

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 17/05/2020.

MARAYLLA INÁCIO DE MORAES

Hidratação enzimática de nitrilas pela enzima Nitrila Hidratase (NHase) para a obtenção de amidas

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

M827h

Moraes, Maraylla Inácio de
Hidratação enzimática de nitrilas pela enzima Nitrila
Hidratase (NHase) para a obtenção de amidas / Maraylla
Inácio de Moraes. – Araraquara : [s.n.], 2019
122 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Cíntia Duarte de Freitas Milagre

1. Biocatálise. 2. Química verde. 3. Clonagem. 4. Nitrilas.
5. Expressão gênica. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Hidratação enzimática de nitrilas pela enzima Nitrila Hidratase (NHase) para a obtenção de amidas"

AUTORA: MARAYLLA INÁCIO DE MORAES

ORIENTADORA: CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

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



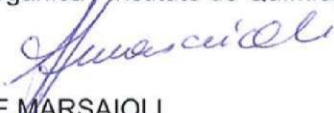
Prof.^a Dr.^a CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof.^a Dr.^a ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof.^a Dr.^a LOURDES CAMPANER DOS SANTOS
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof.^a Dr.^a ANITA JOCELYNE MARSAIOLI
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas



Prof. Dr. ALVARO TAKEO OMORI
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC - UFABC - Santo André

Araraquara, 17 de maio de 2019

DADOS CURRICULARES

Identificação

Nome: Maraylla Inácio de Moraes

Nome em citações bibliográficas: MORAES, M.I.

Formação Acadêmica

- Graduada no curso de Licenciatura em Química pela Universidade Estadual do Piauí (UESPI) no período de 2005 a 2009.

- Mestre em química orgânica, área de concentração: Química Orgânica, Título: "Biorredução de aldeídos e cetonas utilizando células íntegras de espécies vegetais cultivadas no estado do Piauí", sob a orientação da Profa. Dra. Allana Kellen Lima Santos, na Universidade Federal do Piauí (UFPI), no período de 2013 a 2015 com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI).

- Curso de pós-graduação modalidade Doutorado em química, área de concentração: Química Orgânica, Título: "Hidratação enzimática de nitrilas pela enzima Nitrila Hidratase (NHase) na obtenção de amidas" sob a orientação da Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre, no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, no período de 2015 a 2019 com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Estágios e Bolsas auxílio

- Bolsa de mestrado no período de 2013 a 2015, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI).

- Bolsa de Doutorado no período de 2016 a 2019, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

- Bolsa Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, PDSE/CAPES, processo (88881.134096/2016-01).

- Programa de Estágio Docente na disciplina Química Orgânica I sob a orientação da Profa. Dra. Allana Kellen Lima Santos na Universidade Federal do Piauí, 2013.

- Programa de Estágio Docente na disciplina Química Orgânica Experimental sob a orientação da Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2016.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Livros e Capítulos

MILAGRE, C. D. F.; SANTOS, L. S.; **MORAES, M. I.**; CRUZ, R. S. Biocatálise: estratégias para obtenção de substâncias bioativas. In: Lourdes Campaner dos Santos; Maysa Furlan; Marcelo Rodrigues de Amorim. (Org.). Produtos naturais bioativos. 1ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016, v. 1, p. 197-228.

Depósito da sequência de aminoácidos

MORAES, M. I.; AMARAL, B. S.; IGLESIAS, C.; MILAGRE, C.D. F.; GIORDANO, S.R. Depósito da sequência de aminoácidos do gene NHase de *R.erythropolis* ATCC 4277 ao GenBank (nº de acesso MH732727, MH 732728 e MH732729).

Artigo para publicação

MORAES, M. I.; IGLESIAS, C.; MILAGRE, C. D. F.; GIORDANO, S. R. Biotransformations of nitriles mediated by *in vivo* nitrile hydratase of *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 heterologous expressed in *E. coli*. Molecular Catalysis (para submissão).

Apresentação de Trabalhos em Congressos

MORAES, M. I.; AMARAL, B. S.; IGLESIAS, C.; MILAGRE, C.D. F.; GIORDANO, S.R. Clonado y expresión de nuevas NHase: Una herramienta importante en la síntesis de amidas de interés industrial. 5º Encuentro Nacional de Química (Enaqui), 2017, Montevideo.

