

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/11/2020.

ÉVERTON ALVES TORDATO

CASCATAS MULTIENZIMÁTICAS APLICADAS NA SÍNTESE
ESTEREOSELETIVA DE β -HIDROXIAMIDAS

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química

Orientadora: Prof^a Dr^a Cintia Duarte de Freitas Milagre

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

T677c Tordato, Éverton Alves
Cascatas multienzimáticas aplicadas na síntese
estereosseletiva de beta-hidroxiamidas / Éverton Alves
Tordato. – Araraquara : [s.n.], 2018
100 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Cintia Duarte de Freitas Milagre

1. Biocatálise. 2. Síntese assimétrica. 3. Enantiômeros.
4. Metaloenzimas. 5. Oxidorredutases. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Cascatas multienzimáticas aplicadas na síntese estereosseletiva de -hidroxi amidas"

AUTOR: EVERTON ALVES TORDATO

ORIENTADORA: CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof3. Dr3. CINTIA DUARTE MILAGRE
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP -Araraquara

'KJ4 vrfL?.D-Wi

Prof. Dr. RA AEL MAFRA DE PAULA DIAS
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. PAULO JOSÉ SAMENHO MORAN
Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 28 de novembro de 2018

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Éverton Alves Tordato

Nome em citações bibliográficas: TORDATO, É. A.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Pós-graduação (*stricto sensu*), Mestrado em Química, Área de Concentração: Química Orgânica, Título: “Cascatas Multienzimáticas Aplicadas na Síntese Estereosseletiva de β -hidroxiamidas” sob orientação da Prof^a Dr^a Cintia Duarte de Freitas Milagre, no Instituto de Química de Araraquara (IQAr - UNESP), Araraquara/SP, Brasil, 2016 - 2018
- Graduação em Bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas pelo Centro Universitário Hermínio Ometto (FHO – UNIARARAS), Araras/SP, Brasil, 2012 - 2015.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- Minicurso “Química Sustentável: Aplicações no meio acadêmico e na indústria”, promovido pelo Centro de Excelência para Pesquisa em Química Sustentável (CERSusChem) realizado na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos/SP, Brasil, 05 de outubro de 2017, 8 horas.
- Minicurso “Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas por HPLC – estratégias e discussões voltadas à indústria”, com carga horária de 16 horas, realizado no Centro Universitário Hermínio Ometto (FHO – UNIARARAS), Araras/SP, Brasil, 2015.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos submetidos para publicação

- TORDATO, É. A.; MACHADO, L. H. C.; MILAGRE, C. D. F.; MILAGRE, H. M. S.; Artificial linear bi-enzymatic cascades: simultaneous and sequential modes for the synthesis of (S)-3-hydroxy-3-phenylpropanamide, Organic & Biomolecular Chemistry (submetido)

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

- **TORDATO, É. A.**; MACHADO, L. H.C.; MILAGRE, C. D. F.; Sequential cascade reactions toward the synthesis of (S)-3-hydroxy-3-phenylpropanamide, painel, 17th BMOS - Brazilian Meeting on Organic Synthesis, Salvador/BA, Brasil, 21 - 24 de outubro de 2018.

- **TORDATO, É. A.**; MACHADO, L. H.C.; MILAGRE, C. D. F.; Biocatalytic cascade reactions: a sustainable process for the stereoselective synthesis of β -hydroxyamides, painel, 1st Brazilian Symposium on Sustainable Chemistry, São Pedro/SP, Brasil, 1 - 3 de outubro de 2018.
- MACHADO, L. H. C.; **TORDATO, E. A.**; MILAGRE, C. D. F.; Síntese dos padrões usados nas reações biocatalíticas visando a síntese de β -hidroxi(amino)amidas, painel, 30^o Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Araraquara/SP, Brasil, 26 - 27 de setembro de 2018.
- **TORDATO, É. A.**; MACHADO, L. H. C.; MILAGRE, C. D. F.; β -hydroxy(amino)amides: enzymatic catalysis via nitrile hydratases and ketoreductases, painel, 41^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química: Construindo o Amanhã, Foz do Iguaçu/PR, Brasil, 21 - 24 de maio de 2018
- **TORDATO, É. A.**; MILAGRE, C. D. F.; Screening of nitrile hydratases for the synthesis of 3-oxo-3-phenylpropanamide and 3-hydroxy-3-phenylpropanamide, painel, Workshop do Centro de Excelência para Pesquisa em Química Sustentável (CERSusChem), São Pedro/SP, Brasil, 06 - 07 de outubro de 2017.

Apresentações de trabalho e/ou palestra

- **TORDATO, É. A.**; MACHADO, L. H.C.; MILAGRE, C. D. F.; Biocatalytic cascade reactions: a sustainable process for the stereoselective synthesis of β -hydroxyamides, 1st Brazilian Symposium on Sustainable Chemistry, painel, São Pedro/SP, Brasil, 1 - 3 de outubro de 2018.
- **TORDATO, É. A.**; MILAGRE, C. D. F.; Screening of nitrile hydratases for the synthesis of 3-oxo-3-phenylpropanamide and 3-hydroxy-3-phenylpropanamide, painel, Workshop do Centro de Excelência para Pesquisa em Química Sustentável (CERSusChem), painel, São Pedro/SP, Brasil, 06 - 07 de outubro de 2017.

Estágios e Bolsas Auxílio

- Bolsa de mestrado no período de 01/08/2016 a 31/07/2018, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Processo: 134686/2016-0
- Bolsa de graduação 50% no período 02/2012 a 12/2013 e 100% no período de 01/2014 a 12/2015, Programa Universidade para todos (PROUNI)
- Estágio docência na disciplina de Química Orgânica Experimental I para o curso de graduação em química (BQ/BQT) realizado no 2^o semestre de 2017 sob supervisão da Prof^a Dr^a Lidiane Gaspareto Felipe e Prof^a Dr^a Maysa Furlan no Instituto de Química de Araraquara (IQAr – UNESP), Araraquara/SP, Brasil, 2017.
- Estágio no Laboratório de Análises e Simulação Tecnológica (LAST) do Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-economia rural da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) *campus* Araras, sob supervisão da Prof^a Dr^a Maria Teresa Mendes Ribeiro Borges com bolsa da Fundação de Apoio Institucional ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FAI.UFSCar, Araras/SP, Brasil, 08/04 a 31/12 de 2015.

Participação em eventos

- 1ª e 2ª Olimpíada interna de química (OLINQUI) no Centro Universitário Hermínio Ometto.
- 7º, 8º e 9º Congresso Científico UNIARARAS
- 8ª Feira de Profissões do Centro Universitário Hermínio Ometto
- Pint of Science Araraquara
- 1ª Escola de Verão do Instituto de Química de Araraquara
- 30º Congresso de Iniciação Científica da UNESP

Organização de eventos

- Integrante da equipe de apoio do festival internacional de divulgação científica Pint of Science, Araraquara, 15 – 17 de maio de 2017, 15 horas.

Minicursos ministrados

- Integrante da equipe de organização e realização do minicurso “Biocatálise: fundamentos e imobilização de biocatalisadores” na 1ª Escola de Verão do Instituto de Química de Araraquara (IQAr/UNESP), Araraquara/SP, Brasil, 26 de fevereiro – 02 de março de 2018, 20 horas.

DEDICATÓRIA

*À minha família, especialmente para meus pais,
Conceição e Sebastião e meu irmão Émerson*

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo auxílio financeiro, essencial para que eu pudesse me dedicar com afinco ao meu desenvolvimento científico e a este projeto de pesquisa.

Ao Instituto de Química de Araraquara e a UNESP pelo espaço e infraestrutura fundamentais para realização deste trabalho.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Cintia D. F. Milagre pela confiança, paciência, ensinamentos, incentivo e orientação ao longo destes dois anos.

À minha família, pela ajuda, apoio, confiança e incentivo, fundamental para que eu chegasse até aqui. Esta conquista também a vos pertence.

À força misteriosa que floresce em mim em meus estados niilistas e angustiantes.

Ao CERSusChem e INCT- BioNat pelo auxílio financeiro ao grupo de pesquisa.

À CAPES pela manutenção do Portal de Periódicos.

Ao Prof. Dr. Uwe Bornscheuer do Departamento de Biotecnologia e Catálise Enzimática do Instituto de Bioquímica da Universidade de Greifswald – Alemanha, pela colaboração e envio dos plasmídeos contendo as ω -transaminases

Ao Prof. Dr. Humberto M. S. Milagre pelas contribuições neste trabalho.

Aos colegas de laboratório: Gabriel, Iris, João Lucas, Laíza, Lucas, Maraylla e Noelle pela convivência, cafés, momentos descontraídos e discussões.

A todos funcionários do Instituto de Química pelo profissionalismo, atenção, dedicação e empenho, especialmente para o Rafa e a Márcia do laboratório didático de Química Orgânica, a Naira e ao Albertinho do Laboratório Multiusuário de Análises Químicas I, e a todo pessoal da manutenção, especialmente ao Sr. Antônio Carlos, Rogério e Afonso pela grande atenção e profissionalismo demonstrado.

À Prof^a Dr^a Isabele Rodrigues Nascimento e sua aluna de doutorado Camila Luiza Cunha pelas análises no polarímetro.

À Prof^a Dr^a Lourdes Campaner dos Santos pela análise no HPLC.

À Dr^a Bianca pela análise no LC-MS.

