluated for reuse and performance at different temperatures. Chromatography techniques were used for purification, UV / Visible spectroscopy and circular dichroism spectroscopy in the distant UV, for structural analysis of (*S*)-NCS and NMR spectroscopy to map the reaction by quantifying the concentration of reagents and product. Of all matrices, Diaion HP-2MG presented the highest value of immobilization yield (99%) followed by Celite 545 (86%), Ni-NTA (65%), Caolin (64%) and lastly Dowex 1X4 (53%). On the other hand, as for the reaction between dopamine and hexanal, the sample of Diaion HP-2MG presented a lower performance than the others, while Ni-NTA, Celite 545 and Caolin, were superior in this aspect, in addition to presenting good performance in refers to reusability. Finally, the possibility of carrying out further experiments involving higher reaction temperatures and higher concentrations of organic co-solvent in the reaction was identified in order to assess the stability gain provided by the immobilization in the matrices used in this work.

Keywords: (*S*)-Norcoclaurine synthase, tetrahydroisoquinolines, enzyme immobilization, Pictet-Spengler reaction, biocatalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação genérica de um aminoácido.....	19
Figura 2 – Representação genérica de uma reação envolvendo uma enzima e um substrato	21
Figura 3 – Anel tetraidroisoquinolínico e isoquinolínico	21
Figura 4 – Representações das estruturas do 3,4-diidroxifenilacetaldeído e da (S)-norlaudanosolina	23
Figura 5 – Estrutura da Bet v 1 (A) e estruturas da Bet v 1 e $\Delta 19TfNCS$ sobrepostas (B)	27
Figura 6 – Estrutura da cristalográfica da proteína $\Delta 29TfNCS$ (PDB: 5NON)	32
Figura 7 – Rotas de síntese de tetraidroisoquinolinas propostas por Erdmann <i>et al.</i> (2017).....	33
Figura 8 – Gel de eletroforese com amostras da expressão da <i>TfNCS</i>	51
Figura 9 – Cromatograma da purificação por afinidade à Ni^{2+}	53
Figura 10 – Cromatograma da purificação de exclusão molecular	56
Figura 11 – Espectro de dicroísmo circular da <i>TfNCS</i>	57
Figura 12 - Espectro de dicroísmo circular da <i>TfNCS</i> com rampa de temperatura	59
Figura 13 – Espectro da dopamina.	61
Figura 14 – Espectro do Hexanal.....	63
Figura 15 – Hidrogênios 2 do hexanal.....	65
Figura 16 – Sinais dos reagentes na mostra controle.....	66
Figura 17 – Espectro da amostra contendo <i>TfNCS</i> livre.	67
Figura 18 – Amostra de sílica gel comparada ao controle.....	68
Figura 19 - Sílica antes (esquerda) e depois (direita) da reação	69
Figura 20 – Amostra Dowex 50WX8 comparada ao controle.....	69
Figura 21 – Rendimento de imobilização das amostras	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB.....	20
Tabela 2 – Biblioteca de variantes naturais da (S)-NCS.....	28
Tabela 3 – Composição de 1L do meio LB líquido	37
Tabela 4 – Composição de 1L do meio LB ágar.....	37
Tabela 5 – Composição de 1L de NaP com 500 mM de imidazol.....	40
Tabela 6 – Materiais usados na produção do gel de eletroforese.....	41
Tabela 7 – Amostras das reações a 37°C	47
Tabela 8 – Amostras da reação a 47°C	48
Tabela 9 – Amostras de matrizes.	60
Tabela 10 – Concentração da dopamina das amostras da primeira reação (37°C)	72
Tabela 11 – Concentração do produto das amostras da primeira reação (37°C)	72
Tabela 12 – Soma das concentrações de dopamina e produto nas amostras da primeira reação (37°C).....	73
Tabela 13 – Rendimento da reação (37°C)	75
Tabela 14 – Comparação dos valores de rendimento de imobilização e rendimento de reação	76
Tabela 15 – Rendimento de reação dos três usos.....	78
Tabela 16 – Rendimento da reação a 47°C	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CD	-	<i>Circular dichroism</i> (Dicroísmo circular)
CHO	-	<i>Chinese hamster ovary</i> (Ovário de hamster chinês)
CO ₂	-	Dióxido de carbono
d.d.p	-	Diferença de potencial
DNA	-	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
D.O	-	Densidade óptica
DTT	-	Ditiotritol
EC	-	<i>Enzyme commission</i> (Comissão de enzimas)
<i>E. coli</i>	-	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	-	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
FT	-	<i>Flow-through</i> (Flui através)
IPTG	-	Isopropil- β -d-1-tiogalactopiranosídio
IUBMB	-	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)
LB	-	Luria Bertani
PB	-	<i>Phosphate buffer</i> (Tampão fosfato)
PSA	-	Persulfato de amônio
R	-	Radical
RNA	-	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RNA _m	-	RNA mensageiro
RNAP Ec	-	RNA polimerase da <i>Escherichia coli</i>
RNAP T7	-	RNA polimerase T7
RMN	-	Ressonância magnética nuclear
SDS	-	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)

(*S*)-NCS - (*S*)-Norcoclaurina sintase

TEMED - *N,N,N',N'*-Tetrametiletlenodiamina

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

UV-Vis - Ultravioleta-Visível

VC - Volume de coluna

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Contextualização	15
1.2 Enzimas	18
1.2.1 O que são	18
1.2.2 Classificação das enzimas	19
1.2.4 Funcionamento das enzimas	20
1.3 Isoquinolinas e tetraidroisoquinolinas	21
1.4 (S)-Norcoclaurina sintase	23
1.4.1 Descoberta e primeiros estudos	23
1.4.2 Relação com as proteínas da família PR-10/Bet v 1	27
1.4.3 Variantes conhecidas da (S)-NCS	28
1.4.4 Estrutura e mecanismo de reação da (S)-NCS	30
1.4.5 Aplicações da (S)-NCS para síntese de compostos orgânicos	32
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivos Gerais	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3 PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1 Expressão da enzima S-NCS	35
3.2 Purificação da enzima S-NCS	38
3.3 Ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida	40
3.4 Purificação por cromatografia de exclusão molecular e análise de concentração por espectroscopia no UV/Visível	42
3.5 Análise da estrutura da enzima por espectroscopia de dicroísmo circular	43
3.6 Seleção e avaliação inicial de matrizes	43
3.6.1 Ensaios de atividade da $\Delta 19TfNCS$	43
3.6.2 Ensaios de atividade da $\Delta 19TfNCS$ imobilizada em matrizes	44
3.7 Imobilização da $\Delta 19TfNCS$ em matrizes selecionadas e análise do rendimento de imobilização	46

3.8 Avaliação dos biocatalisadores.....	47
3.8.1 Procedimento para a primeira reação a 37°C.....	47
3.8.2 Procedimento para o avaliação do reuso dos biocatalisadores (segundo e terceiro uso) a 37°C.....	47
3.8.3 Procedimento para a reação a 47°C	48
3.9 Análise da atividade catalítica da $\Delta 19TfNCS$ por espectroscopia de RMN.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Expressão e purificação da enzima $\Delta 19TfNCS$.....	51
4.1.1 Expressão da $\Delta 19TfNCS$	51
4.1.2 Purificação por afinidade à Ni^{2+}	53
4.1.3 Purificação por cromatografia de exclusão molecular e quantificação da $\Delta 19TfNCS$	56
4.2 Quantificação e análise da estrutura da $\Delta 19TfNCS$	57
4.3 Seleção inicial de matrizes	60
4.3.1 Espectros de RMN dos reagentes.....	60
4.3.2 Espectros de RMN da amostra controle e $\Delta 19TfNCS$ livre	65
4.3.3 Espectros de RMN das matrizes.....	67
4.4 Avaliação do rendimento de imobilização das matrizes	69
4.5 Avaliação dos biocatalisadores.....	70
4.5.1 Primeira reação (37°C)	70
4.5.2 Reuso dos biocatalisadores (reação a 37°C)	76
4.5.3 Reação a 47°C	78
5 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXOS.....	88
Anexo 1	88
Anexo 2	90

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

Enzimas são biocatalisadores de extrema importância em processos de biossíntese, sendo essenciais para a manutenção da vida na Terra. Por conta de suas propriedades, as enzimas também se apresentam como um recurso valioso em processos de sínteses laboratoriais e industriais. Por meio delas é possível realizar reações químicas em condições brandas e com elevada quimio-, régio- e estereosseletividade, o que, em alguns casos, pode torná-las uma alternativa interessante em relação a muitos métodos convencionais, e, em algumas situações, evitando etapas de proteção e desproteção, podendo encurtar rotas sintéticas. Além das características relativas à eficiência das reações envolvendo enzimas, o uso deste recurso também é vantajoso do ponto de vista ambiental em comparação com os catalisadores metálicos ou orgânicos convencionais, uma vez que as enzimas são obtidas de fontes renováveis, são biodegradáveis e não tóxicas (BORNSCHEUER *et al.*, 2012; RIGOLDI, FEDERICA *et al.*, 2018).

As enzimas já têm sido aplicadas a processos industriais. Os setores contemplados por essa tecnologia incluem o de detergentes, farmacêutico, cosmético, têxtil, alimentício, agricultura, energia entre muitos outros, o que demonstra a relevância do investimento em pesquisas que visem aprimorar a aplicação destas enzimas em processos em larga escala (RIGOLDI, FEDERICA *et al.*, 2018). Nesse contexto, é necessário dar atenção a alguns desafios envolvidos no uso de enzimas em processos industriais, tais como a baixa estabilidade de muitas enzimas em alta temperatura, em valores de pH significativamente diferentes dos que estão adaptadas (próximo de 7) e na presença de solventes orgânicos, condições estas que em geral estão presentes nos processos em larga escala (RIGOLDI, FEDERICA *et al.*, 2018). Diferentes estratégias visando as aplicações de enzimas em processos industriais já são estudadas e aplicadas. Algumas destas são: a imobilização da enzima e tecnologias de engenharia de proteínas, sendo que estas estratégias podem ser aplicadas simultaneamente visando um melhor desempenho em processos envolvendo biocatálise (RIGOLDI, FEDERICA *et al.*, 2018).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma técnica que pode conferir ao biocatalisador maior resistência térmica e química, aumentando sua versatilidade em reações químicas, além de permitir sua reutilização, um aspecto vantajoso sob a perspectiva industrial e econômica. Ademais, a imobilização permite que as enzimas sejam utilizadas em reatores de

leito-fixo para aplicação em reações em fluxo contínuo (BRITTON; MAJUMDAR; WEISS, 2018). A utilização de técnicas de química de fluxo contínuo, proporciona um melhor controle de temperatura, purificação dos produtos, recuperação e reuso da enzima, melhor mistura de reagentes. Essas técnicas também contribuem para um aumento na transferência de massa por conta do maior contato entre os reagentes e a enzima, tornam possíveis processos em pressão elevada, permitem produção contínua e relativamente estável em larga escala, e em geral, são mais facilmente escalonáveis em comparação a processos em batelada. Outro aspecto importante da química de fluxo contínuo é permitir a compartimentalização de catalisadores através de sistemas de múltiplos reatores, o que a torna uma ferramenta versátil em processo multicatalíticos (BRITTON; MAJUMDAR; WEISS, 2018).

As metodologias de imobilização das enzimas nos suportes sólidos são classificadas como adsorção, incluindo adsorção por afinidade, imobilização por ligação covalente, e encapsulamento. As técnicas de adsorção são, em geral, as mais simples, entretanto, estão mais sujeitas a efeitos de lixiviação da enzima se comparadas às técnicas de imobilização por ligação covalente, que permitem a formação de ligações mais fortes entre a matriz e as enzimas (GUISAN *et al.*, 2020).

A adsorção por afinidade, em especial, é um recurso valioso no caso de enzimas que contenham algum grupo específico, como calda poli-histidinica (HisTag), que apresente alguma afinidade específica por um grupo presente na superfície da matriz, como grupos que contenham Ni^{2+} , por exemplo. Por fim, a adsorção por encapsulamento, pode ser usada para conferir a enzima uma maior proteção em relação ao meio reacional, tornando-a mais estável (GUISAN *et al.*, 2020).

Em relação aos suportes sólidos empregados nestes processos, é geralmente desejável que possuam grande área superficial, caráter hidrofílico, sejam insolúveis no solvente da reação, possuam grupos funcionais ou propriedades que permitam a imobilização, estabilidade térmica e química, resistência mecânica, não sejam tóxicos e sejam preferencialmente baratos (BRITTON; MAJUMDAR; WEISS, 2018). Por fim, as técnicas de imobilização de enzimas têm permitido a aplicação da biocatálise à síntese de compostos orgânicos via química em fluxo (BRITTON; MAJUMDAR; WEISS, 2018).

Uma importante classe de compostos que podem ser obtidos por biocatálise são as benzilisoquinolinas, uma subclasse das tetraidroisoquinolinas, que apresentam ampla aplicação farmacêutica. Exemplos destes compostos são: a berberina, a codeína, a morfina, a papaverina,

a noscapina entre outros, produzidos por meio do metabolismo secundário de plantas e que possuem o amino ácido L-tirosina como precursor (ILARI *et al.*, 2009a) (SMOLKE; HAWKINS, 2019).

Um intermediário na biossíntese das benzilisoquinolinas, e que pode ser usado como um precursor valioso para a síntese destes compostos é a (S)-norcoclaurina, uma tetraidroisoquinolina obtida a partir da reação cujo mecanismo foi proposto por Pictet-Spengler, na qual ocorre uma ciclização enantiosseletiva, catalisada pela enzima (S)-norcoclaurina sintase ((S)-NCS), tendo a dopamina e 4-hidroxifenilacetaldeído como substratos (LICHMAN, BENJAMIN R. *et al.*, 2015; LICHMAN, BENJAMIN R.; SULA; *et al.*, 2017).

As enzimas (S)-NCS, foram identificadas em espécies de plantas como *Thalictrum flavum* e *Coptis japonica* (LICHMAN, BENJAMIN R. *et al.*, 2015). Existem também variantes da (S)-NCS, planejadas a partir de técnicas de engenharia de proteínas, as quais também podem ser produzidas por expressão heteróloga de proteínas recombinantes. Essas variantes se diferem das variantes naturais por conta da modificação em sua estrutura primária, seja acrescentando, removendo ou substituindo determinados resíduos de aminoácidos na estrutura visando um melhor desempenho da enzima, tendo como alguns exemplos a $\Delta 19TfNCS$ e $\Delta 29TfNCS$, construídas a partir da *TfNCS* (EC 4.2.1.78), que serão explicadas melhor ao longo do texto (LICHMAN, BENJAMIN R. *et al.*, 2015; LICHMAN, BENJAMIN R.; SULA; *et al.*, 2017).

A imobilização de variantes naturais dessa enzima foi realizada em um recente estudo de Lechner *et al.* (2018) em que foram obtidos resultados promissores para a enzima NCS de *Papaver bracteatum* imobilizada em suporte EziG, um suporte que possui cátions Fe^{2+} em sua superfície, à qual se ligam enzimas apresentando uma cauda de resíduos de histidina (His-tag). Não foram identificados, entretanto, trabalhos em que se utilizam suportes mais acessíveis e de baixo custo, como sílica e celite, e trabalhos nos quais se relata a imobilização da *TfNCS* e de variantes obtidas por técnicas de engenharia de proteínas fossem imobilizadas. Nesse projeto de mestrado, propõe-se realizar a imobilização das variantes $\Delta 19TfNCS$, uma vez que essa construção apresentou melhor atividade catalítica em relação as variantes naturais (LICHMAN, BENJAMIN R. *et al.*, 2015; LICHMAN, BENJAMIN R.; SULA; *et al.*, 2017). É importante destacar que se propõe utilizar a técnica de imobilização por adsorção, envolvendo diferentes materiais comercialmente disponíveis, incluindo alguns de menor custo em relação àqueles utilizados no trabalho descrito por Lechner *et al.* (2018). As estratégias de imobilização serão comparadas em relação a melhoria das propriedades catalíticas da enzima, visando contribuir

para que a (S)-NCS possa, posteriormente, ser utilizada em reações biocatalíticas para a obtenção de tetraidroisoquinolinas, incluindo reações em fluxo contínuo.

1.2 Enzimas

1.2.1 O que são

Enzimas são macromoléculas biológicas que possuem a função de catalisar reações de extrema importância para o funcionamento de organismos vivos, estando presentes nas mais variadas rotas metabólicas e sendo, por isso, essenciais para a manutenção da vida na Terra. Estas macromoléculas fascinantes vêm sendo estudadas a muitos anos, e a função que elas exercem, catalisar reações biológicas, foi identificada por Frederick W. Kuhne no final do século XIX através de pesquisas relacionadas à capacidade de secreções estomacais digerirem carne, (NELSON; COX, 2011).

As enzimas catalisam reações específicas, sendo quimio-, régio- e estereosseletivas, o que é muito importante considerando que os processos biológicos são bem específicos, e por isso necessitam de compostos que correspondam a esta especificidade, cuja biossíntese seria extremamente dificultada na ausência delas. Todas essas maravilhosas características proporcionadas pelas enzimas são resultado da composição, complexidade estrutural e dinâmica destas moléculas, as quais apresentam cavidades, denominadas sítios ativos, que criam um ambiente altamente favorável para a ocorrência das reações que catalisam (BRITTON; MAJUMDAR; WEISS, 2018).

Proteínas são as estruturas macromoleculares mais abundantes em seres vivos, apresentando uma enorme variedade de funções além da própria função das enzimas já descrita. Estas moléculas são compostas basicamente por vinte blocos construtores denominados aminoácidos (Figura 1), os quais podem ser classificados de acordo com a cadeia lateral (R) como: apolares alifáticos, aromáticos, polares não-carregados, positivamente carregados e negativamente carregados (NELSON; COX, 2011).

Aminoácidos são moléculas que compartilham de uma estrutura em comum, um grupo amino e um grupo carboxila ligados a um átomo de carbono que é denominado carbono α , e se diferenciam uns dos outros por conta da presença de um grupo R, que forma sua cadeia lateral. Tendo em vista que o carbono α é um centro de quiralidade (à exceção da glicina, em que $R = H$), duas configurações são possíveis para ele, que são especificadas pelo sistema D/L.

Entretanto, observa-se que apenas a configuração L é encontrada nos aminoácidos que constituem as proteínas (NELSON; COX, 2011).

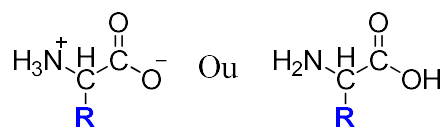


Figura 1 – Estrutura química de um aminoácido. O grupo R, representa a cadeia lateral, região responsável por definir as propriedades físico-químicas específicas dos aminoácidos.

A sequência de resíduos de aminoácidos presente nas proteínas constitui o que é chamado de estrutura primária da proteína, em que, a extremidade que se encerra com o grupo carboxila é denominada C-terminal, enquanto a outra extremidade, por se encerrar com um grupo amino, é denominada N-terminal. Ao longo desta sequência de resíduos de aminoácidos, são formados alguns padrões conformacionais específicos da cadeia principal, tais como hélices α e fitas β , padrões estes que se restringem a determinados segmentos da cadeia e que, tratados de forma isolada, dão origem à estrutura secundária da proteína (NELSON; COX, 2011).

Por fim, a estrutura tridimensional das proteínas é denominada estrutura terciária. Quando a estrutura tridimensional de uma proteína é obtida experimentalmente, ela é depositada em um banco de dados de proteínas (Protein Data Bank, PDB) na forma de um arquivo digital, sendo atribuído a cada proteína um código de quatro dígitos denominado PDB ID.

A estrutura das enzimas não é completamente rígida, mas pode sofrer mudanças conformacionais ao longo do tempo, como por exemplo a abertura e fechamento da entrada de um sítio ativo de uma dada enzima, e isso ocorre por conta da flexibilidade das ligações peptídicas, assim como mudanças de conformação de cadeias laterais da proteína, sendo que existem alguns segmentos mais flexíveis, o que depende dos resíduos que os compõem, e alguns segmentos são mais rígidos, sofrendo pouca alteração ao longo do tempo. Toda essa dinâmica da molécula também pode interferir em suas propriedades, assim como sua estrutura e sequência de resíduos de aminoácidos (NELSON; COX, 2011).

1.2.2 Classificação das enzimas

As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam, o que é definido pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB). Cada classe é identificada por um número, chamado de número EC. As classes, por sua vez, podem ser divididas em subclasses. Sete classes de enzimas são apresentadas na Tabela 1. Em 2018, mais de 6000 enzimas já haviam sido registradas na lista oficial de enzimas da IUBMB com um

número que cresce cada vez mais (TIPTON, 2018; TIPTON; MCDONALD, 2018). À medida que mais enzimas vão sendo descobertas, elas podem ser acrescentadas à esta lista. Desde que a reação que catalisa tenha sido caracterizada e seja diferente de qualquer outra enzima. Igualmente, enzimas já existentes, mas que tenham sofrido modificação significativa podem ser adicionadas a lista desde que passem por um processo de revisão semelhante ao de novas enzimas. Todas as enzimas incluídas na lista oficial de enzimas têm o seu nome e número EC registrados na base de dados ExplorEnz (TIPTON, 2018; TIPTON; MCDONALD, 2018).

Tabela 1 – Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB.

Nº EC	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Oxirredução
2	Transferases	Transferência de grupos
3	Hidrolases	Hidrólise
4	Liasas	Formação de ligações duplas por eliminação ou adição de grupos a ligações duplas
5	Isomerases	Formação de isômeros
6	Ligases	Ligação química entre duas moléculas acoplada a hidrólise de ATP ou de cofatores similares
7	Translocases	Movimento de moléculas ou íons através de membranas ou sua separação dentro delas

Fonte – IUBMB

1.2.4 Funcionamento das enzimas

As enzimas, como qualquer outro catalisador, não alteram a constante de equilíbrio das reações e sim a energia de ativação, a qual é reduzida, levando a um aumento na velocidade das transformações químicas. Isso tudo é possível pelo fato de que essas moléculas criam um ambiente favorável às reações que catalisam através da estabilização de possíveis estados de transição.

O ambiente em que a reação ocorre é denominado sítio ativo, uma cavidade na superfície da enzima, à qual se liga uma ou mais moléculas que participam da reação, que nesse caso são denominados substratos, e, em alguns casos cofatores. Os substratos se ligam ao sítio ativo da enzima por meio de interações com os resíduos de aminoácidos presentes na cavidade, criando um complexo enzima-substrato. Muitas vezes a interação do substrato como sítio ativo depende

da dinâmica de abertura e fechamento desta cavidade da enzima. A Figura 2 descreve uma reação envolvendo uma enzima e um substrato (NELSON; COX, 2011).

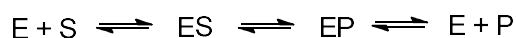


Figura 2 – Equação química de uma reação química genérica envolvendo uma enzima e um substrato.

As reações catalisadas por enzimas podem ser simples, como representado na Figura 2, ou mais complexas, envolvendo cofatores, por exemplo, ou até mesmo outras enzimas que participam de alguma forma da reação principal, e sem as quais a catálise enzimática não poderia ocorrer. Vários estudos envolvendo enzimas foram realizados ao longo dos anos e muitas descobertas foram feitas nesse período. Isso proporcionou um conjunto de conhecimentos que permitiu o surgimento de tecnologias envolvendo a aplicação das enzimas em diversas áreas, tanto na indústria, laboratórios, agricultura, medicina entre outras. Algumas técnicas que são usadas para alcançar essas finalidades serão apresentadas ao longo do texto e fornecerão uma base para a compreensão do presente trabalho.

1.3 Isoquinolinas e tetraidroisoquinolinas

Um grupo muito importante de alcaloides de origem natural é o de alcaloides isoquinolínicos. Esses são derivados dos aminoácidos tirosina e fenilalanina e caracterizados por possuir um anel isoquinolínico ou tetraidroisoquinolínico, no caso do subgrupo das tetraidroisoquinolinas, em sua estrutura básica (MCCREATH; DELGODA, 2017). A Figura 3 mostra o anel isoquinolínico e o tetraidroisoquinolínico.

Anel tetraidroisoquinolínico Anel isoquinolínico

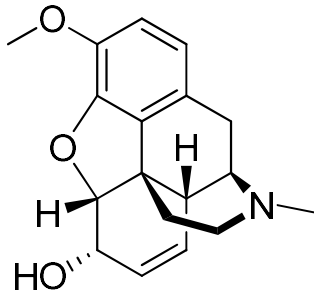
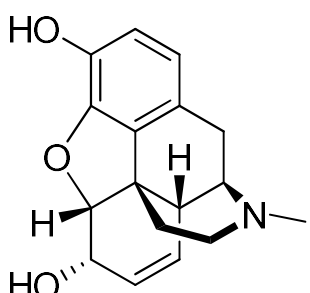
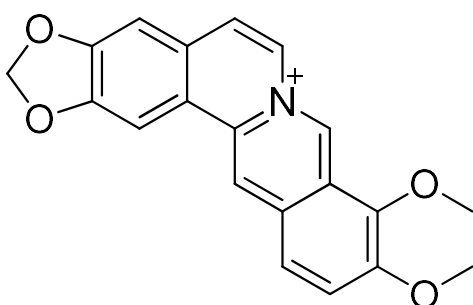
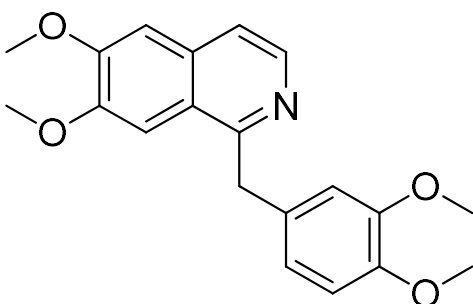


Figura 3 – Estrutura química do anel tetraidroisoquinolínico e isoquinolínico.

Os alcaloides isoquinolínicos apresentam estruturas diversas, que conservam o núcleo isoquinolínico ou tetraidroisoquinolínico, podendo apresentar uma variedade de substituintes, assim como anéis adicionais conectados ao núcleo principal e diferentes níveis de oxidação (MCCREATH; DELGODA, 2017). Por isso são divididos em oito subgrupos: aporfina, benzilisoquinolinas, benzo[c]fenatridinas, emitinas, ftalideisoquinolinas, morfina, protoberberinas e protopinas, sendo que desses, as protoberberinas incluem o maior número de isoquinolinas. Um dos exemplos mais famosos de isoquinolina é a morfina, um analgésico potente presente em plantas como *Papaver somniferum* e que apresenta núcleo

tetraidroisoquinolínico (MCCREATH; DELGODA, 2017). O Quadro 1 mostra alguns exemplos de isoquinolinas e tetraidroisoquinolinas indicando sua atividade farmacológica.

Quadro 1 – Exemplos de alcaloides isoquinolínicos e sua atividade farmacológica

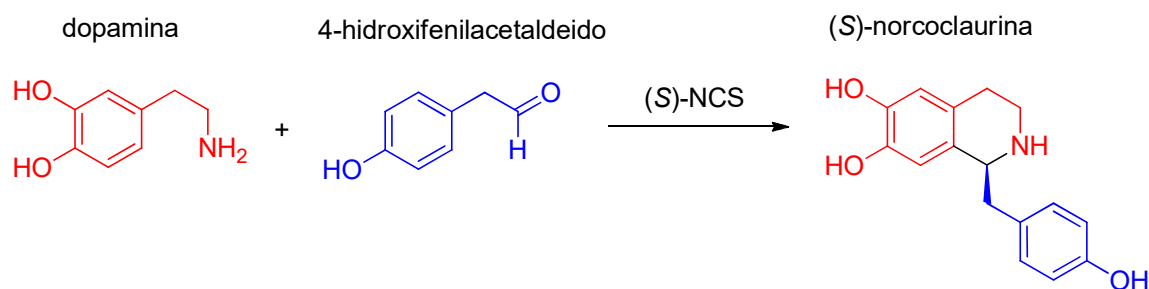
Alcaloide	Atividade farmacológica
Codeína 	• Analgésico (no corpo humano é convertido em morfina por ação enzimática). • Antitussígeno.
Morfina 	• Analgésico. • Antitussígeno. • Antidiarreico.
Berberina 	• Melhora a atividade do sistema digestivo. • Antibacteriano; antifúngico. • Leishmanicida; antimalárico. • Ansiolítico; antidepressivo. • Antinociceptivo; neuroprotetivo. • Vasorelaxante; hipotensivo.
Papaverina 	• Antiespasmódico. • Vasodilatador coronário. • Profilático para enxaquecas.

Fonte - (MCCREATH; DELGODA, 2017) modificado.

1.4 (S)-Norcoclaurina sintase

1.4.1 Descoberta e primeiros estudos

A enzima (S)-Norcoclaurina sintase ((S)-NCS), presente em algumas espécies de plantas como *Thalictrum flavum* e *Papaver somniferum*, é responsável por catalisar, na natureza a reação de ciclização entre dois derivados de tirosina, a dopamina e o 4-hidroxifenilacetaldeído, cujo mecanismo foi proposto por Pictet-Spengler. Esta reação resulta na formação da (S)-norcoclaurina, precursora dos alcaloides benzilisoquinolínicos como morfina, codeína, berberina, sanguinarina, papaverina, entre muitos outros (BERKNER et al., 2007) (LICHMAN, BENJAMIN R. et al., 2015). A Figura 4 apresenta um esquema que representa a reação de Pictet-Spengler entre o 4-hidroxifenilacetaldeído e a dopamina promovida pela (S)-NCS.



Esquema 1 – Reação de Pictet Spengler entre 4-hidroxifenilacetaldeído e a dopamina promovida pela (S)-NCS.

O fato de a (S)-NCS catalisar a reação de Pictet-Spengler entre os substratos mencionados faz desta enzima uma Pictet-Spenglerase de extrema importância, uma vez que a (S)-norcoclaurina é precursora de todos os alcaloides benzilisoquinolínicos naturais. Por esse motivo, a (S)-NCS tornou-se tema de diversas pesquisas, que também são fomentadas pelo potencial de aplicação desta enzima na biocatálise de reações envolvendo substratos não naturais e que resultam na formação estereosseletiva de diversas tetraidroisoquinolinas (LICHMAN, BENJAMIN R.; SULA; *et al.*, 2017) (RODDAN *et al.*, 2020).

A (S)-NCS foi extraída pela primeira vez, a partir de células de plantas, em meados dos anos 1980 (RUEFFER *et al.*, 1981), sendo posteriormente isolada a partir da planta *Eschscholzia tenuifolia* (SCHUMACHER *et al.*, 1983). A enzima foi inicialmente denominada (S)-Norlaudanosolina sintase por Rueffer *et al.* (1981), pois acreditava-se que a (S)-norlaudanosolina, não a (S)-norcoclaurina, era a precursora das benzilisoquinolinas de origem natural, o que tinha como base experimentos envolvendo a administração de norlaudanosolina radioativa a plantas da espécie *Papaver somniferum* (BATTERSBY *et al.*, 1963). Portanto, acreditou-se em um primeiro momento, que a Pictet-Spenglerase em questão, catalisava, nas

plantas, a reação de Pictet Spengler entre a dopamina e a 3,4-diidroxifenilacetaldeído, que tem como produto a (*S*)-norlaudanosolina. Essa hipótese inicial foi embasada por um experimento envolvendo dopamina marcada com trítio (^3H), em que se confirmou que a enzima catalisava a reação que resultava na formação da (*S*)-norlaudanosolina (RUEFFER *et al.*, 1981). Representações das estruturas do 3,4-diidroxifenilacetaldeído e da (*S*)-norlaudanosolina podem ser visualizadas na Figura 4.

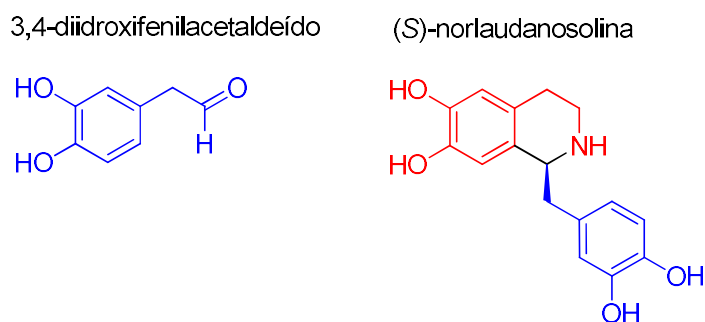


Figura 4 – Representações das estruturas químicas do 3,4-diidroxifenilacetaldeído e da (*S*)-norlaudanosolina.

De fato, a (*S*)-NCS aceita como substrato o composto 3,4-diidroxifenilacetaldeído e catalisa a reação de formação da (*S*)-norlaudanosolina, como concluíram os primeiros estudos. Entretanto, experimentos posteriores, envolvendo o uso de compostos marcados radioativamente, demonstraram algumas incoerências na hipótese inicial de que a (*S*)-norlaudanosolina seria a precursora natural das benzilisoquinolinas (STADLER, R. *et al.*, 1987) (STADLER, RICHARD; KUTCHAN; ZENK, 1989). Em especial, um estudo envolvendo a administração de uma série de compostos marcados a algumas culturas de células de plantas confirmaram que apenas a (*S*)-norcoclaurina e não a (*S*)-norlaudanosolina era precursora dos alcaloides benzilisoquinolínicos naturais (STADLER, RICHARD; ZENK, 1990). Tais estudos levaram a uma reformulação do nome da Pictet-Spenglerase em questão de (*S*)-Norlaudanosolina sintase para (*S*)-Norcoclaurina sintase, nome este que tem sido usado desde então.

Estudos subsequentes envolvendo a enzima (*S*)-NCS foram realizados, sendo que, no início dos anos 2000, foram publicados trabalhos em que algumas variantes da enzima foram caracterizadas. Em especial, no ano de 2001, foi publicado um trabalho em que variantes da enzima obtidas de diferentes partes da planta *Papaver somniferum* e a partir de culturas de células das plantas *P. somniferum*, *Eschscholzia californica* e *Thalictrum flavum* foram parcialmente caracterizadas, sendo que nesse caso a enzima não foi isolada, permanecendo no lisado bruto das amostras (SAMANANI; FACCHINI, 2001).

A partir do estudo supracitado, realizado por Samanani *et. al.* (2001), algumas características importantes a respeito das variantes com que trabalharam foram identificadas. Os autores constataram que as três variantes apresentaram atividade máxima para reação entre dopamina e 4-hidroxifenilacetaldeído na faixa de pH entre 6,5 e 7 e temperatura entre 42 °C e 55 °C, além da atividade não ser afetada na presença de 40 mM CaCl₂ ou MgCl₂. Os autores também observaram que a (S)-NCS ocorre em todas as partes da *Papaver somniferum*, inclusive sendo detectada em sementes no estágio de germinação, o que explica a ocorrência de diferentes benzilisoquinolinas em diferentes partes dessa planta. Por fim, verificou-se que não houve perda da atividade das amostras contendo (S)-NCS quando armazenadas a -80 °C por 7 dias. Entretanto, quando armazenadas a 4 °C por 7 dias a perda de atividade foi de 75% (SAMANANI; FACCHINI, 2001).

Em um estudo realizado pelos mesmos autores no ano de 2002, a (S)-NCS foi extraída da planta *T. flavum*, sendo posteriormente purificada, em um processo de cinco etapas, e caracterizada. Através de análises por cromatografia de exclusão molecular, constatou-se que a (S)-NCS foi eluída com uma massa molecular de aproximadamente 28 kDa, o que também foi identificado por eletroforese em gel de poliacrilamida. Por meio de análise por eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida, foram identificadas 4 isoformas da (S)-NCS com valores de ponto isoelétrico (pI) de 5,5, 5,7, 6,0 e 6,2 com massa molecular de 15 kDa cada uma, sugerindo, em um primeiro momento, que a massa molecular de 28 kDa corresponderia a uma forma dimérica da (S)-NCS enquanto a massa de 15 kDa estaria relacionada a forma monomérica. Por fim, os autores sugeriram que a reação catalisada pela enzima ocorreria por um mecanismo em que o aldeído se ligaria primeiro ao sítio ativo para que depois a dopamina se ligasse (SAMANANI; FACCHINI, 2002).

O isolamento da (S)-NCS da planta *T. flavum* (*Tf*NCS) (SAMANANI; FACCHINI, 2002), possibilitou a análise e determinação da sequência de resíduos de aminoácidos dessa proteína (SAMANANI; LISCOMBE; FACCHINI, 2004). A partir disso, no ano de 2004, os autores foram capazes de obter um gene que codifica a *Tf*NCS por meio da construção de “primers” baseados na estrutura primária da enzima. Então foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês Polymerase chain reaction), permitindo a obtenção de muitas cópias de DNA complementar relativo à enzima *Tf*NCS para clonagem em vetor de expressão, que no caso foi o plasmídeo pET29b.