MORAES, M. I.; IGLESIAS, C.; GIORDANO, S.R.; MILAGRE,C.D.F. Biotransformations of nitriles mediated by nitrile hydratase of *Rhodococcus erythropolis* heterologous expressed in *E. coli*. 1st Brazilian Symposium on Sustainable Chemistry (BSSC-I), 2018, São Pedro/SP.

SARAIVA, E.S; **MORAES, M. I.**; LEMOS,T.L.G.; Pereira, A.K.L.S. Determinação da composição e do teor de ácidos graxos no óleo fixo das folhas de *Hematanthus drasticus* (Mart.) Plumel. 9º Simpósio Nacional de Biocombustíveis, 2016, Teresina.

MORAES, M. I.; MATOS, J. M. E.; VIEIRA, E.C.; VIANA, C. C.; NOBRE, F. X.; SANTOS, A.K.L. Biotransformação de compostos carbonílicos utilizando células íntegras de *Morinda citrifolia* Linn. II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêutica, 2015, Teresina.

AQUINO, T. P. B.; **MORAES, M. I.**; PAIVA, G. M. S. ; SILVA, D. M. L. C. . Análise

do uso de fóruns de discussão no ensino e aprendizagem da disciplina Química Orgânica I. Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal/ RN.

SOARES, S. H.; **MORAES, M. I.**; MATOS, J. M. E.; VIEIRA, E.C.; SANTOS, A. K. L.; CITO, A. M. G. L. 'Utilização de Alpiste (*Phalaris canariensis*) em reações de biotransformação'. Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal/ RN.

MORAES, M. I.; SOARES, S. H.; VIANA, C. C.; NOBRE, F. X.; MATOS, J. M. E.; VIEIRA, E. C.; MACHADO, L. L.; SANTOS, A. K. L. Biocatálise utilizando células integras de Amendoim (*Arachis hypogaea*). Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal/ RN.

SOARES, S. H.; **MORAES, M. I.**; CITO, A. M. G. L.; MATOS, J. M. E.; VIEIRA, E. C.; SANTOS, A. K. L. *Samanea tubulosa* e *Morinda citrifolia* como biocatalisadores em reações com benzaldeído. Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal/ RN.

MORAES, M. I.; SOARES, S. H.; MATOS, J. M. E.; VIEIRA, E. C.; MACHADO, L. L.; SANTOS, A. K. L. Biotransformação de compostos carbonílicos utilizando células íntegras de sementes de Girassol (*Helianthus annuus*). Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal/ RN.

MORAES, M. I.; AQUINO, T. P. B.; PAIVA, G. M. S.; SILVA, D. M. L. C.; SILVA, L. K. R.; ARAUJO, M. M. Uma prospecção do tema Química verde na revista Química nova on-line no período de 2000 à 2012.11º Simpósio Brasileiro de Educação Química, 2013, Teresina.

AQUINO, T. P. B.; **MORAES, M. I.**; PAIVA, G. M. S.; SILVA, D. M. L. C.; SILVA, L. K. R.; ARAUJO, M. M. Química Verde: Uma abordagem sobre a formação ambiental do licenciado.11º Simpósio Brasileiro de Educação Química, 2013, Teresina.

AQUINO, T. P. B.; PAIVA, G. M. S.; **MORAES, M. I.**; SILVA, D.M.L C.; ARAUJO, M. M.; NASCIMENTO, L.A. Fotonovela: Trabalhando conceitos químicos de forma lúdica.11º Simpósio Brasileiro de Educação Química, 2013, Teresina.

ARAUJO, M. M.; SILVA, L. K. R.; NASCIMENTO, L. A.; **MORAES, M. I.**; PAIVA, G. M. S.; AQUINO, T. P. B. O uso da internet por alunos de escolas públicas de Teresina-PI: Um caminho para novas metodologias no ensino de Química.. In: 11º Simpósio Brasileiro de Educação Química, 2013, Teresina.

PEREIRA, A. B.; SOARES, S. H.; RAMOS, T. F; **MORAES, M. I.**; SANTOS, A. K. L. Prática de ensino de Química no ensino médio em escolas da rede pública de Campinas-PI.11º Simpósio Brasileiro de Educação Química, 2013, Teresina.