EPÍGRAFE

“Pior que não terminar uma viagem é nunca partir”

“Um homem precisa viajar por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar do calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser. Que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver”

Amyr Klink - Mar sem Fim, fevereiro de 2000

RESUMO

A tão almejada meta global de desenvolvimento sustentável pode ser facilitada, no âmbito dos processos químicos, pelo uso de biocatalisadores nas reações de sínteses orgânicas. O uso de sistemas em cascatas multienzimáticas propicia menor geração de resíduos, uma vez que dispensa o isolamento e purificação dos intermediários sintéticos, reduzindo, desta forma, o consumo de produtos químicos (especialmente solventes), energia, espaço e tempo. As β -hidroxiamidas são intermediários sintéticos que podem ser empregados como blocos construtores quirais na síntese de ingredientes farmacêuticos ativos, polímeros, heterociclos, etc. Neste trabalho, foram realizadas triagens com 3 diferentes classes de enzimas para serem utilizadas nas reações em cascata, sendo: 13 nitrila hidratases disponíveis comercialmente, 7 cetorredutases sendo 4 de células íntegras de microrganismos (*Bacillus cereus*, *Lysinibacillus boronitolerans*, *Saccharomyces cerevisiae* e MLH 15) e 3 enzimas isoladas disponíveis comercialmente (Horse Liver, Recombinante e *Saccharomyces cerevisiae*) e 9 ω -transaminases sendo 5 expressas heterologamente (*Aspergillus terreus*, *Chromobacterium violaceum*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Ruegeria pomeroyi* e *Vibrio fluvialis*) e 4 enzimas isoladas comerciais (*Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Neosartorya fischeri* e *Penicillium chrysogenum*) com a finalidade de investigar a atividade e estereosseletividade dessas enzimas frente aos compostos de interesse deste projeto. Nas triagens com nitrila hidratases, 4 enzimas apresentaram grande potencial para catalisar a conversão dos substratos benzoilacetoneitrila, *rac*-3-hidroxi-3-fenilpropanonitrila e *rac*-3-amino-3-fenilpropanonitrila nas amidas correspondentes com conversões que variaram de 86 - >99%. Não foi observada estereosseletividade para as enzimas nitrila hidratases. As conversões e ee dos microrganismos contendo cetorredutases com o substrato benzoilacetoneitrila foram de 5 - 26% e 87 - 92%, respectivamente, com formação predominante do enantiômero (S). Porém, a enzima cetorredutase isolada e recombinante apresentou conversão e ee >99 do enantiômero (S). Também foi realizado um ensaio com o microrganismo *Bacillus cereus* e a cetorredutase recombinante frente ao substrato 3-oxo-3-fenilpropanamida e nenhuma conversão foi observada. Em relação as ω -transaminases expressas heterologamente e as enzimas isoladas nenhuma conversão foi observada frente ao substrato benzoilacetoneitrila e 3-oxo-3-fenilpropanamida. Entretanto, como algumas enzimas nitrila hidratases haviam demonstrado grande potencial para a catálise dos três substratos citados acima e uma cetorredutase recombinante também havia apresentado excelente conversão e ee, o composto (S)-3-hidroxi-3-fenilpropanamida pôde ser obtido de duas formas diferentes de reações em cascata a partir da reação de redução/hidratação do substrato benzoilacetoneitrila. Na abordagem de reações em cascatas multienzimáticas simultânea a conversão foi de 83% e ee >99% e na abordagem de reações em cascatas multienzimáticas sequencial a conversão foi de >99% e ee >99% em condições ambientalmente amigáveis de reação e eliminando etapas de extração e purificação do intermediário. Portanto, essas metodologias mostraram-se promissoras para o desenvolvimento de um processo sustentável visando a obtenção de compostos versáteis com elevada pureza enantiomérica.

Palavras-chave: reações em cascata, β -hidroxiamida, estereosseletividade

ABSTRACT

The long-awaited global goal of sustainable development can be facilitated, in the context of chemical processes, by the use of biocatalysts in the organic synthesis reactions. The use of multi-enzymatic cascade systems results in less waste generation, since it eliminates the isolation and purification of synthetic intermediates, reducing the consumption of chemicals (especially solvents), energy, space and time. β -hydroxyamides are synthetic intermediates which can be employed as chiral building blocks in the synthesis of active pharmaceutical ingredients, polymers, heterocycles, etc. In this work, three different classes of enzymes were used for the cascade reactions: 13 nitriles hydratases commercially available, 7 keto reductases being 4 whole cells of microorganisms (*Bacillus cereus*, *Lysinibacillus boronitolerans*, *Saccharomyces cerevisiae* and MLH 15) and 3 isolated commercially available enzymes (Horse Liver, Recombinant and *Saccharomyces cerevisiae*) and 9 ω -transaminases, being 5 heterologously expressed (*Aspergillus terreus*, *Chromobacterium violaceum*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Ruegeria pomeroyi* and *Vibrio fluvialis*) and 4 commercially isolated enzymes (*Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Neosartorya fischeri* and *Penicillium chrysogenum*) with the purpose of investigating the activity and stereoselectivity of these enzymes with the substrates of interest of this project. In the screening of nitrile hydratase, 4 enzymes showed great potential to catalyze the conversion of the benzoylacetone nitrile, *rac*-3-hydroxy-3-phenylpropanenitrile and *rac*-3-amino-3-phenylpropanenitrile substrates into the corresponding amides with conversions ranging from 86 -> 99 %. No stereoselectivity was observed with these enzymes. Conversions and ee of the whole cells biocatalysts containing keto reductases with benzoylacetone nitrile were 5 - 26% and 87-92%, respectively, with predominant (*S*)-enantiomer formation. However, an isolated and recombinant keto reductase enzyme showed conversion and ee >99% of the (*S*)-enantiomer. An assay was also performed with *Bacillus cereus* and the recombinant keto reductase with 3-oxo-3-phenylpropanamide substrate and no conversion was observed. In relation to the heterologously expressed ω -transaminases and the isolated enzymes no conversion was observed with benzoylacetone nitrile and 3-oxo-3-phenylpropanamide substrates. However, since some nitrile hydratase enzymes presented great potential for the catalysis with the three substrates mentioned above and a recombinant keto reductase afforded excellent conversion and ee, the building block (*S*)-3-hydroxy-3-phenylpropanamide compound could be obtained in two different approaches of cascade reactions from the reduction/hydration reaction of the benzoylacetone nitrile substrate. In the simultaneous multi-enzymatic cascade reaction approach, conversion was 83% and ee > 99% and in the sequential multi-enzymatic cascade reaction approach, conversion and ee was >99% in both steps, under environmentally friendly reaction conditions and without step of extraction and isolation of the intermediate. Therefore, these methodologies are promising for the development of a more sustainable process toward the synthesis of versatile compounds with high enantiomeric purity.

Key words: cascade reactions, β -hydroxyamide, stereoselectivity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação estrutural de NHases dependentes de ferro (A) e cobalto (B)	23
Figura 2: Representação estrutural de uma ω –transaminase	26
Figura 3: Representação estrutural de uma cetorredutase	29
Figura 4: Cromatograma mostrando a separação dos compostos 1 e rac-3 utilizando a coluna Restek® (Coluna A).....	48
Figura 5: Cromatograma mostrando os sinais referentes aos enantiômeros do composto rac-3 utilizando a coluna quiral Lipodex E® (Coluna C)	49
Figura 6: Cromatograma mostrando os picos referentes aos enantiômeros do composto rac-4 utilizando a coluna quiral Lipodex E® (Coluna C)	52
Figura 7: Perfil cromatográfico da separação dos compostos 1 e rac-5 utilizando a coluna Restek® (Coluna A).....	53
Figura 8: Perfil cromatográfico para a separação dos enantiômeros do composto rac-5 utilizando a coluna Lipodex E® (Coluna C).....	55
Figura 9: Cromatograma mostrando os picos referentes aos enantiômeros do composto rac-6 utilizando a coluna quiral Hydrodex® β -3P (Coluna B).....	57
Figura 10: Espectro de massas da enamina formada	60
Figura 11: Bolsões do sítio catalítico da enzima ω -Ta	62
Figura 12: Conversão de 1 em (S)- 3 utilizando <i>B. cereus</i> ou MLH 15.....	65
Figura 13: Determinação do ee dos microrganismos <i>B. cereus</i> e MLH 15.....	65
Figura 14: Cromatograma da reação da <i>S.cerevisiae</i> com substrato 1 após 72 horas.	66
Figura 15: Determinação do excesso enantiomérico da <i>S. cerevisiae</i>	66
Figura 16: Consumo de 1 e formação dos produtos 1-A. , 1-A.R. , (S)- 3 de 0,5 a 96 horas de reação	69
Figura 17: Determinação dos excessos enantioméricos para a redução assimétrica do composto 1 em (S)- 3 catalisada pela enzima KRED recombinante	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Programação da temperatura para a coluna A, B e C	34
Tabela 2: Resultados das triagens das NHases com os substratos 1, rac-3 e rac-5	59
Tabela 3: Conversões e ee do substrato 1 em (S)-3 catalisada pelos microrganismos contendo KRED.....	64
Tabela 4: Conversões e ee de 1 para (S)-3 catalisada pelas enzimas KRED	72

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Possíveis transformações do substrato 1 catalisadas por NHases, KRED e ω -TA.....	19
Esquema 2: Síntese da fluoxetina e análogos utilizando o bloco construtor 3	20
Esquema 3: Processo biocatalítico para obtenção de amidas a partir de nitrilas catalisado por nitrila hidratase (NHase).....	24
Esquema 4: Proposta mecanística para a hidratação da acetonitrila catalisada por NHase	25
Esquema 5: Reação geral para obtenção de aminas primárias a partir de carbonilas de cetonas ou aldeídos	27
Esquema 6: Proposta mecanística para a aminação redutiva da carbonila	28
Esquema 7: Reação geral para obtenção de álcoois a partir de cetonas.....	29
Esquema 8: Proposta mecanística para a redução carbonila.....	30
Esquema 9: Possibilidades de reações em cascata multienzimáticas visando a obtenção dos blocos construtores 4 e 6	31
Fluxograma 1: Etapas para o desenvolvimento do projeto	45
Esquema 10: Reação geral para hidrólise ácida da nitrila de 1 em 2	46
Esquema 11: Reação geral para redução da carbonila de 1 em <i>rac-3</i>	48
Esquema 12: Reação geral para a hidratação da nitrila de <i>rac-3</i> em <i>rac-4</i>	50
Esquema 13: Reação geral para a aminação redutiva da carbonila de 1 em <i>rac-5</i>	52
Esquema 14: Reação geral para a hidratação da nitrila de <i>rac-5</i> em <i>rac-6</i>	55
Esquema 15: Reação geral de hidratação da nitrila catalisada por NHase	58
Esquema 16: Reação entre o substrato 1 e a feniletilamina	60
Esquema 17: Reação geral para a aminação redutiva da carbonila de 1 e 2 catalisada por ω -TA	61
Esquema 18: Aminação redutiva do substrato 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona catalisada pelos extratos enzimáticos. Aminação redutiva da carbonila do substrato 4-fenil-2-butanona catalisada por <i>A. fumigatus</i>	62
Esquema 19: Obtenção da (S)- β -fenilalanina via reação em cascata partindo de 1	63
Esquema 20: Reação geral para a redução assimétrica da carbonila de 1 para formação de (S)- 3	63
Esquema 21: Representação da Regra de Prelog para estereosseletividade.....	67
Esquema 22: Formação do produto 1-A na presença de <i>S. cerevisiae</i> e glicose.....	67
Esquema 23: Proposta mecanística para a primeira etapa da formação do produto 1-A via condensação aldólica ácida	68
Esquema 24: Ciclo catalítico da enzima enoato redutase para redução da ligação dupla C=C do Intermediário A levando a formação de 1-A	68

Esquema 25: Reação Geral para redução assimétrica da carbonila de 1 para (S)-3 utilizando a enzima KRED.....	71
Esquema 26: Reação em cascata sequencial para a obtenção do bloco construtor (S)-4 a partir de 1	75
Esquema 27: Reação em cascata simultânea para a obtenção do bloco construtor (S)-4 de 1	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATR - *Attenuated total reflection* (Reflexão total atenuada)