No mesmo trabalho, os autores expressaram as variantes $\Delta 10TfNCS$ e $\Delta 19TfNCS$ na bactéria *E. Coli* ER2566 pLys S. Tais variantes apresentaram uma atividade ótima em pH 7,0 e temperatura de 40°C, a qual caía pela metade em pH 6,0 ou 7,5, e nas temperaturas de 25°C ou 53°C. Além disso, as propriedades cinéticas relativas à reação entre a dopamina e o 4-hidroxifenilacetaldeído foram as mesmas das variantes naturais da (S)-NCS avaliadas nos trabalhos anteriormente realizados pelos autores (SAMANANI; LISCOMBE; FACCHINI, 2004).

Os autores também constataram a presença de cinco genes no genoma da *T. flavum* que apresentaram elevada identidade (igual ou maior a 80%) em comparação com a (S)-NCS isolada neste trabalho (SAMANANI; LISCOMBE; FACCHINI, 2004). Essa observação sugere a presença de outros genes que expressam variantes dessa enzima na planta, o que explicaria a identificação de diferentes isoformas da enzima no trabalho realizado em 2002 (SAMANANI; FACCHINI, 2002).

1.4.2 Relação com as proteínas da família PR-10/Bet v 1

A partir da obtenção do gene que expressa a *TfNCS*, foi possível realizar uma comparação com outros genes depositados em bancos de dados por meio de um algoritmo denominado BLAST (do inglês - Basic Local Alignment Search Tool) (SAMANANI; LISCOMBE; FACCHINI, 2004). Essa análise permitiu a observação de que a *TfNCS* apresenta considerável homologia (50% - 60%) e identidade (28% a 38%) com proteínas das famílias Bet v 1 e PR-10, ao passo que nenhuma homologia é observada entre a *TfNCS* e a Strictosidina sintase (STR), uma outra Pictet-Spenglerase, que tem como substratos a triptamina e a secologanina (LICHMAN, BENJAMIN ROBERT, 2015).

A superfamília Bet v 1 compreende uma grande diversidade de proteínas que possuem estruturas tridimensionais similares, as quais se assemelham à da proteína Bet v 1, que foi a primeira do tipo a ter sua estrutura elucidada, tanto por cristalografia de raios X quanto por espectroscopia de RMN (LICHMAN, BENJAMIN ROBERT, 2015) (GAJHEDE *et al.*, 1996). Uma dessas famílias é a PR-10, que compreende a própria proteína Bet v 1, além de outras proteínas, das quais uma grande parte é do tipo PR (relacionada a patogenia, do inglês pathogenesis-related). Essas proteínas do tipo PR são produzidas por plantas por meio de mecanismos de regulação gênica induzidos por fatores de estresse, como infecções por microrganismos, por exemplo (FERNANDES *et al.*, 2013).

A Bet v 1, em especial, é uma proteína associada a alergia causada por pólen de plantas da família *Betulaceae*, sendo a própria proteína o principal alérgeno presente nesse pólen, além de ser uma carreadora de metabólitos (RADAUER; LACKNER; BREITENEDER, 2008). Essa proteína possui um enovelamento característico (Figura 7) que pode ser observado em proteínas presentes em seres vivos de todos os reinos, o que sugere que este tipo de enovelamento já estava presente em uma proteína do último ancestral comum universal que foi se diversificando ao longo do tempo, dando origem a uma grande diversidade de proteínas que compartilham o mesmo tipo de enovelamento característico (RADAUER; LACKNER; BREITENEDER, 2008). A Figura 7 mostra a estrutura da Bet v 1 (PDB: 1BV1) (em ciano) e a estrutura da $\Delta 19TfNCS$ (PDB: 2VNE-B) (em cinza) sobreposta a da Bet v 1 (em ciano) para fins de comparação.

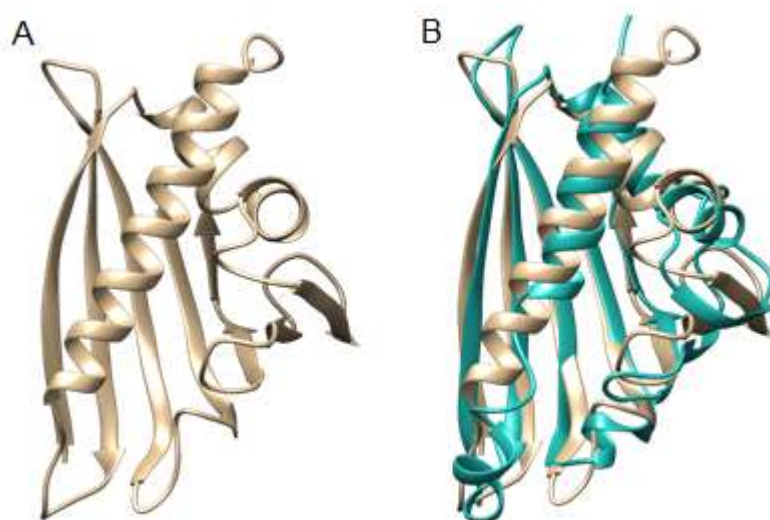


Figura 5 – Estrutura da cristalográfica da proteína Bet v 1 (PDB: 1BV1) (A) e estruturas da Bet v 1 (PDB: 1BV1) e $\Delta 19TfNCS$ sobrepostas (PDB: 2VNE-B) (B). As figuras foram desenhadas usando o software Chimera 1.15rc.

1.4.3 Variantes conhecidas da (S)-NCS

Considerando-se o grande número de proteínas pertencentes à família PR10/Bet v 1, é interessante notar que diferentes variantes da própria (S)-NCS estão presente em diferentes espécies de plantas, além da existência de mais de uma variante desta enzima em uma mesma espécie de planta, como já mencionado na sessão 1.4.1. Neste caso, é importante considerar que o que define a enzima como uma (S)-NCS é sua capacidade de catalisar a reação de Pictet-Spengler entre a dopamina e o 4-hidroxifenilacetaldeído resultando na formação da (S)-norcoclaurina.

Em um trabalho realizado em 2018, foram identificadas oito variantes naturais da (S)-NCS através da ferramenta BLAST, já mencionada, usando o gene da *TfNCS* como entrada para pesquisa. Dessas oito, três ainda não haviam sido descritas na literatura (LECHNER *et al.*, 2018a). Uma nova variante, a *CjNCS1*, foi adicionada à biblioteca por ser capaz de catalisar a mesma reação (MINAMI *et al.*, 2007). A partir disso, foi construída uma biblioteca com essas variantes naturais da (S)-NCS conforme apresentado na Tabela 2, em que os percentuais de identidade e similaridade foram determinados usando a sequência da *TfNCS* como base.

Tabela 2 – Biblioteca de variantes naturais da (S)-NCS

Abreviação	Organismo de origem	Similaridade de sequência	Identidade de sequência	Massa molecular (kDa)	Número de resíduos
<i>TfNCS</i>	<i>Thalictrum flavum</i>	100%	100%	22,2	200
<i>AmNCS1</i>	<i>Argemone mexicana</i>	67%	51%	21,5	193
<i>AmNCS2</i>	<i>Argemone mexicana</i>	64%	50%	22,4	197
<i>CsNCS</i>	<i>Corydalis saxicola</i>	70%	55%	20,0	180
<i>PbNCS</i>	<i>Papaver bracteatum</i>	71%	55%	19,5	172
<i>PsNCS1</i>	<i>Papaver somniferum</i>	67%	51%	26,8	237
<i>PsNCS2</i>	<i>Papaver somniferum</i>	69%	51%	23,7	208
<i>CjNCS1</i>	<i>Coptis japonica</i>	-	-	40,0	352
<i>CjNCS2</i>	<i>Coptis japonica</i>	77%	64%	20,3	179

Fonte - (LECHNER *et al.*, 2018a) modificado.

Além das variantes naturais, uma série de novas variantes da (S)-NCS foi criada a partir de técnicas de engenharia de proteínas nos últimos anos e, dentre estas, é interessante citar

algumas. As primeiras construções foram a $\Delta 10TfNCS$ e $\Delta 19TfNCS$, como já citado. Posteriormente, a variante $\Delta 29TfNCS$ foi construída a partir da $\Delta 19TfNCS$, sendo que esta nova variante não apresentou alterações na atividade enzimática em comparação à construção anterior (BERKNER *et al.*, 2007) (SAMANANI; LISCOMBE; FACCHINI, 2004).

Em 2015, foi publicado um trabalho em que novas construções, tendo como ponto de partida a $\Delta 29TfNCS$, foram obtidas, tendo como objetivo avaliar estrategicamente a interferência de determinadas substituições de resíduos de aminoácidos da enzima na atividade dessa, pois tais informações auxiliariam na melhor compreensão do mecanismo de reação da (S)-NCS. No caso, os resíduos que mutados foram Leu76, Tyr108, Glu110, Lys122 e Asp141. A construção L76A, em especial (em que a leucina 76 foi substituída por uma alanina), apresentou um desempenho interessante por ter apresentado uma alteração no perfil de atividade em relação aos aldeídos, corroborando a proposta de mecanismo sugerida pelos autores além de demonstrar o grande potencial de modificações das propriedades da enzima, visando diferentes objetivos, a partir de técnicas de engenharia de proteínas (LICHMAN, BENJAMIN R. *et al.*, 2015). Desde então, outros estudos propondo novas construções da enzima foram publicados (LICHMAN, BENJAMIN R.; ZHAO; *et al.*, 2017) (ERDMANN *et al.*, 2017a).

1.4.4 Estrutura e mecanismo de reação da (S)-NCS

Em 2009 foi publicado um importante trabalho apresentando duas estruturas da $\Delta 19TfNCS$ obtidas a partir de difração de raio X de cristais dessa proteína, uma na forma apo (PDB: 2VNE) e a outra na forma holo (PDB: 2VQ5). Essa última foi obtida por meio da imersão de cristais da (S)-NCS em solução contendo dopamina (2 mM) e 4-hidroxibenzaldeído (2 mM), em que o aldeído em questão é um análogo ao 4-hidroxifenilacetaldeído, sendo, porém, inerte quanto à reação catalisada pela enzima. As estruturas em questão apresentaram-se na forma de tetrâmeros compostos por duas unidades diméricas (A1-B1 ou A2-B2) e, ao analisar as estruturas, foi possível então constatar a semelhança entre a estrutura da (S)-NCS e a da proteína Bet v 1, algo que já havia sido sugerido anteriormente a partir da análise da estrutura primária (ILARI *et al.*, 2009b).

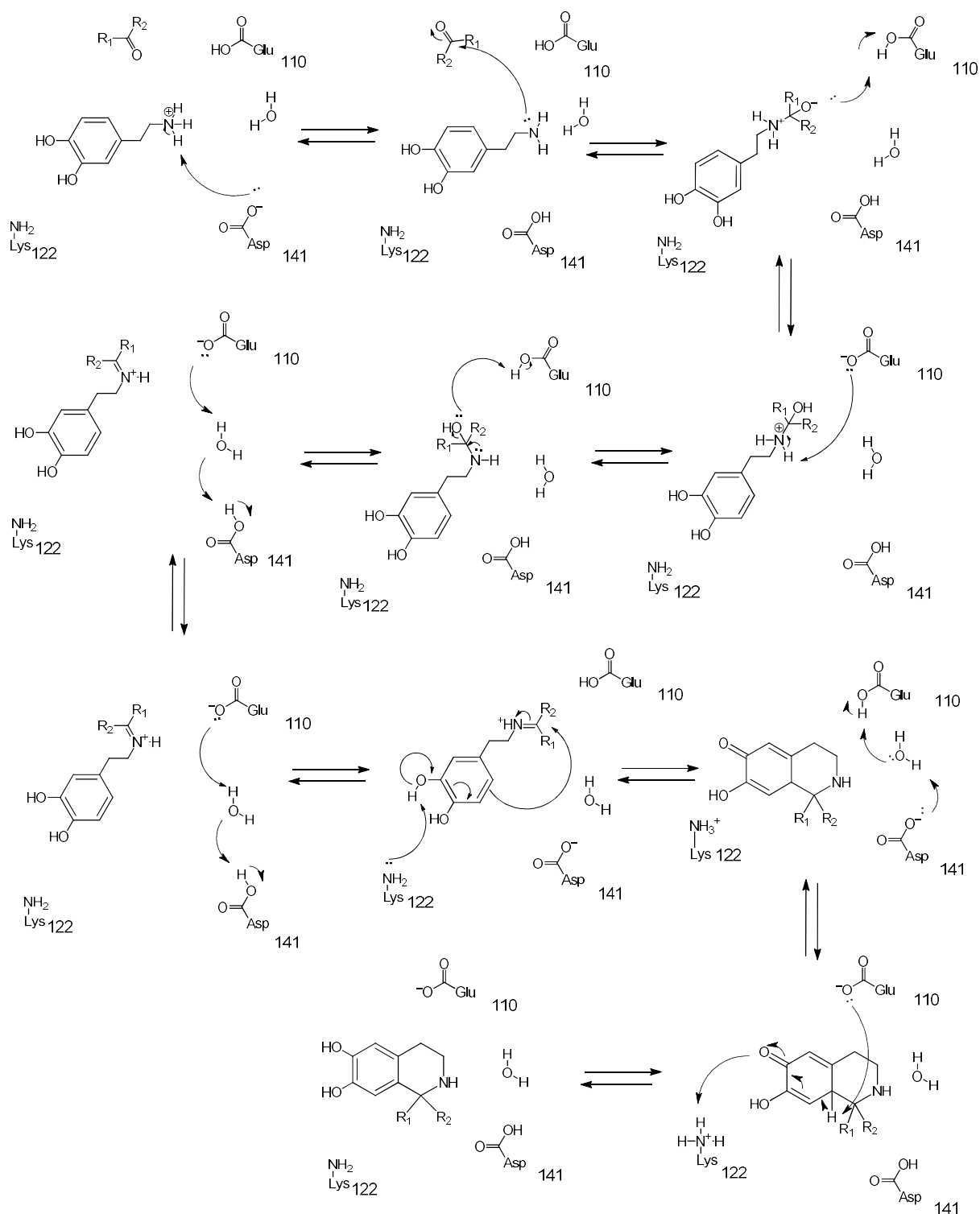
Através da análise da estrutura holo, os autores identificaram os resíduos Tyr108, Glu110, Lys122 e Asp141 no sítio ativo da enzima como possivelmente importantes ao longo da reação. Observaram também que o aldeído estava ligado mais profundamente no sítio ativo, sendo que a carbonila situava-se próximo ao resíduo de Lys122, enquanto a dopamina

encontrava-se mais próxima à entrada do sítio ativo (ILARI *et al.*, 2009b). Tal informação corroborou a proposta de mecanismo em que o aldeído se liga primeiro ao sítio ativo e em seguida a dopamina, o que já havia sido proposto em estudos anteriores baseados em dados cinéticos (SAMANANI; FACCHINI, 2002) (LUK *et al.*, 2007).

Inicialmente, muitos autores propuseram que o mecanismo de reação promovido pela (S)-NCS baseava-se na interação do 4-hidroxifenilacetaldeído com o sítio ativos antes da dopamina, ou seja, o aldeído se ligava ao sítio primeiro (LUK *et al.*, 2007) (BONAMORE *et al.*, 2010). Esta hipótese era reforçada principalmente por dados de cristalografia e difração de raios X, em que se visualizava a dopamina na entrada da cavidade do sítio ativo, enquanto o aldeído encontrava-se mais próximo aos resíduos do interior da cavidade do sítio ativo. O mecanismo proposto foi denominado por alguns como “HPPA first” (“hidroxifenilacetaldeído primeiro”) (LICHMAN *et al.*, 2015).

Entretanto, essa proposta de mecanismo falhava em explicar a promiscuidade da proteína em relação aos aldeídos, ao mesmo tempo que apresentava especificidade muito maior à dopamina. Por conta disso, outros autores propuseram um mecanismo em que a dopamina se ligava primeiro ao sítio ativo, seguida da interação com o aldeído, tendo em vista que neste caso, parte da molécula do aldeído permanece voltada para a entrada do sítio ativo (PESNOT *et al.*, 2012) (LICHMAN *et al.*, 2015).

Em especial, Lichman *et al.* (2015) propôs esse mecanismo com base em estudos de “docking molecular” comparados à estrutura cristalográfica já depositada no PDB, além de outros dados experimentais, como o estudo da cinética de reação e a realização de experimentos monitorando o efeito de mutações em resíduos da (S)-NCS na atividade catalítica da enzima. Todos esses dados contribuíram para a conclusão de que o mecanismo em que a dopamina se ligava primeiro, “dopamine first” (dopamina primeiro), era o mais factível e explicava melhor as observações experimentais. O Esquema 2 mostra o de mecanismo de reação catalisada pela (S)-NCS, do tipo “dopamine first” proposto por Sheng *et al.* (2019).



Esquema 2 – Mecanismo de reação de Pictet-Spengler catalisada pela (S)-NCS proposto por Sheng *et al.* (2019).

Ademais, os estudos cinéticos realizados nessa ocasião, em relação à variante natural TfNCS, indicaram uma baixa eficiência desta enzima por conta do alto valor de K_m em relação a dopamina (22 mM), que corresponde a concentração em que se alcança 50% da atividade máxima da enzima, em relação ao k_{cat} (24 s⁻¹), que está relacionado à velocidade de reação na

condição de saturação do sítio ativo, sendo que esta baixa eficiência é típica de enzimas reguladoras de rotas metabólicas.

Posteriormente, Lichman *et. al* (2017), obtiveram evidências estruturais para a proposta de mecanismo “dopamine first” (LICHMAN, BENJAMIN R.; SULA; *et al.*, 2017). Para tanto, os autores cristalizaram a enzima $\Delta 29TjNCS$ ligada a um composto sintético, 4-{2-[(4-metoxifenetil)amino]etil}benzeno-1,2-diol, análogo a um dos estados de transição e obtiveram a estrutura do complexo via difração de raios X. A estrutura foi depositada no PDB com código 5NON.

Dessa análise, observou-se que o grupo OH do carbono 3 no anel catecol da dopamina estava interagindo, por ligação de hidrogênio, com a Lys122 do sítio ativo. Também foi observado que o aldeído se posiciona à entrada do sítio ativo, o que corrobora a hipótese do aldeído se ligar depois e explica a promiscuidade em relação aos aldeídos (Figura 6).

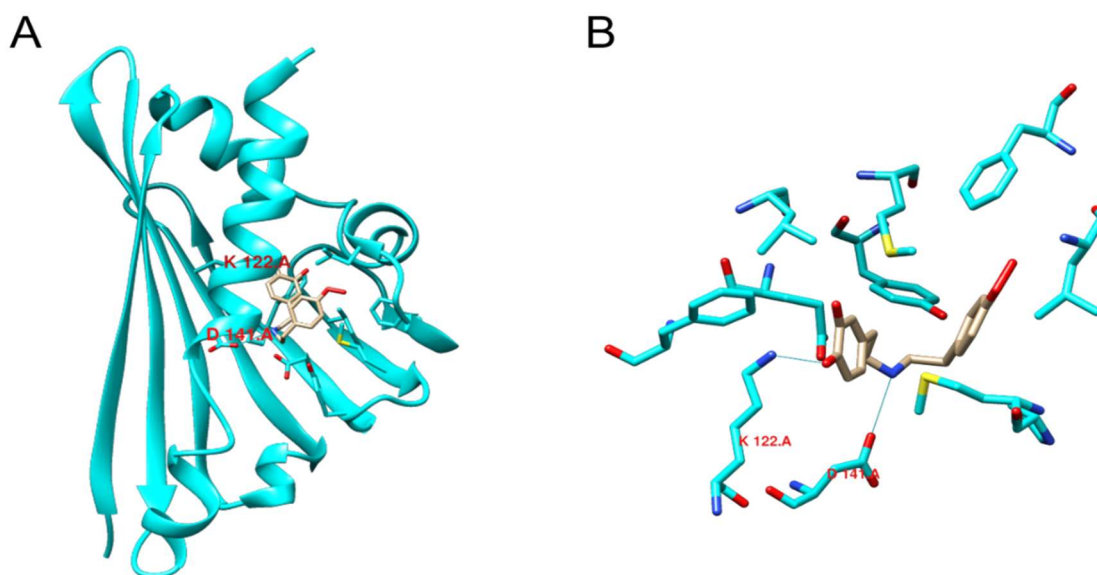


Figura 6 – Estrutura da cristalográfica da proteína $\Delta 29TjNCS$ (PDB: 5NON). (A) – Estrutura da enzima inteira. (B) – Ampliação do sítio ativo interagindo com molécula análoga ao estado de transição, conforme descrito por Lichman *et. al.* (2017). As figuras foram desenhadas usando o software Chimera 1.15rc.

1.4.5 Aplicações da (S)-NCS para síntese de compostos orgânicos

Recentemente, foram desenvolvidas algumas variantes da (S)-NCS através de técnicas de engenharia de proteínas, em especial, por meio da substituição de resíduos de aminoácidos estratégicos, visando aumentar a promiscuidade da enzima em relação aos compostos carbonílicos e aumentar atividade da enzima. Em especial, um trabalho realizado em 2017

proporcionou o desenvolvimento de variantes da *Tj*NCS, com destaque para as A79F e A79I, capazes de catalisar reações envolvendo a dopamina e cetonas, produzindo tetraidroisoquinolinas 1,1'-disubstituídas e spiro-tetraidroisoquinolinas, algo que ainda não havia sido relatado (LICHMAN, BENJAMIN R.; ZHAO; *et al.*, 2017).

Outras aplicações interessantes são as reações em cascata envolvendo a (*S*)-NCS. Em um trabalho publicado recentemente, foram desenvolvidas duas rotas de reações em cascata, ou seja, reações consecutivas, uma completamente enzimática e outra quimioenzimática (ERDMANN *et al.*, 2017b). As rotas partiam do 3-hidroxibenxaldeído e tinham como última etapa a reação de Pictet-Spengler, sendo que em uma delas, a reação era catalisada pela (*S*)-NCS e em outra pelo tampão fosfato, produzindo tetraidroisoquinolinas estereoquimicamente complementares, ou seja, uma com configuração *R* e outra *S* em relação ao centro de quiralidade formado durante a reação de Pictet-Spengler. Ambas proporcionaram produtos com elevada estereoseletividade e alta conversão em relação ao material de partida (ERDMANN *et al.*, 2017b). As rotas propostas pelos autores podem ser visualizadas na Figura 7.

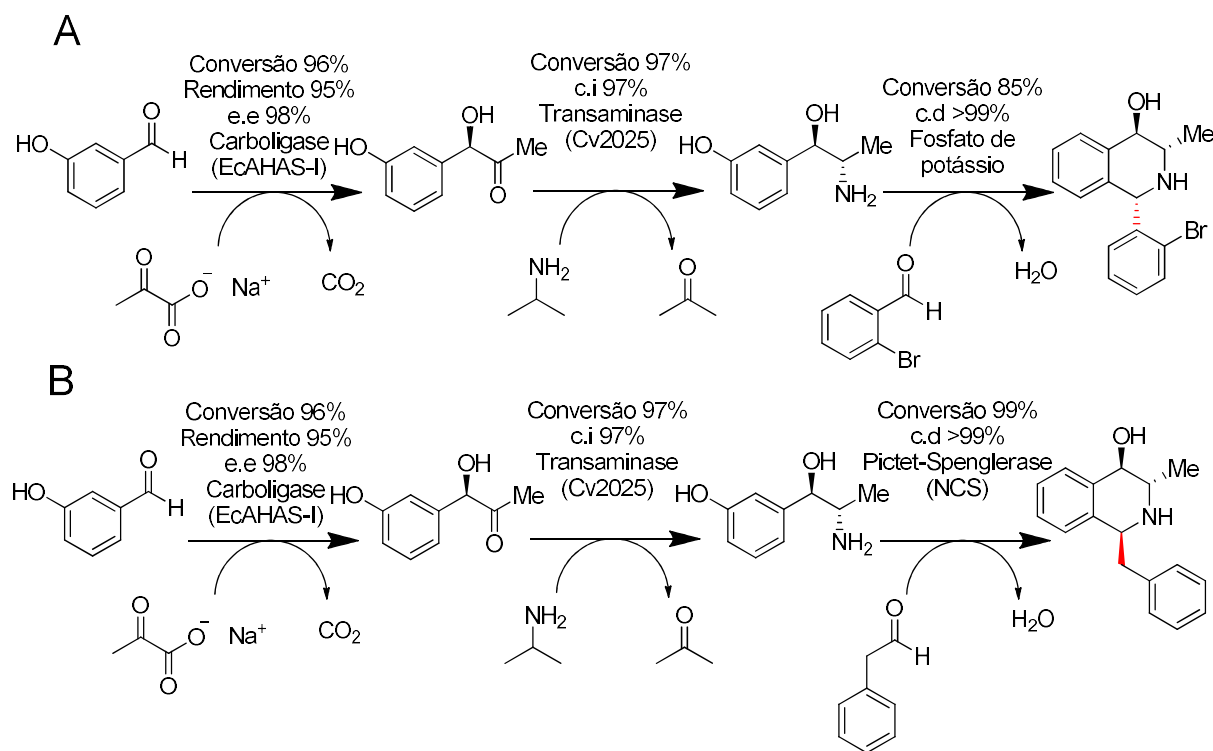


Figura 7 – Rotas de síntese de tetraidroisoquinolinas descritas por Erdmann *et al.* (2017). A-Rota quimioenzimática; B-Rota enzimática; e.e-Excesso enantiomérico; c.i-Conteúdo isomérico; c.d-Conteúdo diastereoisomérico. Fonte - (ERDMANN *et al.*, 2017) modificado.

A obtenção de tetraidroisoquinolinas também pode ser alcançada por meio de técnicas de engenharia metabólica. Pyne *et al.* (2020) descreve o desenvolvimento de cepas de leveduras

capazes de produzir tetraidroisoquinolinas a partir de sacarose, por meio de rotas metabólicas que envolvem a etapa catalisada por (S)-NCS, sendo que, algumas delas apresentaram resultados promissores. Estas cepas foram obtidas por meio de modificação genética dos seus respectivos DNAs cromossomiais através da técnica “Crispr Cas 9”, fazendo com que a rota de produção dos compostos desejados fosse incorporada ao metabolismo desses organismos. Ainda em relação a este tipo de técnica, uma patente relacionada à produção de tetraidroisoquinolinas através do uso de engenharia metabólica de microrganismos foi registrada recentemente (SMOLKE; HAWKINS, 2019).

Por fim, um trabalho publicado em 2018, relata o desenvolvimento de técnicas de imobilização da (S)-NCS, tanto em sua forma livre, quanto dentro das células em que foi expressa. Nesse trabalho, foram utilizadas diversas matrizes e a técnica de imobilização da (S)-NCS usada foi adsorção por afinidade de HisTag a Ni^{2+} e Fe^{2+} , sendo que o biocatalisador mais promissor foi o obtido a partir da imobilização da enzima a uma matriz de vidro com superfície semi-hidrofílica contendo íons Fe^{2+} , denominada EziG3 (LECHNER *et al.*, 2018a).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Desenvolver um estudo de imobilização da enzima $\Delta 19TfNCS$, visando sua aplicação na síntese de uma tetraidroisoquinolina e avaliar os biocatalisadores resultantes em relação a capacidade de reuso, e desempenho em diferentes temperaturas;

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir a enzima $\Delta 19TfNCS$ via expressão heteróloga de proteínas recombinantes na bactéria *Escherichia coli* BL 21 (DE3), em grande quantidade e em processo reprodutível;
- Avaliar a estrutura e a atividade da enzima produzida;
- Definir e avaliar matrizes que serão usadas para imobilização da $\Delta 19TfNCS$: Verificar quais são inertes no meio reacional;
- Imobilizar a $\Delta 19TfNCS$ nas matrizes selecionadas e avaliar os biocatalisadores resultantes: Rendimento de imobilização, rendimento de reação;
- Avaliar os biocatalisadores (enzima imobilizada) quanto ao reuso: Rendimento de reação (3 usos);
- Avaliar os biocatalisadores (enzima imobilizada e enzima livre) quanto a estabilidade térmica: Rendimento de reação em diferentes temperaturas (37°C; 47°C);

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Expressão da enzima $\Delta 19TfNCS$

A enzima $\Delta 19TfNCS$ (~24 KDa) foi produzida via metodologia de expressão heteróloga de proteínas recombinantes seguindo as seguintes etapas: 1) Preparação e planejamento do plasmídeo; 2) Replicação do plasmídeo (miniprep); 3) Transformação das células *E. coli* BL21 (DE3); 4) Seleção das colônias; 5) Preparo e crescimento do pré-inóculo; 6) Preparo e crescimento do inóculo; 7) Indução da expressão da enzima.

Na etapa de transformação, foi usada a bactéria *E. coli* BL21 (DE3) competentes e o gene responsável pela expressão da $\Delta 19TfNCS$ foi clonado no vetor de expressão pET-28-a, cuja sequência clonada encontra-se no Anexo 1, fornecido por GenScript (Piscataway, USA). O gene da $\Delta 19TfNCS$ foi inserido no plasmídeo e, dessa forma, a sequência da enzima produzida contém His-tag (calda polihistidínica) seguida do sítio de clivagem da protease Trombina na região N-terminal. A transformação das bactérias foi feita via choque térmico, em que um eppendorf contendo as bactérias (100 μ L) e os plasmídeos (2 μ L) (vetor de expressão pET-28-a) foi encubado em um banho de água à 42 °C por 1 min e 30 s e em seguida foi imerso em um recipiente contendo gelo por 10 min.

Após a transformação foram acrescentados 500 μ L de meio de cultura Luria Bertani (LB) líquido (pH 7,0) (Tabela 3) ao recipiente contendo as bactérias transformadas, o qual foi então encubado à 37 °C por 1 h, o que permitiu um crescimento da cultura bacteriana. Depois da incubação, o meio contendo as bactérias foi centrifugado à 3000 rpm, 4 °C, por 3 min, permitindo assim a formação de um pellet, o qual contém as bactérias, no fundo do recipiente. Após a centrifugação, 450 μ L de sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso cuidadosamente na solução restante. O pellet ressuspenso foi espalhado sobre a superfície de um meio LB ágar (Tabela 4), em placa de Petri, contendo 50 μ g.L⁻¹ do antibiótico canamicina, para formação de um meio de cultura na placa e encubado à 37 °C por aproximadamente 16 horas.

Tabela 3 – Composição de 1L do meio LB líquido.

Componente	Quantidade para 1 L
Água deionizada	950 mL
Tryptona	10 g
Extrato de Levedura	5 g
NaCl	10 g

Tabela 4 – Composição de 1L do meio LB ágar.

Componente	Quantidade para 1 L
Água deionizada	950 mL
Tryptona	10 g
Extrato de Levedura	5 g
NaCl	10 g
Bacto agar (para placas)	15 g
Bacto agar (semi sólido)	7 g
Canamicina	50 µg

Após esse intervalo, foram observadas colônias da *E. coli* BL21 (DE3) transformadas. O vetor de expressão pET-28-a contém um marcador de seleção que confere às bactérias transformadas resistência ao antibiótico canamicina, presente no meio de cultura, de tal maneira que somente as bactérias transformadas formaram colônias no meio.

Duas colônias do meio de cultura foram selecionadas e introduzidas em um Erlenmeyer contendo 100 mL de meio LB líquido (Tabela 3) contendo 50 µg.L⁻¹ de canamicina. Essa etapa do processo é denominada de pré-inóculo. O pré-inóculo foi incubado à 37 °C com agitação de 180 rpm durante aproximadamente 16 horas para permitir o crescimento das bactérias transformadas e sua adaptação ao meio LB líquido.

O pré-inóculo foi retirado da incubadora e vertido em um Erlenmeyer contendo 900 mL de LB líquido, dando origem a um volume total de 1 L de LB líquido contendo as bactérias transformadas e 50 µg.L⁻¹ de canamicina. A essa etapa do processo dá-se o nome de inóculo. Deste inóculo recém preparado, foi retirada uma alíquota de 1 mL para medir a densidade óptica

(D.O.), do meio aferida em $\lambda = 600$ nm via espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, a fim de avaliar, qualitativamente, a quantidade de bactérias no meio.

Após a primeira medida de D.O., o inóculo foi introduzido em incubadora, submetido a uma temperatura de 37 °C e agitação de 180 rpm. Foram retiradas alíquotas do inóculo periodicamente para medir a densidade óptica do meio e acompanhar o crescimento dos microrganismos. A D.O. do meio no tempo zero, ou seja, na etapa de adição do pré-inóculo ao inóculo, foi de 0,183 e no momento da indução com IPTG, após 4 h e 30 min de encubação, foi de 0,757. Portanto, a expressão da TfnCS foi induzida em D.O do inóculo de ~0.8 pela adição do indutor de expressão isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídiol, IPTG, em concentração final de 0.5 mM. Após a indução, a temperatura da incubadora foi reduzida para 20 °C, mantendo agitação de 180 rpm, por aproximadamente 16 horas. O processo de expressão foi repetido por 9 vezes seguindo este mesmo protocolo, entretanto, em alguns casos foi utilizado 2 L de meio LB, mantendo as proporções de pré-inóculo/inóculo já mencionadas.

3.2 Purificação da enzima $\Delta 19TfnCS$

A metodologia de purificação seguiu as seguintes etapas: 1) centrifugação do inóculo; 2) lise; 3) centrifugação do lisado; 4) filtração do sobrenadante; 5) cromatografia por afinidade a níquel (Ni^{2+}); 6) cromatografia por exclusão molecular (gel-filtração).

A primeira etapa da purificação consiste em liberar a enzima para o meio extracelular, através da lise das bactérias, para que posteriormente ela possa ser separada das demais enzimas, proteínas, DNA e detritos celulares que são liberados nesse processo. Para tanto, o inóculo foi retirado da incubadora, após o processo de expressão da $\Delta 19TfnCS$, e então centrifugado com rotação de 4000 rpm, à 4 °C durante 40 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pelet contendo as células foi congelado à -20 °C para iniciar o processo de lise celular. O pelet foi então retirado do congelador e ressuspensão em 10 mL de tampão de fosfato (NaP) (50 mM) com imidazol (10 mM) e DTT (2 mM), pH 7,0. A enzima lisozima, que promove rompimento da parede celular, foi adicionada ao recipiente contendo o pelet ressuspensão em quantidade para concentração final dela no meio ser 3 mg.mL⁻¹. Também foi adicionado um inibidor de protease com o objetivo de evitar a degradação da $\Delta 19TfnCS$ durante a lise. O inibidor de protease usado foi o fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) a uma concentração final de 2 mM. O recipiente de lise foi agitado por 30 min. Após o processo de lise com lisozima, a solução resultante foi submetida a um processo de estresse mecânico promovido por seringa, por três vezes, com o objetivo de promover mais rompimento celular.

Também foi avaliada a lise por meio de sonicação, em que o pelet ressuspenso, e imerso em banho de gelo, é submetido a pulsos de ultrassom em 2 ciclos de 10 min de duração cada com um intervalo de 20 min entre os ciclos, visando evitar o aquecimento excessivo da amostra.

A solução obtida foi então centrifugada com rotação de 11000 rpm, à 4 °C durante 40 min sendo que, neste caso, o material de interesse permanece no sobrenadante enquanto o pelet é descartado. Então, foi realizada uma análise de cromatografia líquida usando equipamento Akta Start (General Electric), dotado de um detector do tipo espectrômetro de UV-Vis, usando-se uma coluna contendo esferas funcionalizados com Ni^{2+} (His-Select® Nickel-Affinity gel) para afinidade com a calda de histidina presente na região N-terminal da (S)-NCS, sendo que esta coluna possui um volume de fase estacionária, chamado de volume de coluna (VC), de 10 mL.

O método de cromatografia usado iniciou-se com a lavagem da coluna com 8 volumes de coluna (VC) de água, ou seja, 80 mL (um VC é 10 mL), mantendo um fluxo de 5,0 mL.min⁻¹. Posteriormente a coluna foi equilibrada com 8 volumes de coluna da solução A (PB 50 mM, 10 mM de imidazol e pH 7,0). Durante a injeção da amostra do lisado, foi coletado uma fração denominada *flow through* (FT) a qual foi analisada visando verificar que a proteína de interesse foi retida na coluna ao longo da injeção. Após a injeção da amostra inicia-se o processo de eluição, em que primeiramente injeta-se apenas a solução A, usando 5 volumes de coluna, para que a $\Delta 19Tj$ NCS se ligue a coluna e as impurezas sejam descartadas. O eluente oriundo desta etapa é denominado *wash unbound* (WU), o qual também foi coletado para avaliar se a enzima de interesse permaneceu ligada à coluna enquanto as impurezas foram eliminadas. Posteriormente, foi construído um gradiente de concentração crescente de imidazol na fase móvel usando uma mistura de solução A e solução B (NaP 50 mM com 500 mM de imidazol e 2 mM de DTT) (Tabela 5), começando com 100% da solução A e aumentando a quantidade de solução B ao longo do tempo, de maneira que após 10 volumes de coluna a partir do início da construção do gradiente, a fase móvel é constituída por 100% da solução B.