SOARES, S. H.; **MORAES, M. I.**; MACHADO, L. L.; LEMOS, T. L. G.; SANTOS,

A.K.L. Hidrólise de éster aromático catalisada por células integras de macaúba (*Acrocomia aculeata*). 53º Congresso Brasileiro de Química, 2013, Rio de Janeiro.

MORAES, M. I.; NASCIMENTO, L. A.; PAIVA, G. M. S.; SILVA, D. M. L. C.; AQUINO, T. P. B. Importância da biocatálise na química verde. I Congresso Regional dos Estudantes de Química, 2013, Teresina.

SOARES, S. H.; **MORAES, M. I.**; MACHADO, L. L. ; LEMOS, T. L. G.; SANTOS, A. K. L. Biorreduções utilizando células integras de macaúba (*Acrocomia aculeata*). 53º Congresso Brasileiro de Química, 2013, Rio de Janeiro.

Participação em bancas de trabalho de conclusão de curso

MATOS, J. M. E; **MORAES, M. I.**; ARAUJO, S. B. Participação em banca de Lília Verônica Cardoso Cunha. "Nanotubos de carbono e algumas aplicações". 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química)-Universidade Federal do Piauí.

MATOS, J. M. E.; **MORAES, M. I.**; COSTA, I. C. G. Participação em banca de Janiele Pinto de Sousa. "Utilização de cromatografia líquida na separação de enantiômeros". 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) -Universidade Federal do Piauí.

SANTOS, A. K. L.; **MORAES, M. I.**; SILVA, D. Participação em banca de Katiana Lima do Patrocínio. "Química sustentável: O biodiesel e os diversos produtos obtidos através do glicerol-Um estudo de revisão". 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal do Piauí.

SANTOS, A. K. L.; **MORAES, M. I.**; MATOS, J. M. E.; MOURA, C. V. R. Participação em banca de Espedito de Sousa Saraiva. "Biotransformação utilizando células íntegras de sementes de vegetais da família Fabaceae cultivadas no estado do Piauí". 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal do Piauí.

Participação em Eventos

5º Encuentro Nacional de Química (Enaqui), 2017.

1º Workshop de Inovação e Empreendedorismo do Instituto de Química, 2016.

Mulheres na Ciência 2016: o Gênero na Pós-Graduação, 2016.

Workshop "Inovações em análise de Enantiômeros", 2016.

34° Congresso Brasileiro de Química, 2014.

I- Curso de Geoquímica Orgânica: Fundamentos e Aplicações da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, 2014.

11° Simpósio Brasileiro de Química, 2013.

I Congresso Regional dos Estudantes de Química, 2013.

Organização de eventos

- Integrante da equipe de apoio do festival internacional de divulgação científica Pint of Science, Araraquara, 2017 e 2018.

Coorientação concluída

Luana Alves Galvão de Souza. Imobilização de nitrila hidratases em matrizes poliméricas visando o aumento da estabilidade enzimática. 2017. Iniciação Científica - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Estágio no Exterior

Estágio na Universidad de La República, Montevideo, Uruguai, 2017, para realização do projeto “Clonagem e expressão de nitrilas hidratases dos catalinismos *Klebsiella* e *Rhodococcus*”. Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, CAPES, processo 88881.134096/2016-01, com supervisão da Profa. Dra. Sonia Rodriguez Giordano.

*Para Caio
com muito amor*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por acreditarem em mim e depositarem tanta confiança. Mãe você é o meu maior exemplo de amor e dedicação.

Aos meus irmãos Diego e Solano, mesmo longe estavam me apoiando e ajudando.

Ao Caio, razão da minha vida. Eu te amo muito.

À Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre, pela orientação, compreensão, paciência, aprendizado e amizade. Serei eternamente grata pela confiança depositada em mim.

Ao Prof. Dr. Humberto M. S. Milagre, pelas contribuições neste trabalho e para a minha formação.

Aos colegas de laboratório Íris, Gabriel, Laíza, Lucas e Thayna pela convivência, discussões e momentos descontraídos.

À Profa. Dra. Sonia Rodrigues pela oportunidade de desenvolver meu estágio de doutorado sanduiche em seu grupo de pesquisa. Obrigada pelo constante acompanhamento no laboratório e dedicação em ensinar-me. Agradeço, também, aos amigos do laboratório 12, Ariel, Agustin, César, Diego, Gabriela, Luís, Mariana, Maria Inés, Nicol, Virginia, Valentina, María Eugenia e Martin, por terem me recebido de braços abertos.