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

DEPT – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (Intensificação por transferência de polarização sem distorção)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC – *Dry Silica Chromatography* – (Cromatografia em sílica seca)

ee - excesso enantiomérico

GC-FID - *Gas Chromatography/Flame Ionization Detector* (Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chama)

GC-MS - *Gas Chromatography/Mass Spectrometry* (Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas)

GDH - *Glucose Dehydrogenase* (Glicose desidrogenase)

IPA – *Isopropyl alcohol* (Álcool isopropílico)

IUBMB - *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)

IV - Infravermelho

J - Constante de acoplamento

KRED - *Ketoreductases* (Cetorreductases)

m/z - razão massa carga

NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NB - *Nutrient Broth* (Meio Nutriente)

NHases - Nitrila Hidratases

PLP - Piridoxal-5-fosfato

PMP - Piridoxamina-5-fosfato

ppm - partes por milhão

q.s.p. - quantidade suficiente para

RMN de ¹H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de ¹³C - Ressonância magnética nuclear de carbono

rpm – rotação por minuto

t.a. - temperatura ambiente

TMS - Tetrametilsilano

ω -TA - ω -transaminase

Sumário

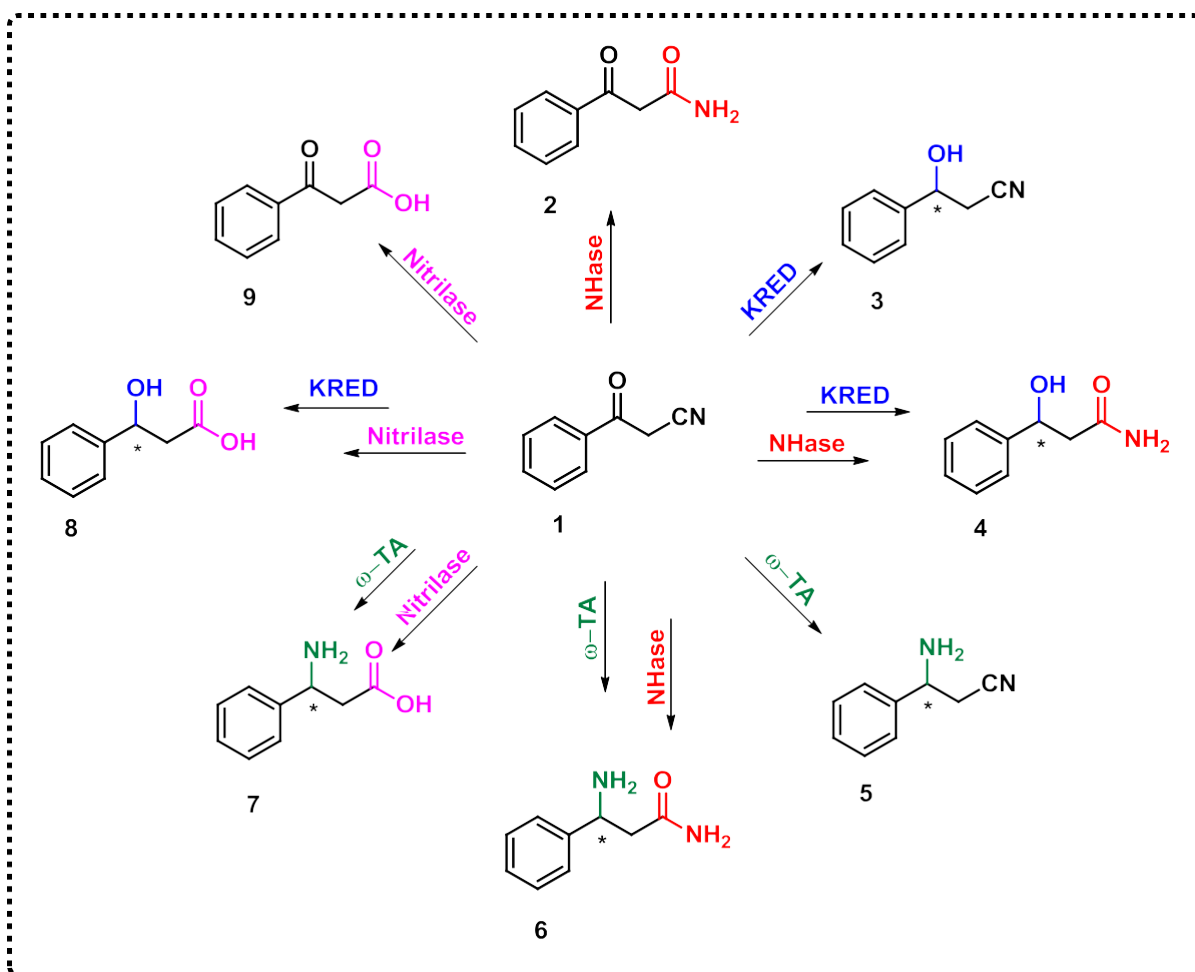
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Nitrila Hidratase (NHase)	23
1.2. ω -Transaminases (ω -TA).....	26
1.3. Cetorredutase (KRED).....	28
2. OBJETIVOS	31
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	32
3.1. Considerações Gerais.....	32
3.1.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^1H e ^{13}C)	32
3.1.2. Métodos Cromatográficos	32
3.1.3. Espectroscopia na região do infravermelho	35
3.1.4. Ponto de Fusão.....	35
3.1.5. Enzimas, Plasmídeos e Microrganismos	35
3.1.6. Reagentes e Solventes.....	35
3.1.7. Meio de Cultura.....	36
3.1.8. Solução Tampão.....	36
3.1.9. Esterilização	36
3.1.10. Manipulação dos microrganismos.....	36
3.1.11. Experimentos com microrganismos	36
3.1.12. Outros	36
3.2. Metodologias para as Sínteses e Dados Espectroscópicos dos Compostos ..	37
3.2.1. Síntese do composto 3-oxo-3-fenilpropanamida (2) ⁶¹	37
3.2.2. Síntese do composto <i>rac</i> -3-hidroxi-3-fenilpropanonitrila (rac-3) ^{14;64}	37
3.2.3. Síntese do composto <i>rac</i> -3-hidroxi-3-fenilpropanamida (rac-4) ⁸	38
3.2.4. Síntese do composto <i>rac</i> -3-amino-3-fenilpropanonitrila (rac-5).....	39
Segunda etapa: ⁶⁸	39
3.2.5. Síntese do composto <i>rac</i> -3-amino-3-fenilpropanamida (rac-6) ⁶¹	40
3.3. Reações com enzimas isoladas, extratos enzimáticos e células íntegras.....	41
3.3.1. Procedimento geral para triagem das NHases	41
3.3.2. Procedimento geral para triagem de ω -TA (extratos enzimáticos).....	42
3.3.3. Procedimento geral para triagem de ω -TA (enzimas).....	42
3.3.4. Procedimento geral para triagem das KRED (microrganismos).....	43
3.3.5. Procedimento geral para triagem das KRED (enzimas).....	43
3.3.6. Procedimento geral para as reações em cascata	44

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1. Estratégia de trabalho	45
4.2.1. Síntese do composto 2	46
4.2.2. Síntese do composto rac-3	47
4.2.3. Síntese do composto rac-4	50
4.2.4. Síntese do composto rac-5	52
4.2.5. Síntese do composto rac-6	55
4.3. Triagem das enzimas NHases	58
4.4. Triagem dos extratos enzimáticos e enzimas comerciais de ω -TA.....	59
4.5. Triagem de microrganismos contendo KRED	63
4.6. Triagem com as enzimas KRED isoladas	71
4.7. Desenvolvimento das reações em cascata simultânea e sequencial para obtenção do bloco construtor (S)-4	73
5. CONCLUSÕES	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
7. ANEXO.....	87

1. INTRODUÇÃO

A benzoilacetnitrila (**1**) é um substrato pró-quiral versátil devido às possibilidades de interconversão de seus grupos funcionais. Dessa forma, sua estrutura molecular pode ser transformada em diversos blocos construtores com variadas combinações de funcionalizações (Esquema 1). Sendo assim, apresenta uma gama de aplicações, como, por exemplo, na síntese dos fármacos fluoxetina e análogos¹⁻⁷ e levamisol⁸, além de também poderem ser utilizados como precursores na síntese de compostos de maior complexidade estrutural tais como, β -aminoálcoois⁹⁻¹⁴, heterociclos^{15;16}, polímeros¹⁷⁻²⁰, etc.

Esquema 1: Possíveis transformações do substrato **1** catalisadas por NHases, KRED e ω -TA

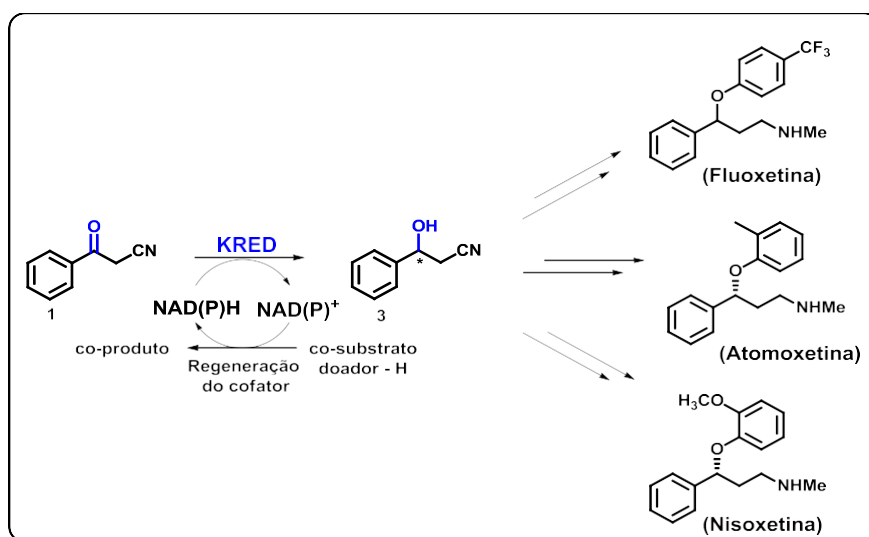


Fonte: Autor, 2018

A título de exemplo, o bloco construtor 3-hidroxi-3-fenilpropanonitrila (**3**) (Esquema 2) pode ser utilizado como intermediário sintético na produção da fluoxetina e análogos.^{8,21}

Entretanto, os procedimentos típicos de redução assimétrica de cetonas pró-quirais para a síntese de álcoois e formação de aminas primárias e a hidratação de nitrilas para a obtenção de amidas primárias apresentam características pouco atrativas do ponto de vista sustentável^{4-6, 15;16, 22-29}, como, por exemplo, reação sob alta pressão, uso de catalisadores metálicos (recursos não-renováveis), atmosfera inerte, etapa de purificação, geralmente excesso enantiomérico (ee) <99% e possibilidade de contaminação do fármaco com traços de metais pesados.^{30;31}