Tabela 5 – Composição de 1L do tampão B, NaP com 500 mM de imidazol.

Composto	Concentração (mM)	Massa (g) para 1 L
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	45	12,06
NaH ₂ PO ₄	5	0,60
NaCl	300	17,52
Imidazol	500	17
Ditiotritol (DTT)	2	0,695

Ao longo do processo de eluição com gradiente de imidazol, o eluente foi fracionado e coletado a cada 5 mL em tubos de ensaio, as quais foram usadas em etapas posteriores.

3.3 Ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida

Ao longo de todo processo de expressão da enzima $\Delta 19T/NCS$ foram coletadas diversas amostras para análise por eletroforese em gel, a fim de averiguar de forma qualitativa a presença desta enzima em cada uma das etapas associadas as amostras. Estas amostras foram introduzidas em poços de uma placa de gel de poliacrilamida cujas extremidades são submetidas a uma diferença de potencial elétrico, induzindo o deslocamento das proteínas da extremidade em que foram introduzidas para a oposta. A técnica permite que ocorra uma separação das proteínas por diferença da carga elétrica adquirida por cada uma a partir da adição de SDS, sendo que esta carga elétrica é diretamente proporcional ao número de resíduos de aminoácidos de cada proteína.

As amostras obtidas a partir da purificação do lisado, foram preparadas para o processo de eletroforese em gel. As amostras contendo sólidos, como pelets e amostras de bactérias coletadas ao longo do processo de expressão, foram submetidas a uma centrifugação, com exceção das de pelet que já haviam passado por este processo, e os seus respectivos pelets foram ressuspensos em 300 μ L de tampão TES (50 mM de Tris(hidroximetil)aminometano (Tris); 1 mM de EDTA e 1% v/v de SDS), permanecendo assim por 1 hora, e depois foram centrifugadas por 15 min à 1000 rpm.

Posteriormente, 40 μ L do sobrenadante de cada uma destas amostras foram coletados. Igualmente, foi coletado 40 μ L das demais amostras (não contendo sólidos). A cada amostra foi acrescentado 8 μ L de tampão de amostra (12% m/v de SDS; 6% v/v de Mercaptoetanol; 30% m/v Glicerol; 0,05% Cromassie Blue G-250 (Serva); 150 mM Tris/HCl - pH 7,0) de

maneira que estivessem adequadas para a análise por eletroforese em gel, resultando em 48 µL de cada amostra com tampão.

O gel utilizado nas análises é constituído de duas partes: aquela que contém os poços onde são introduzidas as amostras (gel de alinhamento) e aquela em que ocorrerá a separação das proteínas para que as amostras sejam analisadas (gel de separação). O gel foi produzido de acordo com a Tabela 6, sendo que cada um dos componentes foi acrescentado na sequência em que aparecem na tabela.

Tabela 6 – Materiais usados na produção do gel de eletroforese.

Componentes	Gel de separação (quantidade)	Gel de alinhamento (quantidade)
H ₂ O	4660 µL	7440 µL
Acrilamida	10000 µL	1200 µL
Tris ^a	5000 µL (pH 8,8)	1200 µL (pH 6,8)
SDS ^b	200 µL	100 µL
PSA ^c	100 µL	40 µL
TEMED ^d	40 µL	20 µL

Aa – Tris: Tris(hidroximetil)aminometano; b – SDS: dodecil sulfato de sódio; c – PSA: Persulfato de amônio; d – TEMED: *N,N,N',N'*-Tetrametiletilenodiamina.

O gel de separação e gel de alinhamento foram preparados separadamente. O gel de separação foi vertido em uma placa de vidro (própria para eletroforese) com 1,5 mm de espessura e, após sua polimerização, o gel de alinhamento foi vertido sobre o gel de separação.

Após a polimerização dos géis, a placa de vidro mencionada foi posicionada no suporte apropriado, o qual foi introduzido em um recipiente de acrílico no qual foi vertido tampão de Tris-glicina (solução aquosa: 1,45% m/v de glicina; 0,3% m/v de Tris e 0,1% de SDS - pH 8,3). As amostras, 12 µL cada, foram introduzidas nos poços do gel de alinhamento e, 3 µL de uma amostra de padrão de proteínas, foi introduzida em um dos poços. O processo de eletroforese foi então iniciado a partir da criação da diferença de potencial (d.d.p.) de 110 V até que as amostras passassem do gel de alinhamento para o gel de separação e então foi alterada para 120 V até o final da eletroforese.

Ao término da eletroforese, o gel de eletroforese foi submerso em um recipiente contendo em tampão corante (40% v/v de etanol; 10% v/v de ácido acético e 0,1% m/v de cromassie blue R) e aquecido por 30 s em um forno de micro-ondas. Após o aquecimento, o gel ainda no recipiente foi agitado por 15 min e então retirado do tampão corante e submerso em

tampão descorante (40% v/v de etanol e 10% v/v de ácido acético) para que as bandas contendo as proteínas fossem reveladas. O gel permaneceu descorando por 16 horas e o tampão descorante foi renovado e depois substituído por água, de maneira ao final do processo de revelação do gel foi possível identificar as bandas e analisar os resultados. As amostras em que foi identificada a banda correspondente a $\Delta 19TfNCS$ foram unidas, adicionadas em um Centricon 25 mL (GE Health Care) e concentradas por meio de centrifugação (2500 rpm e 1h) sendo posteriormente submetidas a um processo de purificação por gelfiltração.

3.4 Purificação por cromatografia de exclusão molecular e análise de concentração por espectroscopia no UV/Visível

Após a purificação por afinidade a Ni^{2+} , as amostras contendo a $\Delta 19TfNCS$ foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular. Essa é uma etapa de polimento da purificação e é importante por dois motivos. Em primeiro lugar foi necessário trocar a enzima de um meio contendo imidazol para outro contendo o tampão a ser usado nas etapas posteriores, o tampão HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfônico). Além disso, foi necessário separar o monômero de $\Delta 19TfNCS$ de uma impureza de massa próxima a 50 KDa. Tal impureza pode ter sido resultado da dimerização da enzima de interesse, entretanto, é necessário a realização de experimentos posteriores para confirmar a hipótese.

A purificação por cromatografia de exclusão molecular foi realizada em um cromatógrafo Akta Start utilizando uma coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Health Care, EUA). Inicialmente a coluna foi lavada com 3 volumes de coluna de água (1 volume de coluna equivale a 120 mL) e posteriormente equilibrada com 3 volumes de coluna de tampão de eluição (HEPES 50 mM; NaCl 100 mM e DTT 2 mM, pH 7,0), aplicando um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹.

A amostra contendo a enzima de interesse foi injetada na coluna e eluída com 1,5 volumes de coluna de tampão HEPES, resultando em 30 frações de 6 mL cada. As frações para as quais foi observado absorção significativa no cromatograma foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguindo o procedimento já mencionado no item 3.3. Através desta análise foram identificadas as frações contendo a enzima, as quais foram concentradas por meio de centrifugação (2500 rpm e 1h) em um concentrador de centrifuga modelo Centricon 25 mL (GE Health Care) resultando em uma solução estoque de 15 mL de $\Delta 19TfNCS$.

Por fim, uma alíquota da solução estoque de $\Delta 19TfNCS$ foi submetida a quantificação por espectroscopia no UV/Visível. Neste caso foi realizada uma varredura na faixa de 200-800 nm de comprimento de onda (λ), sendo que o valor de absorbância em 280 nm foi utilizado para determinação da concentração de proteína corrigindo a diluição. Nesta análise, o tampão HEPES (50 mM) puro foi usado como branco.

A lei de Lambert Beer, Equação 1, foi usada para determinação da concentração de $\Delta 19TfNCS$ a partir do valor de absorbância.

$$C(NCS) = \frac{A}{\epsilon \times L} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: “A” a absorbância; “L” o comprimento de caminho óptico (1 cm); “ ϵ ” o coeficiente de absorvidade molar, que para a $\Delta 19TfNCS$ é $19.940 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (valor calculado através do “ExPASy ProtParam tool” assumindo resíduos de cisteína reduzidos).

3.5 Análise da estrutura da enzima por espectroscopia de dicroísmo circular

A análise por espectroscopia de dicroísmo circular em UV distante, foi realizada no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG pela doutoranda do programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia da UFMG Verônica Valadares. O equipamento usado foi um espectrômetro de DC modelo J-815 (JASCO Inc, EUA) equipado com um controlador de temperatura Peltier. Uma alíquota da solução estoque de $\Delta 19TfNCS$, diluída a uma concentração de $70 \mu\text{M}$ ($1,68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) foi introduzida em uma cubeta de 0,01 cm de caminho óptico e submetida a análise. Foram realizadas três varreduras de 190 a 260 nm de comprimento de onda (λ), sendo a primeira a uma temperatura de 20°C , a segunda a 75°C e a terceira a 20°C novamente, visando avaliar a reversibilidade do desenovelamento da proteína.

Posteriormente, foi realizado um experimento com rampa de temperatura, com o fim de avaliar a estabilidade térmica da proteína livre e determinar a partir de que faixa de temperatura inicia-se o processo de desnaturação. Foi construída uma rampa de temperatura, variando de 25°C a 75°C com incrementos de $0,5^\circ\text{C}$ e, selecionou-se o comprimento de onda (λ) de 208 nm para detecção.

3.6 Seleção e avaliação inicial de matrizes

3.6.1 Ensaio de atividade da $\Delta 19TfNCS$

A avaliação da atividade da $\Delta 19TfNCS$ seguiu as seguintes etapas: 1) Preparo das soluções estoque usadas no meio reacional; 2) Preparo do meio reacional; 3) Reação química a 37 °C; 4) Centrifugação da amostra; e 5) Coleta e estocagem da amostra.

Foi preparada uma solução estoque contendo HEPES (tampão HEPES 62,5 mM) em meio aquoso, cujo valor de pH foi ajustado para 7,0. Igualmente, produziram-se soluções estoque de hexanal (hexanal 25 mM em DMSO 90% v/v e HEPES 50 mM pH 7,0) e dopamina (dopamina 10 mM, ácido ascórbico 20 mM, HEPES 62,5 mM pH 7,0), sendo que o ácido ascórbico exerceu a função de antioxidante, prevenindo a oxidação do grupo catecol da dopamina.

As soluções-estoque, tampão HEPES e DMSO foram adicionadas a frascos de 15 mL resultando nas soluções reacionais desejadas: dopamina 2,5 mM, hexanal 2,5 mM, ácido ascórbico 5 mM, HEPES 50 mM pH 7,0 e DMSO 10%. Uma alíquota da solução estoque de $\Delta 19TfNCS$ foi então adicionada ao meio reacional, alcançando uma concentração final de 5 μ M (0,12 mg.mL⁻¹), e dando início à reação que ocorreu por 2 horas, sob agitação, em uma estufa mantida a 37°C. Ao término da reação a amostra foi centrifugada por 5 min, 3000 rpm e 8°C e, então, coletada, filtrada (filtro 20 μ m) e imediatamente armazenada em freezer (~ -20°C) para análises posteriores. Nesta etapa, também foi preparada uma amostra controle, com as mesmas características relatadas, entretanto sem conter a $\Delta 19TfNCS$, para fins de comparação.

3.6.2 Avaliação das matrizes em meio reacional

Antes do processo de imobilização com a $\Delta 19TfNCS$, algumas matrizes foram avaliadas quanto à interação com os substratos dopamina e hexanal e a capacidade de catalisar a reação de interesse. Essa metodologia foi dividida nas seguintes etapas: 1) Pesagem das matrizes; 2) Lavagem das matrizes; 3) Preparo das soluções estoque usadas no meio reacional; 4) Preparo do meio reacional específico para cada amostra; 5) Reação química a 37°C; 6) Centrifugação das amostras; e 7) Coleta e estocagem dos sobrenadantes de cada amostra.

Uma série de matrizes, disponíveis em laboratório, que poderiam ser utilizadas como suporte para imobilização da enzima foram selecionadas para uma avaliação com o objetivo de determinar quais eram inertes no meio reacional e, portanto, poderiam ser usadas para

imobilizar a $\Delta 19T$ /NCS. Todas essas matrizes já haviam sido descritas na literatura quanto à aplicação em imobilização de enzimas. As matrizes estão listadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Matrizes avaliadas inicialmente

Matriz	Fabricante	Material/observações
Ni-NTA (His-Select [®] Nickel-Affinity gel)	Sigma Aldrich	Resina de afinidade Material: Beads de agarose revestidos com ácido nitriloacético que complexa Ni^{2+} (Ni-NTA). Material hidrofílico Granulometria: 45-165 μm
Celite 545	Fisher Scientific	Material: Terra diatomácea calcinada – majoritariamente constituída de sílica podendo conter alumina e óxido ferroso em menor proporção Granulometria: 0,02-0,1 mm
Dowex 1X8	Fluka AG./Dow Chemicals	Resina aniônica básica (Cl ⁻) Material: co-polímero de estireno (92%) e divinilbenzeno (8%) Granulometria: 200-400 Mesh Capacidade de retenção de água: 39-45%
Caolin	Pur QM/Química moderna	Material: hidróxido de alumínio silicato $Al_2Si_2O_5(OH)_4$
Diaion HP-2MG	Sigma Aldrich/Mitsubish Chemicals	Material: Polimetacrilato Granulometria: 25-50 Mesh Tamanho médio de poros: 170 Å
Dowex 50WX8	Sigma Aldrich/Dow Chemicals	Resina catiônica ácida (H ⁺) Material: co-polímero de estireno (92%) e divinilbenzeno (8%) Granulometria: 100-200 Mesh Capacidade de retenção de água: 50-58%

Dowex 50WX4	J.T.Baker Chemicals/Dow Chemicals	Resina catiônica ácida (H ⁺) Material: co-polímero de estireno (96%) e divinilbenzeno (4%) Granulometria: 100-200 Mesh Capacidade de retenção de água: 64-72%
Sílica Gel	Sigma Aldrich	Tamanho de poro: 60 Å Granulometria: 70-230 Mesh 63-200 µm

Os dados para construção deste quadro foram obtidos através de consulta no site dos fabricantes.

Pesou-se 110 mg de cada uma dessas matrizes, com exceção da Ni-NTA e Celite 545. As matrizes foram lavadas por 3 vezes com tampão HEPES (50 mM pH 7,0) e então adicionadas ao meio reacional e submetidas ao mesmo protocolo relatado no item 3.6.1. Neste processo, as matrizes não passaram pelo processo de imobilização.

3.7 Imobilização da $\Delta 19TfNCS$ em matrizes selecionadas e análise do rendimento de imobilização

As matrizes que se mostraram inertes, foram submetidas a uma avaliação de rendimento de imobilização, a fim de determinar quantitativamente a capacidade de imobilização da enzima para cada matriz. Para isso, foi realizado inicialmente um processo de imobilização da $\Delta 19TfNCS$ idêntico para todas as matrizes.

O processo consistiu em pesar 110 mg de cada matriz, transferi-las para um recipiente, e então adicionar 248 µL de uma solução estoque $\Delta 19TfNCS$ (0,95 mg.mL⁻¹) em cada uma delas. As amostras permaneceram em contato com a solução de proteína por um período de 1 h, a temperatura de 25 °C e sob agitação. Ao término do processo, as amostras foram centrifugadas e 240 µL do sobrenadante foi coletado e transferido para uma cubeta de quartzo, sendo posteriormente adicionado 410 µL de tampão HEPES (50 mM pH 7,0) à cubeta, completando um volume de 650 µL de amostra.

As amostras foram analisadas por espectroscopia de UV/Visível, usando tampão HEPES puro (50 mM pH 7,0) como branco, e a concentração de proteína foi determinada por meio do valor de absorbância a um comprimento de onda (λ) de 280 nm. Através da concentração de $\Delta 19TfNCS$ residual no sobrenadante de cada amostra, foi possível calcular indiretamente a quantidade de enzima imobilizada em cada amostra. A quantidade de enzima imobilizada foi

quantificada utilizando o parâmetro rendimento de imobilização (%) (GUIMARÃES *et al.*, 2018), que é descrito pela seguinte equação.

$$Ri(\%) = \frac{C(NCS)i - C(NCS)s}{C(NCS)i} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Onde Ri(%) é o rendimento de imobilização, C(NCS)i é a concentração inicial de $\Delta 19T/NCS$ e C(NCS)s é a concentração de NCS no sobrenadante.

3.8 Avaliação dos biocatalisadores

3.8.1 Procedimento para a primeira reação a 37 °C

As atividades das enzimas imobilizadas foram analisadas e comparadas a da enzima livre em solução seguindo o protocolo relatado no item 3.5, alterando o volume do meio reacional para 2 mL. Após a imobilização, as matrizes foram lavadas por três vezes com tampão HEPES (50 mM pH 7,0) antes de serem adicionadas ao meio reacional.

Nesse procedimento avaliadas as amostras listadas na Tabela 7, sendo que a amostra de dopamina apresentou a seguinte composição: dopamina 2,5 mM, ácido ascórbico 5 mM, HEPES 50 mM pH 7,0 e DMSO 10% v/v, e a amostra de hexanal: hexanal 2,5 mM, HEPES 50 mM pH 7,0 e DMSO 10% v/v. Ao término da reação, as matrizes foram separadas do meio reacional e armazenadas para o processo de reuso que será descrito posteriormente.

Tabela 7 – Amostras das reações a 37 °C

Nº	Amostra
1	Ni-NTA sem NCS
2	Celite 545 sem NCS
3	Dowex 1 com NCS
4	Caolin com NCS
5	Diaion HP-2MG com NCS
6	NCS livre
7	Controle
8	Ni-NTA com NCS
9	Celite 545 com NCS
10	Dopamina
11	Hexanal

3.8.2 Procedimento para o avaliação do reuso dos biocatalisadores (segundo e terceiro uso) a 37 °C

Com o objetivo de avaliar a capacidade de reuso dos biocatalisadores, as amostras de matriz utilizadas na primeira reação, citada no item 3.7.2, foram lavadas por três vezes com tampão HEPES (50 mM pH 7,0) e então reutilizadas em uma segunda reação pelo mesmo protocolo do item 3.7.2. Por fim, as matrizes foram utilizadas por uma terceira vez, e as amostras foram armazenadas para análise posterior.

3.8.3 Procedimento para a reação a 47 °C

Foi realizada uma nova reação à temperatura de 47 °C com o fim de avaliar a influência do aumento da temperatura no desempenho dos biocatalisadores. Para realização deste procedimento foi necessário realizar mais uma pesagem de matrizes (110 mg) que foram lavadas segundo o mesmo protocolo mencionado no item 3.5. As amostras avaliadas nessa etapa estão listadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Amostras da reação a 47 °C

Nº	Amostra
1	Dowex 1 com NCS
2	Caolin com NCS
3	Diaion HP-2MG com NCS
4	NCS livre
5	Controle
6	Ni-NTA com NCS
7	Celite 545 com NCS
8	Dopamina
9	Hexanal

3.9 Análise das amostras por espectroscopia de RMN

Todas as amostras obtidas nos itens 3.5 e 3.7 foram analisadas via espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) através de experimentos realizados nos espectrômetros Bruker NanoBay 400 MHz equipado com sonda de 5 mm, com gradiente em Z e detecção multi-nuclear indireta modelo BBI e Bruker Avance Neo 600 MHz equipado com sonda de dupla ressonância de 5 mm, multi-nuclear com gradiente em Z modelo SmartProbe, ambos

localizado no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LAREMAR) do Departamento de Química da UFMG. Os espectros de RMN adquiridos foram processados e analisados usando o software Topspin 4.06 (Bruker SA, EUA).

Para isso, adicionou-se uma alíquota de 540 μL de cada amostra do item 3.5, em tubos de RMN (5 mm) completando o volume de 600 μL com a adição de 60 μL de D_2O (dióxido de deutério 99,9%). As amostras foram caracterizadas via aquisição de espectros de RMN de ^1H , utilizando o programa de pulso p3919gp (PIOTTO; DAUDEK; SKLENAR, 1992), com supressão do sinal da água, (com D1 de 1,2 segundos). A partir dos dados coletados nessa etapa, foram selecionadas as matrizes para a próxima seguinte. Também foi preparada uma amostra de dopamina (dopamina 2,5 mM, ácido ascórbico 5 mM em tampão NaP 1 M pH 7,0 e D_2O 10% v/v) e hexanal (hexanal 2,5 mM em DMSO 90% v/v e D_2O 10% v/v) a fim de identificar os sinais referentes a cada um destes reagentes nos espectros.

As amostras do item 3.7 foram preparadas da seguinte forma: aliquotou-se 600 μL (538,5 μL de amostra; 60 μL de DMSO D_6 – deuterado; 1,5 μL de DSS - 55,58 mM) em tubos de RMN (5 mm); Espectros de RMN de ^1H foram adquiridos no espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz. A sequência de pulso utilizada foi a noesygppr1d, com supressão do sinal da água via pré-saturação e com tempo de recuperação de 20 segundos.

A sequência de pulso noesygppr1d foi utilizada visando a supressão do sinal da água nas amostras. Tendo em que essa sequência de pulso aplicada a análises quantitativas de amostras aquosas via RMN já havia sido validada em estudos anteriores (LØHRE et al., 2021), ela foi selecionada para esse fim no presente trabalho.

O tempo de recuperação foi definido como 20 segundos por conta da necessidade de que os spins dos hidrogênios estejam em equilíbrio térmico para uma análise quantitativa, condição alcançada quando o tempo de recuperação é no mínimo cinco vezes superior ao maior tempo de relaxação longitudinal (T_1) na amostra (DA S. SANTOS; COLNAGO, 2013), o que mostra a potencialidade da espectroscopia de RMN como técnica de análise quantitativa e qualitativa ao mesmo tempo.

O ácido 2,2-dimetilsilapentano-5-sulfônico (DSS) foi utilizado como padrão para quantificação dos analitos e, sua concentração final nos tubos de RMN foi de 139 μM . Para determinação de tais parâmetros, o primeiro passo consistiu em integrar o sinal do DSS em cada amostra e definir sua intensidade relativa como 9, pois o sinal é referente a 9 hidrogênios

presentes na molécula. Posteriormente foi realizada a integração de sinais do hidrogênio 3 da dopamina e hidrogênio 4 do produto para determinação das respectivas concentrações.

A incerteza experimental de cada ensaio foi estimada pela incerteza das pipetas utilizadas no preparo das soluções. A micropipeta usada na adição de DSS foi uma Labmate Pro 0,5-10 µL com incremento mínimo de 0,02 µL e acuidade de 4%, enquanto a micropipeta usada para transferir 600 µL das amostras prontas, já contendo DMSO deuterado e DSS, aos tubos de RMN (5 mm), foi uma Labmate Pro 100-1000 µL com incremento mínimo de 0,2 µL e acuidade de 1,6%. Portanto, para determinação da incerteza experimental associado ao uso dessas pipetas foi estimada usando a Equação 3.

$$Incerteza\ experimental = \left(\frac{V(DSS) \times 0,04}{V(DSS)} + \frac{V(amostra) \times 0,016}{V(amostra)} \right) \quad Eq. 3$$

Onde V(DSS) e V(amostra) são os volumes pipetados de DSS e da amostra respectivamente. Sendo 0,04 o valor da acuidade da micropipeta usada para medir o volume de DSS e 0,016 o da pipeta usada na transferência da amostra para o tubo de RMN. A concentração do analito, seja produto ou reagente, foi definida como:

$$Concentração = IR \times 139 \mu M \pm [(IR \times 139 \mu M) \times (Incerteza\ experimental)] \quad Eq. 4$$

Onde IR é a integral relativa de A e a incerteza experimental é de 0,056.

Os cálculos de rendimento, que definem o quanto de produto foi formado a partir da concentração inicial de reagente dopamina, foram calculados através da Equação 5

$$Rendimento\ (\%) = \frac{Concentração\ do\ produ}{concentração\ inicial\ do\ reagente} \times 100 \quad Eq. 5$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão e purificação da enzima $\Delta 19TfNCS$

4.1.1 Expressão da $\Delta 19TfNCS$

O gel de eletroforese em que foram analisadas amostras coletadas ao longo da expressão da $\Delta 19TfNCS$ é mostrado na Figura 10.

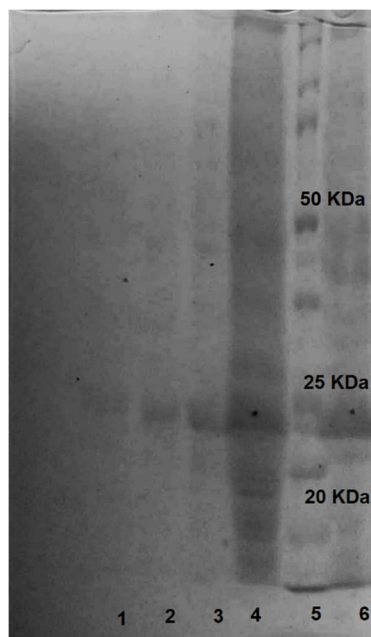


Figura 8 – Gel de eletroforese com amostras da expressão da $\Delta 19TfNCS$. 1-Inóculo antes da indução; 2-inóculo 3 horas após da indução; 3-Inóculo 16 h após a indução; 4-Pellet da lise; 5-Padrão de proteínas; 6-Lisado.

É possível observar uma banda de massa molecular próxima a 25 KDa na maioria das amostras, que é mais intensa nas amostras do lisado (amostra 6) e do pelet de lise (amostra 4). Tendo em vista que a massa da $\Delta 19TfNCS$ usada no presente trabalho possui uma massa molecular de aproximadamente 24 KDa, é possível concluir que essa banda corresponde a enzima desejada, indicando que o processo de expressão foi bem-sucedido.

A partir dessa conclusão, observa-se que presença de $\Delta 19TfNCS$ no inóculo antes da indução é muito pequena, indicando que a enzima é produzida mesmo antes da indução com IPTG, porém em pequenas quantidades. Tal evento não é incomum e é denominado expressão basal, entretanto, é desejável que não ocorra, ou que ocorra o mínimo possível (OVERTON, 2014), especialmente no caso de proteínas tóxicas a célula hospedeira.

A enzima $\Delta 19TfNCS$ foi observada em maior quantidade na amostra 2 (inóculo 3 horas após expressão) e amostra 3 (inóculo 16 horas após a expressão), porém, a intensidade da banda da enzima desejada na amostra 3 não é tão maior do que na amostra 2, o que pode levar a

especulação de que a expressão da proteína chega a um limite máximo após a indução e a partir de então é interrompida. Entretanto, a única forma de confirmar esta hipótese é por meio de um teste de expressão, em que sejam colhidas mais amostras, a cada uma hora, por exemplo, desde o momento da indução com IPTG até um tempo considerável pós indução, e analisar tais amostras por eletroforese.

A amostra 4 (pelet da lise) e 6 (lisado) apresentam uma grande quantidade de proteínas, o que pode ser observado pelo grande número de bandas presentes em cada amostra, o que era de se esperar. Ambas as amostras apresentam a banda relativa a $\Delta 19T/NCS$, entretanto, a banda ganha mais destaque na amostra do lisado, o que é desejável, pois é a partir do lisado que a proteína é purificada, estocada e utilizada.

4.1.2 Purificação por afinidade à Ni^{2+}

O cromatograma da purificação por afinidade, juntamente ao gel de eletroforese obtido a partir das amostras dessa etapa, são mostrados na Figura 9.

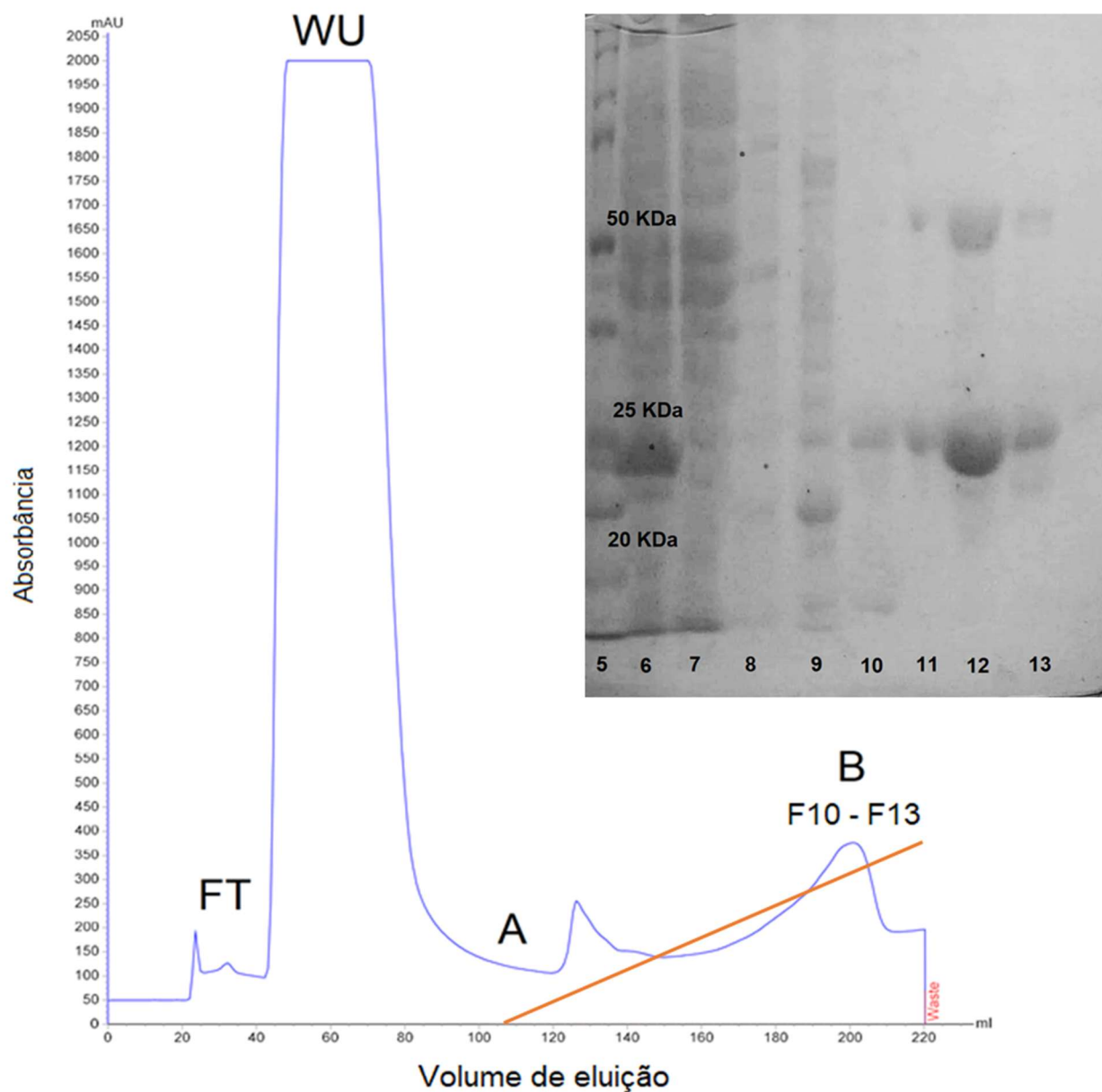


Figura 9 – Cromatograma da etapa de purificação por afinidade a Ni^{2+} . Cromatograma: FT-Flow Through; WU-Wash Unbound; A-Início da aplicação do gradiente de imidazol; B-região de maior eluição de $\Delta 19T/NCS$; C-Fim da aplicação do gradiente de imidazol. Gel de Eletroforese: 5-Padrão de proteínas; 6-Lisado; 7- Flow Through; 8-Wash Unbound; 9-Fração coletada a 15% de solução B; 10 à 13-Frações contendo $\Delta 19T/NCS$ (coletadas no intervalo de 40-100% de B).

Através do cromatograma acima é possível identificar alguns pontos importantes. Primeiramente, a região legendada como FT corresponde ao “flow-through”, ou seja, o material que foi detectado quando a amostra (12 mL) estava sendo injetada. Percebe-se nesta região do cromatograma um pequeno pico, que provavelmente indica a eluição das primeiras impurezas, o que é confirmado no gel de eletroforese, em que a amostra 7 corresponde a fração do FT.

Em seguida, é possível observar a região designada por WU, que corresponde ao “wash-unbound”, ou seja, o material que foi eluído (5 volumes de coluna) logo após a injeção e, antes da aplicação do gradiente de imidazol. Espera-se, que neste momento seja eluído todo material que não se liga a coluna através da afinidade ao Ni^{2+} , ao contrário da proteína $\Delta 19T\text{fNCS}$ que possui uma calda poli-histidinica (HisTag) que permite que não seja eluída neste momento.

De fato, pela intensidade do pico relativo ao WU, é possível que uma grande quantidade de impurezas tenha sido eluída nessa fração. A amostra da fração de WU no gel de eletroforese (amostra 8) apresenta algumas bandas correspondentes a proteínas de diferentes massas moleculares, indicando a presença de impurezas no *Wash Unbound* conforme esperado.

A região indicada por “A” no cromatograma (Figura 9), é o ponto a partir do qual inicia-se a aplicação do gradiente de imidazol conforme descrito na parte experimental. É possível identificar um primeiro pico na região entre 120 e 140 mL que corresponde a região com aplicação de 15% da solução B na cromatografia. A fração coletada nessa região (amostra 9 do gel) contém algumas impurezas residuais, o que pode ser observado pela presença de diversas bandas de proteínas no gel de eletroforese.

Posteriormente, é possível identificar a ascendência de um pico que apresenta intensidade máxima na região designada por “B”, o qual corresponde a eluição da proteína $\Delta 19T\text{fNCS}$, o que pode ser confirmado pela presença da banda de aproximadamente 25 KDa nas frações coletadas nessa região (frações 10 a 13 do gel de eletroforese). Também foi observado que, nessas mesmas frações há uma banda na região de 50 KDa, o que poderia ser consequência da formação de um dímero da proteína por meio da formação de ligação de dissulfeto, entre dois monômeros, envolvendo o resíduo de cisteína presente na $\Delta 19T\text{fNCS}$, algo que já havia sido observado em trabalhos anteriores, como o realizado por Ilari *et al.* (2009) em que foram obtidos cristais de duas estruturas da construção $\Delta 19T\text{fNCS}$ que foram analisadas por difração de raios X, uma na forma (PDB: 2VNE) e a outra holo (PDB: 2VQ5). ((ILARI *et al.*, 2009b).

A hipótese da formação do dímero só poderia ser confirmada por meio de experimentos posteriores, tais como espectrometria de massas. Entretanto, é muito mais provável que a proteína de ~50 KDa corresponda a uma impureza pois, a presença de DTT reduziria a ligação de dissulfeto entre os resíduos de cisteína desfazendo os dímeros, o que também seria promovido pelo β -mercaptoetanol usado no preparo das amostras.

É importante notar a partir do cromatograma (Figura 11), que a proteína de interesse, a $\Delta 19TfNCS$, começa a ser eluída gradualmente e lentamente a partir do volume 150 mL, em que a concentração de aproximadamente 40% da solução B (PB 50 mM com 500 mM de imidazol e 2 mM de DTT), e começa a sofrer uma eluição mais pronunciada a partir do volume 180 mL (70% B) alcançando o máximo a uma concentração de aproximadamente 90% de B, indicando a eficiência deste processo na separação da proteína $\Delta 19TfNCS$ das demais proteínas. Outra observação interessante é que, a aplicação do gradiente de concentração de imidazol se mostrou uma estratégia mais interessante do que a mudança isocrática de concentração, ou seja, mudança repentina da concentração de imidazol da solução A para a B, tendo em vista que, uma parcela de impurezas ainda é removida ao longo da mudança gradual de concentração (aproximadamente 15% de B) e, no caso da aplicação isocrática, estas impurezas seriam eluídas ao mesmo tempo que a proteína.

Por fim, conclui-se que a primeira etapa de purificação da proteína, cromatografia por afinidade à Ni^{2+} , foi bem-sucedida e permitiu que a enzima desejada, $\Delta 19TfNCS$, fosse separada das impurezas presentes no lisado de forma eficiente como pode ser visto a partir do cromatograma desta etapa.

4.1.3 Purificação por cromatografia de exclusão molecular e quantificação da $\Delta 19TfNCS$

O cromatograma da purificação por exclusão molecular, juntamente ao gel de eletroforese obtido a partir das amostras dessa etapa, é mostrado na Figura 10.

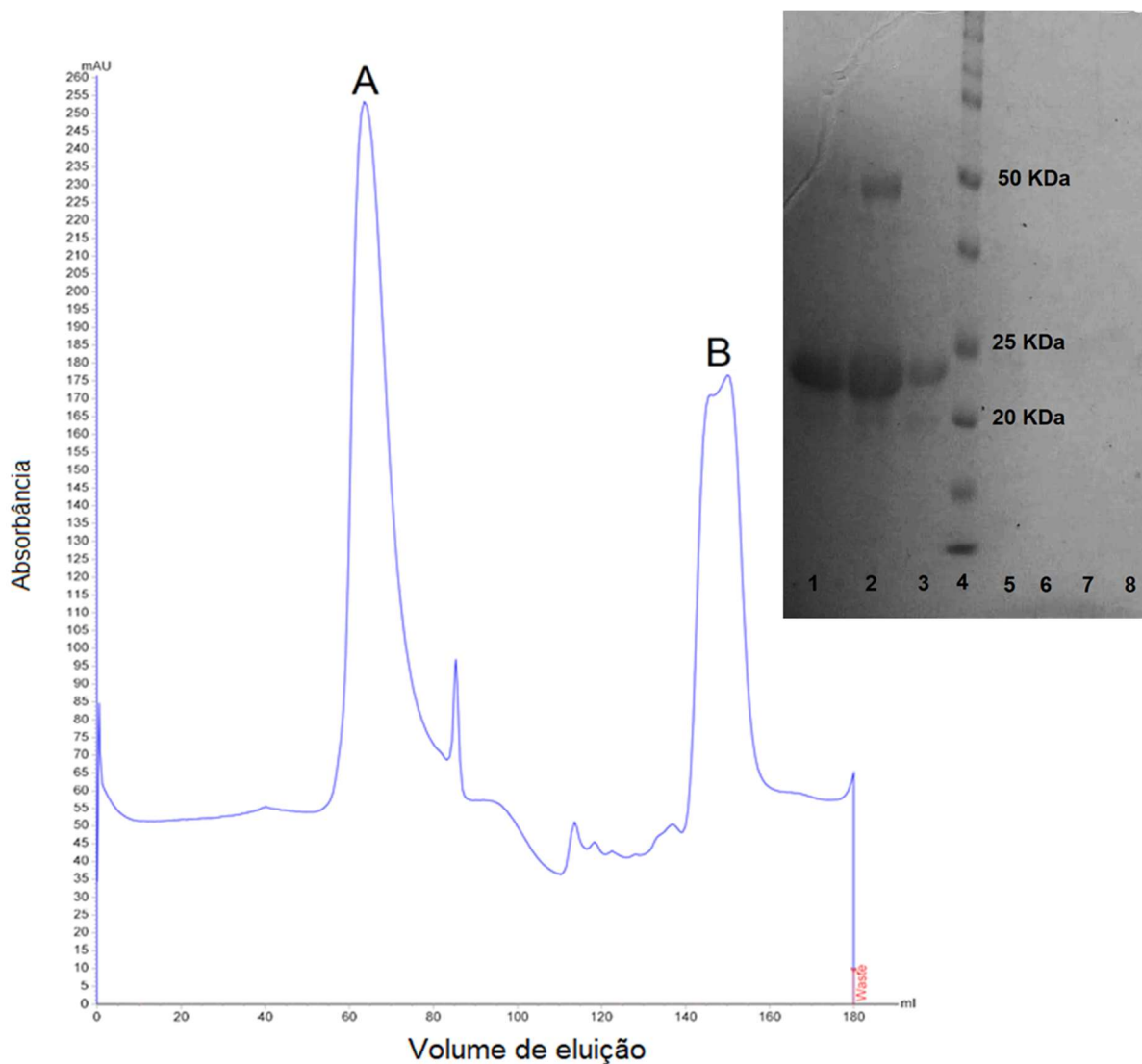


Figura 10 – Cromatograma da purificação por exclusão molecular. Cromatograma: A-Primeiro pico contendo $\Delta 19TfNCS$; B-Segundo pico Gel de Eletroforese: 1 à 3-Frações contendo $\Delta 19TfNCS$ (correspondentes ao pico A); 4-Padrão de proteínas; 5 à 6-Frações correspondentes as regiões entre o pico A e pico B; 7- Fração correspondente ao pico B; 8-Última fração coletada na cromatografia de exclusão molecular.

O primeiro pico presente no cromatograma (pico A) corresponde a enzima e uma proteína de aproximadamente 25 KDa, que nesse caso é a $\Delta 19TfNCS$, o que pode ser confirmado pelas bandas das frações 1 a 3 no gel de eletroforese, as quais correspondem ao pico A. Entretanto, ainda é possível notar uma banda de proteína de 50 KDa nessas frações, sugerindo que ainda há impureza na amostra, mas em menor intensidade quando comparado aos resultados da primeira cromatografia.

O pico B, corresponde ao imidazol presente nas frações coletadas da cromatografia de afinidade, pois as moléculas maiores, como a $\Delta 19TfNCS$ são eluídas mais rapidamente por esse método, saindo primeiro, enquanto as menores, como o imidazol, são eluídas mais lentamente. A conclusão de que o pico B corresponde ao imidazol é corroborada pela ausência de bandas nas frações 5 e 6 do gel de eletroforese, pois, por não se tratar de uma proteína, o imidazol não poderia ser identificado por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Por fim, o processo de quantificação foi realizado conforme descrito na parte experimental, por meio de espectroscopia de UV/Visível. Foi obtido 15 mL de uma solução estoque de $\Delta 19TfNCS$ ($184,44 \mu M$ - $4,42 \text{ mg.L}^{-1}$) para a nona expressão, em que foi usado sonicador, totalizando 66,3 mg da enzima. Também foi obtido 20 mL de uma solução estoque de $\Delta 19TfNCS$ ($40,37 \mu M$ - $0,95 \text{ mg.L}^{-1}$) para a oitava expressão, em que não foi usado sonicador, totalizando 19 mg de $\Delta 19TfNCS$. Essas duas soluções estoques foram majoritariamente usadas no presente trabalho, com destaque para a obtida na oitava expressão.

4.2 Análise da estrutura da $\Delta 19TfNCS$

A estrutura da proteína foi avaliada qualitativamente por meio de espectroscopia de dicroísmo circular em UV distante. O primeiro espectro obtido, com varredura na faixa 190 a 260 nm pode ser visualizado na Figura 11.

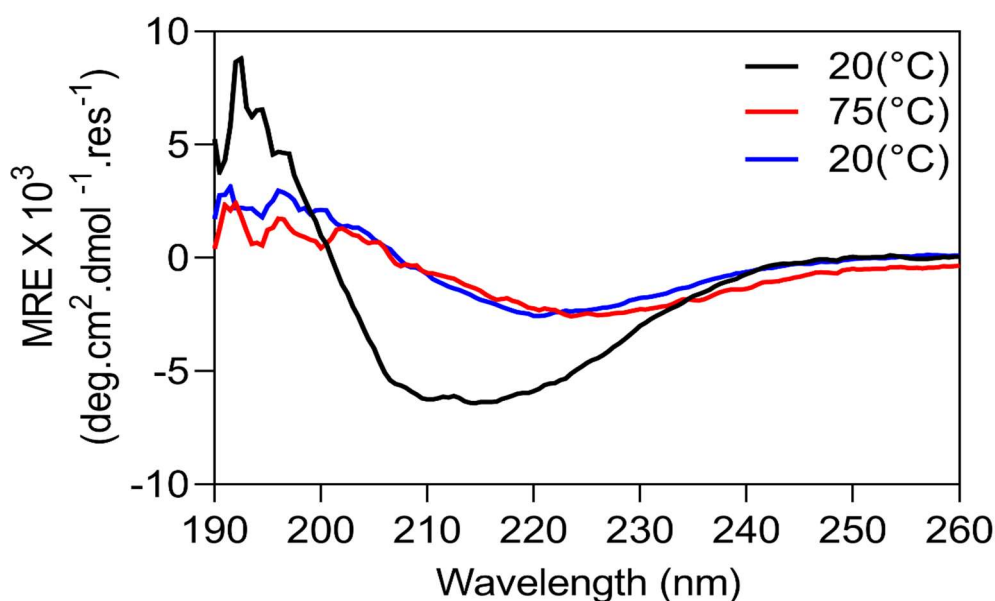


Figura 11 – Espectro de dicroísmo circular da $\Delta 19TfNCS$, Amostra de $70 \mu M$ da enzima em tampão HEPES 50 mM, NaCl 100 mM pH 7,0 em cubeta 0,01 cm de caminho óptico. Equipamento: Espectrômetro de DC modelo J-815. Curva em Preto-Primeira varredura a $20^\circ C$; Curva em vermelho-Varredura a $75^\circ C$; Curva em azul-Segunda varredura a $20^\circ C$.

A primeira varredura a uma temperatura de 20 °C (curva em preto) apresenta um padrão característico que indica que a proteína $\Delta 19TfNCS$ está com sua estrutura secundária conservada e formada por uma composição de hélices α e fitas β . Este padrão de espectro também foi observado por Berkner *et al.* (2008) que trabalhou com a $\Delta 19TfNCS$. Segundo Berkner *et al.* (2008), a presença de um mínimo largo na região de 215 nm, também observado no espectro da Figura 12, indica a presença de fitas β . No mesmo trabalho, é reportado o uso de um algoritmo, denominado CDSSTR, capaz de estimar a distribuição de padrões na estrutura secundária através da comparação com dados de outras proteínas. Na ocasião, verificou-se que 27% da $\Delta 29NCS$ era composta por α -hélices e 25% por fitas β (BERKNER *et al.*, 2008).

Ao elevar a temperatura para 75 °C (em vermelho), observa-se, pelo padrão da curva, uma perda de estrutura secundária da proteína, indicando um desenovelamento por desnaturação térmica. Por fim, ao retornar a temperatura de 20 °C, curva azul, percebe-se que a proteína se mantém desenovelada, indicando um processo de desnaturação irreversível. Esta observação contrasta com o trabalho de Berkner *et al.* (2008), em que a $\Delta 29NCS$ sofreu uma perda de estrutura ao ser aquecida a 95 °C e, ao ser resfriada à 20 °C foi observado uma curva semelhante a curva da primeira varredura à 20 °C, o que poderia indicar um ganho de estrutura secundária no processo de resfriamento (BERKNER *et al.*, 2008).

No trabalho de Berkner *et al.* (2008), é utilizada uma metodologia que envolve a clivagem da cauda de histidina da $\Delta 19TfNCS$ usando a protease trombina, diferentemente do que foi feito no presente trabalho. Esta clivagem pode ter conferido maior estabilidade a enzima, o que poderia ter resultado na reversibilidade do desenovelamento observada pelos autores (BERKNER *et al.*, 2007; BERKNER *et al.*, 2008). Outra diferença importante é a presença de concentrações maiores de NaCl, o que também pode contribuir para a maior reversibilidade do processo de desnaturação térmica.

Posteriormente a amostra foi analisada em uma faixa de temperatura entre 25 °C e 75 °C, conforme descrito na parte experimental. A curva resultante é exibida na Figura 12.

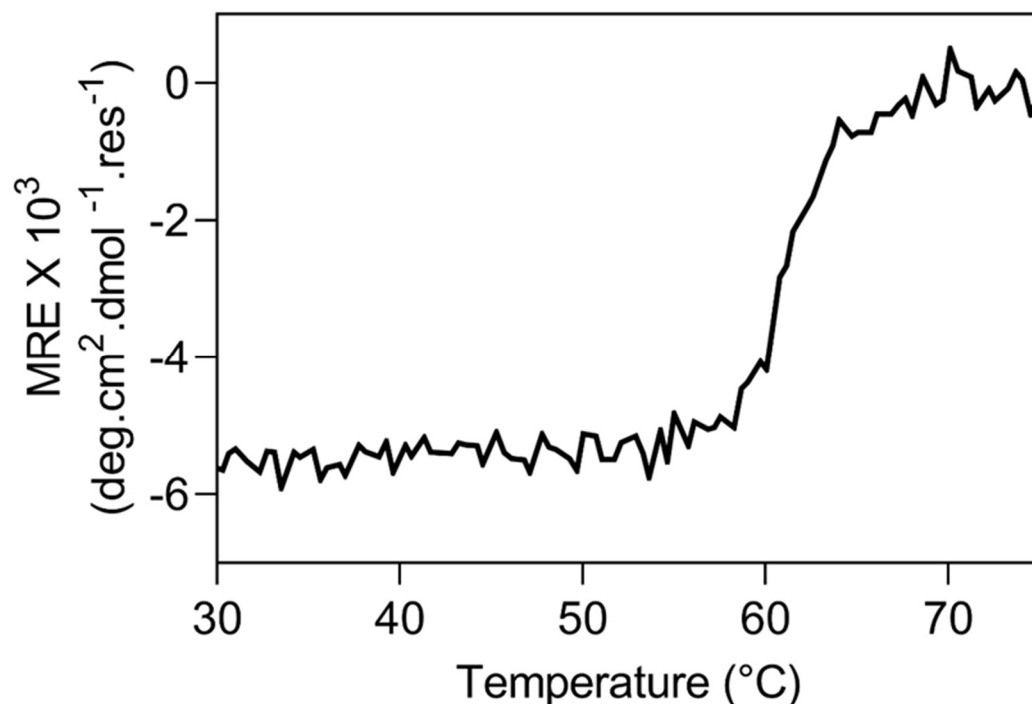


Figura 12 – Resistência térmica da $\Delta 19TfNCS$. Amostra de 70 μM da enzima em tampão HEPES 50 mM, NaCl 100 mM pH 7,0 em cubeta 0,01 cm de caminho óptico. Equipamento: Espectrômetro de DC modelo J-815. Foi construída rampa de temperatura selecionando o comprimento de onda (λ) 208 nm.

Através da curva acima, é possível observar que, em uma faixa de temperatura entre 55 °C e 60 °C a proteína inicia o processo de desnaturação. Isso pode ser observado pela redução na distorção da luz plano polarizada no comprimento de onda (λ) 208 nm, indicando uma redução de estruturas α -hélice, presentes na $\Delta 19TfNCS$, e consequentemente uma perda da estrutura secundária da proteína (GREENFIELD, 2007a; GREENFIELD, 2007b).

Outra observação é que o ponto de fusão estrutural, em que 50% da proteína perde a estrutura secundária, é de aproximadamente 62 °C, próximo ao valor encontrado por Berkner *et al.* (2008), 66 °C.

4.3 Seleção inicial de matrizes

Antes de realizar o processo de imobilização da enzima $\Delta 19TfNCS$, algumas matrizes foram avaliadas e as que se mostraram inertes em relação à reação entre dopamina e hexanal foram selecionadas para as etapas posteriores, conforme descrito na parte experimental. As amostras resultantes deste processo foram avaliadas por espectroscopia de RMN e as amostras em questão estão listadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Amostras de matrizes.

Nº	Amostra
1	Sílica gel sem NCS
2	Dowex 1X8 sem NCS
3	Dowex 50WX8 sem NCS
4	Dowex 50WX4 sem NCS
5	Caolin sem NCS
6	Diaion HP-2MG sem NCS
7	<i>Tj</i> NCS livre
8	Controle

4.3.1 Espectros de RMN dos reagentes

Com o intuito de averiguar a integridade química dos reagentes utilizados, em especial da dopamina e do aldeído hexanal, e de assinalar os sinais de RMN dos hidrogênios desses compostos, os espectros de RMN desses reagentes, foram adquiridos na mesma solução utilizada nos ensaios catalíticos. Primeiramente é apresentado o espectro da dopamina Figura 13.

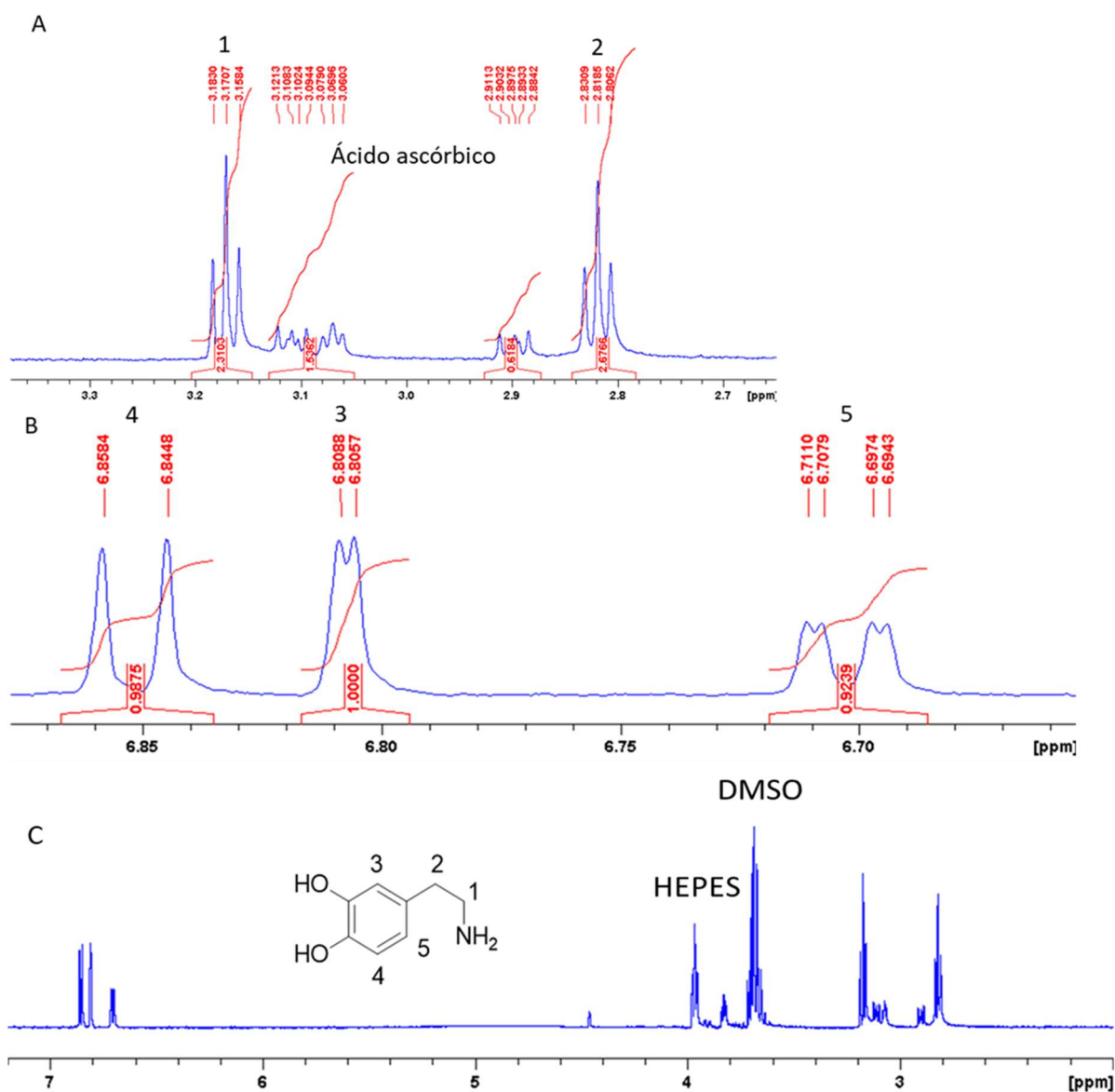


Figura 13 – Espectro de RMN de ^1H da amostra de dopamina. 2.5 mM de dopamina em tampão fosfato 1 M, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico e 10% v/v de D_2O . O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Quadro A - região dos hidrogênios 1 e 2 ampliada; Quadro B – região dos hidrogênios 3, 4 e 5 ampliada. Quadro C – Espectro completo.

No espectro acima, os sinais de hidrogênios ligados ao anel aromático (3, 4 e 5) estão à esquerda, com maior deslocamento químico, enquanto os sinais dos hidrogênios 1 e 2 encontram-se à direita, com menor deslocamento químico. A partir da Figura 14 é possível observar que os sinais 3 (6,8516 ppm) e 4 (6,8073 ppm) se tratam de dupletos, o que ocorre devido ao acoplamento escalar (J) entre estes hidrogênios e o hidrogênio 5 (6,7024 ppm).

O acoplamento escalar entre o hidrogênio 4 e 5 ($J^{4-5}=8,12$ Hz) ocorre devido à proximidade entre esses hidrogênios, ou seja, 3 ligações químicas, tratando-se de um acoplamento do tipo *orto*. Por outro lado, os hidrogênios 3 e 5 se situam a 4 ligações químicas de distância entre si (posição *para* no anel aromático) e por isso, o acoplamento escalar entre eles é menor ($J^{3-5}=1,89$ Hz). Por fim, o sinal do hidrogênio 5 desdobra-se em um duplete duplo devido aos dois acoplamentos com os hidrogênios 3 (J^{3-5}) e 4 (J^{4-5}). Os padrões de sinais, os valores de deslocamentos químicos e de acoplamento escalar estão de acordo com a estrutura química da dopamina e com valores encontrados na literatura (BISAGLIA; MAMMI; BUBACCO, 2007).

Os sinais referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 1 (3,1707 ppm) e 2 (2,8185 ppm) desdobram-se em tripletos devido ao acoplamento escalar ($J^{1-2}=7,62$ Hz) que ocorre entre estes hidrogênios, tendo em vista que a cada um destes carbonos estão ligados dois hidrogênios. Os hidrogênios 1 estão menos blindados por conta do efeito indutivo exercido pelo grupo NH_2 da dopamina, o qual atrai maior densidade eletrônica para si, de forma que o deslocamento químico destes hidrogênios, é maior do que os hidrogênios 2, conforme mostra a Figura 13. Nesta figura também é possível identificar sinais relativos ao ácido ascórbico, DMSO e tampão HEPES, entretanto estes sinais não são pertinentes para o acompanhamento da reação química.

A Figura 14 mostra o espectro de RMN ^1H do hexanal.

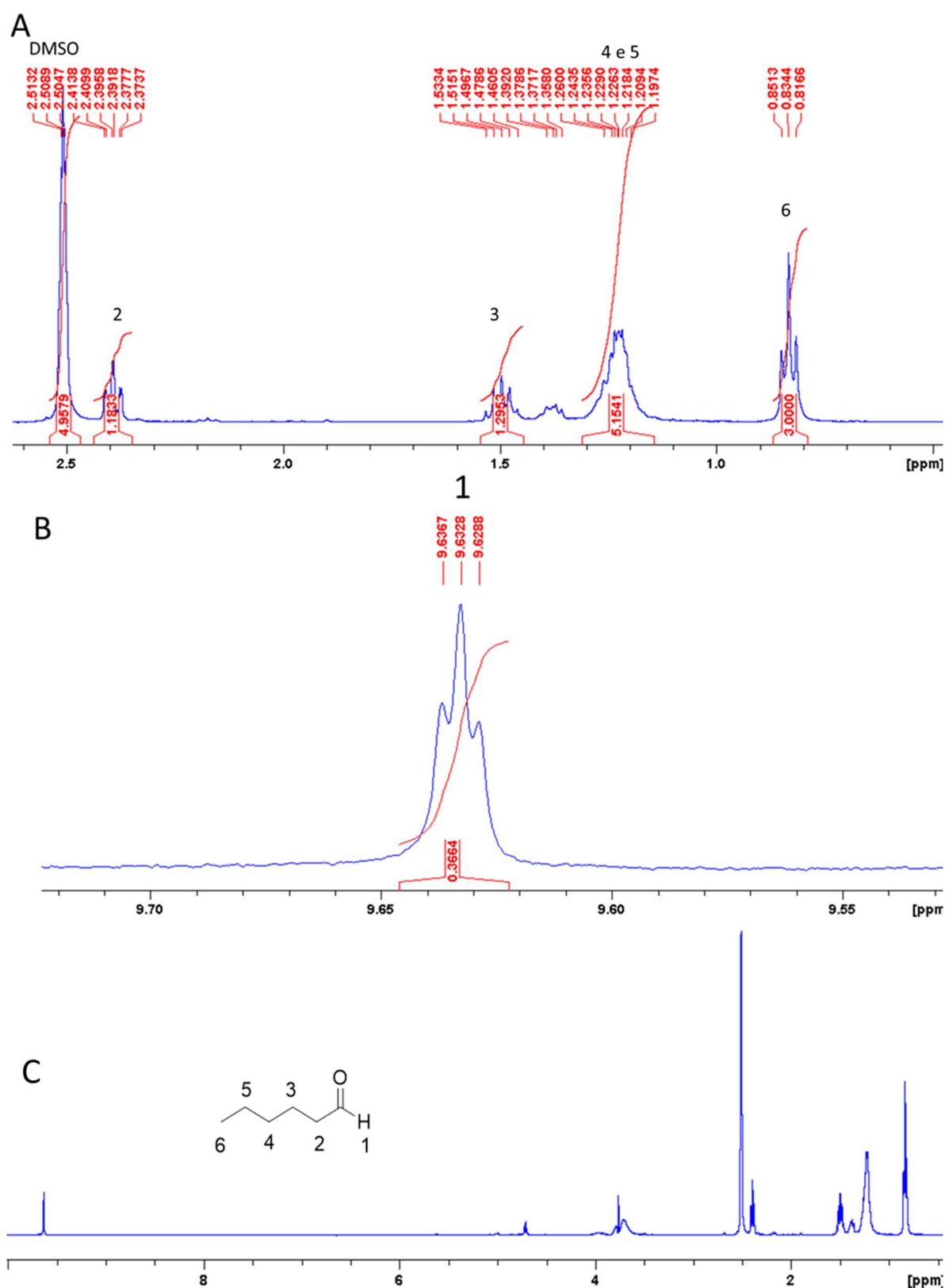


Figura 14 – Espectro de RMN ^1H da amostra de hexanal. 2,5 mM de hexanal em DMSO 90% v/v e 10% v/v de D_2O . O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Quadro A - região dos hidrogênios 2 à 6 ampliada; Quadro B – região do hidrogênio 1 ampliada. Quadro C – Espectro completo.

No espectro acima é possível observar uma série de sinais relativos ao hexanal. Os sinais com menor deslocamento químico referem-se aos hidrogênios presentes aos grupos funcionais $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$, enquanto o sinal com alto valor de deslocamento químico corresponde ao hidrogênio do grupo formil.

O valor elevado de deslocamento químico (9,6328 ppm) do hidrogênio carbonílico, reflete o ambiente químico em que este hidrogênio se encontra em que, a eletronegatividade do átomo de carbono do grupo carbonílico, resulta em uma menor densidade eletrônica no hidrogênio 1, tornando-o consideravelmente desblindado. O sinal se desdobra em um tripleto devido ao acoplamento escalar ($J^{1-2}=1,59$ Hz) entre este hidrogênio e os dois hidrogênios ligados ao carbono 2.

Percebe-se pelo espectro que, quanto mais próximo os hidrogênios estão da carbonila, maior é o deslocamento químico de seus respectivos sinais. Neste sentido, dos hidrogênios do carbono 2 aos hidrogênios do carbono 6, observa-se um decrescimento nos valores de deslocamento químico, com destaque para os sinais dos hidrogênios 5 e 4 que se sobrepõem no espectro por conta da semelhança entre os ambientes químicos destes dois hidrogênios.

Quanto aos desdobramentos dos sinais, os hidrogênios 6 se desdobram em um tripleto por conta do acoplamento J_3 com os dois hidrogênios 5. Os sinais dos hidrogênios 5 e 4 por sua vez, se desdobram em sexteto e quinteto respectivamente, entretanto, por conta da sobreposição destes sinais, não é possível identificar isso no espectro. Os hidrogênios 3 se desdobram em quinteto, por se acoplarem com 4 hidrogênios via J_3 e, por fim, o sinal dos hidrogênios 2 se desdobra em um tripleto duplo, como pode ser visto na Figura 15, devido ao acoplamento com o hidrogênio 1 e com os dois hidrogênios ligados ao carbono 3.

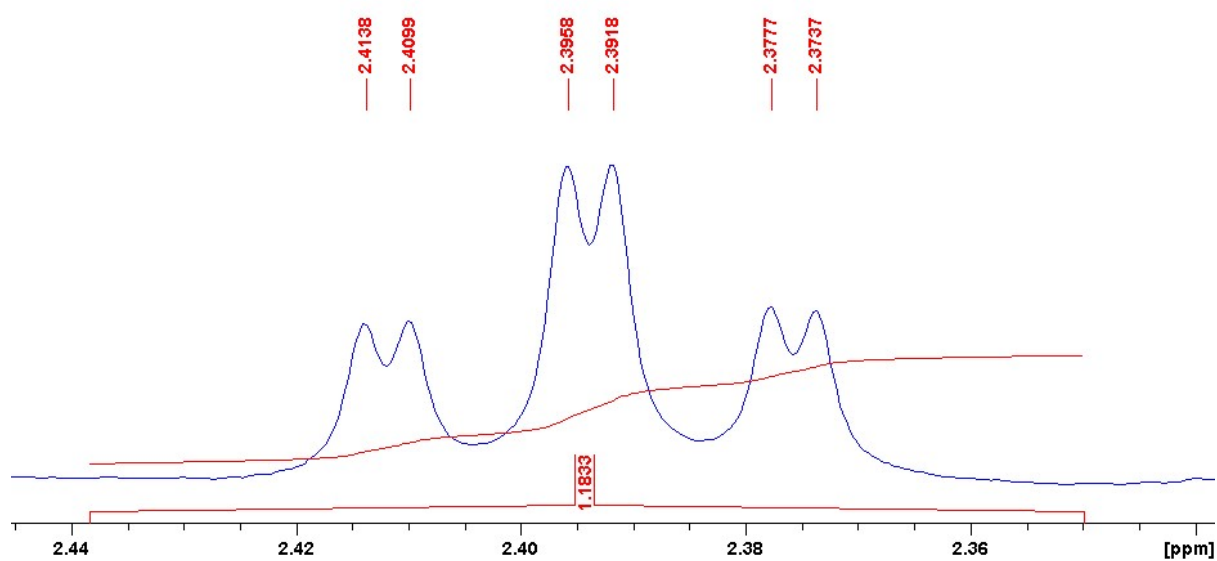


Figura 15—Hidrogênios 2 do hexanal. Espectro de RMN de ^1H de 2.5 mM de hexanal em DMSO 90% v/v e 10% v/v de D_2O ampliado na região de deslocamento químico dos hidrogênios 2 do hexanal. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp.

4.3.2 Espectros de RMN da amostra controle e $\Delta 19TfNCS$ livre

A Figura 16 mostra o espectro de RMN 1H da amostra controle ampliado na região dos sinais pertinentes para acompanhamento da reação, ou seja, os hidrogênios 3, 4 e 5 da dopamina e o hidrogênio 1 do hexanal como já foi discutido.

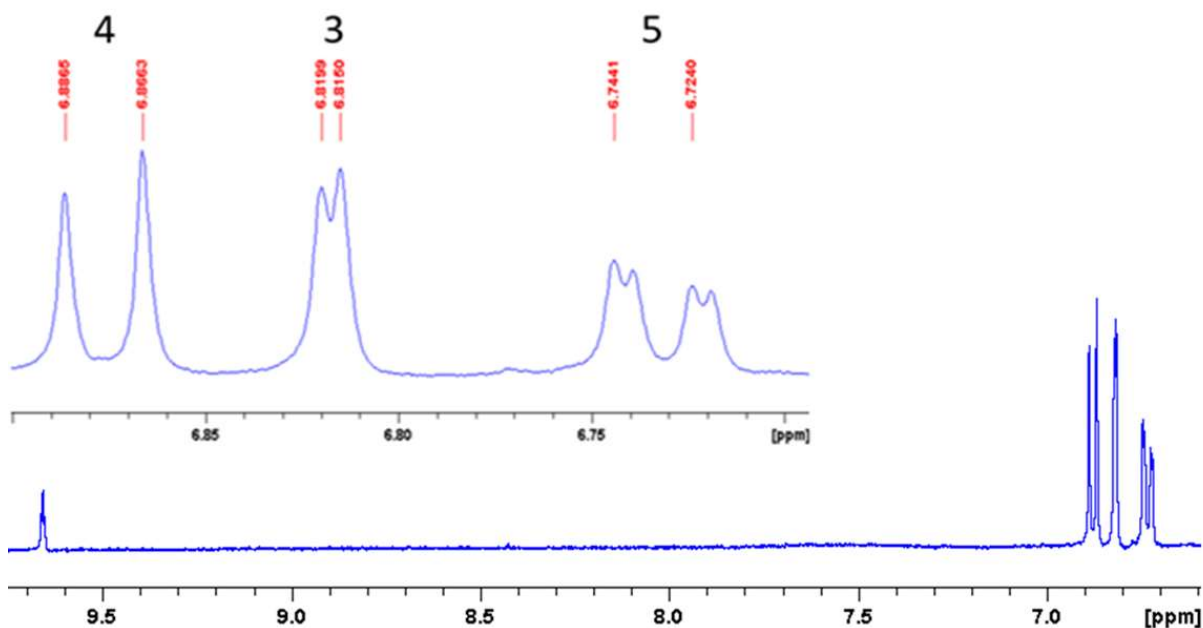


Figura 16 – Sinais dos reagentes na amostra controle. Espectro de RMN de 1H de 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico 10% v/v de D_2O . O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Quadro de baixo - mostra a região ampliada dos sinais dos hidrogênios 3, 4 e 5 da dopamina, assim como o hidrogênio 1 do hexanal. Quadro de cima - região ampliada dos sinais dos hidrogênios 3, 4 e 5 da dopamina.

A amostra controle (amostra 8), por conter apenas os reagentes em tampão HEPES, que não catalisa a reação, apresenta em seu espectro de RMN apenas os sinais dos dois reagentes ao mesmo tempo, uma vez que não ocorreu reação nesta amostra. Portanto, através do espectro acima, é possível identificar os sinais da dopamina e hexanal inalterados em relação aos espectros de cada um dos reagentes isolados, conforme esperado, confirmando que praticamente não ocorre reação quando os reagentes estão em tampão HEPES, pelo período de 2 horas, sem qualquer catalisador presente no meio.

O espectro de RMN 1H da amostra de $\Delta 19TfNCS$ livre apresentou o surgimento de dois novos sinais, indicando que a reação de fato foi catalisada pela enzima. Este espectro e da tetraidroisoquinolina resultante estão apresentados na Figura 17.

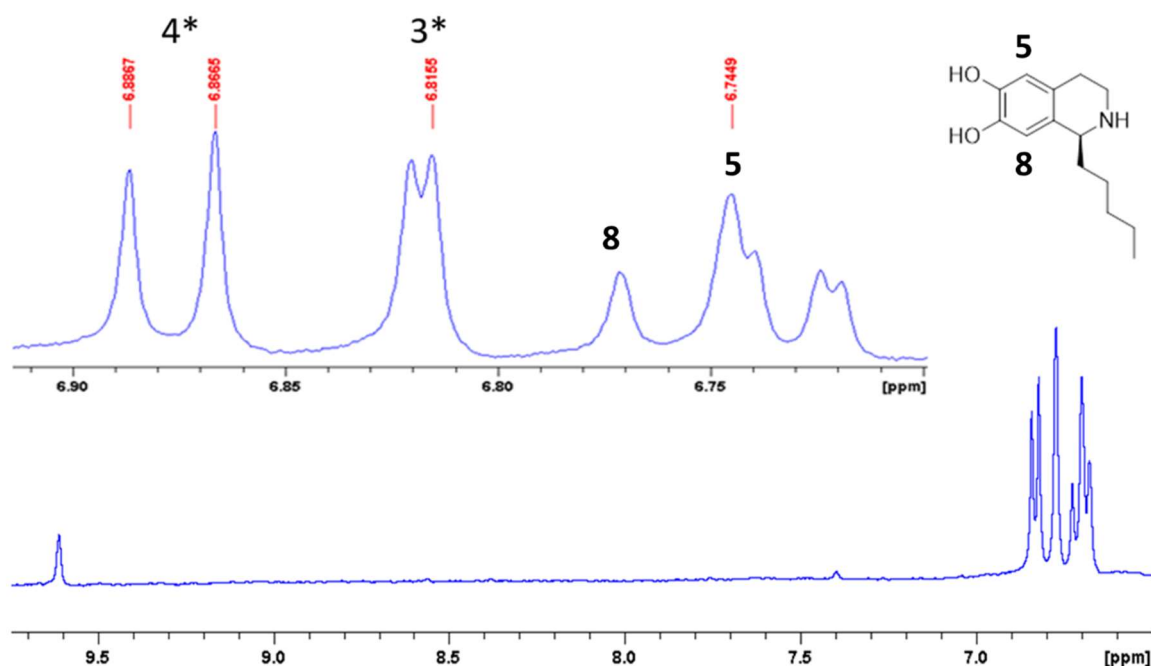


Figura 17 – Espectro de RMN ^1H da amostra contendo $\Delta 19\text{T}/\text{NCS}$ livre. Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal, na presença da $\Delta 19\text{T}/\text{NCS}$, em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico e 10% v/v de D_2O . O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Quadro de baixo - mostra a região ampliada dos sinais dos hidrogênios 3, 4 e 5 da dopamina, assim como o hidrogênio 1 do hexanal e do produto 1-pentil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina-6,7-diol. Quadro de cima - região ampliada dos sinais dos hidrogênios 3, 4 e 5 da dopamina e hidrogênios 5 e 8 do produto 1-pentil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina-6,7-diol.