Esquema 2: Síntese da fluoxetina e análogos utilizando o bloco construtor **3**



Fonte: Adaptado de (HAMMOND, et al, 2007)²¹

Sendo assim, grandes esforços vêm sendo realizados para a obtenção dessa classe de compostos. Xie e colaboradores²³ obtiveram o composto (*S*)-3-hidroxi-3-fenilpropanamida (**S**)-**4** por meio de hidrogenação assimétrica do precursor 3-oxo-3-fenilpropanamida (**2**) utilizando irídio como catalisador sob pressão de 15 atm e atmosfera inerte com 20 horas reacionais e ee 98%. Wessjohann e colaboradores²⁶ sintetizaram o composto **4** em sua forma racêmica via reação de Reformatsky catalisada por cromo sob atmosfera inerte. González-Fernández e colaboradores^{15;16} obtiveram o composto **4** utilizando o substrato **1** em um processo *one-pot* com condições reacionais mais brandas, porém, em sua forma racêmica. Kitano e

colaboradores²⁹ sintetizaram o composto **3** e **4** utilizando sais de cobre e reações de adição com boro com ee 81%. β -ceto amidas como o composto **2**, são muito difíceis de serem obtidas ou não são acessíveis pelos métodos convencionais^{16,32}, além disso, a grande maioria das metodologias sintéticas para a formação de amidas, são apropriadas para a obtenção de amidas secundárias e terciárias.³³

Embora a síntese orgânica tenha atingido um elevado grau de desenvolvimento nas últimas décadas, os processos químicos convencionais ainda necessitam de grandes melhorias, principalmente tratando-se dos termos ecológicos e ambientais.³⁴ Diante dessa questão de sustentabilidade, torna-se cada vez mais relevante explorar o potencial celular ou até mesmo mimetizar a forma em que as reações ocorrem no interior das células, pois as células são as fábricas químicas mais eficientes conhecidas³⁵ onde as reações ocorrem em cascatas catalisadas por enzimas.

A biocatálise pode ser definida como a transformação química de um substrato não-natural em um número limitado de etapas catalisada por células íntegras ou enzimas isoladas.³⁶ O que a torna tão atrativa do ponto de vista sintético e ambiental são as condições brandas de reação em que a catálise pode ocorrer. Na grande maioria das vezes, a catálise ocorre sob pressão e temperatura ambiente, solução aquosa tamponada com pH próximo ao fisiológico e utiliza pequeno ou nenhum volume de solvente, para auxiliar na solubilização do substrato.^{37;38} Além disso, as enzimas são matérias-primas oriundas de fontes renováveis, biodegradáveis e potencialmente regio-, quimio- e enantiosseletivas na biotransformação de substâncias polifuncionalizadas.^{37;38} Dessa forma, evitam-se etapas de proteção e desproteção requeridas pela síntese tradicional e formação de subprodutos provenientes de processos de isomerização e rearranjos.^{37;38} Portanto, há considerável redução na geração de resíduos e consumo de energia.^{39;40}

As reações em cascata são consideradas uma abordagem promissora para a síntese sustentável de compostos que requerem mais de uma etapa de reação^{35,41}, pois evitam a extração e purificação de intermediários sintéticos. Dessa forma, há uma redução significativa na geração de resíduos e custos para a indústria⁴², conseqüentemente, o consumo de produtos químicos (especialmente solventes), energia, espaço e tempo é diminuído.^{34;35}

As reações em cascata podem ser classificadas de acordo com vários parâmetros, como, por exemplo, número de etapas, número de catalisadores, tipos de catalisadores, tipos de reações redox, tipos das reações químicas em cada etapa, etc.⁴² Todas essas requerem mais de um catalisador. No entanto, há três tipos de reações em cascata que utilizam somente um catalisador, que são: (I) as reações dominó em que a reação é iniciada por um catalisador e as etapas subsequentes ocorrem espontaneamente, (II) reação sequencial catalisada, como, por exemplo, a enzima multifuncional policetídeo sintase, sendo que quando dois ou mais catalisadores adicionados em tempos diferentes da reação também é conhecida como reação sequencial e (III) reação em cascata em que o substrato tem diferentes funcionalizações que podem ser transformadas pelo mesmo catalisador mais de uma vez.⁴² Para maiores discussões, ver referências ^{34;35;41;43-48}

Neste trabalho, definimos as reações como sendo em cascata simultânea ou sequencial. O que as diferem é o momento em que um segundo (bio)catalisador é adicionado na reação. Dessa forma, o parâmetro utilizado para classificar esse tipo de cascata é o parâmetro cronológico.⁴² Na Reação em Cascata Simultânea, a adição de todos os reagentes e (bio)catalisadores ocorrem no instante inicial da reação. Na Reação em Cascata Sequencial o segundo (bio)catalisador é adicionado somente quando o primeiro estágio atinge sua completude.^{35,42} O fato é que, adicionando todos os reagentes e (bio)catalisadores no início da reação ou não, ambas abordagens apresentam as mesmas vantagens relevantes citadas acima.³⁵

Portanto, diante do contexto exposto acima, a obtenção desses blocos construtores utilizando metodologias sintéticas sustentáveis torna-se de grande relevância. Além da economia de recursos naturais e energéticos, apresentam grande aplicação como intermediários sintéticos na produção de moléculas com atividades biológicas.

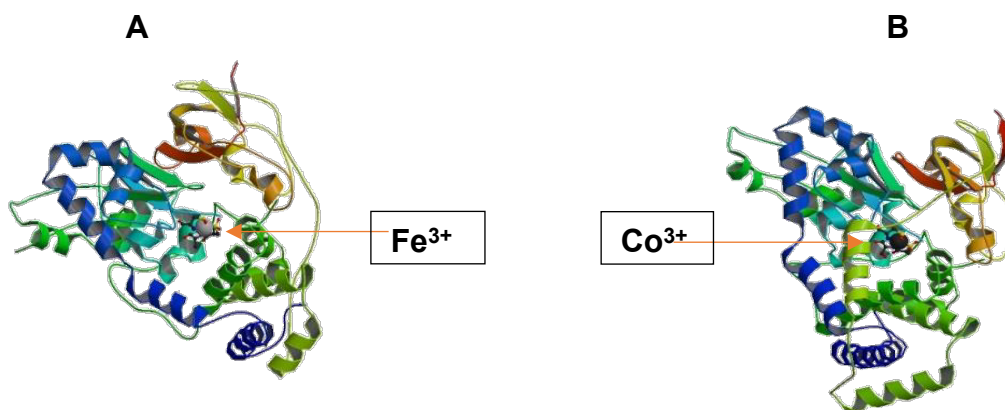
Sabendo que os blocos construtores ácido 3-amino-3-fenilpropanóico^{49;50} (**7**) e ácido 3-hidroxi-3-fenilpropanóico⁵¹ (**8**) já foram obtidos via reações em cascata multienzimáticas utilizando as enzimas ω -TA/nitrilase e KRED/ ω -TA, respectivamente, partindo do substrato **1**, torna-se de grande relevância a síntese estereosseletiva dos blocos construtores 3-hidroxi-3-fenilpropanamida (**4**) e 3-amino-3-fenilpropanamida (**5**) utilizando reações em cascata multienzimáticas. Para isso, três enzimas são

fundamentais: a enzima NHase, ω -TA e KRED. Na sequência, seguem maiores detalhes de cada enzima.

1.1. Nitrila Hidratase (NHase)

A enzima NHase, classificada pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) como EC 4.2.1.84, é uma metaloenzima que pode conter grupo ferro não-heme (Fe^{3+}) e cobalto não-corrinóide (Co^{3+}) como grupos prostéticos no centro catalítico (Figura 1). Estes grupos prostéticos variam com as espécies de microrganismos e definem se a enzima sofrerá ou não foto-ativação⁵². O fenômeno da foto-ativação ocorre somente com a enzima NHase do tipo ferro que necessita de luz para desempenhar sua atividade catalítica, após ocorrer a quebra da ligação do óxido nítrico (NO) com o íon metálico Fe^{3+} e ser trocado por uma molécula de água ou íon hidróxido (dependendo do pH).⁵²

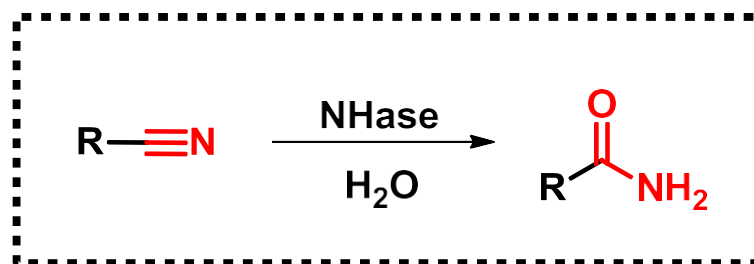
Figura 1: Representação estrutural de NHases dependentes de ferro (A) e cobalto (B)



Fonte: Protein Data Bank, estruturas 3A8L (Figura A) e 1IRE (Figura B)

A enzima NHase é responsável por catalisar a reação de hidratação da nitrila na amida correspondente sem a formação de ácido carboxílico, conforme apresentado no Esquema 3.