No espectro acima é possível identificar os novos sinais relativos à formação do produto de reação entre dopamina e hexanal, o 1-pentil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina-6,7-diol. Os sinais 4* e 3* fazem referência aos hidrogênios do anel aromático da dopamina como já foi discutido, enquanto os sinais 5 e 8 estão relacionados aos hidrogênios 5 e 8 no produto. Os novos picos são singletos, sendo que o sinal do hidrogênio 5 do produto se sobrepõe ao sinal do hidrogênio 5 da dopamina residual.

No processo de ciclização que resulta na formação da tetraidroisoquinolina correspondente a reação entre dopamina e hexanal, o hidrogênio 5 desaparece para formação da ligação química, enquanto os sinais dos hidrogênios 5 e 8 do produto, correspondentes aos hidrogênios 3 e 4 da dopamina, sofrem mudança pela substituição do hidrogênio 5 do reagente pelo grupo alquila do produto. Por isso, esses três sinais são relevantes para o acompanhamento da reação química. Os sinais dos hidrogênios 1 e 2 da dopamina, ao contrário dos hidrogênios 3, 4 e 5, não são pertinentes para acompanhamento da reação, tendo em vista que estes sinais não sofrem mudanças significativas no espectro do produto.

A primeira informação que pode ser extraída do espectro acima é que a reação de fato ocorreu em pequena quantidade. Os sinais do produto são singletos pelo fato de não haver mais acoplamento J^3 entre os hidrogênios 4 e 5 da dopamina, nem J^4 entre 3 e 5 da dopamina, pois o hidrogênio 5 não está mais presente no produto (Figura 17). Estes resultados estão de acordo com dados da literatura para essa mesma tetraidroisoquinolina (LICHMAN *et al.*, 2015).

A segunda informação é que a reação foi incompleta no período de 2 h, 37 °C e 5 μ M de dopamina, tendo em vista que ainda há dopamina e hexanal. Por fim, a partir deste resultado, definiu-se que o sinal do hidrogênio 8 no produto seria usado para quantificação do produto na etapa de avaliação dos biocatalisadores, uma vez que este sinal não sofre sobreposição como o do hidrogênio 5 do produto.

4.3.3 Espectros de RMN das matrizes

Das matrizes avaliadas conforme o protocolo do item 3.5, apenas 3 se mostraram inapropriadas para as etapas posteriores, portanto, apenas os espectros destas matrizes serão apresentados, enquanto os demais podem ser consultados no Anexo 2. A primeira matriz descartada foi a Sílica gel, para a qual é possível observar o desaparecimento completo do sinal do hidrogênio do grupo formila do hexanal no espectro (expandido na região entre 6,8 ppm e 10,8 ppm) quando comparado ao espectro da amostra controle (Figura 18), o que inviabiliza o uso dessa matriz para imobilização da $\Delta 19T/NCS$.

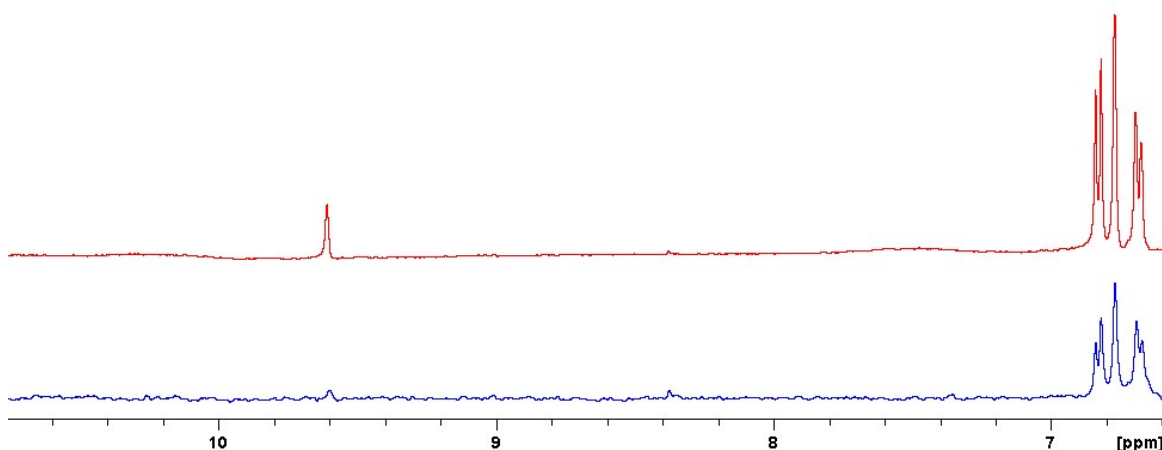


Figura 18 – Espectro de RMN 1H da mostra do meio reacional com sílica gel comparada ao controle. Espectro de RMN de 1H (na região entre 6,8 ppm e 10,8 ppm) obtido de amostra de reação entre 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal, na presença da matriz Sílica gel sem $\Delta 19T/NCS$, em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico 10% v/v de D_2O . O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Curva em vermelho - Espectro da amostra controle; Curva em azul - Espectro da do meio reacional na presença de sílica gel.

É notável o desaparecimento total do sinal do hexanal, conforme já mencionado. Ademais, foi identificada uma alteração significativa da coloração da sílica após a reação Figura 19, o que indica a possibilidade de que a matriz não seja inerte no meio, entretanto, seriam necessários estudos posteriores para identificar a causa exata desta propriedade.



Figura 19 – Amostras de Sílica gel. Sílica antes da reação química (esquerda); Sílica gel depois da reação química (direita). Reação entre dopamina (2,5 mM), hexanal (2,5 mM) em tampão HEPES (50 mM pH 7,0) e ácido ascórbico (5 mM).

As outras duas matrizes descartadas foram a Dowex 50WX8 e Dowex 50WX4 que apresentaram resultados muito parecidos. Na Figura 20 é possível identificar o espectro da amostra Dowex 50WX8 (amostra 3) comparada à amostra controle. O espectro da amostra Dowex 50WX4 não será exibido por ser muito semelhante ao da amostra Dowex 50WX8.

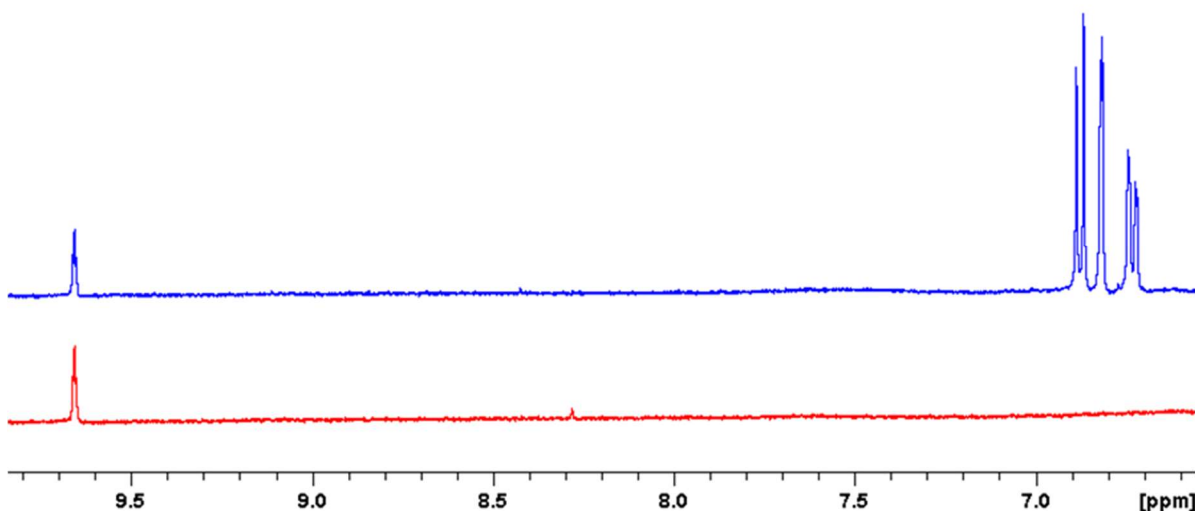


Figura 20 – Espectro de RMN ^1H da amostra do meio reacional Dowex 50WX8 adicionada comparada ao controle. Espectro de RMN de ^1H (na região entre 6,6 ppm e 9,8 ppm) obtido de amostra de reação entre 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal, na presença da matriz Dowex 50WX8 sem $\Delta 19\text{TfNCS}$, em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico 10% v/v de D_2O . O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Curva em vermelho-Espectro da amostra controle; Curva em azul-Espectro da amostra de Dowex 50WX8.

A partir deste espectro é possível observar o desaparecimento completo de todos os sinais referentes à dopamina indicando a possibilidade de adsorção deste reagente por parte das resinas catiônicas de poliestireno e polidivinilbenzeno (Quadro 2). A possibilidade de adsorção da dopamina por parte destas resinas pode ser corroborada por um trabalho em que a resina Dowex 50WX4, que é muito semelhante à Dowex 50WX8, foi usada para adsorver dopamina em um processo de cromatografia (BETHEA; RØENNEKLEIV; KOZAK, 1987).

Por fim, esta etapa permitiu selecionar as matrizes mais apropriadas para as próximas etapas. As três matrizes descartadas foram sílica gel, Dowex 50WX8 e Dowex 50WX4 por interferirem significativamente no meio reacional, uma característica inapropriada para matrizes aplicadas a produção de biocatalisadores eficientes a partir de técnicas de imobilização de enzimas. Ademais, os resultados e discussão relativos aos sinais de reagentes e produtos serão úteis para discussão da etapa de avaliação dos biocatalisadores, entretanto, vale ressaltar que nenhuma das amostras sem $\Delta 19TfNCS$ catalisou a reação de Pictet-Spengler, indicando que nas condições de reação usadas no presente trabalho, nenhuma matriz catalisa essa reação na ausência da enzima.

4.4 Avaliação do rendimento de imobilização das matrizes

As matrizes selecionadas na fase anterior foram avaliadas quanto ao rendimento de imobilização da enzima $\Delta 19TfNCS$, conforme mencionado na parte experimental. O resultado pode ser visualizado no gráfico a seguir (Figura 21).

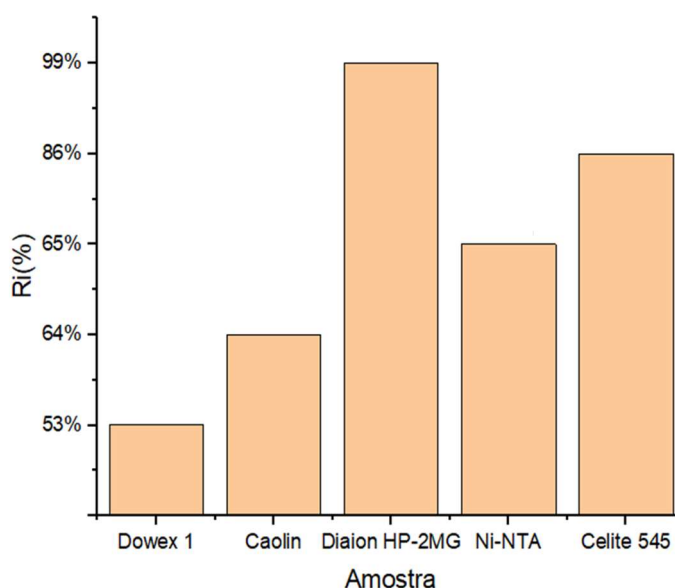


Figura 21 – Rendimento de imobilização da enzima $\Delta 19TfNCS$ nas amostras de matrizes. Protocolo de imobilização: 248 μL de solução estoque $\Delta 19TfNCS$ ($0,95 \text{ mg.mL}^{-1}$) adicionada às matrizes por 1 h, a temperatura de 25°C e sob agitação.

De todas as matrizes, a Diaion HP-2MG foi a que apresentou maior rendimento de imobilização, seguida da Celite 545, Ni-NTA, Caolin e, por último a Dowex 1 (Dowex 1X8). O Diaion HP-2MG é um adsorvente, constituído de polimetacrilato que, por possuir grupos ésteres. Por possuir um tamanho médio de poros de 170 Å, o Diaion HP-2MG permite a difusão de moléculas maiores, como a enzima $\Delta 19TfNCS$, para o interior de seus poros, uma característica favorável para o processo de adsorção e, conseqüentemente, imobilização de proteínas, como de fato pode ser observado pelo elevado valor de rendimento de imobilização da $\Delta 19TfNCS$ (99%).

Esta matriz já foi empregada na adsorção de enzimas e até mesmo de células inteiras. Um exemplo interessante pode ser observado no trabalho envolvendo a imobilização de células de *E. coli* contendo a enzima (*S*)-NCS realizado por Lechner *et al.* (2018) (LECHNER *et al.*, 2018b). Nesse estudo, a matriz Diaion HP-2MG foi adicionada ao meio de crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) durante a indução com IPTG, visando a formação de um biofilme, na superfície da matriz, constituído pelas células com (*S*)-NCS em seu interior. Neste trabalho não foram informados valores de rendimento de imobilização, entretanto, a discussão relativa à performance desse biocatalisador em relação à reação catalisada pela (*S*)-NCS será retomada na próxima seção.

4.5 Avaliação dos biocatalisadores

4.5.1 Primeira reação (37 °C)

A partir dos dados de RMN, foi possível avaliar o desempenho de cada um dos biocatalisadores nas condições mencionadas na parte experimental. Tendo em vista o grande número de espectros obtidos, estes serão apresentados no Anexo 2, entretanto, os parâmetros calculados a partir destes espectros serão apresentados. A começar pela concentração de dopamina em cada amostra (Tabela 10), calculada a partir do sinal do hidrogênio 3 nos respectivos espectros, e a concentração do produto em cada amostra da primeira reação a 37 °C (Tabela 11).

Tabela 10 – Concentração da dopamina das amostras da primeira reação (37 °C)

Amostra	Intensidade relativa de H3 da dopamina	Concentração de dopamina (mM)
Ni-NTA sem NCS	4,2348	0,59
Celite 545 sem NCS	10,1378	1,41
Dowex 1 com NCS	8,2303	1,14
Caolin com NCS	3,8476	0,54
Diaion HP-2MG com NCS	8,3517	1,16
NCS livre	5,0814	0,71
Controle	13,6917	1,90
Ni-NTA com NCS	5,5274	0,77
Celite 545 com NCS	5,6224	0,78
Dopamina	18,7319	2,6

Tabela 11 – Concentração do produto das amostras da primeira reação (37 °C)

Amostra	Intensidade relativa de H 8 do produto	Concentração produto (mM)
Ni-NTA sem NCS	1,8282	0,25
Celite 545 sem NCS	10,1780	1,42
Dowex 1 com NCS	4,4005	0,61
Caolin com NCS	6,2651	0,87
Diaion HP-2MG com NCS	2,1745	0,30
NCS livre	13,6358	1,90
Controle	4,4079	0,61
Ni-NTA com NCS	9,1028	1,27
Celite 545 com NCS	10,0172	1,39

Ao comparar os dados de concentração nas tabelas, é possível observar que a soma das concentrações de produto e reagente diferem de amostra para amostra. Portanto, foi construída uma tabela contendo a soma das concentrações de dopamina e produto em cada amostra visando estimar a quantidade de dopamina inicial disponível em cada amostra. Caso não haja adsorção

de dopamina ou produto por parte das matrizes é esperado que a soma em todos os casos seja igual pois a concentração.

de dopamina inicial em cada amostra, antes da reação, é igual (2,5 mM). Entretanto, alguns fatores como adsorção ou ocorrência de reações paralelas podem influenciar nos valores observados, no sentido de diminuir a concentração de dopamina e produto no meio. Além disso, erros associados à pipetagem ao longo do experimento, especialmente à pipetagem do padrão DSS, que envolveu um volume muito pequeno (1,5 µL), podem exercer influência sobre os valores observados.

Tabela 12 – Soma das concentrações de dopamina e produto nas amostras da primeira reação (37 °C)

Amostra	Soma das concentrações de dopamina e produto (mM)
Ni-NTA sem NCS	0,84
Celite 545 sem NCS	2,82
Dowex 1 com NCS	1,76
Caolin com NCS	1,41
Diaion HP-2MG com NCS	1,46
NCS livre	2,60
Controle	2,52
Ni-NTA com NCS	2,03
Celite 545 com NCS	2,17
Dopamina	2,60

A partir da tabela acima é possível observar que em algumas amostras, como a Ni-NTA sem $\Delta 19TfNCS$, por exemplo, a quantidade da soma da dopamina com o produto formado é bem inferior ao valor observado na amostra controle da dopamina (2,6 mM), o que poderia indicar adsorção do substrato, do produto, ou de ambos compostos. A possibilidade destes valores terem sido influenciados por conta de reações laterais é pequena, tendo em vista que não foi constatada formação considerável de produtos paralelos a partir da análise dos espectros de RMN 1H de cada amostra (Anexo 2).

Outra observação relevante a respeito da Tabela 11, é a formação de produto na amostra controle, inferior ao observado para amostra de $\Delta 19TfNCS$ não imobilizada. Não se esperava a

formação de produto na amostra controle tendo em vista a ausência de enzima ou qualquer outro componente que poderia catalisar a reação, tendo em vista a utilização de tampão HEPES nessa amostra (LICHMAN *et al.*, 2015), além de que não se observou a formação de produto em uma primeira amostra controle, cujo espectro de RMN ^1H pode ser observado na Figura 16, o que confirma que, nas condições de reação utilizadas, a reação não ocorre na ausência de $\Delta 19\text{TfNCS}$. É possível que isso tenha ocorrido devido ao longo tempo de estocagem das amostras desde que foram obtidas até a análise por RMN (aproximadamente 1 mês), além do mal funcionamento do freezer em que foram estocadas, pois observou-se que estavam descongeladas no dia da análise, problemas causados pela pandemia de Covid-19. A partir dessa observação, pode-se esperar que em todas as amostras tenha ocorrido formação de produto de forma não enzimática, durante a estocagem. Entretanto, é difícil determinar a proporção em que isso ocorreu para as amostras das matrizes por conta da adsorção de produto e reagentes, além de não terem sido encontrados na literatura, dados cinéticos relativos à reação, não catalisada, entre a dopamina e hexanal em tampão HEPES, que poderiam viabilizar uma melhor compreensão dos resultados obtidos no presente trabalho.

Das amostras de matrizes sem $\Delta 19\text{TfNCS}$, apenas a Ni-NTA adsorveu dopamina e possivelmente, parte do produto que tenha sido formado, enquanto a amostra de Celite 545 não adsorveu como pode ser observado pela Tabela 12, que é uma característica desejável para suportes sólidos aplicados à imobilização de enzimas. É possível que a dopamina tenha se complexado ao Ni^{2+} por conta dos oxigênios do anel catecol, uma hipótese corroborada por dados da literatura (PORTER; ARREGUIN; CORTLANDT, 2010). Porter *et.al.* (2010) relatou a complexação do catecol ao íon Fe^{3+} presente na superfície de uma matriz semelhante a Ni-NTA, sugerindo que esse fenômeno de fato poderia ocorrer com o Ni^{2+} em relação à dopamina e ao próprio produto que conserva o anel catecol em sua estrutura.

Por outro lado, é importante considerar a redução na adsorção indesejada de produto e reagentes por parte da amostra Ni-NTA com $\Delta 19\text{TfNCS}$, para a qual a concentração de dopamina inicial disponível é bem superior à da amostra desta mesma matriz sem $\Delta 19\text{TfNCS}$. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de a imobilização da $\Delta 19\text{TfNCS}$ ter reduzido o número de sítos contendo Ni^{2+} livre na matriz, por conta da complexação com a HisTag da enzima, consequentemente reduzindo a quantidade de dopamina e produto que poderia se complexar ao Ni^{2+} presente nesses sítos ativos. Entretanto, a possibilidade de adsorção não é completamente anulada, uma vez que, por conta de diversos fatores, nem todos os sítos ativos

são necessariamente ocupados pela enzima, sendo um deles a própria possibilidade de lixiviação de $\Delta 19TfNCS$ durante as lavagens e reação.

As matrizes Dowex 1X8, Diaion HP-2MG e Caolin com $\Delta 19TfNCS$ também apresentaram concentrações de dopamina inicial inferior ao esperado, inclusive menor do que a Ni-NTA com $\Delta 19TfNCS$ indicando que tais matrizes também podem ter adsorvido dopamina e a tetraidroisoquinolina resultante da reação. Essa característica é desfavorável a aplicação destas matrizes na reação de Pictet-Spengler envolvendo dopamina e qualquer aldeído ou cetona.

Ademais, é importante considerar que, apesar de na Tabela 12 alguns valores de concentração serem superiores a 2,5 mM, que é a concentração de dopamina planejada para os experimentos, tais valores podem ser considerados aceitáveis por conta da faixa de erro relativa ao experimento. Além disso, a partir destes experimentos e seus respectivos resultados, percebeu-se a necessidade de aprimoramento na metodologia empregada, visando minimizar erros principalmente durante a preparação das soluções reacionais.

Além da concentração de produto fornecido por cada biocatalisador, que indica a eficiência destes em fornecer o composto de interesse, um parâmetro importante na avaliação do desempenho dos biocatalisadores é o rendimento de reação a partir da concentração inicial de dopamina disponível (Tabela 12), considerando a quantidade de reagentes livres no meio, ou seja, que não tenham sido adsorvidos. Nesse caso, esse parâmetro atesta a eficiência do biocatalisador desconsiderando o fenômeno de adsorção. A tabela 13 fornece os valores de rendimento obtidos para cada amostra, calculados a partir da Eq. 5.

Tabela 13 – Rendimento da reação (37 °C)

Amostra	Rendimento de reação
Dowex 1 com NCS	35%
Caolin com NCS	62%
Diaion HP-2MG com NCS	21%
NCS livre	73%
Controle	24%
Ni-NTA com NCS	62%
Celite 545 com NCS	64%

Conforme esperado, a amostra que forneceu maior rendimento foi a da $\Delta 19TfNCS$ livre por dois motivos. Primeiramente, é comum que a atividade enzimática caia com a imobilização da enzima, entretanto isso precisa ser compensado por um aumento de estabilidade, facilidade de reuso, entre outros benefícios, para que a estratégia de imobilização se torne interessante em contraste ao uso da enzima livre (GUISAN *et al.*, 2020). Em segundo lugar, o rendimento de imobilização não foi de 100% e nem próximo a isso para a maioria das matrizes (Figura 23), com exceção da Diaion HP-2MG, cujo rendimento de imobilização foi de 99%, consequentemente, a quantidade de enzima presente no meio reacional destas amostras é inferior ao da $\Delta 19TfNCS$ livre.

Ao comparar o rendimento de reação das amostras de matrizes com $\Delta 19TfNCS$ com os valores de rendimento de imobilização destas mesmas matrizes (Tabela 14), é possível estabelecer, para a maioria dos casos, uma relação direta entre rendimento de imobilização e rendimento de reação, no sentido de que quanto maior é o rendimento de imobilização maior é o rendimento da reação, o que sugere que nestes casos, a eficiência do biocatalizador (enzima imobilizada) está majoritariamente ligada a sua capacidade de imobilizar a enzima $\Delta 19TfNCS$. Entretanto, uma exceção é a amostra Diaion HP2-MG que, apesar de ser a matriz com a maior capacidade de imobilização da enzima, foi a que apresentou o rendimento de reação mais baixo.

É possível que isso esteja relacionado a inativação da enzima que se liga a essa matriz, seja por desenovelamento da proteína por conta do caráter hidrofóbico do material de que essa matriz é constituída, ou por conta da possibilidade da proteína se ligar a matriz com sua cavidade hidrofóbica (sítio ativo) voltada para a matriz (GUISAN *et al.*, 2020), diminuindo a acessibilidade ao sítio ativo por parte dos reagentes. Por fim, existe a possibilidade de alta lixiviação desta proteína ao longo das lavagens e reação.

Tabela 14 – Comparação dos valores de rendimento de imobilização e rendimento de reação

Amostra	Rendimento de reação	Rendimento de imobilização
Dowex 1 com NCS	35%	53%
Caolin com NCS	62%	64%
Diaion HP-2MG com NCS	21%	99%
Ni-NTA com NCS	62%	65%
Celite 545 com NCS	64%	86%

Vale destacar o trabalho de Lechner *et al.* (2018), em que a matriz Diaion HP-2MG foi usada, conforme já mencionado. Na ocasião, apesar de não ter sido determinado o rendimento de imobilização para qualquer matriz, os autores informam uma conversão de 20% e 30% de excesso enantiomérico para 30 min de reação entre dopamina e fenilacetaldéido em HEPES (50 mM pH 7,0), e 28% de conversão e 98% de excesso enantiomérico para 30 min da mesma reação em HEPES (50 mM pH 7,0) com 10% de metanol. Entretanto, estes dados não podem ser comparados aos do presente trabalho por envolverem imobilização de células inteiras.

Por outro lado, a matriz Ni-NTA (His-Select[®] Nickel-Affinity gel), comumente usada em purificação de proteínas por afinidade de HisTag à Ni²⁺, não havia sido encontrada na literatura quanto à aplicação em imobilização da $\Delta 19TfNCS$ para fins de biocatálise. Entretanto, matrizes semelhantes, às quais, variantes da enzima (S)-NCS se liga através da HisTag por afinidade, foram usadas por Lechner *et al.* (2018) para imobilização de (S)-NCS na forma livre. Estas matrizes e suas respectivas propriedades são listadas no Quadro 3.

Quadro 3 – Matrizes de afinidade a HisTag usadas por Lechner et al. (2018).

Matriz	Características
ABT High Density Nickel	Constituída de alginato, na forma de beads cobertos com Ni ²⁺
EziG1	Beads de vidro, com superfície hidrofílica, coberta com Fe ²⁺
EziG2	Beads de vidro, com superfície hidrofóbica, coberta com Fe ²⁺
EziG3	Beads de vidro, com superfície semi-hidrofílica, coberta com Fe ²⁺

Fonte - (LECHNER *et al.*, 2018b) modificado.

Das matrizes presentes no Quadro 3, a EziG3, de superfície semi-hidrofílica apresentou resultados melhores em termos de conversão (46%) e estereosseletividade (88% e.e), para as mesmas condições de reação da Diaion HP-2MG, seguida da EziG2, EziG1 e por último a ABT, sugerindo que a hidrofilicidade da superfície influencia no desempenho do biocatalizador resultante da imobilização da (S)-NCS.

Quanto às demais matrizes, não foram encontrados trabalhos na literatura envolvendo a imobilização da enzima $\Delta 19TfNCS$ a elas. Igualmente, os experimentos relatados na literatura (LECHNER *et al.*, 2018b) envolvendo a imobilização da *PbNCS* à Diaion HP-2MG, assim como a matrizes de afinidade (Quadro 3) diferem dos experimentos realizados no presente trabalho, tanto pelo uso de matrizes diferentes, como a Caolin e a Celite 545 por exemplo,

quanto ao uso de uma variante ($\Delta 19T/NCS$), diferente das usadas por Lechner *et al.* (2018), o que torna inéditas as observações aqui realizadas.

4.5.2 Reuso dos biocatalisadores (reação a 37 °C)

A reusabilidade de um biocatalisador oriundo de técnicas de imobilização de enzimas é uma característica extremamente importante. Por isso, a reusabilidade foi avaliada no presente trabalho por meio da comparação dos valores de rendimento de reação para cada amostra ao longo dos três usos de cada uma delas (Tabela 15).

Tabela 15 – Rendimento de reação dos três usos

Amostra	Rendimento de reação 1º uso	Rendimento de reação 2º uso	Rendimento de reação 3º uso
Ni-NTA sem NCS	30%	31%	25%
Celite 545 sem NCS	50%	35%	26%
Dowex 1 com NCS	35%	20%	18%
Caolin com NCS	62%	51%	46%
Diaion HP-2MG com NCS	21%	5%	19%
Controle	24%	26%	17%
Ni-NTA com NCS	62%	52%	54%
Celite 545 com NCS	64%	49%	49%

* A amostra controle foi produzida a cada reação para fins de comparação, ao contrário das demais que foram reutilizadas

Inicialmente, é importante observar que o rendimento de reação, quanto a formação da tetraidroisoquinolina, na amostra controle reduziu no terceiro uso em comparação aos anteriores. Tal amostra não foi reutilizada como as matrizes, mas foi preparada uma nova amostra controle a cada reação, para fins de comparação. A redução no rendimento de reação das amostras controle está relacionado ao tempo de estocagem das amostras desde o fim das reações até as análises por RMN, de forma que as amostras da reação 1 ficaram estocadas por mais tempo, seguidas das amostras da reação 2 e por fim da reação 3, o que leva a uma redução no rendimento de reação não enzimática ao longo do período de estocagem, confirmando a hipótese dos problemas relacionados a estocagem mencionados no item 4.5.1.

Igualmente, houve uma queda no rendimento de reação das matrizes Ni-NTA e Celite 545 sem $\Delta 19T/NCS$, as quais, teoricamente não catalisam a reação. Portanto, esta queda também está relacionada ao tempo de estocagem.

Observou-se para estas mesmas matrizes, mas contendo a enzima imobilizada, uma diminuição nos rendimentos da reação. Entretanto, a discussão sobre o quanto desta diminuição é devido a efeito de estocagem e o quanto se deve à própria diminuição da eficiência dos biocatalisadores é complexa, sendo necessário a repetição dos experimentos para quantificação destes efeitos. Porém, é interessante notar que para essas duas amostras, o rendimento no segundo e terceiro uso foi bem parecido, o que leva a concluir que a diminuição de eficiência entre o segundo e terceiro uso é praticamente nula, enquanto a diminuição do primeiro uso para o segundo é mais pronunciada.

A amostra de Caolin com $\Delta 19TfNCS$ apresentou um rendimento de reação semelhante às amostras de Ni-NTA e Celite 545 nos três usos, enquanto a amostra de Dowex 1X8 apresentou rendimentos pronunciadamente inferiores a estas três, além de apresentar diminuição significativa não somente do primeiro ao segundo uso como do segundo ao terceiro como pode ser constatado na Tabela 15, indicando que esta não é uma boa matriz para imobilização da $\Delta 19TfNCS$, tanto pelo baixo rendimento de imobilização, quanto pela baixa eficiência na reação e baixa reusabilidade.

A amostra de Diaion HP-2MG apresentou a pior performance em comparação às demais. O rendimento na primeira reação foi o mais baixo, permanecendo baixo nos demais usos. O resultado da segunda reação comparado a terceira não é muito coerente, pois é pouco provável que o rendimento seja reduzido para 5% e depois se eleve a 21% no terceiro uso, sendo mais provavelmente causado por erro de medida. O resultado obtido para esta amostra é de elevada importância no presente trabalho pois confirma a necessidade de se avaliar diversos parâmetros ao se trabalhar com imobilização de enzimas, pois, apesar de imobilizar bem a $\Delta 19TfNCS$ o desempenho como biocatalisador foi pronunciadamente inferior aos demais

Quanto à reusabilidade, as melhores matrizes foram Ni-NTA, Celite 545 e Caolin, que apresentaram rendimentos de reação relativamente elevados e baixa queda nos ensaios de reuso. Ademais, as matrizes Celite 545 e Caolin possuem vantagens quanto ao baixo custo, comparado a Ni-NTA. A matriz Celite 545 ainda se destaca pelo fato de não adsorver reagentes e produto em proporções observáveis, fazendo desta, uma boa candidata a suporte para imobilização da $\Delta 19TfNCS$. Entretanto, são necessários estudos em que seja avaliada a conservação da estereosseletividade da enzima após a imobilização em cada uma destas amostras, o que poderia ser feito por meio de técnicas de cromatografia com coluna quiral, além de análises por polarimetria do produto purificado.

4.5.3 Reação a 47 °C

Os resultados da reação a 47 °C, em termos de rendimento de reação, comparados aos rendimentos da primeira reação a 37 °C, para fins de comparação, são exibidos na Tabela 16.

Tabela 16 – Rendimento da reação à 37 °C e 47 °C

Amostra	Rendimento à 37 °C	Rendimento à 47°C
Dowex 1 com NCS	35%	33%
Caolin com NCS	62%	54%
Diaion HP-2MG com NCS	21%	6%
NCS livre	73%	81%
Controle	24%	6%
Ni-NTA com NCS	62%	58%
Celite 545 com NCS	64%	65%

A partir da Tabela 16 observa-se que os valores de rendimento da reação à 47 °C permanecem próximos aos valores das amostras obtidas da reação à 37 °C, com exceção da amostra de $\Delta 19Tf$ NCS livre, em que se observa um aumento considerável no rendimento de reação, e as amostras Caolin, controle e Diaion HP-2MG, em que se observa uma diminuição nesses valores. Entretanto, vale ressaltar que as amostras da reação a 47 °C permaneceram menos tempo estocadas antes da análise de RMN em comparação as demais, o que pode ser confirmado pelo valor de rendimento de reação do controle a 47 °C, portanto, é esperado que essas sejam as amostras com menor influência sem a presença da $\Delta 19Tf$ NCS.

A amostra obtida a partir da reação na presença de $\Delta 19Tf$ NCS livre (47 °C) apresentou um rendimento consideravelmente superior à mesma amostra da primeira reação. De fato, o aumento da temperatura do meio reacional, conservando as demais condições reacionais, resulta em um aumento da velocidade de reação desde que a proteína se mantenha estável. Através do resultado de espectroscopia de dicroísmo circular, foi observado que a proteína mantém sua estrutura à temperatura de 47 °C e, por isso, o resultado de rendimento de reação está de acordo com o esperado.

A matriz Diaion HP-2MG apresentou, mais uma vez, um baixo desempenho em termos de rendimento de reação, um padrão observado em todos os experimentos, indicando que de

fato essa matriz é inapropriada para imobilização da $\Delta 19TfNCS$. O rendimento de reação envolvendo a matriz Caolin com $\Delta 19TfNCS$ foi inferior ao aumentar-se a temperatura do meio reacional, apesar de não tanto quanto a Diaion HP-2MG, indicando a possibilidade desta matriz não conferir um aumento de estabilidade térmica a enzima $\Delta 19TfNCS$.

Quanto às demais amostras, tendo em vista que a queda no rendimento de reação das amostras de matrizes com $\Delta 19TfNCS$ na reação a 47 °C não é tão expressivo quanto a queda da amostra controle, além de considerar a faixa de erro dos resultados, é razoável considerar a possibilidade de que o desempenho à 47 °C seja parecido, ou até superior as amostras da reação a 37 °C.

5 CONCLUSÕES

A expressão e purificação da enzima $\Delta 19TfNCS$ foi bem-sucedida, sendo observado que o uso da lise por ultrassom gera um aumento no rendimento deste processo.

Os experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular levaram a concluir que a estrutura secundária da proteína obtida por expressão heteróloga estava conservada. Além disso, identificou-se que, a proteína, ao ser aquecida a uma temperatura de 75 °C sofre desnaturação irreversível, além de sugerir que a faixa de temperatura em que este processo se inicia é de 55 °C a 60 °C.

As matrizes Sílica gel, Dowex 50WX4 e Dowex 50WX8 se mostraram inapropriadas para o processo de imobilização da $\Delta 19TfNCS$ por adsorverem os reagentes em elevada quantidade.

De todas as matrizes, a Diaion HP-2MG apresentou o maior valor de rendimento de imobilização (99%), seguido da Celite 545 (86%), Ni-NTA (65%), Caolin (64%) e Dowex 1X8 (53%).

Os experimentos de reuso dos biocatalisadores indicaram, surpreendentemente, que a matriz Diaion HP-2MG é a menos apropriada para imobilização da $\Delta 19TfNCS$, apesar do elevado rendimento de imobilização desta amostra, o que poderia ser causado por uma inativação da enzima ao se imobilizar, ou uma imobilização com orientação desfavorável (dificultando o acesso ao sítio ativo) e até mesmo pela possibilidade de alta lixiviação da enzima ao longo das lavagens e reação.

Quanto a reusabilidade, as melhores matrizes foram Ni-NTA, Celite 545 e Caolin, que apresentaram rendimentos de reação relativamente elevados e baixa queda nos ensaios de reuso. Além disso, as matrizes Celite 545 e Caolin possuem vantagens quanto ao baixo custo, comparado a Ni-NTA, sendo que a matriz Celite 545 ainda se destaca pelo fato de não adsorver reagentes e produto em proporções observáveis.

Os dados da reação a 47 °C indicam uma diminuição no rendimento da amostra de Caolin com NCS, indicando a possibilidade de redução da estabilidade térmica ao usar este suporte, enquanto as demais amostras apresentaram resultados parecidos com a reação a 37 °C, com destaque para a matriz Celite 545 que se apresentou como uma matriz promissora em todos os experimentos.

O produto da reação de Pictet-Spengler entre a dopamina e hexanal, 1-pentil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina-6,7-diol, foi obtido em quantidades diferentes para algumas amostras obtidas pelo presente trabalho, com destaque para as amostras obtidas pelas reações catalisadas pela $\Delta 19TfNCS$ (ex. 1,90 mM de produto para a primeira reação à 37°C). Entretanto, esse produto não foi purificado, e sua estereoquímica não foi determinada, apesar de que se espera, com base na literatura, que a tetraidroisoquinolina de configuração *S* no centro quiral, esteja em excesso enantiomérico nas amostras obtidas a partir da reação catalisada pela $\Delta 19TfNCS$ (LICHMAN *et al.*, 2015), o que poderia ser confirmado por técnicas de HPLC com coluna quiral e polarimetria.

Através do presente trabalho, foi possível constatar a necessidade de realizar experimentos envolvendo temperaturas superiores e maiores concentrações de co-solvente orgânico, a fim de verificar o desempenho dos suportes no aumento da estabilidade térmica e a presença de solventes orgânicos a partir do protocolo de imobilização. Também se mostrou necessário o uso de outros métodos analíticos a fim de avaliar outros parâmetros relativos ao desempenho dos biocatalisadores, em especial técnicas de cromatografia com coluna quiral que permitiriam avaliar a estereosseletividade proporcionada por cada amostra.

REFERÊNCIAS

- BALASUNDARAM, B.; HARRISON, S.; BRACEWELL, D. G. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 477–485, 2009.
- BASCONI, J. E.; CARTA, G.; SHIRTS, M. R. Effects of polymer graft properties on protein adsorption and transport in ion exchange chromatography: A multiscale modeling study. **Langmuir**, v. 31, n. 14, p. 4176–4187, 2015.
- BATTERSBY, A. R. et al. Alkaloid Biosynthesis. Part IV. 1-Benzylisoquinolines as precursors of Thebaine, Codeine, and Morphine. **J. Chem. Soc.**, p. 3600–3610, 1963.
- BERKNER, Hanna et al. High-yield expression and purification of isotopically labeled norcoclaurine synthase, a Bet v 1-homologous enzyme, from *Thalictrum flavum* for NMR studies. **Protein Expression and Purification**, v. 56, n. 2, p. 197–204, 2007.
- BERNAL, C.; RODRÍGUEZ, K.; MARTÍNEZ, R. Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 5, p. 1470–1480, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.06.002>>.
- BATTERSBY, A. R. et al. Alkaloid Biosynthesis. Part IV. 1-Benzylisoquinolines as precursors of Thebaine, Codeine, and Morphine. **J. Chem. Soc.**, p. 3600–3610, 1963.
- BERKNER, Hanna et al. Conformation, catalytic site, and enzymatic mechanism of the PR10 allergen-related enzyme norcoclaurine synthase. **Biochemical Journal**, v. 413, n. 2, p. 281–290, 2008a.
- BERKNER, Hanna et al. Conformation, catalytic site, and enzymatic mechanism of the PR10 allergen-related enzyme norcoclaurine synthase. **Biochemical Journal**, v. 413, n. 2, p. 281–290, 2008b.
- BERKNER, Hanna et al. High-yield expression and purification of isotopically labeled norcoclaurine synthase, a Bet v 1-homologous enzyme, from *Thalictrum flavum* for NMR studies. **Protein Expression and Purification**, v. 56, n. 2, p. 197–204, 2007.
- BETHEA, C. L.; RØENNEKLEIV, O. K.; KOZAK, S. L. Extracellular matrix changes PC12 cell shape and processing of newly synthesized dopamine. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 54, n. 1, p. 63–79, 1987.

- BISAGLIA, Marco; MAMMI, Stefano; BUBACCO, Luigi. Kinetic and structural analysis of the early oxidation products of dopamine: Analysis of the interactions with α -synuclein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 21, p. 15597–15605, 2007.
- BONAMORE, Alessandra et al. Norcoclaurine synthase: Mechanism of an enantioselective pictet-spengler catalyzing enzyme. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2070–2078, 2010.
- BORNSCHEUER, U T et al. Engineering the third wave of biocatalysis. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 185–194, 2012.
- BRITTON, Joshua; MAJUMDAR, Sudipta; WEISS, Gregory A. Continuous flow biocatalysis. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 15, p. 5891–5918, 2018.
- DA S. SANTOS, Maiara; COLNAGO, Luiz Alberto. Validação de método quantitativo por RMN de ¹H para análises de formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 324–330, 2013.
- ERDMANN, Vanessa et al. Enzymatic and Chemoenzymatic Three-Step Cascades for the Synthesis of Stereochemically Complementary Trisubstituted Tetrahydroisoquinolines. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 56, n. 41, p. 12503–12507, 2017a.
- ERDMANN, Vanessa et al. Enzymatic and Chemoenzymatic Three-Step Cascades for the Synthesis of Stereochemically Complementary Trisubstituted Tetrahydroisoquinolines. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 56, n. 41, p. 12503–12507, 2017b.
- FERNANDES, Humberto et al. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. **FEBS Journal**, v. 280, n. 5, p. 1169–1199, 2013.
- GAJHEDE, Michael et al. X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. **Nat Struct Biol**, v. 3, n. 12, p. 1040–1045, 1996.
- GREENFIELD, Norma J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2527–2535, 2007a.
- GREENFIELD, Norma J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2007b.

GUIMARÃES, José Renato et al. Evaluation of strategies to produce highly porous cross-linked aggregates of porcine pancreas lipase with magnetic properties. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 13–16, 2018.

GUISAN, Jose M et al. Immobilization of Enzymes and Cells. Fourth Edi ed. [S.l.]: **Methods in Molecular Biology**, 2020. Disponível em: <<http://www.springer.com/series/7651>>.

ILARI, Andrea et al. Structural Basis of Enzymatic (S) -Norcoclaurine Biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 2, p. 897–904, 2009a.

ILARI, Andrea et al. Structural basis of enzymatic (S)-norcoclaurine biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 2, p. 897–904, 2009b.

LECHNER, Horst et al. Library of Norcoclaurine Synthases and Their Immobilization for Biocatalytic Transformations. **Biotechnology Journal**, v. 13, n. 3, p. 1–9, 2018a.

LECHNER, Horst et al. Suplementar - Library of Norcoclaurine Synthases and Their Immobilization for Biocatalytic Transformations. **Biotechnology Journal**, p. 1–19, 2018b.

LICHMAN, Benjamin R. et al. Dopamine-first mechanism enables the rational engineering of the norcoclaurine synthase aldehyde activity profile. **FEBS Journal**, v. 282, n. 6, p. 1137–1151, 2015.

LICHMAN, Benjamin R.; ZHAO, Jianxiong; et al. Enzyme catalysed Pictet-Spengler formation of chiral 1,1'-disubstituted- A nd spiro-tetrahydroisoquinolines. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms14883>>.

LICHMAN, Benjamin R.; SULA, Altin; et al. Structural Evidence for the Dopamine-First Mechanism of Norcoclaurine Synthase. **Biochemistry**, v. 56, n. 40, p. 5274–5277, 2017.

LICHMAN, Benjamin Robert. Norcoclaurine synthase: The mechanism and biocatalytic potential of a Pictet-Spenglerase. 2015. 2015.

LØHRE, Camilla et al. A Workup Protocol Combined with Direct Application of Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Aqueous Samples from Large-Scale Steam Explosion of Biomass. **ACS Omega**, 2021.

LUK, Louis Y.P. et al. Mechanistic studies on norcoclaurine synthase of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis: An enzymatic Pictet-Spengler reaction. **Biochemistry**, v. 46, n. 35, p. 10153–10161, 2007.

MCCREATH, Simone Badal; DELGODA, Rupika. Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00009-3>>.

MINAMI, Hiromichi et al. Functional analysis of norcoclaurine synthase in *Coptis japonica*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 9, p. 6274–6282, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M608933200>>.

OVERTON, Tim W; OVERTON, Tim W. Recombinant protein production in bacterial hosts. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 5, p. 590–601, 2014.

PESNOT, Thomas et al. The catalytic potential of *Coptis japonica* NCS2 revealed - Development and utilisation of a fluorecamine-based assay ETI. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 354, n. 16, p. 2997–3008, 2012.

PIOTTO, Martial; DAUDEK, Vladimír; SKLENAR, Vladimír. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 3, n. 2, p. 661–666, 1992.

PORTER, Jordan; ARREGUIN, Shelly; CORTLANDT, Pierpont G. Ferric iron complexes of dopamine and 5,6-dihydroxyindole with nta, edda, and edta as ancillary ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 363, p. 2800–2803, 2010.

PYNE, Michael E. et al. A yeast platform for high-level synthesis of tetrahydroisoquinoline alkaloids. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17172-x>>.

RADAUER, Christian; LACKNER, Peter; BREITENEDER, Heimo. The Bet v 1 fold: An ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, p. 1–19, 2008.

RIGOLDI, Federica et al. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. **APL Bioengineering**, v. 2, n. 1, p. 011501, mar. 2018.

RIGOLDI, Frederica et al. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. **APL Bioengineering**, v. 011501, n. November 2017, 2018.

RODDAN, Rebecca et al. Pictet–Spenglerases in alkaloid biosynthesis: Future applications in biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 55, n. 2, p. 69–76, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.12.003>>.

RUEFFER, Martina et al. (S) - NORLAUDANOSOLINE SYNTHASE : THE FIRST ENZYME BENZYLISOQUINOLINE PATHWAY. **FEBS Letters**, v. 129, n. 1, 1981.

SAMANANI, Nailish; FACCHINI, Peter J. Isolation and partial characterization of norcoclaurine synthase, the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis, from opium poppy. **Planta**, v. 213, n. 6, p. 898–906, 2001.

SAMANANI, Nailish; FACCHINI, Peter J. Purification and characterization of norcoclaurine synthase: The first committed enzyme in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 37, p. 33878–33883, 2002.

SAMANANI, Nailish; LISCOMBE, David K.; FACCHINI, Peter J. Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an catalyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. **Plant Journal**, v. 40, n. 2, p. 302–313, 2004.

SCHUMACHER, H. M. et al. Partial Purification and Properties of (S)-Norlaudanosoline Synthase from *Eschscholtzia tenuifolia* Cell Cultures. **Planta Med.**, v. 48, p. 212–220, 1983.

SHENG, X.; HIMO, F. Enzymatic Pictet-Spengler Reaction: Computational Study of the Mechanism and Enantioselectivity of Norcoclaurine Synthase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 28, p. 11230–11238, 2019.

SMOLKE, Christina D.; HAWKINS, Kristy M. COMPOSITIONS AND METHODS FOR PRODUCING BENZYLISOQUINOLINE ALKALOIDS. . United States: USPTO. , 2019

STADLER, R. et al. Revision of the early steps of Reticuline Biosynthesis. **Tetrahedron Lett.**, v. 28, n. 12, p. 1251–1254, 1987.

STADLER, Richard; KUTCHAN, Toni M.; ZENK, Meinhard H. (S)-norcoclaurine is the central intermediate in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 28, n. 4, p. 1083–1086, 1989.

STADLER, Richard; ZENK, Meinhard H. A revision of the generally accepted pathway for the biosynthesis of the benzyltetrahydroisoquinoline alkaloid reticuline. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 1990, n. 6, p. 555–562, 1990.

TIPTON, Keith. Translocases (EC 7): A new EC Class. . [S.l: s.n.], 2018.

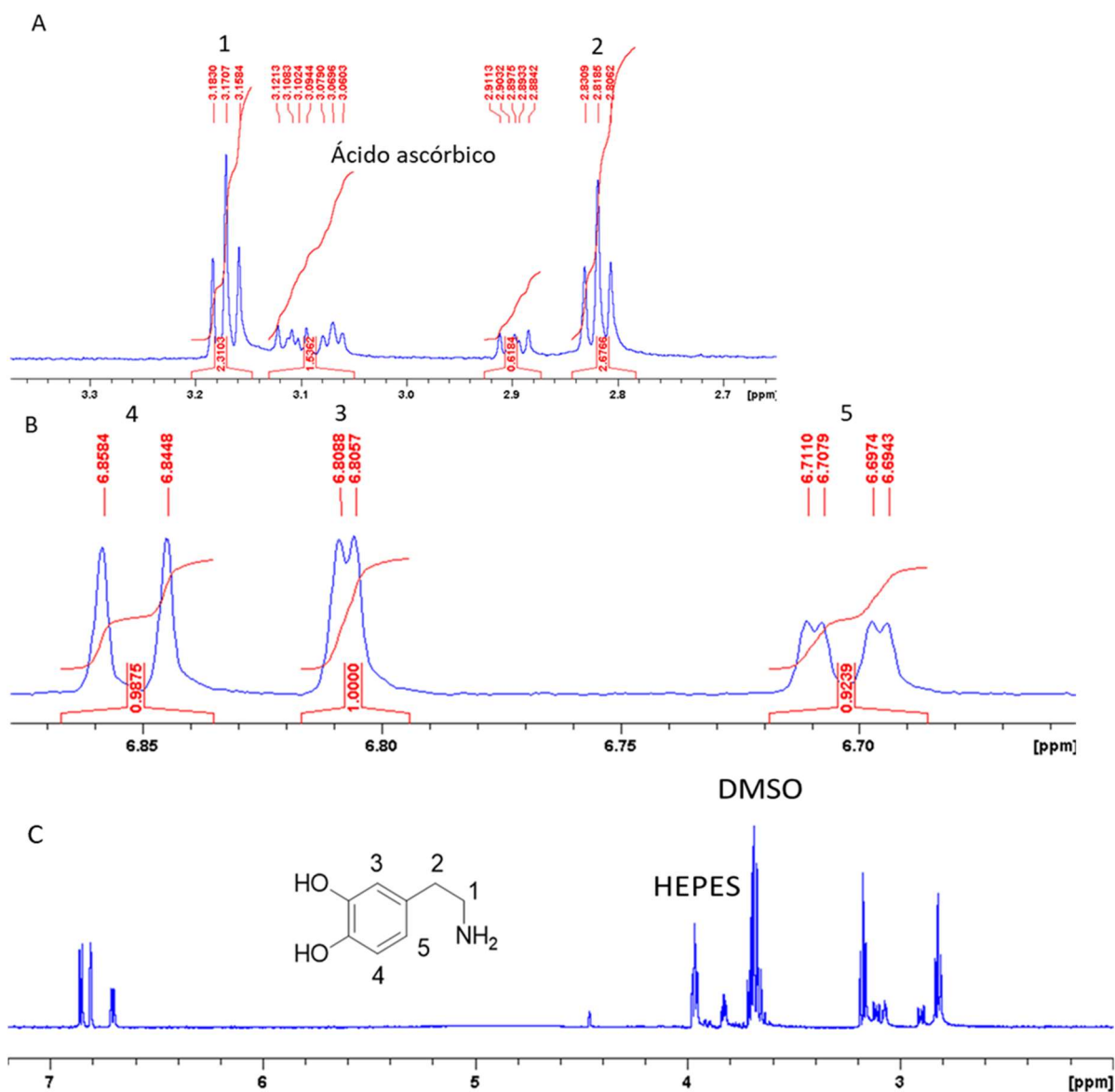
TIPTON, Keith; MCDONALD, Andrew. **A Brief Guide to Enzyme Nomenclature and Classification.** . [S.l: s.n.], 2018.

Anexo 2

Espectros de RMN

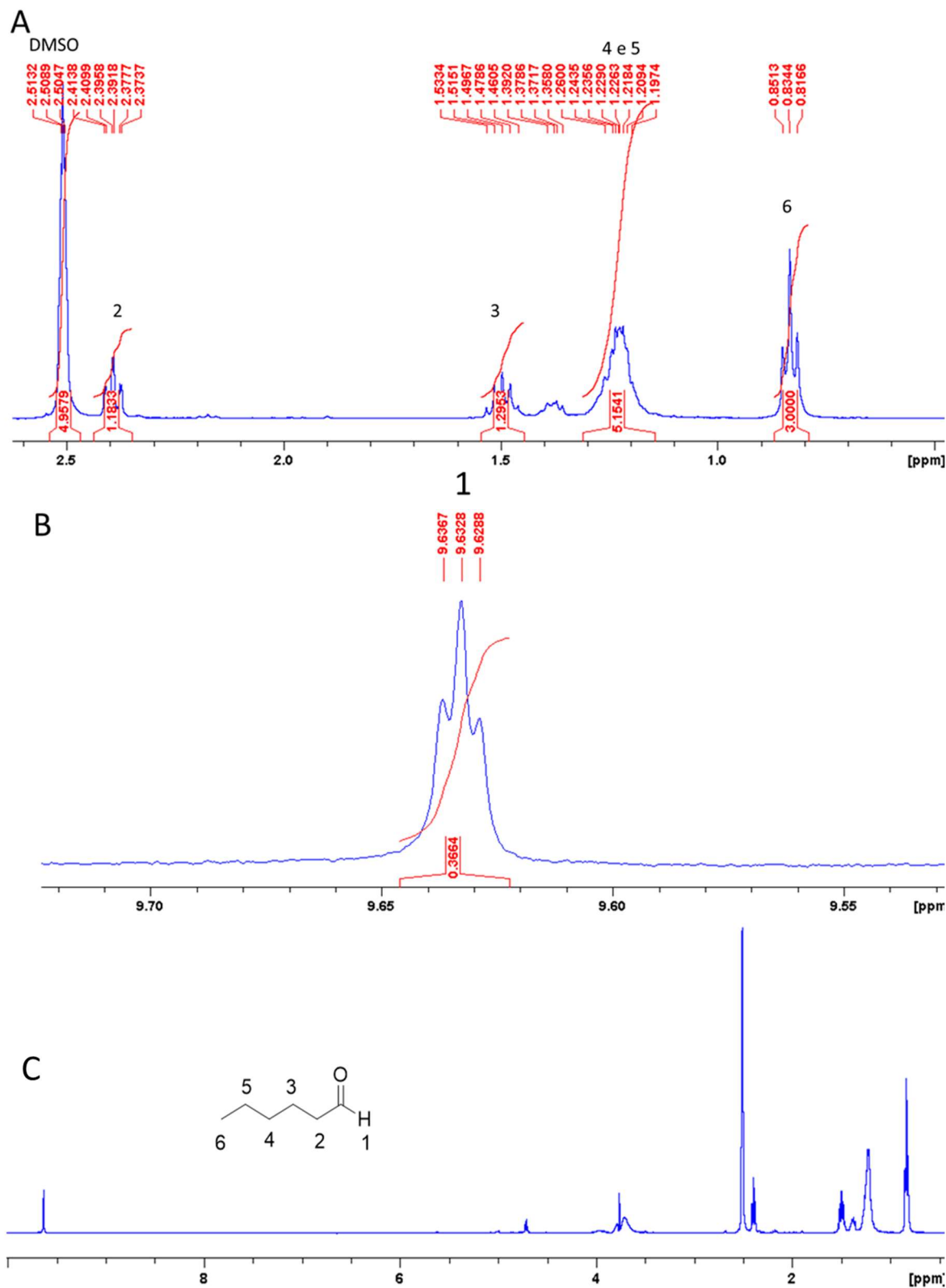
Amostras dos reagentes:

Dopamina



Espectro da amostra de dopamina. Espectro de RMN de ^1H de 2.5 mM de dopamina em tampão fosfato 1 M, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico e 10% v/v de D_2O . O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Quadro A - região dos hidrogênios 1 e 2 ampliada; Quadro B - região dos hidrogênios 3, 4 e 5 ampliada. Quadro C - Espectro completo.

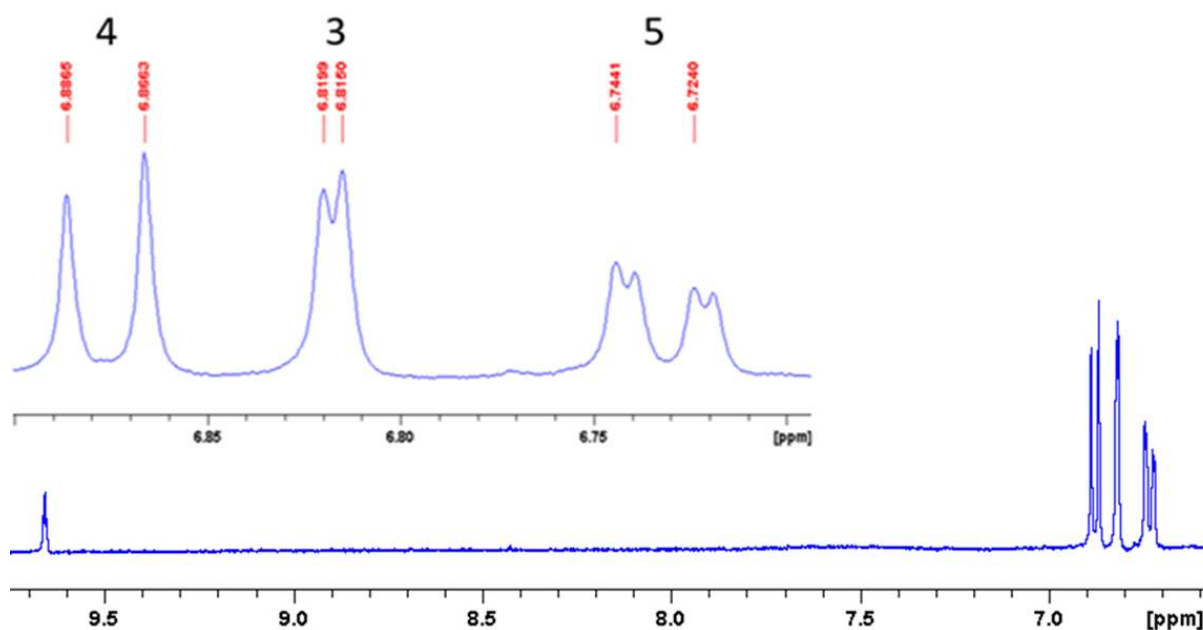
Hexanal



Espectro de RMN de ^1H de 2.5 mM de hexanal em DMSO 90% v/v e 10% v/v de D_2O . O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Quadro A - região dos hidrogênios 2 à 6 ampliada; Quadro B - região do hidrogênio 1 ampliada. Quadro C - Espectro completo.

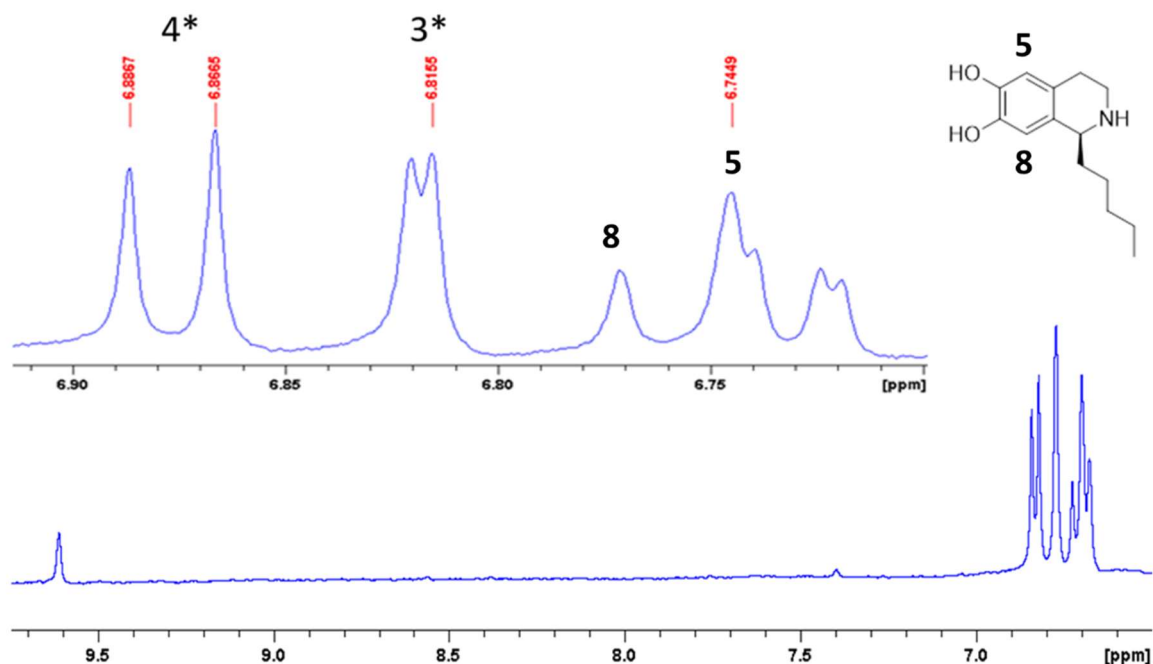
Amostras da seleção inicial das matrizes

Controle



Espectro de RMN de ¹H de 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico e 10% v/v de D₂O. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Quadro de baixo - mostra a região ampliada dos sinais dos hidrogênios 3, 4 e 5 da dopamina, assim como o hidrogênio 1 do hexanal. Quadro de cima - região ampliada dos sinais dos hidrogênios 3, 4 e 5 da dopamina. (Reação à 37°C por 2 horas)

$\Delta 19TfNCS$ livre

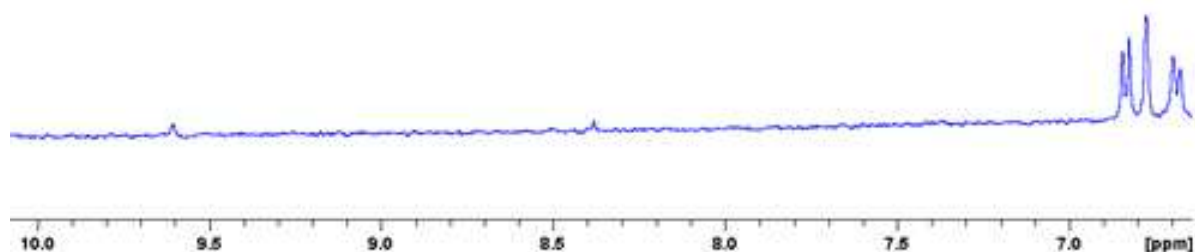


Espectro de RMN 1H da amostra contendo $\Delta 19TfNCS$ livre. Espectro de RMN de 1H obtido de amostra de reação entre 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal, na presença da $\Delta 19TfNCS$, em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico e 10% v/v de D_2O . O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Quadro de baixo - mostra a região ampliada dos sinais dos hidrogênios 3, 4 e 5 da dopamina, assim como o hidrogênio 1 do hexanal e do produto 1-pentil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina-6,7-diol. Quadro de cima - região ampliada dos sinais dos hidrogênios 3, 4 e 5 da dopamina e hidrogênios 5 e 8 do produto 1-pentil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina-6,7-diol.

Espectros das amostras da seleção inicial das matrizes ampliados na região dos sinais pertinentes para acompanhamento da reação de Pictet-Spengler.

Amostra 1:

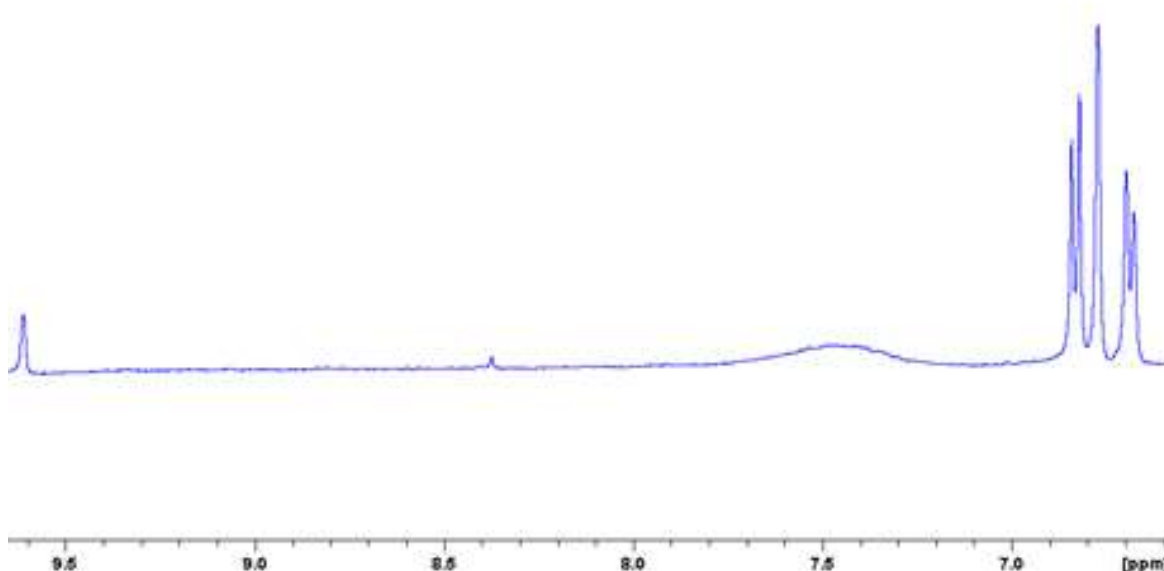
- Sílica gel sem NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre 2.5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal, na presença da matriz Sílica gel sem $\Delta^{19}\text{T}/\text{NCS}$, em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico e 10% v/v de D_2O . O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Espectro ampliado na região dos sinais pertinentes para acompanhamento da reação de Pictet-Spengler. (Reação à 37°C por 2 horas)

Amostra 2:

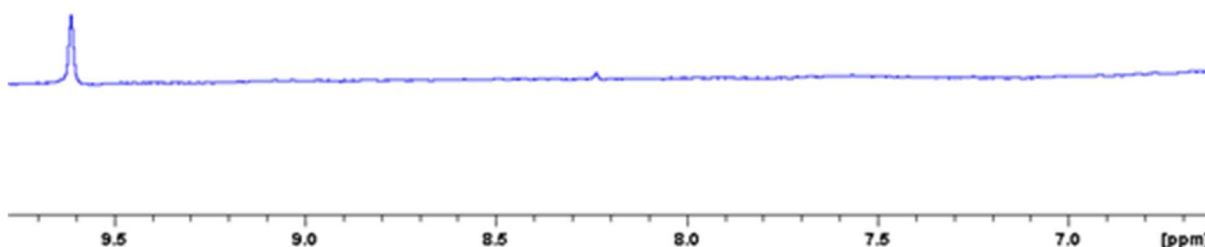
- Dowex 1X8 sem NCS



Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre 2.5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal, na presença da matriz Dowex 1X8 sem Δ^{19T} /NCS, em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido *ascórbico* 10% v/v de D₂O. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Espectro ampliado na região dos sinais pertinentes para acompanhamento da reação de Pictet-Spengler. (Reação à 37°C por 2 horas)

Amostra 3:

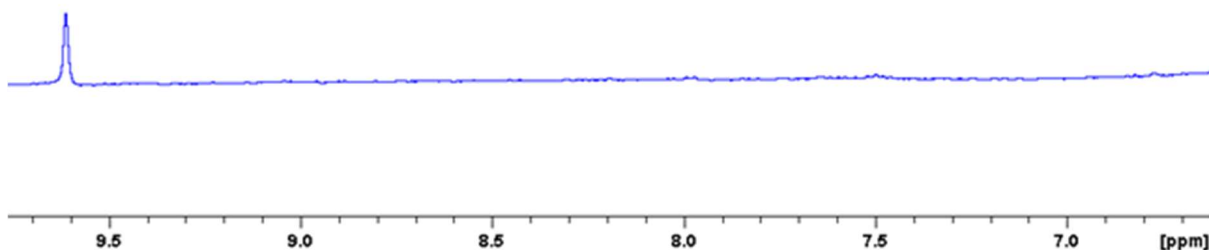
- Dowex 50WX8 sem NCS



Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre 2.5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal, na presença da matriz Dowex 50WX8 sem Δ^{19T} /NCS, em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido *ascórbico* 10% v/v de D₂O. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Espectro ampliado na região dos sinais pertinentes para acompanhamento da reação de Pictet-Spengler. (Reação à 37°C por 2 horas)

Amostra 4:

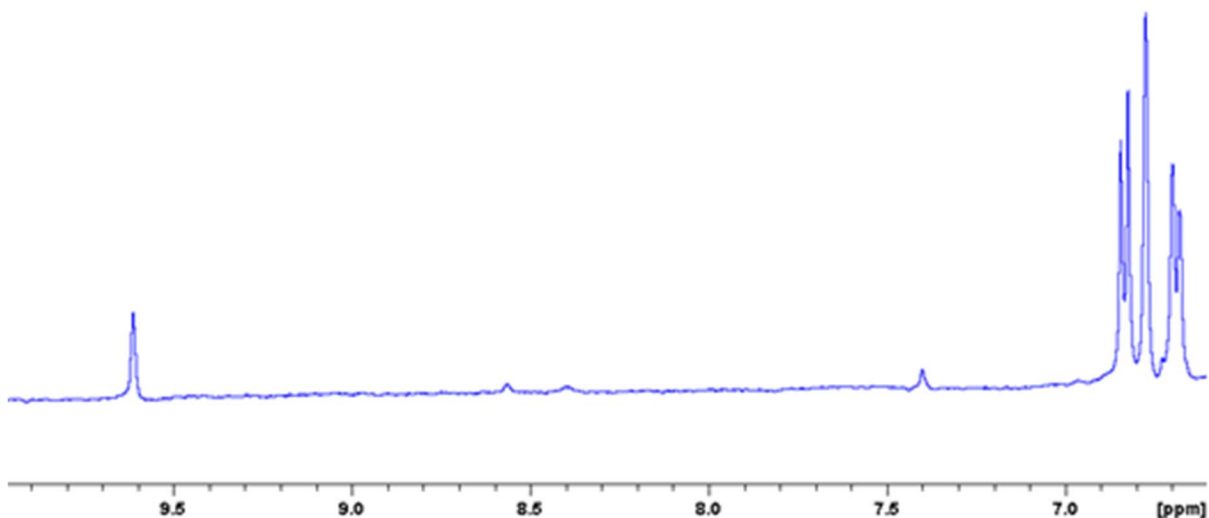
- Dowex 50WX4 sem NCS



Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre 2.5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal, na presença da matriz Dowex 50WX4 sem $\Delta^{19}T/NCS$, em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico 10% v/v de D₂O. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Espectro ampliado na região dos sinais pertinentes para acompanhamento da reação de Pictet-Spengler. (Reação à 37°C por 2 horas)

Amostra 5:

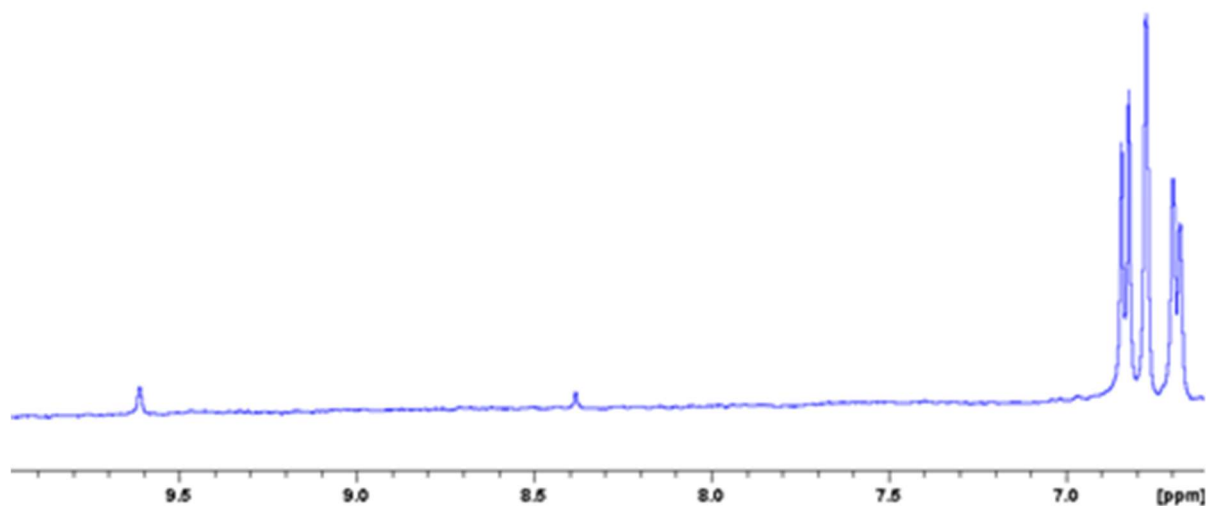
- Caolin sem NCS



Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre 2.5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal, na presença da matriz Caolin sem $\Delta^{19}T/NCS$, em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico 10% v/v de D₂O. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Espectro ampliado na região dos sinais pertinentes para acompanhamento da reação de Pictet-Spengler. (Reação à 37°C por 2 horas)

Amostra 6:

- Diaion HP-2MG sem NCS

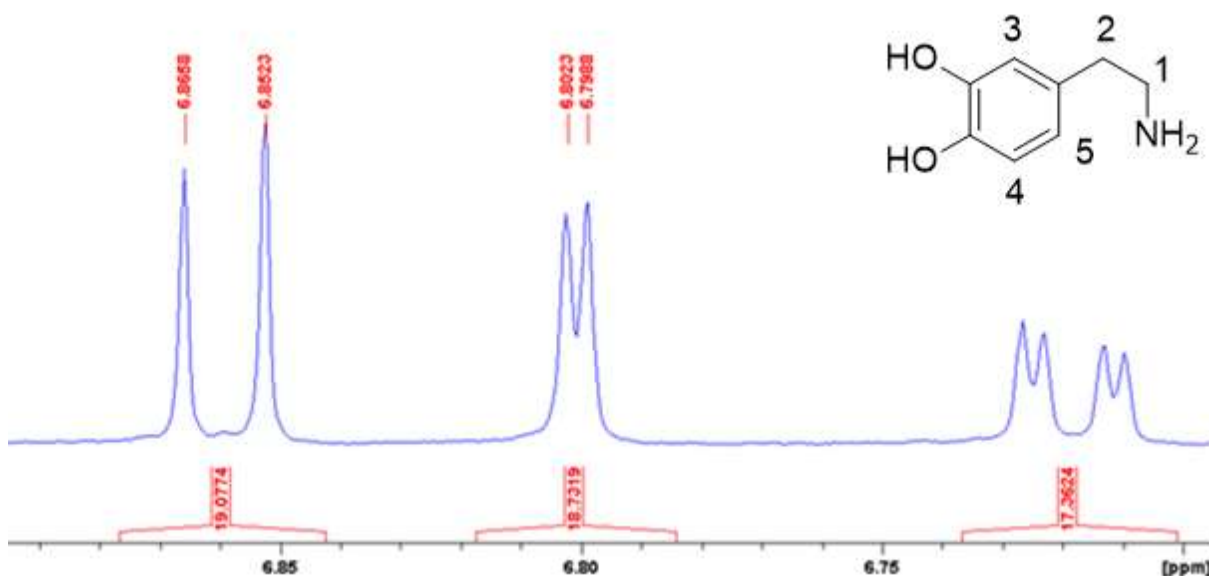


Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre 2,5 mM de dopamina e 2,5 mM de hexanal, na presença da matriz Diaion HP-2MG sem $\Delta^{19}T/NCS$, em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico 10% v/v de D₂O. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker NanoBay 400 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 1,2 s e sequência de pulso Bruker p3919gp. Espectro ampliado na região dos sinais pertinentes para acompanhamento da reação de Pictet-Spengler. (Reação à 37°C por 2 horas)

Amostras da primeira reação a 37°C ampliados na região dos sinais pertinentes para acompanhamento da reação.