Esquema 3: Processo biocatalítico para obtenção de amidas a partir de nitrilas catalisado por nitrila hidratase (NHase)

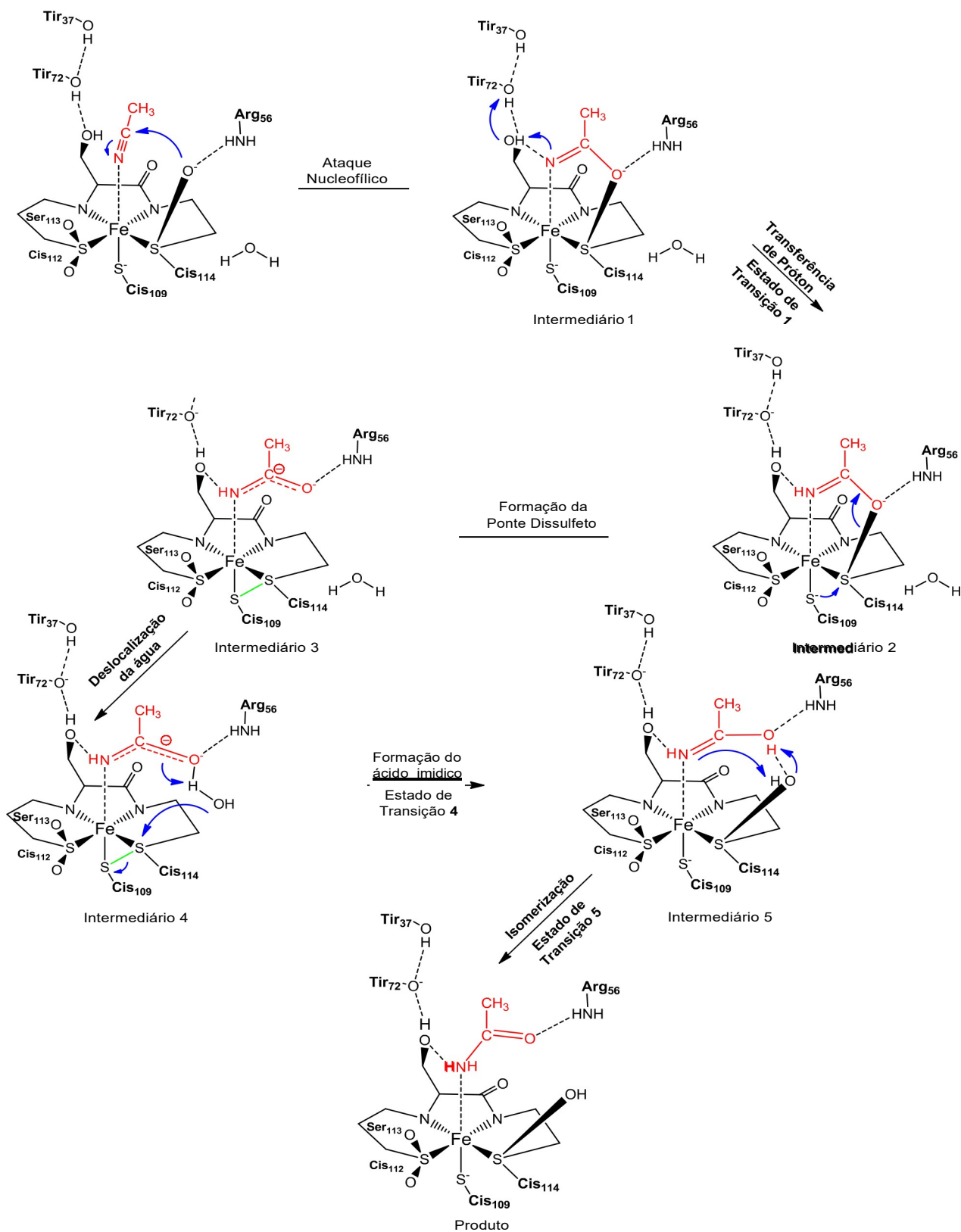


Fonte: (MASCHARAK, P. K.; 2013)⁵²

Muitos esforços vêm sendo realizados para a elucidação do mecanismo da enzima NHase (Esquema 4). Hopmann⁵³ em 2008 mostrou que na primeira etapa da catálise ocorre a formação de um intermediário cíclico a partir de um ataque nucleofílico do átomo de oxigênio de C-SO⁻ ao substrato coordenado com o metal. Em 2016, Kayanuma e colaboradores⁵⁴ concluíram que o aminoácido arginina (βR56), é essencial para a formação da ligação dissulfeto devido a formação de uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio da estrutura cíclica. Dessa forma, desempenha papel fundamental na atividade catalítica da enzima. Entretanto, algumas etapas ainda são pouco conhecidas, como, por exemplo, a formação do produto amida e a regeneração do sítio ativo da enzima.⁵⁴

Como dito anteriormente, na primeira etapa do mecanismo (Esquema 4) ocorre a formação de um intermediário cíclico via ataque nucleofílico do átomo de oxigênio ligado ao aminoácido C-SO⁻ ao substrato coordenado com o metal no sítio ativo. Na sequência, ocorre uma transferência de próton entre os resíduos Y72 → S113 → substrato, resultando na formação do intermediário cíclico protonado (Intermediário 2). Esta transferência é facilitada devido ao átomo de nitrogênio do substrato e os grupos hidroxilas dos resíduos S113, Y72 e Y37 formarem uma rede de ligações de hidrogênio, estabilizando o resíduo Y72 desprotonado. Logo após, ocorre a formação da ligação dissulfeto (Intermediário 3) entre a C109 e C114, a partir de um ataque nucleofílico do átomo de enxofre ligado ao resíduo C109. Quando o átomo de nitrogênio do substrato é protonado, o comprimento da ligação S-O se torna maior e da ligação C-O menor, facilitando a dissociação da ligação S-O e a formação da ligação S-S.⁵⁴

Esquema 4: Proposta mecânica para a hidratação da acetonitrila catalisada por NHase



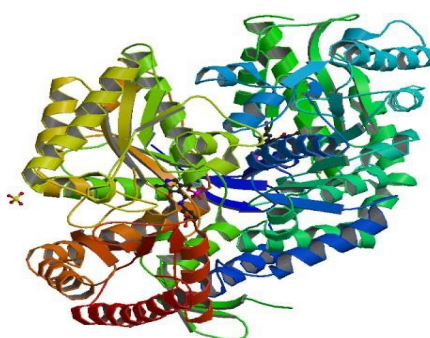
Fonte: Adaptado de (KAYANUMA et al, 2016)⁵⁴

A aproximação de uma molécula de água junto ao aminoácido C114, leva a formação do intermediário 4 e, posteriormente, o átomo de enxofre do aminoácido C114 sofre um ataque nucleofílico do oxigênio da molécula de água, resultando na formação do ácido imídico (Intermediário 5). A formação da ligação S-O do resíduo C114 e a dissociação da ligação S-S entre os resíduos C109 e C114 ocorrem simultaneamente. Após a formação do intermediário 5, ocorre a isomerização do mesmo para o produto amida. Esta etapa é catalisada pelo ácido sulfênico do resíduo C114-SOH que envolve transferência de prótons do oxigênio do ácido imídico para a C114-SOH e da C114-SOH para o nitrogênio do ácido imídico. Quando uma nova molécula de água se aproxima do sítio ativo, ocorre a dissociação do produto amida do íon metálico. A coordenação da molécula de água com o íon metálico se dá em três etapas sequenciais de transferência de próton: C114-SOH → molécula de água coordenada → S113 → Y72, resultando na restauração da estrutura inicial do sítio ativo da NHase.⁵⁴

1.2. ω -Transaminases (ω -TA)

As ω -TA pertencem à classe das transferases, classificadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular como EC 2.6.1.X⁵⁵ (Figura 2)

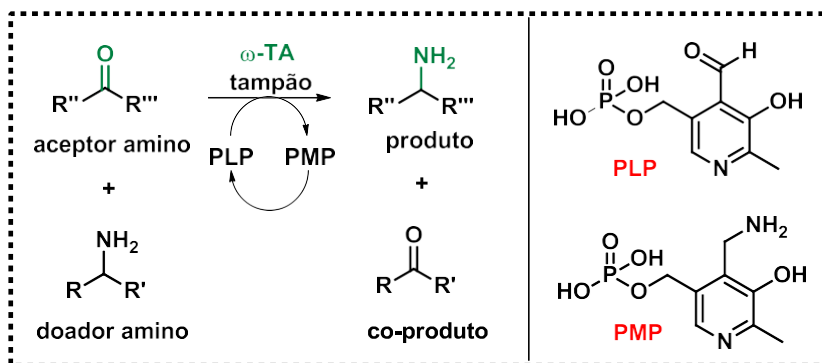
Figura 2: Representação estrutural de uma ω –transaminase



Fonte: Protein Data Bank (estrutura 4BA5)

As ω -transaminases são dependentes de PLP (piridoxal-5-fosfato) como cofator e catalisam a aminação redutiva de carbonilas cetônicas ou aldeídicas^{56:57} (Esquema 5).

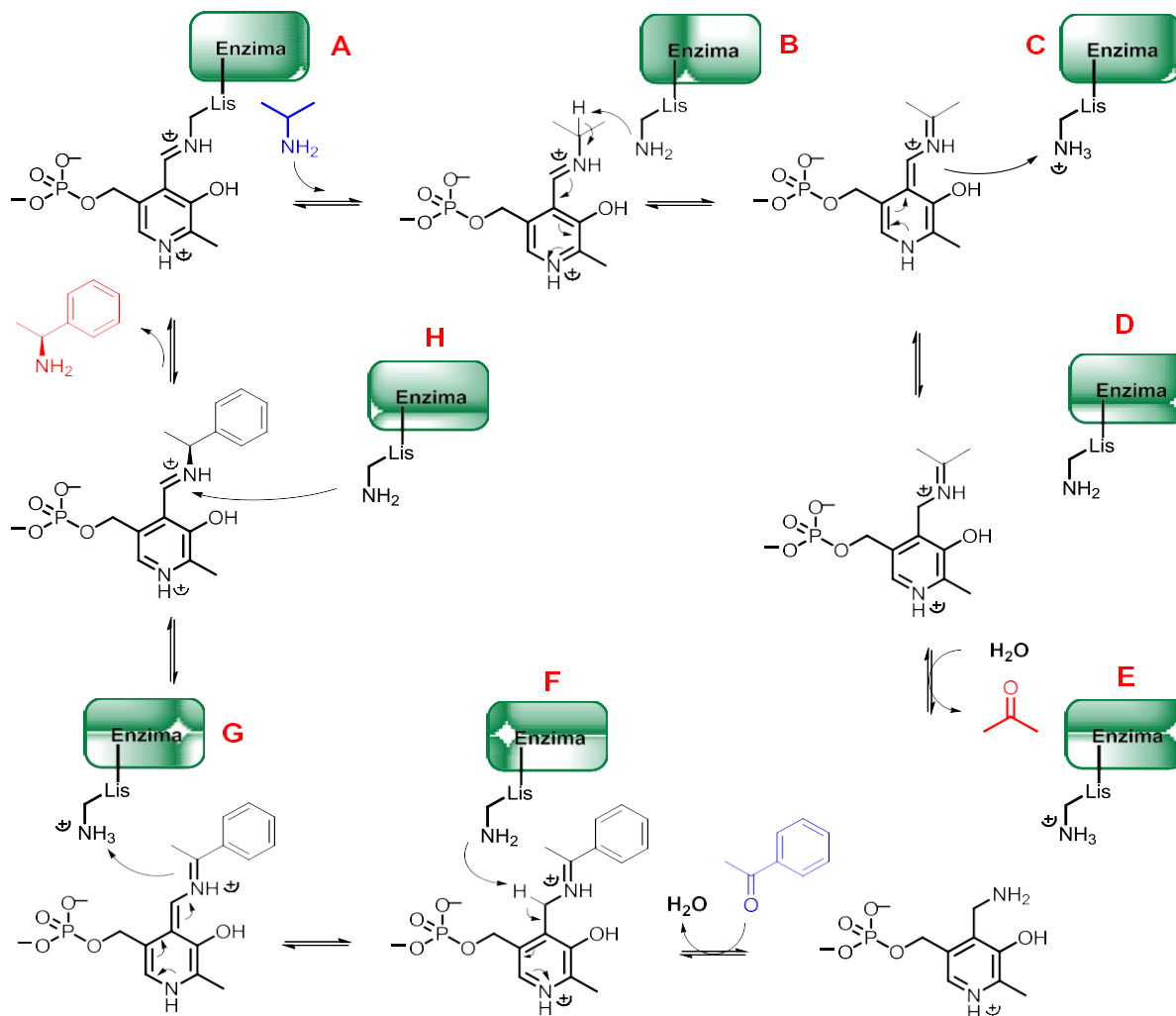
Esquema 5: Reação geral para obtenção de aminas primárias a partir de carbonilas de cetonas ou aldeídos