Amostra 12:

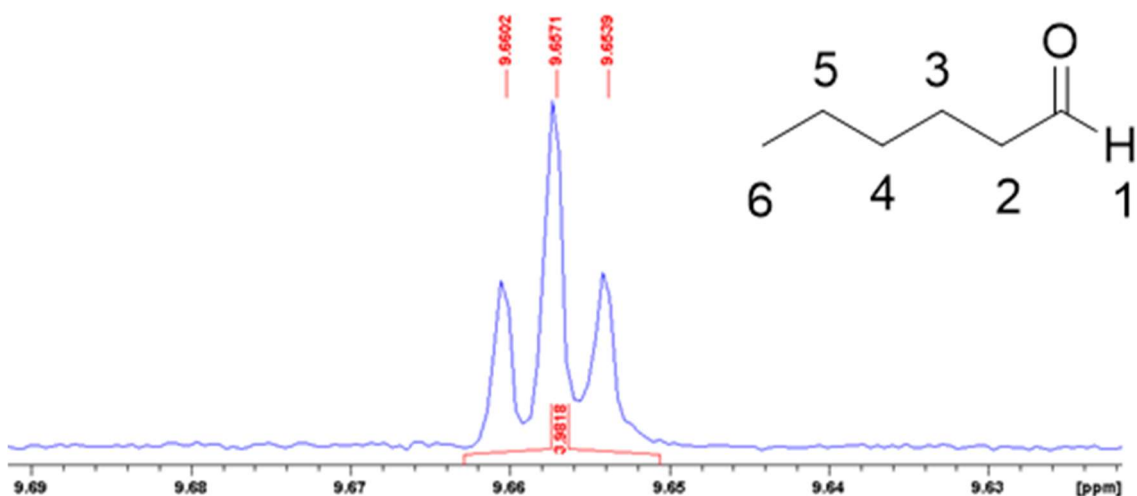
- Dopamina (2,5 mM)



Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de dopamina 2.5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (amostra submetida à temperatura de 37°C por 2 horas)

Amostra 11:

- Hexanal (2,5 mM)

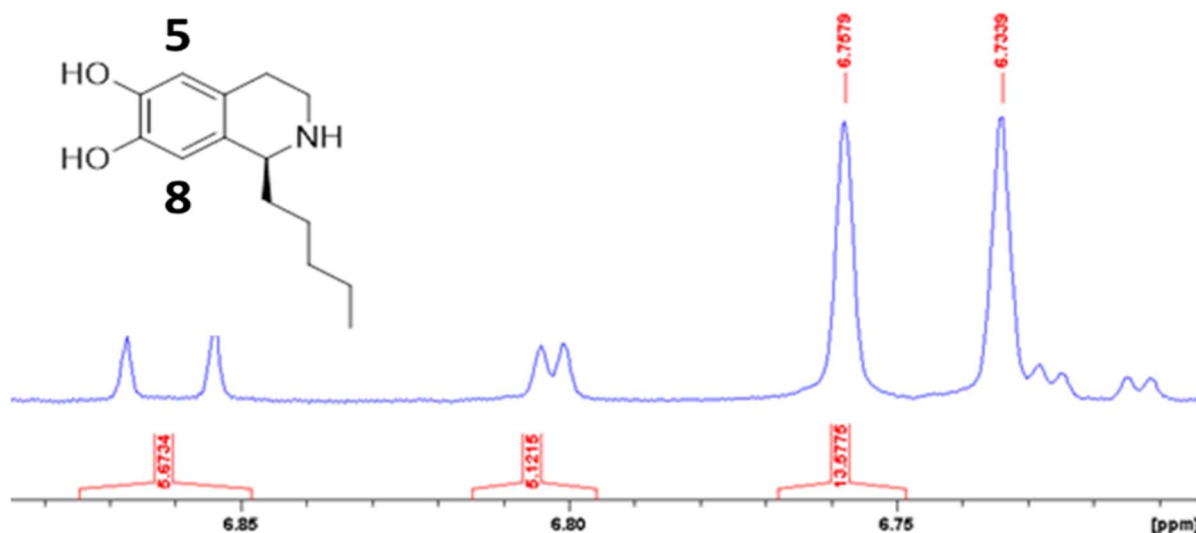


Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra hexanal 2.5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6. O espectro foi adquirido a 298,1 K em

um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (amostra submetida à temperatura de 37°C por 2 horas).

Amostra 6:

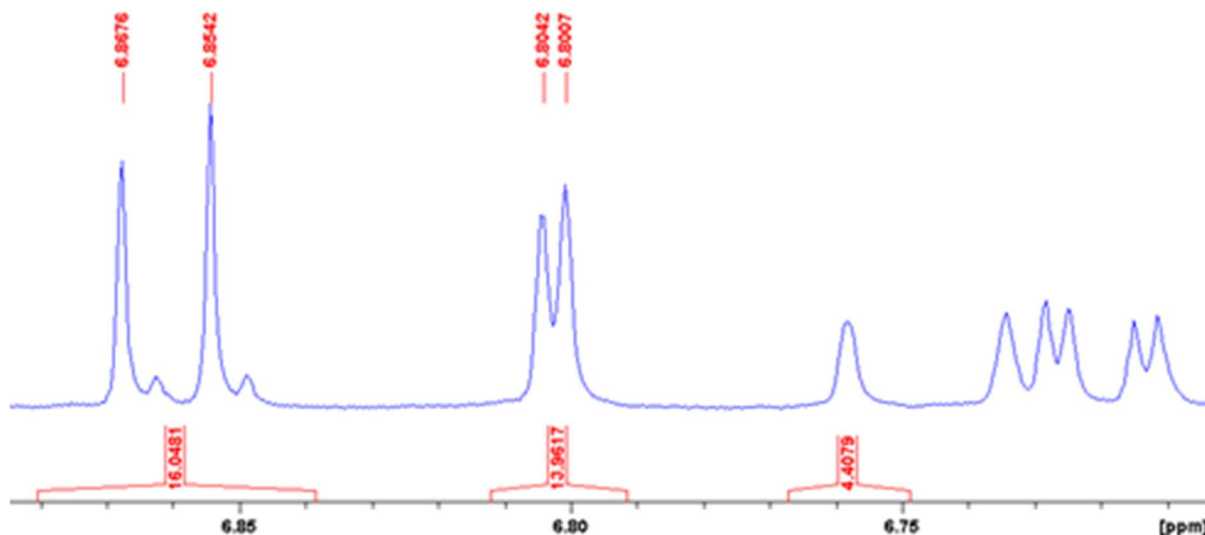
- $\Delta 19T$ /NCS livre



Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença de $\Delta 19T$ /NCS livre. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 7:

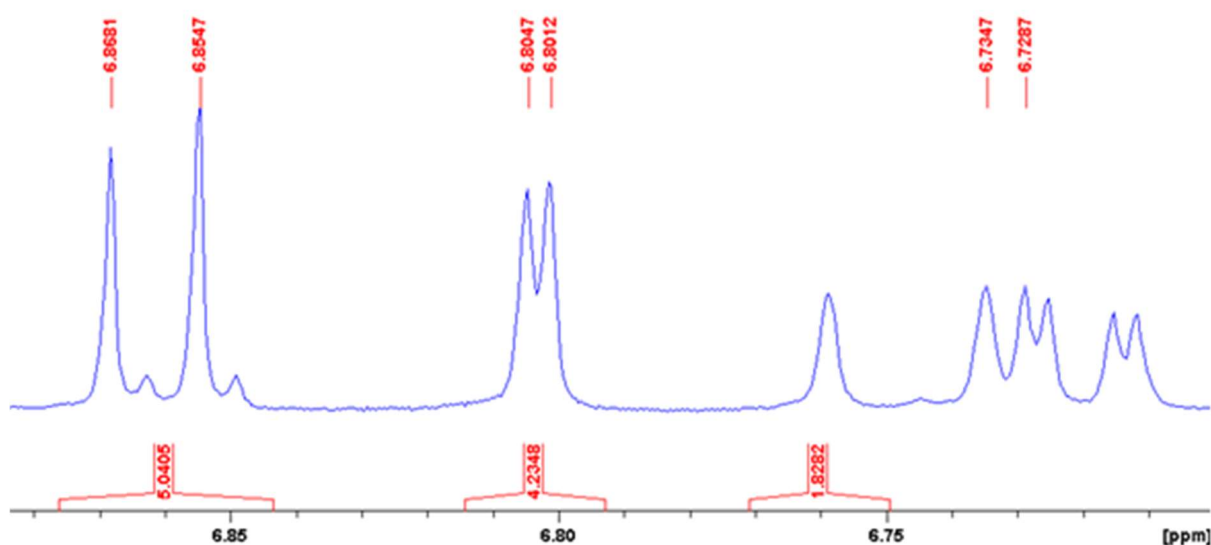
- Controle (reagentes sem NCS)



Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 sem a presença de $\Delta 19Tj$ NCS. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 1:

- Ni-NTA sem NCS

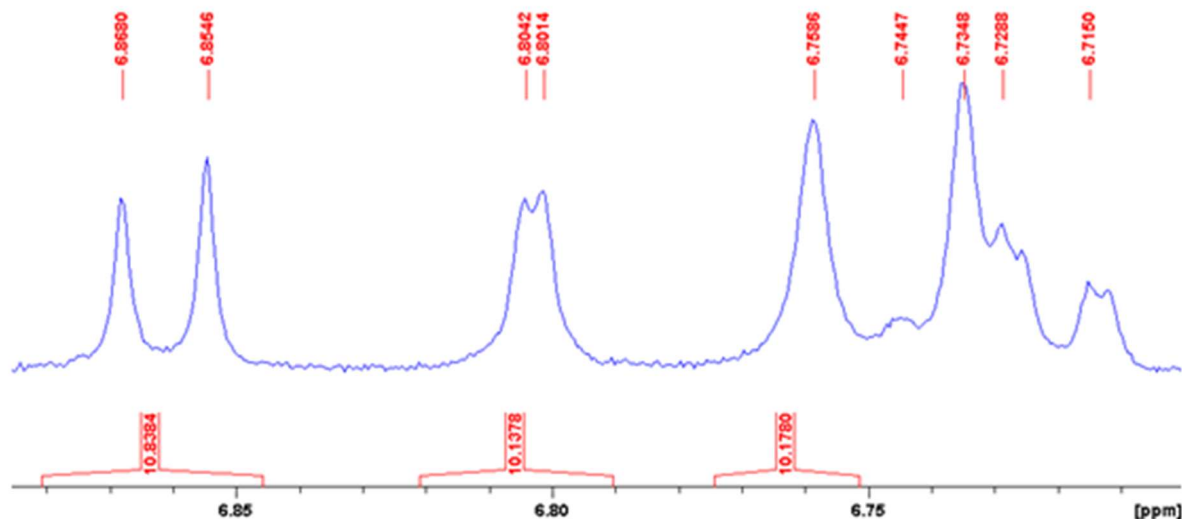


Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 sem a presença da matriz Ni-NTA sem $\Delta 19Tj$ NCS. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker

Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 2:

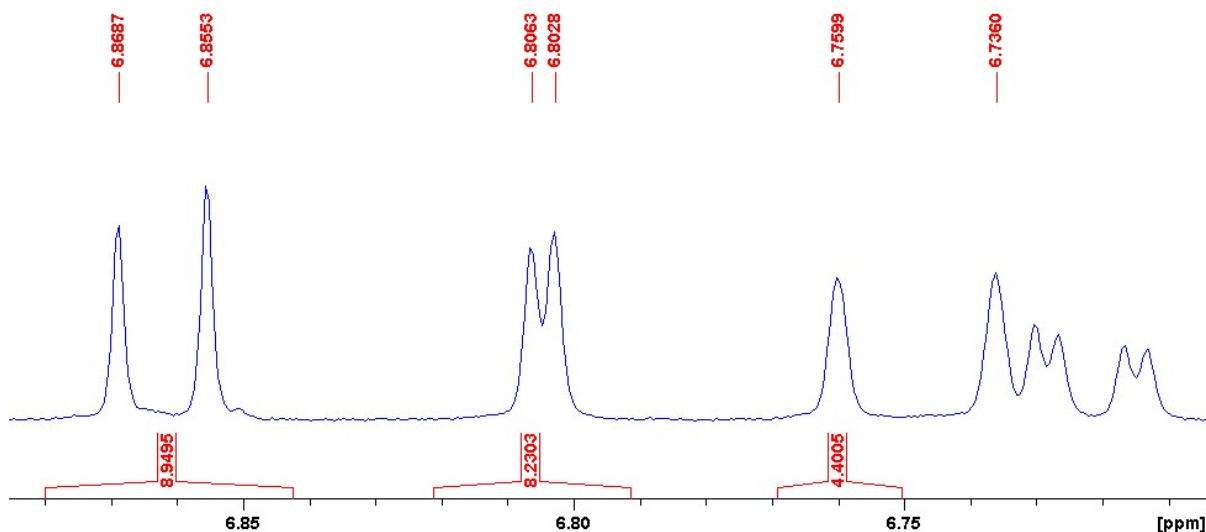
- Celite 545 sem NCS



Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Celite 545 sem $\Delta 19T/NCS$. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 3:

- Dowex 1 com NCS

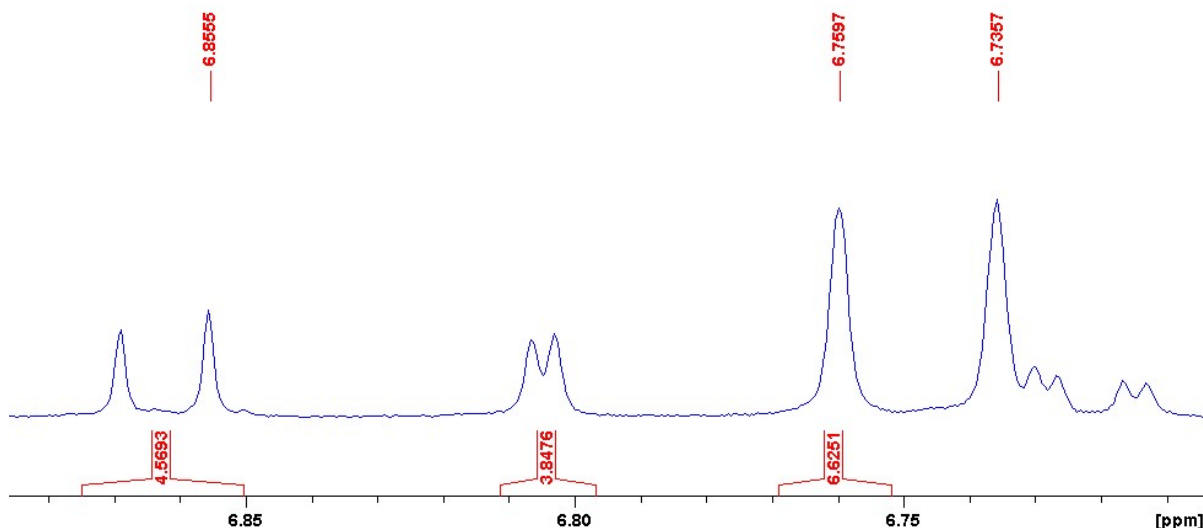


Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Dowex 1 com $\Delta 19T/NCS$. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo

600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duming scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 4:

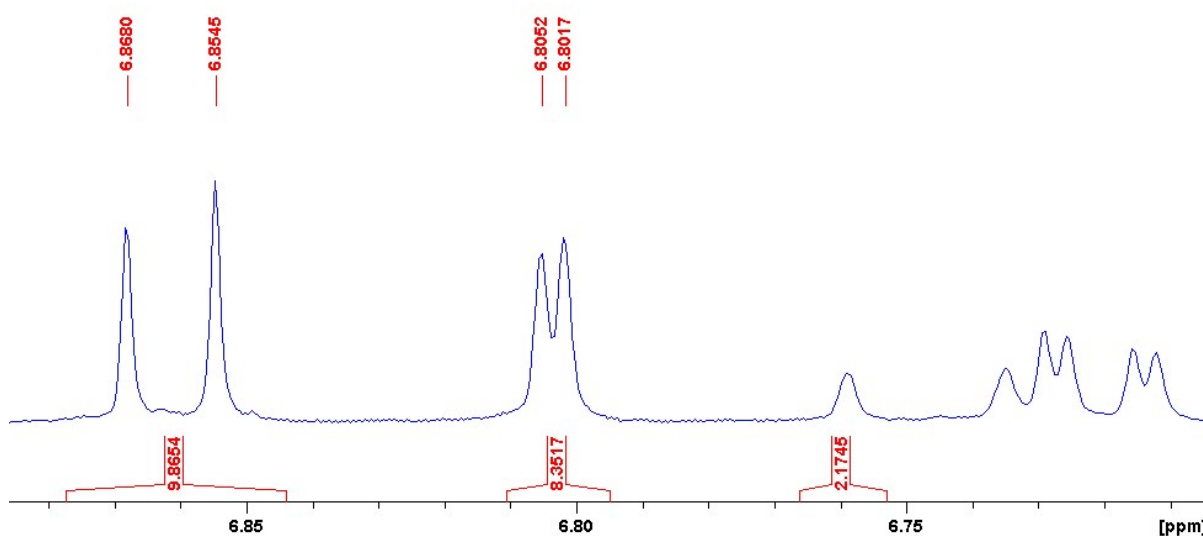
- Caolin com NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Caolin com $\Delta 19T/\text{NCS}$. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duming scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 5:

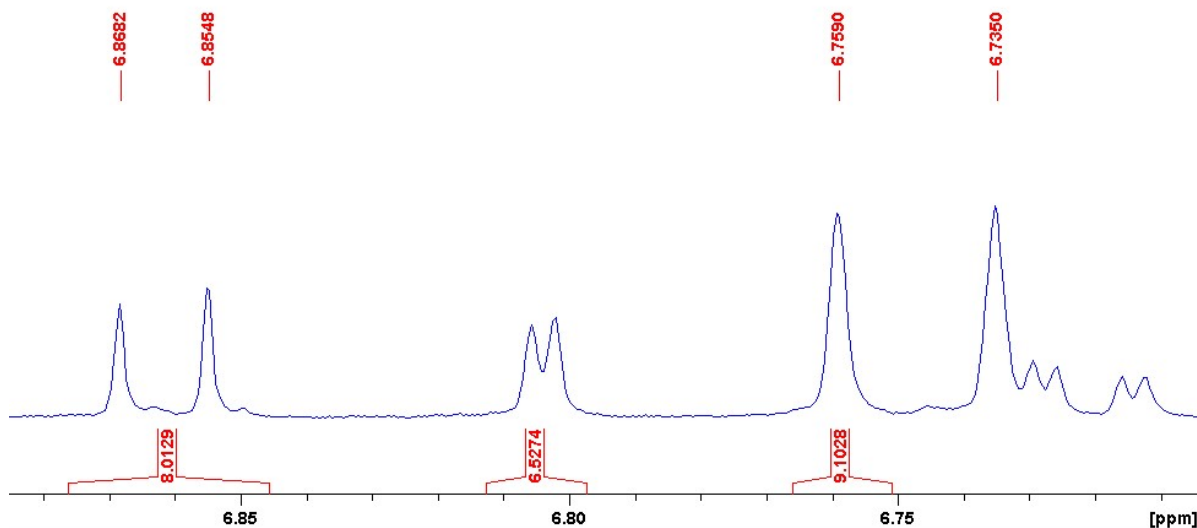
- Diaion HP-2MG com NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Diaion HP-2MG com $\Delta 19T/\text{NCS}$. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duming scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 8:

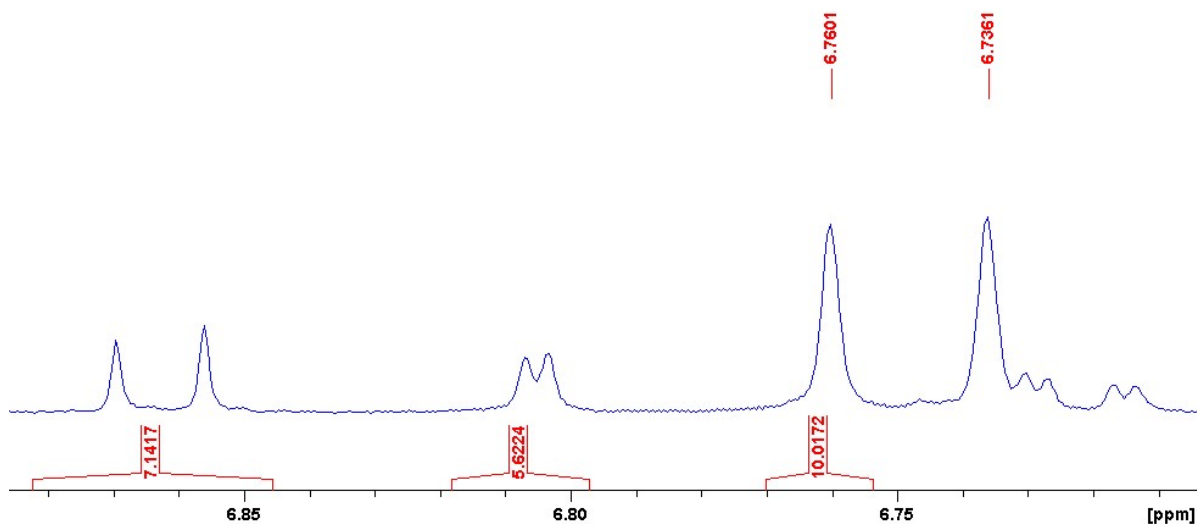
- Ni-NTA com NCS



Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 sem a na presença da matriz Ni-NTA com $\Delta 19T/NCS$. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duming scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 9:

- Celite 545 com NCS

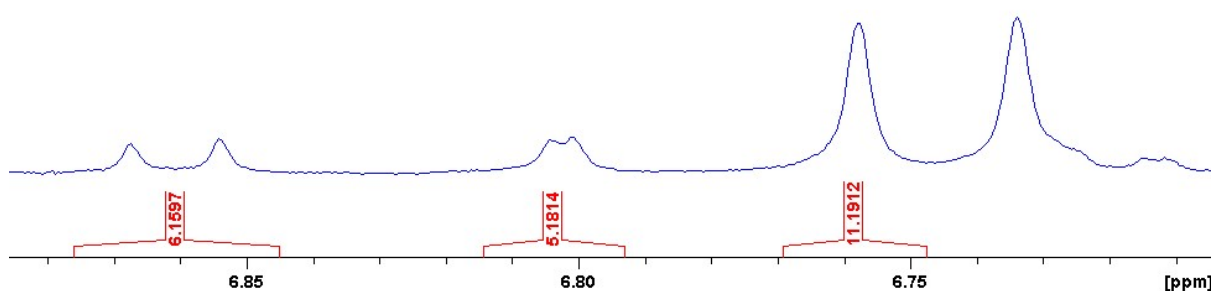


Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Celite 545 com $\Delta 19T/NCS$. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duming scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostras da segunda reação a 37°C

Amostra 6:

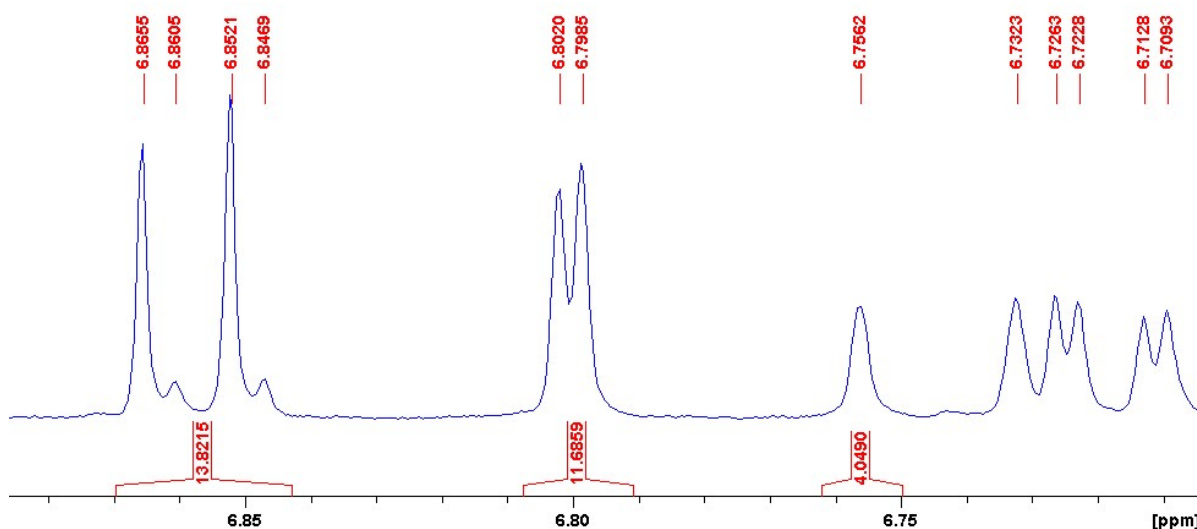
- NCS livre



Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença de Δ197NCS livre. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (amostra submetida à temperatura de 37°C por 2 horas).

Amostra 7:

- Controle (reagentes sem NCS)

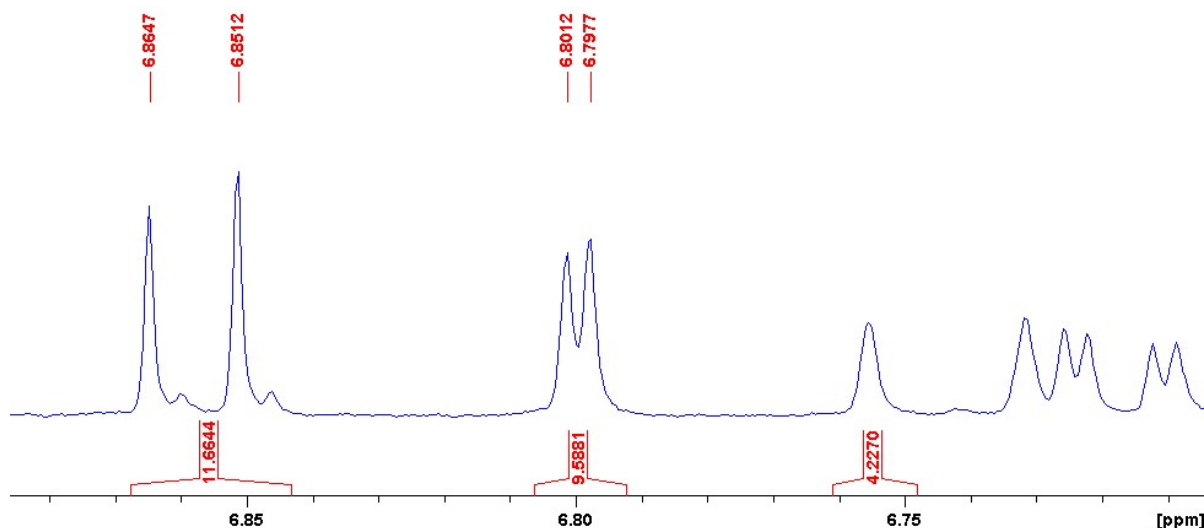


Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 sem a presença de Δ197NCS. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz

Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (amostra submetida à temperatura de 37°C por 2 horas).

Amostra 1:

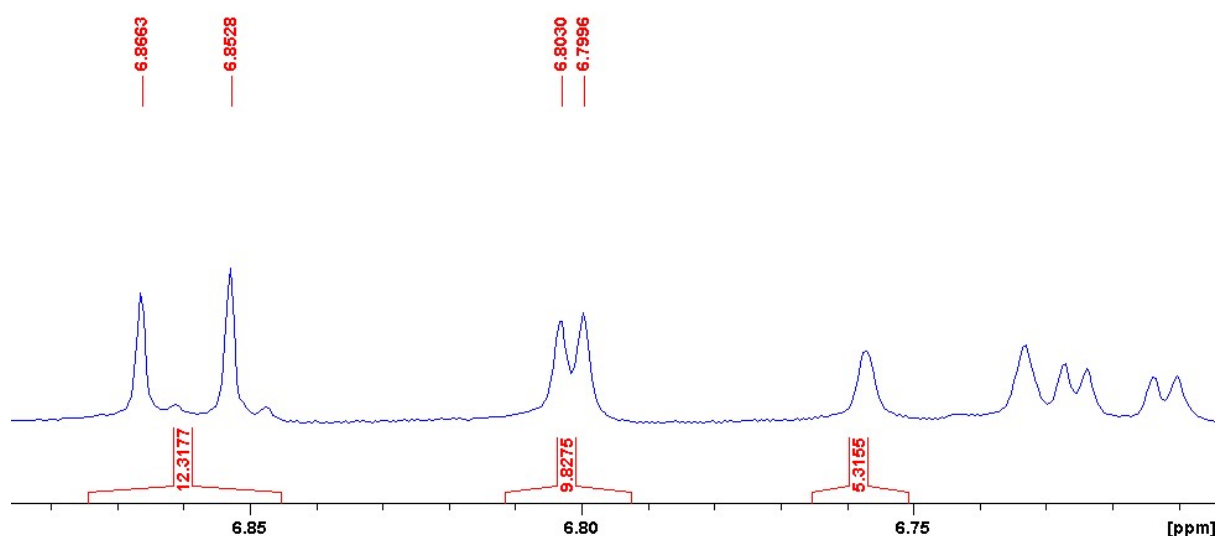
- Ni-NTA sem NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Ni-NTA sem $\Delta 19T$ /NCS, usada pela segunda vez. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (amostra submetida à temperatura de 37°C por 2 horas).