Fonte: Adaptado de (KOSZELEWSKI, et al, 2010)⁵⁷

A molécula crucial para a reação de aminação reductiva é o cofator PLP juntamente com sua forma reduzida PMP. O mecanismo abaixo (Esquema 6) exemplifica a reação entre a isopropilamina (doador amino) e a acetofenona (aceptor amino). Na ausência do substrato, o PLP encontra-se ligado covalentemente ao aminoácido lisina no sítio catalítico, formando uma imina interna (base de Schiff) (**A**). A ligação C=N da imina interna é atacada pelo doador amino, neste caso a isopropilamina, formando uma imina entre o doador amino e o PLP. Este ataque é facilitado pela molécula de água no sítio ativo e pelo oxigênio fenólico do PLP que podem estabilizar o intermediário (**B**) formado através de ligações de hidrogênio. O resíduo da lisina do sítio ativo da enzima abstrai um próton do carbono quaternário que se tornou mais ácido devido a carga positiva no nitrogênio (**C**). A abstração do próton da lisina é realizada com o sistema em ressonância pelos elétrons da dupla ligação C=C, levando ao intermediário (**D**), restabelecendo o sistema aromático. A imina é então hidrolisada, liberando o doador amino na forma de cetona e o cofator PLP é convertido em PMP (**E**) que transfere o grupo amino para a acetofenona (**F**) ao passo em que o aminoácido lisina do sítio ativo da enzima abstrai um próton ácido adjacente ao átomo de nitrogênio com carga positiva, levando a formação do intermediário (**G**). Novamente, com o sistema em ressonância, os elétrons da ligação C=N abstraem próton do aminoácido lisina. Então, o par de elétrons do grupo amino do aminoácido lisina do sítio ativo da enzima (**H**) realiza um ataque nucleofílico no átomo de carbono ligado ao nitrogênio que está mais eletrofílico por estar com carga positiva, sendo liberado o produto feniletilamina.

Esquema 6: Proposta mecanística para a aminação reductiva da carbonila

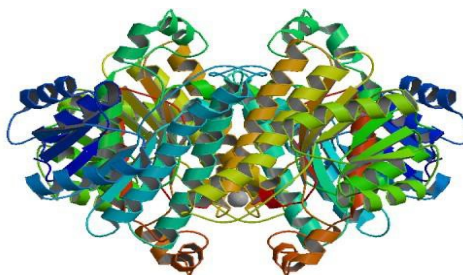


Fonte: Adaptado de (BERGLUND, P.; HUMBLE, M. S.; BRANNEBY, C.; 2012)⁵⁸

1.3. Ceterredutase (KRED)

A ceterredutase (KRED) (Figura 3) pertence à classe das oxidoredutase (EC 1.1.1.1), também são conhecidas por álcool desidrogenase ou carbonila redutase e são dependentes dos cofatores NAD(P)⁺/NAD(P)H, (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) ou FAD⁺/FADH (dinucleotídeo de flavina e adenina).

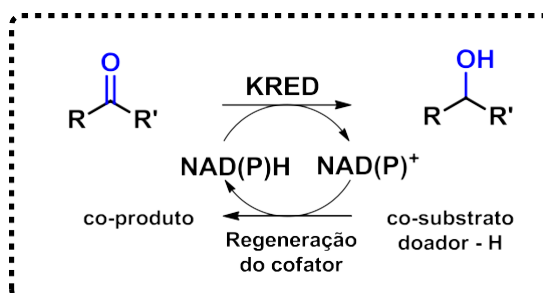
Figura 3: Representação estrutural de uma cetorredutase



Fonte: Protein Data Bank (estrutura 4RF4)

Catalisam a reação de redução da carbonila de aldeídos e de cetonas, formando álcool primário e secundário, respectivamente, como mostram os Esquemas 7 e 8.

Esquema 7: Reação geral para obtenção de álcoois a partir de cetonas

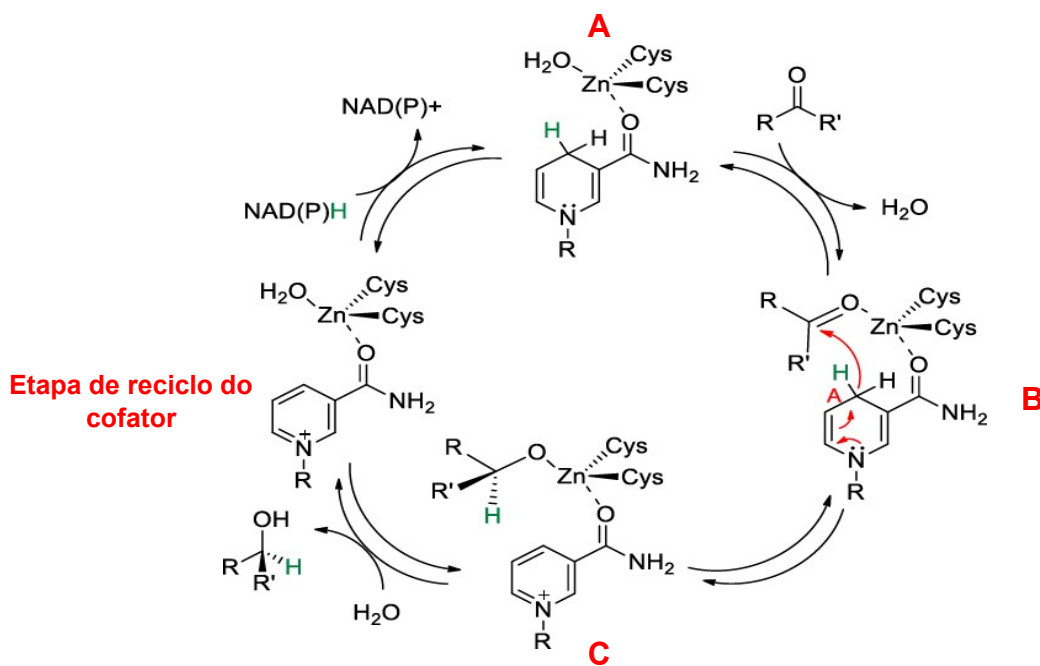


Fonte: Adaptado de (BROUSSY; CHELOHA; BERKOWITZ, 2009)⁵⁹

Na primeira etapa do mecanismo o íon metálico Zn^{2+} se complexa com o oxigênio da carbonila do substrato e o mesmo fica com carga parcial positiva (**A**). Desta forma, o átomo de oxigênio torna-se mais eletrofílico e retira mais densidade eletrônica do carbono carbonílico. Sendo assim, a carga parcial positiva no átomo de carbono fica ainda maior, tornando mais eletrofílico e, portanto, ficando mais suscetível ao ataque nucleofílico do cofator NAD(P)H. Na segunda etapa da reação, o par de elétrons não ligantes do nitrogênio presente no cofator NAD(P)H se desloca no anel, formando uma ligação dupla para manter a aromaticidade e liberar o hidreto que faz um ataque nucleofílico no carbono carbonílico do substrato reduzindo ao alcóxido (**B**). Na última etapa o ânion alcóxido é protonado por uma molécula de água complexada ao Zn^{2+} (**C**), formando o álcool como produto final da reação.

Posteriormente, o cofator NAD(P)H deve ser reciclado para que a catálise enantiosseletiva de redução assimétrica da carbonila possa evoluir.

Esquema 8: Proposta mecanística para a redução carbonila



Fonte: Adaptado de (HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E.; HOLTSMANN, D.; 2011)⁶⁰

5. CONCLUSÕES

Uma nova rota sintética sustentável para a obtenção do bloco construtor **(S)-4** foi desenvolvida a partir de um processo de reações em cascata multienzimáticas simultânea e sequencial. A enzima KRED recombinante foi utilizada em ambas abordagens com a condição de que no processo de reação em cascata simultânea a enzima NHase apresente baixa atividade frente ao substrato **1** e alta atividade frente ao substrato **3**. Neste caso, a enzima NHase utilizada foi a 016. Nesta abordagem, a conversão de **1** em **(S)-4** foi de 83%. A condição para o processo de reação em cascata sequencial é que as enzimas sejam adicionadas em tempos diferentes da reação. A enzima NHase utilizada foi a E0257. Nesta abordagem de cascata a conversão de **1** em **(S)-4** foi >99%. Em ambas abordagens o excesso enantiomérico foi >99%. Outro detalhe interessante destas metodologias é que o álcool isopropílico foi utilizado como cossolvente da reação e regenerador do cofator NADPH da enzima KRED. A possibilidade de reciclar o cofator NADPH (custo elevado) com álcool isopropílico (baixo custo) ao invés de ter que adicionar uma segunda enzima, neste caso, glicose desidrogenase (custo elevado), faz com que a metodologia se torne atrativa economicamente.

Várias NHases apresentaram excelentes conversões e grande potencial para serem utilizadas em síntese utilizando condições suaves de reação para a formação amidas primárias, dificilmente obtidas pela síntese convencional.

Não foi possível a obtenção do composto 3-amino-3-fenilpropanamida devido aos extratos enzimático e as enzimas de ω -transaminases não catalisarem a reação de aminação redutiva da carbonila dos substratos **1** e **2**. Porém, diante desses dados, surge a possibilidade de uma interessante investigação a respeito da influência da nitrila, amida primária e ácido carboxílico na atividade catalítica.

A levedura *S. cerevisiae* catalisou a conversão majoritária do substrato **1** na formação de produtos alquilados. Os microrganismos contendo cetorredutase apresentaram baixas conversões (5 – 26%) e bons excessos enantioméricos (87 – 92%), do enantiômeros **(S)-3**.

Diante dos resultados obtidos, esse trabalho mostrou o grande potencial da Biocatálise, especialmente para a grande quantidade de enzimas NHases que

catalisaram de forma muito eficiente a reação de formação de amida primária; uma importante função orgânica dificilmente obtida pelos métodos tradicionais de síntese. Além disso, esse trabalho contribuirá para o aperfeiçoamento e novos desenvolvimentos de processos de reações em cascatas multienzimáticas estereosseletivas que demonstram grande potencial no meio acadêmico e, portanto, promissores para a obtenção de processos industriais mais sustentáveis, seguros e eficientes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 NOWILL, R. W.; PATEL, T. J.; BEASLEY, D. L.; ALVAREZ, J. A.; JACKSON III, E.; HIZER, T. J.; GHIVIRIGA, I.; MATEER, S. C.; FESKE, B. D.; Biocatalytic strategy toward asymmetric β -hydroxy nitriles and γ -amino alcohols. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 19, p. 2440-2442, maio. 2011.
- 2 XU, G. C.; YU, H. L.; ZHANG, Z. J.; XU, J. H.; Stereocomplementary bioreduction of β -hydroxynitrile without ethylated byproduct. **Organic Letters**, v. 15, n. 21, p. 5408-5411, out. 2013.
- 3 SCHRITTWIESER, J. H.; LAVANDERA, I.; SEISSER, B.; MAUTNER, B.; KROUTIL, W.; Biocatalytic cascade for the synthesis of enantiopure β -azidoalcohols and β -hydroxy nitriles. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2009, n. 14, p. 2293-2298, maio. 2009.
- 4 KIM, E. S.; KIM, H. S.; KIM, J. N.; An efficient Pd-catalyzed hydration of nitrile with acetaldoxime. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 24, p. 2973-2975, jun. 2009.
- 5 LI, Y.; LI, Z.; LI, F.; WANG, Q.; TAO, F.; Preparation of polymer-supported Ru-TsDPEN catalysts and use for enantioselective synthesis of (*S*)-fluoxetine. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 3, n. 14, p. 2513-2518, jun. 2005.
- 6 TOUATI, R.; GMIZA, T.; JEULIN, S.; DEPORT, C.; RATOVELOMANANA-VIDAL, V.; HASSINE, B. B.; GENET, J. P.; Ru-SYNPHOS® and Ru-DIFLUORPHOS®: Highly efficient catalysis for practical preparation of β -hydroxy amides. **Synlett**, n. 16, p. 2478-2482, set. 2005.
- 7 HUANG, H. L.; LIU, L. T.; CHEN, S. F.; KU, H.; The synthesis of a chiral fluoxetine intermediate by catalytic enantioselective hydrogenation of benzoylacetamide. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 9, n. 10, p. 1637-1640, maio. 1998.
- 8 KAMAL, A.; RAMESH KHANNA, G. B.; RAMU, R.; Chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of fluoxetine, tomoxetine and nisoxetine: lipase-catalyzed resolution of 3-aryl-3-hydroxypropanenitriles. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 13, n. 18, p. 2039-2051, set. 2002.
- 9 RIMOLDI, I.; FACCHETTI, G.; NAVA, D.; CONTENTE, M. L.; GANDOLFI, R.; Efficient methodology to produce a duloxetine precursor using whole cells of *Rhodotorula rubra*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 27, n. 9-10, p. 389-396, jun. 2016.
- 10 ANKATI, H.; ZHU, D.; YANG, Y.; BIEHL, E. R.; HUA, L.; Asymmetric synthesis of both antipodes of β -hydroxy nitriles and β -hydroxy carboxylic acids via enzymatic reduction or sequential reduction/hydrolysis. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 4, p. 1658-1662, jan. 2009.

- 11 ZHU, D.; ANKATI, H.; MUKHERJEE, C.; YANG, Y.; BIEHL, E. R.; HUA, L.; Asymmetric reduction of β -keto nitriles with a recombinant carbonyl reductase and enzymatic transformation to optically pure β -hydroxy carboxylic acids. **Organic Letters**, v. 9, n. 13, p. 2561-2563, maio. 2007.
- 12 MIRMASHHORI, B.; AZIZI, N.; SAIDI, M. R.; A simple, economical, and highly efficient synthesis of β -hydroxy nitriles from epoxide under solvent free conditions. **Journal of molecular catalysis A: Chemical**, v. 247, n. 1-2, p. 159-161, mar. 2006.
- 13 QUIRÓS, M.; REBOLLEDO, F.; LIZ, R.; GOTOR, V.; Enantioselective reduction of β -keto amides by the fungus *Mortierella isabelina*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 18, p. 3035-3038, set. 1997.
- 14 KAMILA, S.; ZHU, D.; BIEHL, E. R.; HUA, L.; Unexpected stereorecognition in nitrilase-catalyzed hydrolysis of β -hydroxy nitriles. **Organic Letters**, v. 8, n. 20, p. 4429-4431, set. 2006.
- 15 GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; CROCHET, P.; CADIerno, V.; Ruthenium-catalyzed synthesis of β -hydroxy amides from β -keto nitriles in water. **Organic Letters**, v. 18, n. 23, p. 6164-6167, nov. 2016.
- 16 GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; GONZÁLEZ-LISTE, P. J.; BORGE, J.; CROCHET, P.; CADIerno, V.; Chlorophosphines as auxiliary ligands in ruthenium-catalyzed nitrile hydration reactions: applications to the preparation of β -keto amides. **Catalysis Science & Technology**, v. 6, n. 12, p. 4398-4409, fev. 2016.
- 17 SATHE, P. A.; KARPE, A. S.; PARAB, A. A.; PARED, B. S.; VADAGAONKAR, K. S.; CHASKAR, A. C.; Tandem synthesis of aromatic amides from styrenes in water. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 29, p. 2820-2823, jul. 2018.
- 18 SHARLEY, D. D. S.; WILLIAMS, J. M. J.; A selective hydration of nitriles catalyzed by a Pd(OAc)₂-based system in water. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 43, p. 4090-4093, out. 2017.
- 19 KUMAR, D.; MASITAS, C. A.; NGUYEN, T. N.; GRAPPERHAUS, C. A.; Bioinspired catalytic nitrile hydration by dithiolato, sulfinato/thiolato, and sulfenato/sulfinato ruthenium complexes. **Chemical Communications**, v. 49, n. 3, p. 294-296, nov. 2012.
- 20 ROY, S.; ROY, S.; GRIBBLE, G. W.; Metal-catalyzed amidation. **Tetrahedron**, v. 68, n. 48, p. 9867-9923, dez. 2012.
- 21 HAMMOND, R. J.; POSTON, B. W.; GHIVIRIGA, I.; FESKE, B. D.; Biocatalytic synthesis toward both antipodes of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile precursor to fluoxetine, atomoxetine and nisoxetine. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 7, p. 1217-1219, fev. 2007.

- 22 YANG, X. H.; XIE, J. H.; ZHOU, Q. L.; Chiral spiro iridium catalysts SpiroPAP ligands: highly efficient for asymmetric hydrogenation of ketones and ketoesters. **Organic Chemistry Frontiers** v.1, n. 2, p.190-193, jan. 2014.
- 23 XIE, J. H.; LIU, X. Y.; YANG, X. H.; XIE, J. B.; WANG, L. X.; ZHOU, Q. L.; Chiral iridium catalysts bearing spiro pyridine-aminophosphine ligands enable highly efficient asymmetric hydrogenation of β -aryl β -ketoesters. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 1, p. 201-203, nov. 2011
- 24 KISS, A.; HELL, Z.; A heterogeneous catalytic method for the conversion of nitriles into amides using sieves modified with copper (II), **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 45, p. 6021-6023, nov. 2011.
- 25 VARJOSAARI, S. E.; SKRYPAL, V.; HERLUGSON, S. M.; GILBERT, T. M.; ADLER, M. J.; Enantioselective metal-free reduction of ketones by a user-friendly silane with a reusable chiral additive. **Tetrahedron. Letters**, v. 59, n. 29, p. 2839-2843, jul. 2018.
- 26 WESSJOHANN, L. A.; WILD, H.; FERREIRA, L. A.; SCHREKKER, H. S.; Synthesis of α -alkenyl- β -hydroxy adducts by α -addition of unprotected 4-bromocrotonic acid and amides with aldehydes and ketones by chromium (II)-mediated reactions. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 30, n. 8, p. 674-679, maio. 2016.
- 27 GOTO, Dr. A.; NAKA, Dr. H.; NOYORI, Dr. R.; SAITO, Dr. S.; One-pot nitrile aldolization/hydration operation giving β -hydroxy carboxamides. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 6, n. 7, p. 1740-1743, mar. 2011.
- 28 MATSUOKA, A.; ISOGAWA, T.; MORIOKA, Y.; KNAPPETT, B. R.; WHEATLEY, A. E. H.; SAITO, S.; NAKA, H.; Hydration of nitriles to amides by a chitin-supported ruthenium catalyst. **RSC Advances**, v. 5, n. 16, p.12152-12160, jan. 2015.
- 29 KITANOSONO, T.; XU, P.; KOBAYASHI, S.; Heterogeneous versus homogeneous copper (II) catalysis in enantioselective conjugate-addition reactions of boron in water. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 9, n. 1, p. 179-188, set. 2013.
- 30 GARRETT, C. E.; PRASAD, K.; The art of meeting palladium specifications in active pharmaceutical ingredients produced by Pd-catalyzed reactions. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 346, n. 8, p. 889-900, ago. 2004.
- 31 THAYER, A. M.; Regulatory push for process analytics sets new goals for pharmaceutical manufacturing. **Chemical & Engineering News: Archive**, v. 83, n. 22, p. 63-67, maio. 2005.
- 32 GOTOR, V.; LIZ, R.; TESTERA, A. M^a; Preparation of N-unsubstituted β -ketoamides by Rhodococcus rhodochrous-catalyzed hydration of β -ketonitriles. **Tetrahedron**, v. 60, n. 3, p. 607-618, jan.2004.

- 33 MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V.; Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827-10852, nov. 2005.
- 34 RICCA, E.; BRUCHER, B. SCHRITTWIESER, J. H.; Multi-enzymatic cascade reactions: overview and perspectives. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2239-2262, ago.2011.
- 35 GARCÍA-JUNCEDA, E.; LAVANDERA, I.; ROTHER, D.; SCHRITTWIESER, J. H.; (Chemo)enzymatic cascades-natures's synthetic strategy transferred to the laboratory. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 114, p. 1-6, abr. 2015.
- 36 BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL, B. R.; **Biocatalysis**. 1. ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- 37 DUNN, P. J.; The importance of green chemistry in process research and development. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 4, p. 1452-1461, maio.2011.
- 38 JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H.; Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228-240, mar.2013.
- 39 OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M.; Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742-756, abr.2009.
- 40 GONÇALVES, C. C. S.; MARSAIOLI, A. J.; Fatos e tendências da biocatálise. **Química Nova**, v. 36, n. 10. P. 1587-1590, out.2013.
- 41 ENOKI, J.; MEISBORN, J.; MULLER, A. C.; KOURIST, R.; A multi-enzymatic cascade reaction for the stereoselective production of γ -oxyfunctionalized amino acids. **Frontiers in Microbiology**, DOI:10.3389/fmicb.2016.00425
- 42 SCHRITTWIESER, J. H.; VELIKOGNE, S.; HALL, M.; KROUTIL, W.; Artificial biocatalytic linear cascades for preparation of organic molecules. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 1, p. 270-348, maio.2018.
- 43 SCHRITTWIESER, J. H.; VELIKOGNE, S.; KROUTIL, W.; Artificial hydroxy acids, lactones, and α - and β -amino acids. **Catalysis**, v. 5, n. 8, p. 205-229, maio. 2018.
- 44 MUSCHIOL, J.; PETERS, C.; OBERLEITNER, N.; MIHOVILOVIC, M.; D.; BORNSCHEUER, U.; RUDROFF, F.; Cascade catalysis – strategies and challenges *en route* to preparative synthetic biology. **Chemical Communication**, v. 51, n. 27, p. 5798 – 5811, 2015.