Amostra 2:

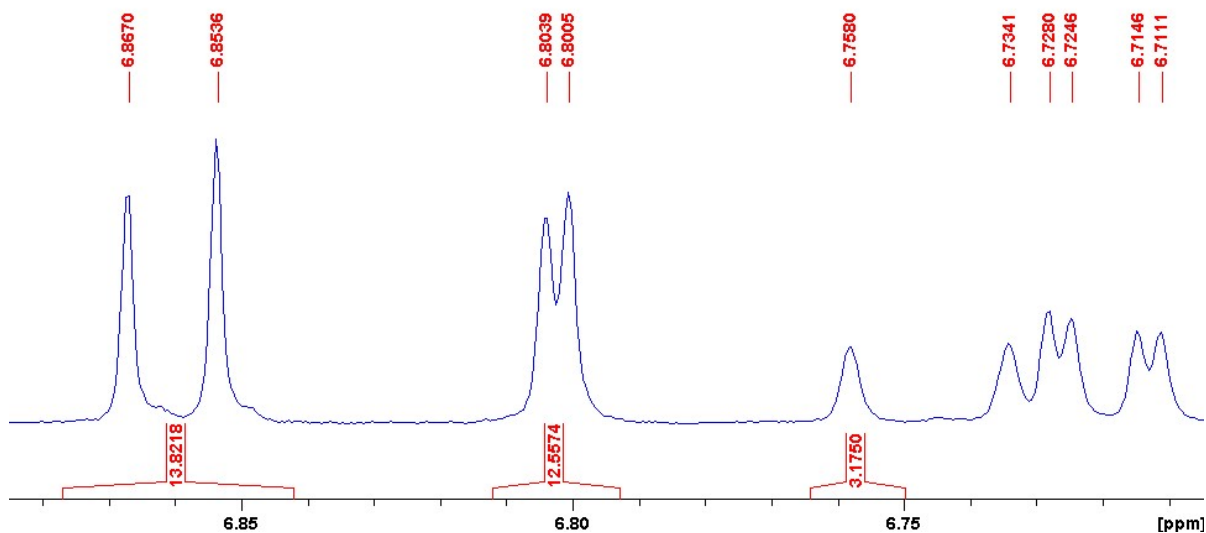
- Celite 545 sem NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Celite sem $\Delta 19T/\text{NCS}$, usada pela segunda vez. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 3:

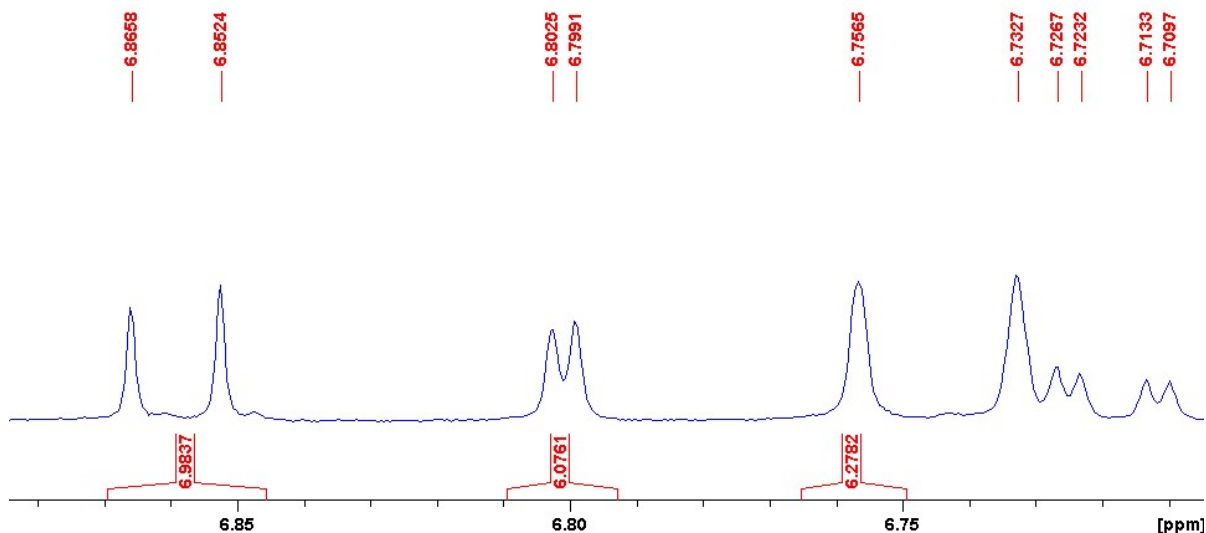
- Dowex 1 com NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Dowex 1 com $\Delta 19T/\text{NCS}$, usada pela segunda vez. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 4:

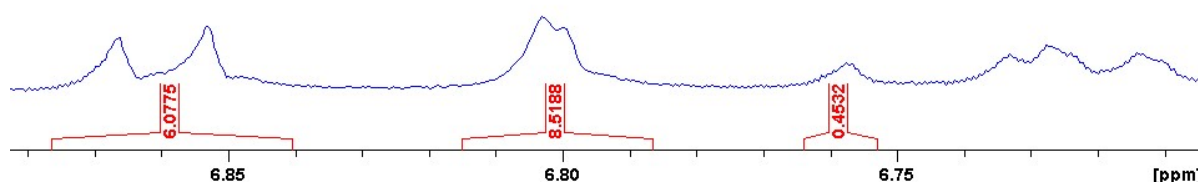
- Caolin com NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Caolin com $\Delta 19T/\text{NCS}$, usada pela segunda vez. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 5:

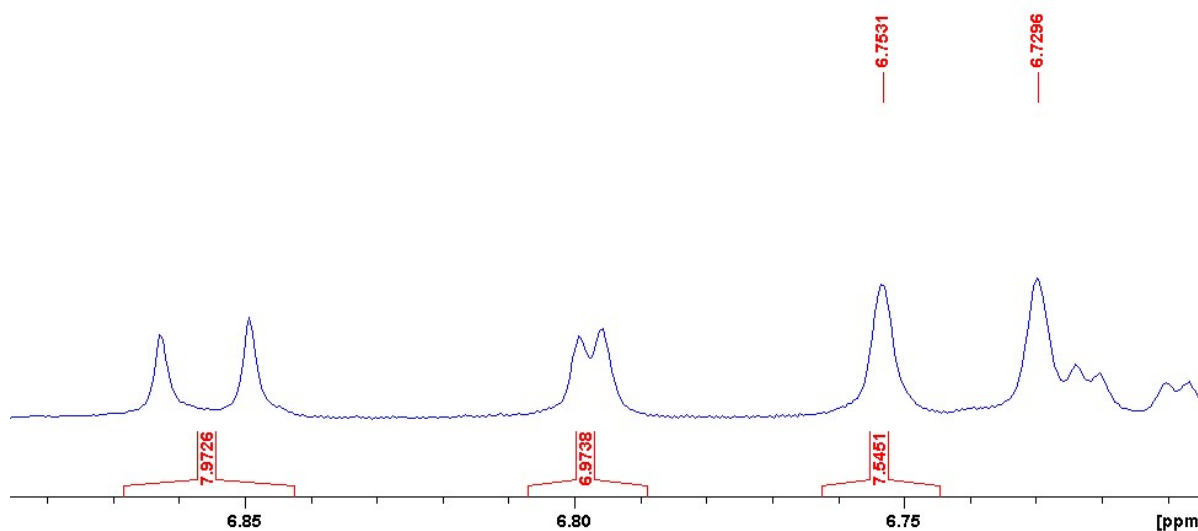
- Diaion HP-2MG com NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Daion HP-2MG com $\Delta 19T/\text{NCS}$, usada pela segunda vez. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 8:

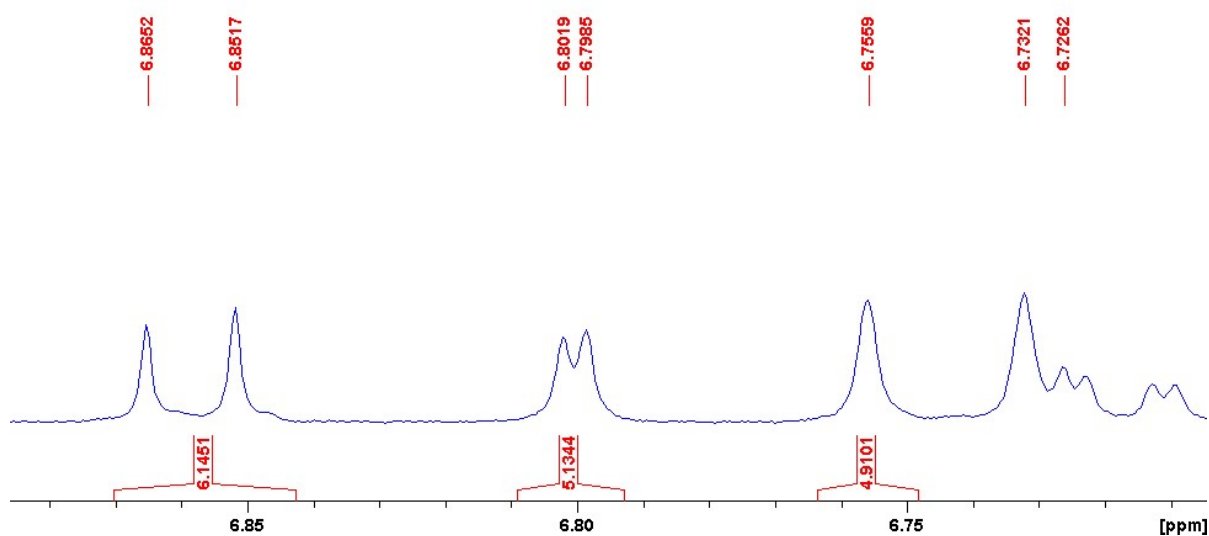
- Ni-NTA com NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Ni-NTA com $\Delta 19T/\text{NCS}$, usada pela segunda vez. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duming scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 9:

- Celite 545 com NCS

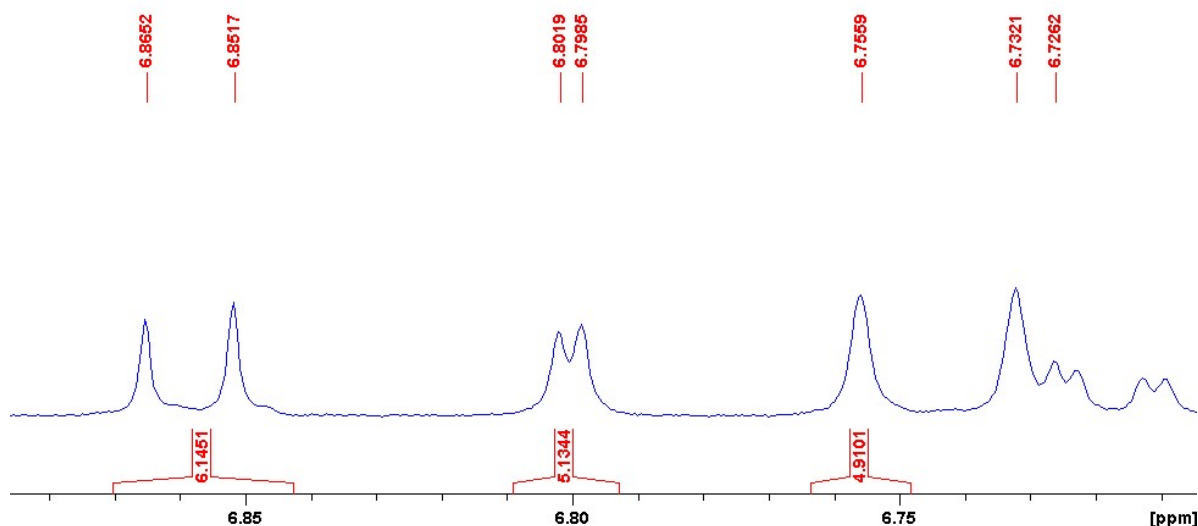


Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Celite 545 com $\Delta 19T/\text{NCS}$, usada pela segunda vez. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duming scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostras da terceira reação a 37°C

Amostra 6:

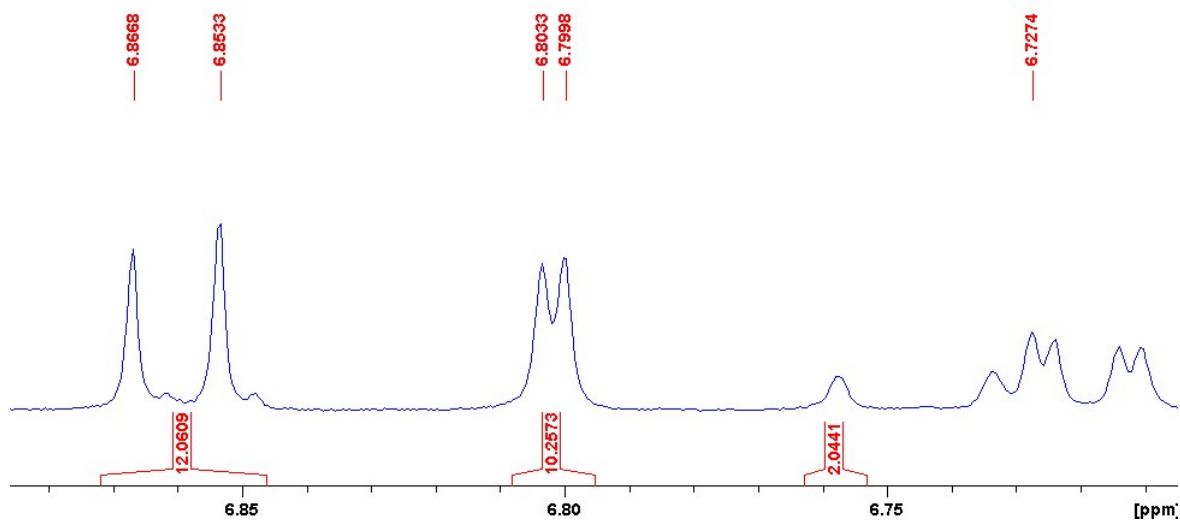
- NCS livre



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença de $\Delta 197$ /NCS livre. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 7:

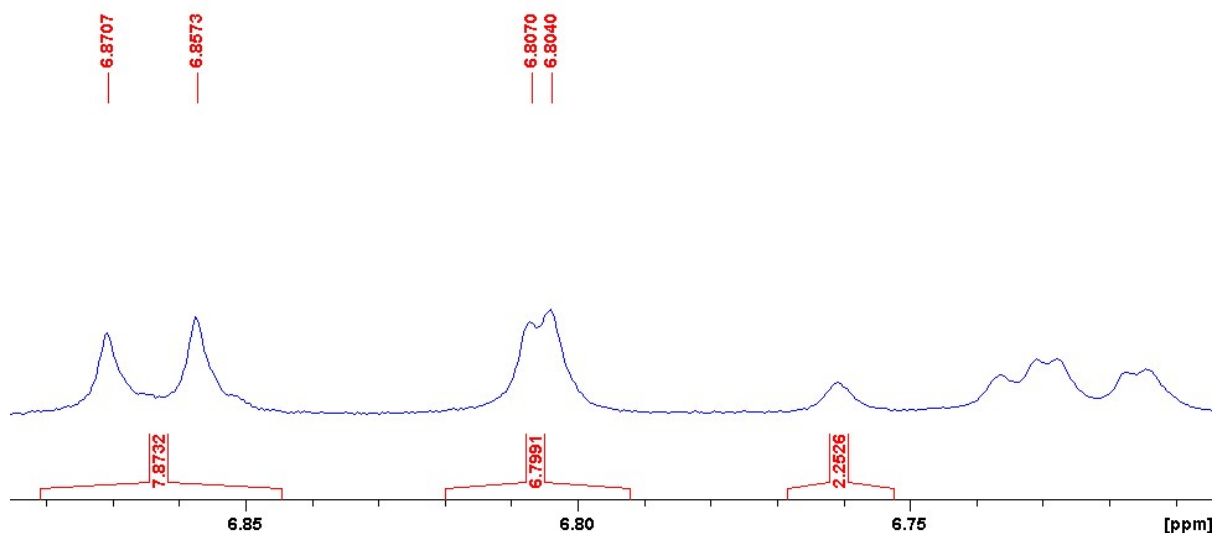
- Controle (reagentes sem NCS)



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 sem a presença de $\Delta 19T/NCS$. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 1:

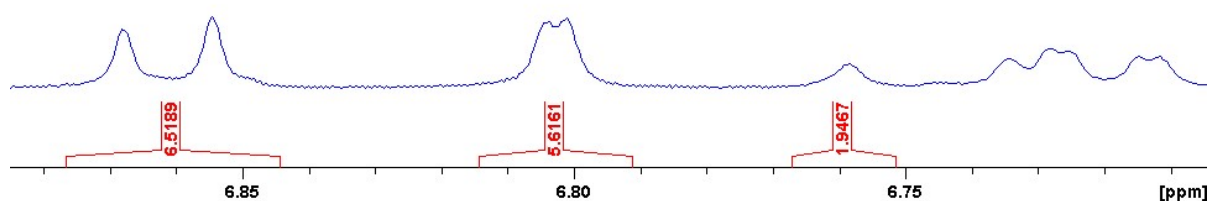
- Ni-NTA sem NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Ni-NTA sem $\Delta 19T/NCS$, usada pela terceira vez. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 2:

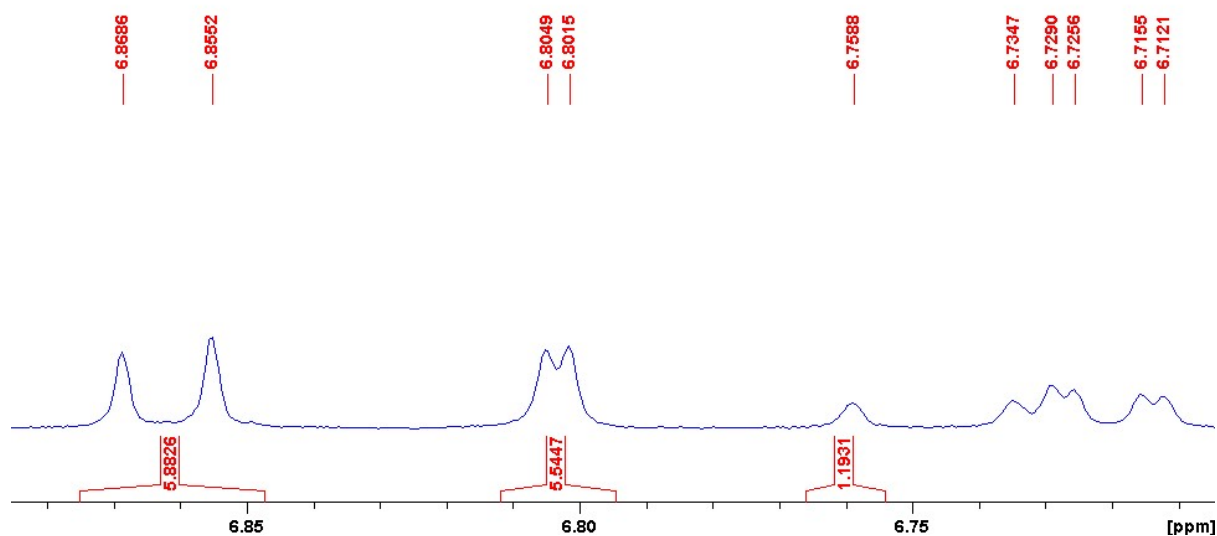
- Celite 545 sem NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 sem a presença da matriz Celite 545 sem $\Delta 19T/\text{NCS}$, usada pela terceira vez. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duming scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 3:

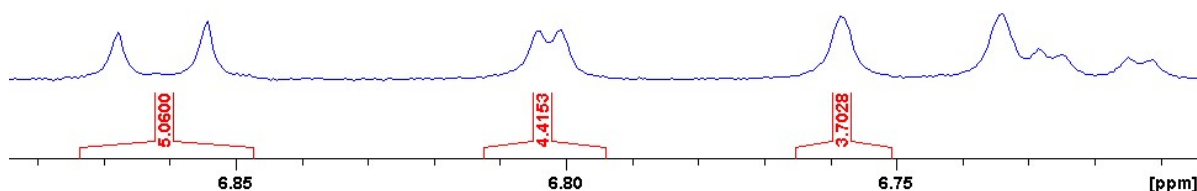
- Dowex 1 com NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Dowex 1 com $\Delta 19T/\text{NCS}$, usada pela terceira vez. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duming scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 4:

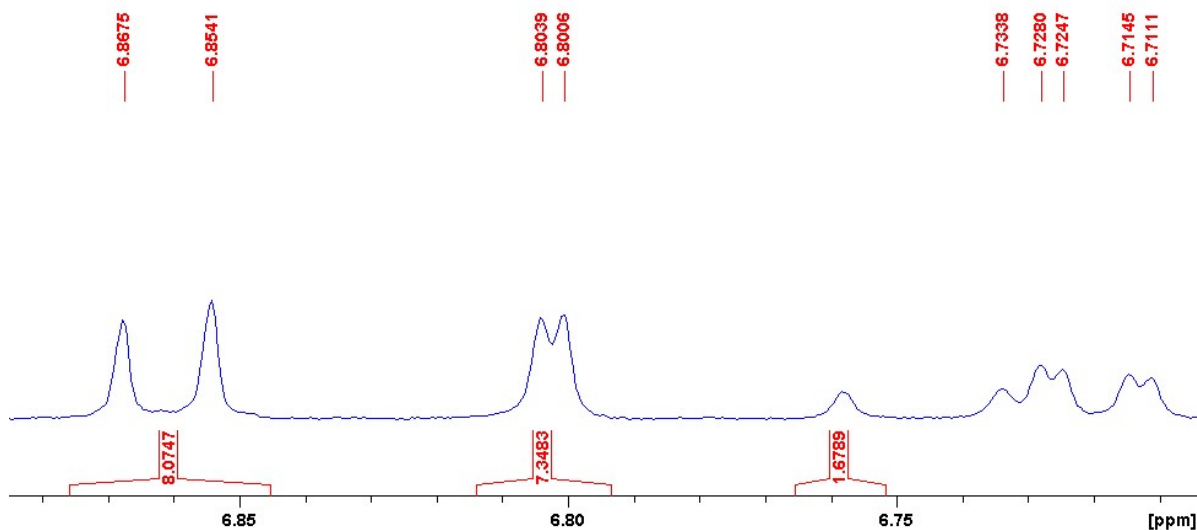
- Caolin com NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Caolin com $\Delta 19T/\text{NCS}$, usada pela terceira vez. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 5:

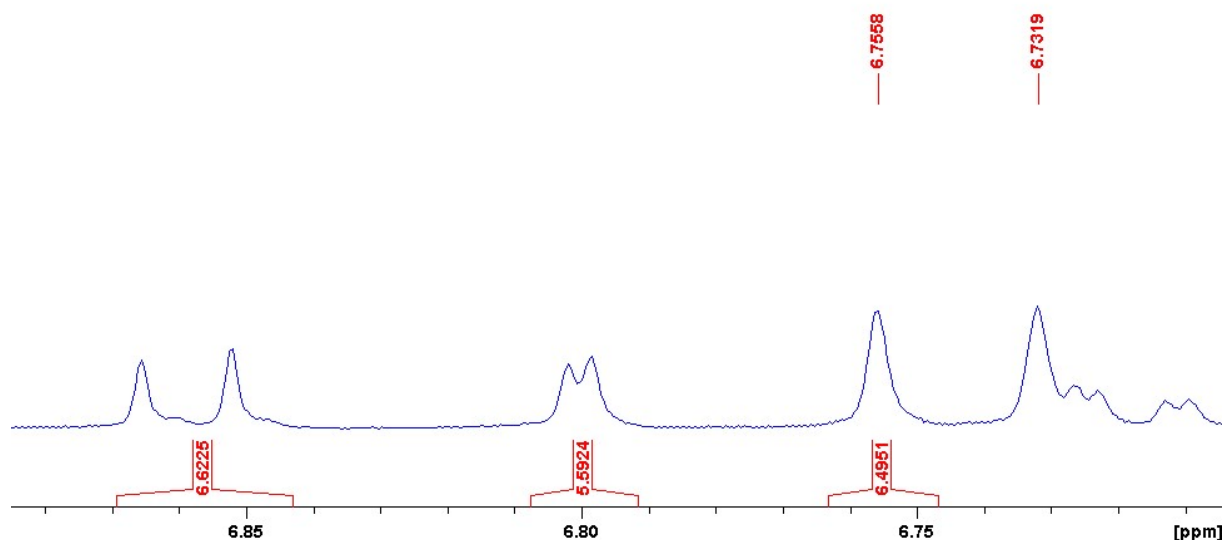
- Diaion HP-2MG com NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Diaion HP-2MG com $\Delta 19T/\text{NCS}$, usada pela terceira vez. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 8:

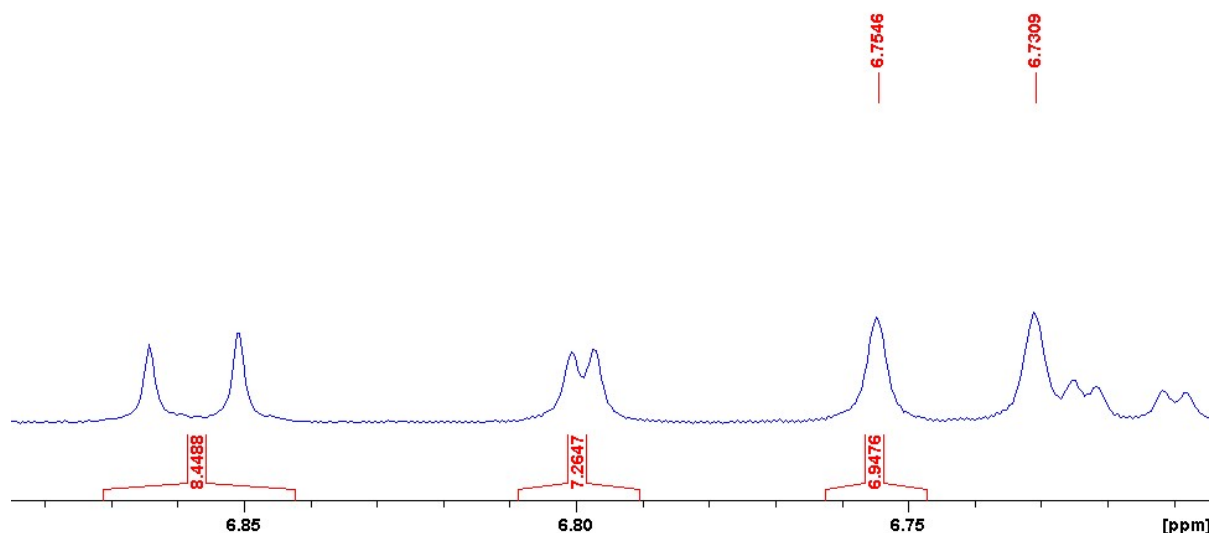
- Ni-NTA com NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Ni-NTA com $\Delta 19T/\text{NCS}$, usada pela terceira vez. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostra 9:

- Celite 545 com NCS

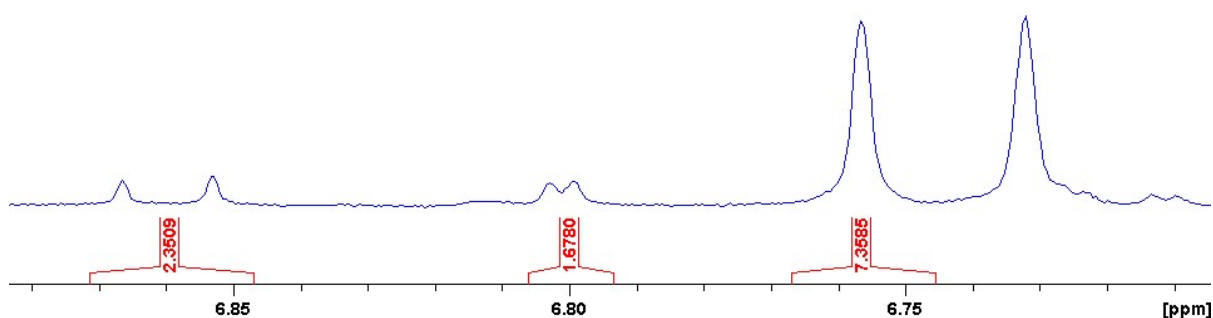


Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Celite 545 com $\Delta 19T/\text{NCS}$, usada pela terceira vez. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 37°C por 2 horas).

Amostras da reação a 47°C

Amostra 6:

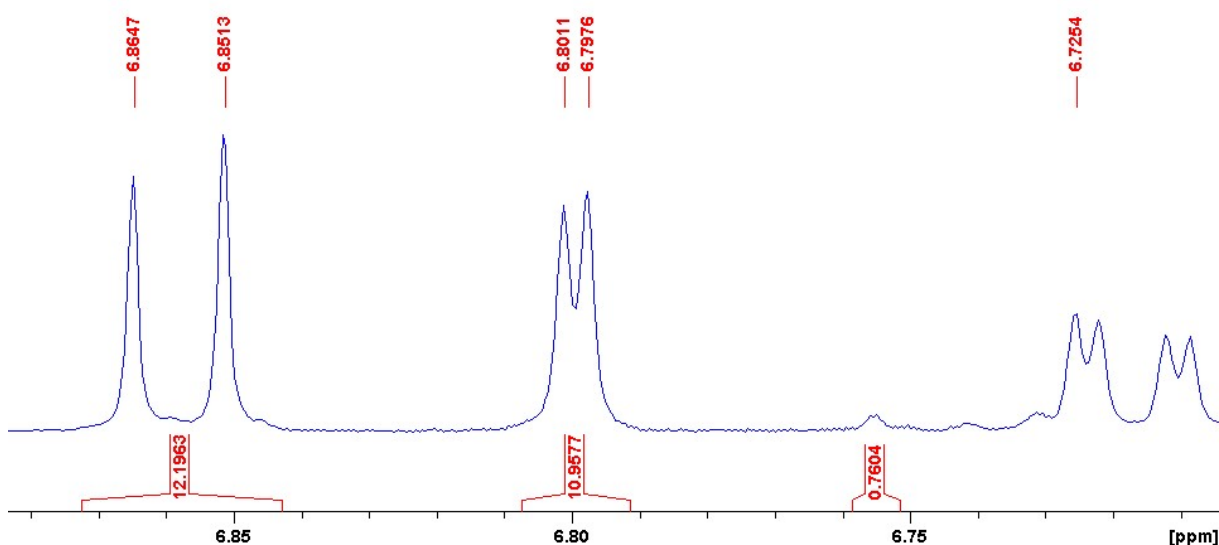
- NCS livre



Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença de $\Delta 19T$ /NCS livre à 47°C. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz. Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 47°C por 2 horas).

Amostra 7:

- Controle (reagentes sem NCS)

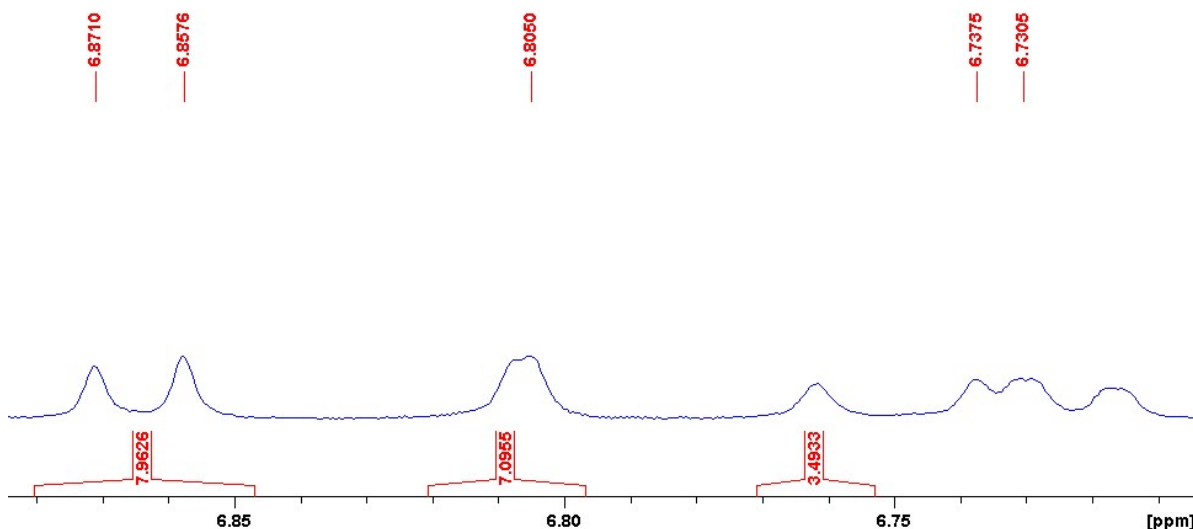


Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 sem a presença de $\Delta 19T$ /NCS, à 47°C. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz.

MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 47°C por 2 horas).

Amostra 3:

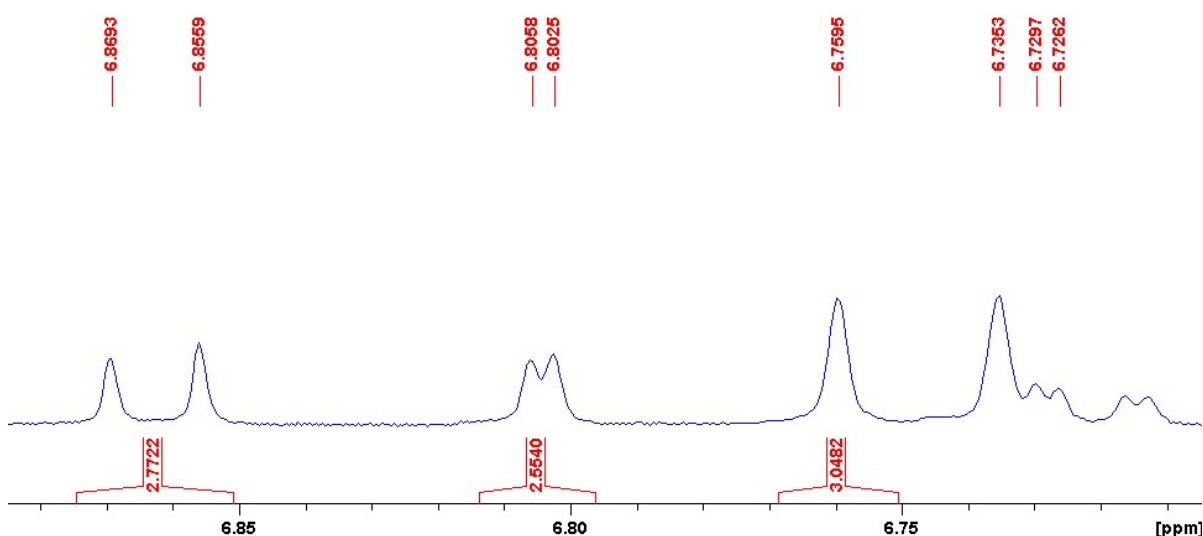
- Dowex 1 com NCS



Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 sem a presença da matriz Dowex 1 com $\Delta 19T/NCS$, à 47 °C. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 47°C por 2 horas).

Amostra 4:

- Caolin com NCS

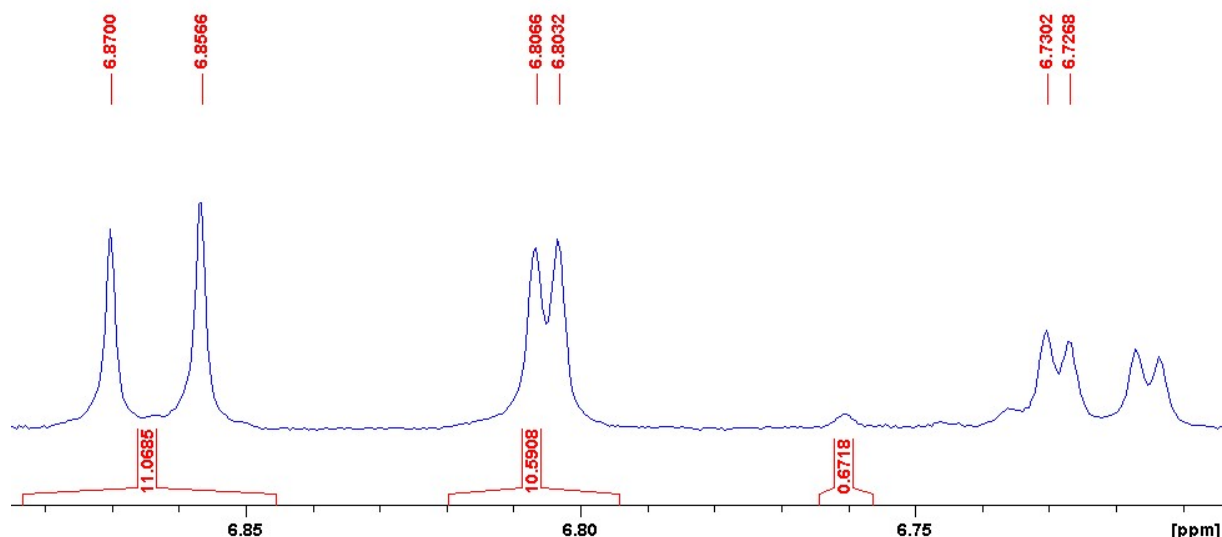


Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2,5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Caolin com $\Delta 19T/NCS$, à 47 °C. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance

Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 47°C por 2 horas).

Amostra 5:

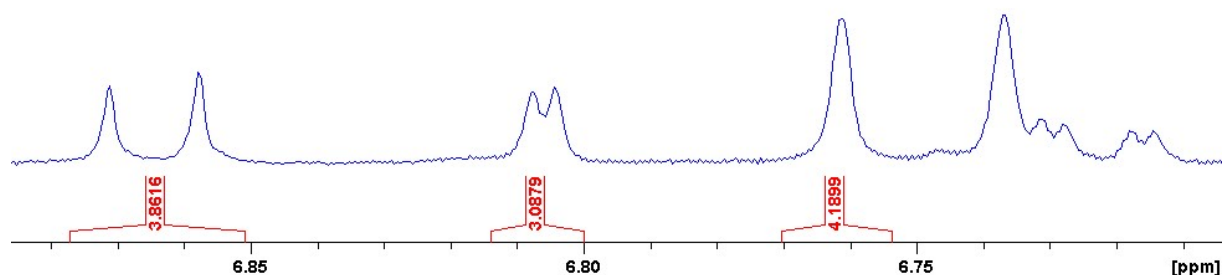
- Diaion HP-2MG com NCS



Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Diaion HP-2MG com Δ19T/NCS, à 47 °C. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 47°C por 2 horas).

Amostra 8:

- Ni-NTA com NCS

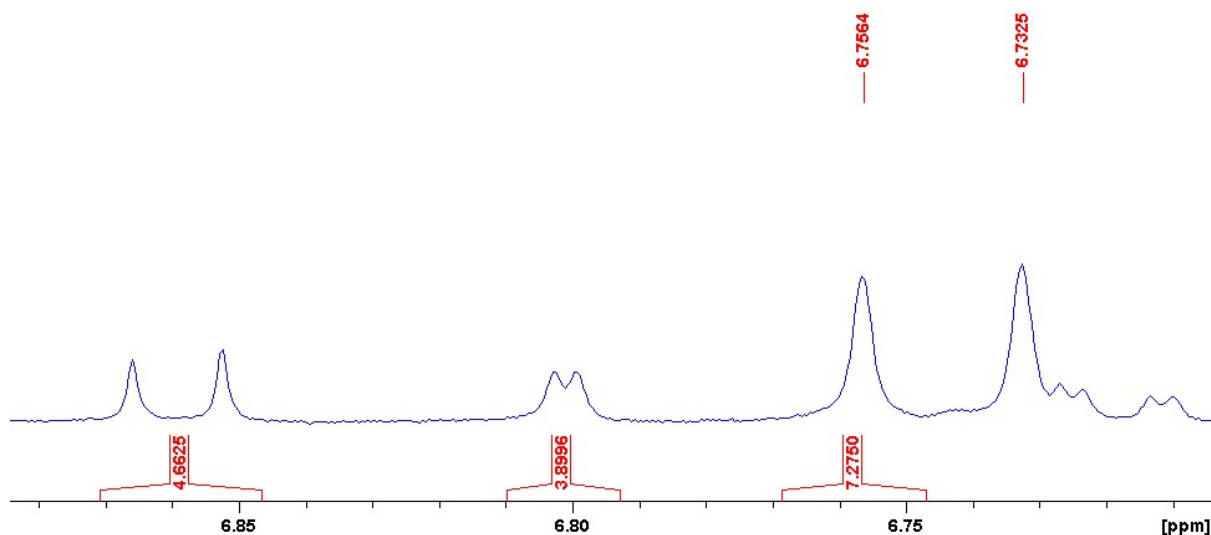


Espectro de RMN de ¹H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Ni-NTA com Δ19T/NCS, à 47 °C. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker

Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 47°C por 2 horas).

Amostra 9:

- Celite 545 com NCS



Espectro de RMN de ^1H obtido de amostra de reação entre dopamina 2.5 mM e hexanal 2,5 mM em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0 com 5 mM de ácido ascórbico, 10% v/v DMSO não deuterado e 10% v/v de DMSO D6 na presença da matriz Celite 545 com $\Delta 19T/NCS$, à 47 °C. O espectro foi adquirido a 298,1 K em um espectrômetro Bruker Avance Neo 600 MHz Os parâmetros experimentais foram: número de scans = 128; número de duning scans = 4, tempo de recuperação = 20 s e sequência de pulso Bruker noesygppr1d. (Reação à 47°C por 2 horas).