- 45 https://baranlab.org/wp-content/uploads/2018/02/Cascade_reactions_Reisberg2018.pdf Acesso: 01/12/2018.
- 46 SPERL, J. M.; SIEBER, V.; Multienzyme cascade reactions – status and recent advances. **ASC Catalysis**, v. 8, n. 3, p. 2385-2396, jan. 2018.
- 47 SCHMIDT, S.; CASTIGLIONE, K.; KOURIST, R.; Overcoming the incompatibility challenge in chemoenzymatic and multi-catalytic cascade reactions. **Chemistry – A European Journal**, v. 24, n. 8, p. 1755-1768, fev. 2018.
- 48 SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M.; Role of biocatalysis in sustainable chemistry. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 2, p. 801-838, set. 2017.
- 49 MATHEW, S.; NADARAJAN, S. P.; SUNDARAMOORTHY, U.; JEON, H.; CHUNG, T.; YUN, H.; Biotransformation of β -keto nitriles to chiral (S)- β -amino acids using nitrilase and ω -transaminase. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 4, p. 535-543, abr.2017.
- 50 ZHANG, Z. J.; CAI, R. F.; XU, J. H.; Characterization of a new nitrilase from *Hoeflea phototrophica* DFL-43 for a two-step one-pot synthesis of (S)- β -amino acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, DOI: 10.1007/s00253-018-9057-7, maio.2018.
- 51 ANKATI, H.; ZHU, D.; YANG, Y.; BIEHL, E. R.; HUA, L.; Asymmetric synthesis of both antipodes of β -hydroxy nitriles and β -hydroxy carboxylic acids via enzymatic reduction or sequential reduction/hydrolysis. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 4, p. 1658-1662, jan.2009.
- 52 MASCHARAK, P. K.; The active site of nitrile hydratase: an assembly of unusual coordination features by nature. In: Rabinovich D. (eds) **Molecular Design in Inorganic Biochemistry: Structure and Bonding**, v. 160, Springer, Berlin, Heidelberg, 2013
- 53 HOPMANN, K. H.; Nitrile hydratases and epoxide-transforming enzymes: quantum chemical modeling of reaction mechanisms and selectivities. Ph.D. Thesis, Royal Institute of Technology, abr.2008.
- 54 KAYANUMA, M.; SHOJI, M.; YOHDA, M.; ODAKA, M.; SHIGETA, Y.; Catalytic mechanism of nitrile hydratase subsequent to cyclic intermediate formation: a QM/MM study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 13, p. 3259-3266, mar.2016.
- 55 MALIK, M. S.; PARK, E. S.; SHIN, J. S. Features and technical applications of ω -transaminases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 5, p. 1163–1171, 2012.

- 56 FUCHS, M.; FARNBERGER, J. E.; KROUTIL, W. The industrial age of biocatalytic transamination. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 32, p. 6965–6982, 2015.
- 57 KOSZELEWSKI, D. et al. ω -Transaminases for the synthesis of non-racemic α -chiral primary amines. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 324–332, 2010.
- 58 BERGLUND, P.; HUMBLE, M. S.; BRANNEBY, C.; C-X bond formation: transaminases as chiral catalysts: engineering, and applications. **Comprehensive chirality**, v. 7, p. 390-400, 2012.
- 59 BROUSSY, S.; CHELOHA, R. W.; BERKOWITZ, D. B.; Enantioselective, ketoreductase-based entry into pharmaceutical building blocks: ethanol as tunable nicotinamide reductant. **Organic Letters**, v. 11, n. 2, p. 305-308, 2009.
- 60 HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E.; HOLTSMANN, D. Enzymatic reductions for the chemist. **Green Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 2285–2314, jul.2011.
- 61 GONZÁLEZ-VERA, J. A.; GARCÍA-LÓPEZ, M. T.; HERRANZ, R.; Molecular diversity via amino acid derived α -amino nitriles: synthesis of spirocyclic 2,6-dioxopiperazine derivatives. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 9, p. 3660-3666, mar.2005.
- 62 WILGUS, C. P.; DOWNING, S.; MOLITOR, E.; BAINS, S.; PAGNI, R. M.; KABALKA, G. W.; The acid-catalyzed and uncatalyzed hydrolysis of nitriles on unactivated alumina. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 20, p. 3469-3472, maio.1995.
- 63 KUKUSHKIN, V. Y.; POMBEIRO, A. J. L.; Metal-mediated and metal catalyzed hydrolysis of nitriles. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, n. 1, p. 1-21, jan.2005.
- 64 COADY, T.M.; COFFEY, L. V.; O'REILLY, C.; LENNON, C. M.; Substrate evaluation of *Rhodococcus erythropolis* SET1, a nitrile hydrolyzing bacterium, demonstrating dual activity strongly dependent on nitrile sub-structure. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 5, p. 1108-1116, jan.2015.
- 65 CONTENTE, M. L.; SERRA, I.; MOLINARI, F.; GANDOLFI, R.; PINTO, A.; ROMANO, D.; Preparation of enantiomerically enriched aromatic β -hydroxynitriles and halohydrins by ketone reduction with recombinant ketoreductase KRED1-Pglu. **Tetrahedron**, v. 72, n 27-28, p. 3974-3979, jul.2016.
- 66 MIRIYALA, B.; BHATTACHARYYA, S.; WILLIAMSON, J. S. Chemoselective reductive alkylation of ammonia with carbonyl compounds: synthesis of

- primary and symmetrical secondary amines. **Tetrahedron**, v. 60, n. 7, p. 1463–1471, 2004.
- 67 ZHAO, Y.; ZHAO, J.; ZHOU, Y.; LEI, Z.; LI, L.; ZHANG, H.; Efficient synthesis of β -amino- α,β -unsaturated carbonyl compounds, **New Journal of Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 769-772, abr. 2005.
- 68 CHHIBA, V.; BODE, M. L.; MATHIBA, K.; KWEZI, W.; BRADY, D.; Enantioselective biocatalytic hydrolysis of β -aminonitriles to β -amino-amides using *Rhodococcus rhodochrous* ATCC BAA-870. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 68-74, abr. 2012.
- 69 AMARAL, B. S.; **Síntese quimioenzimática do levetiracetam e análogos**. 2015. 213 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de Araraquara (IQAr/UNESP), Araraquara, 2015.
- 70 VAN PELT, S.; ZHANG, M.; OTTEN, L. G.; HOLT, J.; SOROKIN, D. Y.; VAN RANTWIJK, F.; BLACK, G. W.; PERRY, J. J.; SHELDON, R. A.; Probing the enantioselectivity of a diverse group of purified cobalt-centred nitrile hydratases. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 3011-3019, jan.2011.
- 71 WANG, M. X.; Enantioselective biotransformation of nitriles. **Top Organometallic Chemistry**, v. 36. p. 105-122, 2011.
- 72 TEIXEIRA, I. S.; **Síntese de amins quirais via aminação redutiva**. 2018. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de Araraquara (IQAr/UNESP), Araraquara, 2018.
- 73 MILAGRE, C.D.F. **Estudo quimioenzimático da síntese de um análogo do resíduo N-terminal de Nikkomicinas**. 2003. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2003.
- 74 SERRA, I.; GUIDI, B.; BURGAUD, G.; CONTENTE, M. L.; FERRABOSCHI, P.; PINTO, A.; COMPAGNO, C.; MOLINARI, F.; ROMANO, D.; Seawater-based biocatalytic strategy: stereoselective reductions of ketones with marine yeasts, *ChemCatChem*, **2016**, 8, 3254-3260.
- 75 MATSUDA, T.; YAMANAKA, R.; NAKAMURA, K.; Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, p. 513-557, 2009.
- 76 SMALLRIDGE, A. J.; TEN, A.; TREWHELLA, M. A.; Enzymatic alkylation of α -cyanoketones by baker's yeast. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 28, p. 5121-5124, jul. 1998.

- 77 HALL, M.; HAUNER, B.; STUERMER, R.; KROUTIL, W.; FABER, K.; Asymmetric whole-cell bioreduction of an α,β -unsaturated aldehyde (citral): competing *prim*-alcohol dehydrogenase and C-C lyase activities. **Tetrahedron:Asymmetry**, v. 17, n. 21, p. 3058-3062, nov. 2006.
- 78 ITOH, T.; TAKAGI, Y.; FUJISAWA, T.; A novel carbon-carbon bond formation in the course of baker's yeast reduction of cyanoacetone. **Tetrahedron Letters**, v. 30, n. 29, p. 3811-3812, 1989.
- 79 FUGANTI, C.; PEDROCCHI-FANTONI, G.; SERVI, S.; Chemo-enzymatic alkylation of active methylene compounds. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 29, p. 4195-4198, 1990.
- 80 FACCHETTI, G.; GANDOLFI, R.; FUSE, M.; ZERLA, D.; CESAROTTI, E.; PELLIZZONI, M.; RIMOLDI, I.; N. J. Chem, 2015. DOI: 10.1039/c5nj00110b
- 81 DEHLI, J. R.; GOTOR, V.; Stereoselective alkylation-reduction of β -keto nitriles by the fungus *Curvularia lunata*. **Tetrahedron:Asymmetry**, v. 12, n. 10, p. 1485-1492, jun.2001.
- 82 NATH, D.; FLEMING, F. F.; Sulfinylnitriles: sulfinyl-metal exchange-alkylation strategies. **Chemistry – A European Journal**, v. 19, n. 6, p. 2023-2029, fev.2013.
- 83 RODRÍGUEZ, C.; BORZECKA, W.; SATTLER, J. H.; KROUTIL, W.; LAVANDERA, I.; GOTOR, V.; Steric vs. electronic effects in the *Lactobacillus brevis* ADH-catalyzed bioreduction of ketones. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 12, n., p. 673-681, 2014.
- 84 <https://www.codexis-estore.com/protocols>. Acesso: 31/10/2018
- 85 BISOGNO, F. R.; LAVANDERA, I.; KROUTIL, W.; GOTOR, V.; Tandem concurrent process: one-pot single-catalyst biohydrogen transfer for the simultaneous preparation of enantiopure secondary alcohols. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 4, p. 1730-1732, jan.2009.