Aos meus amigos Cibele, Erika, João, Isabella, Luís Paulo, Túlio, Maxsuelen e Vitor, sem os quais não imagino como seria essa minha jornada.

Ao Instituto de Química e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela oportunidade e infraestrutura concedidas.

À CAPES pela bolsa concedida e pela manutenção do Portal de Periódicos, essencial para que essa pesquisa fosse realizada.

À CAPES-PDSE pela bolsa de estágio no exterior.

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

Aos técnicos e funcionários do IQ, Naira, Alberto, Marquinhos, Nivaldo e Lucinéia.

À Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento pelas análises no polarímetro e HPLC. À Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos pela coluna de HPLC emprestada. À doutoranda Camila Luiza Cunha pelo auxílio com os equipamentos.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Só é verdadeiramente digno da liberdade, bem como da vida, aquele que se empenha em conquistá-la”.

(Johann Goethe)

RESUMO

Reações catalisadas enzimaticamente constituem uma alternativa ambientalmente atrativa em relação a catálise metálica e organometálica, pois utiliza catalisadores biodegradáveis e oriundos de fontes renováveis, oferecendo ferramentas apropriadas para a transformação de substâncias naturais ou sintéticas levando-se em conta os preceitos da Química Verde. Neste trabalho, foi realizada a clonagem do gene nitrila hidratase (subunidades α e β e gene ativador) de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 e *Klebisella oxytoca* via metodologia de clonagem livre de restrição e posterior expressão em *E. coli* para realização de reações de biotransformação. A análise da especificidade do substrato da NHase tipo Fe de *R. erythropolis* ATCC 4277 indica que este aceita uma diversidade de nitrilas. As nitrilas alifáticas foram hidratadas com conversões acima de 99%, com exceção da acrilonitrila. As nitrilas aromáticas foram hidratadas com conversões que variaram de 1% a 88%. As células inteiras de *E. coli* recombinante hidrataram o 1,4-fenilenodiacetonitrila com elevada regioseletividade, enquanto o excesso enantiomérico das nitrilas aromáticas 2-amino-2-(4-fluorofenil) acetonitrila e 2-fenilbutironitrila foram de 7% e 60%, respectivamente. A clonagem do gene NHase de *Klebisella oxytoca* não foi observada. A segunda etapa deste trabalho consistiu na síntese de 4-(cianometil)benzenoacetanamida, um intermediário importante na síntese de compostos de interesse industrial e utilizado como material de partida em reações de Grignard e transamidação. Uma coleção de enzimas do tipo NHase obtidas comercialmente foram empregadas para catalisar as reações de conversão da nitrila na amida correspondente, com altas conversões e rendimentos. Para as reações de Grignard e transamidação não foram obtidos bons resultados nas condições estudadas. De maneira geral foi possível obter amidas, que são de interesse industrial, com conversões variadas através de catálise enzimática.

Palavras-chave: Biocatálise, Nitrila hidratase, Clonagem, Expressão enzimática, nitrila.

ABSTRACT

Enzymatically catalyzed reactions are an environmentally attractive alternative for metal and organometallic catalysis, because it uses biodegradable catalysts and from renewable sources, offering appropriate tools for the transformation of natural substances or synthetic taking into account the precepts of Green Chemistry. This work was performed nitrile hydratase gene cloning (α - and β -subunits and activator gene) from *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 and *Klebsiella oxytoca* via restriction-free cloning methodology and subsequent expression in *E. coli* to perform biotransformation reactions. The analysis of the substrate specificity of the Fe-type NHase of *R. erythropolis* ATCC 4277 indicates that it accepts a diversity of nitriles. The aliphatic nitriles were hydrated with conversions above 99%, with the exception of acrylonitrile. The aromatic nitriles were hydrated with conversions ranging from 1% to 88%. Whole cells of recombinant *E. coli* hydrated 1,4-phenylenediacetonitrile with high regioselectivity, while the enantiomeric excess of the aromatic nitriles 2-amino-2-(4-fluorophenyl)acetonitrile and 2-phenylbutyronitrile were 7% and 60%, respectively. The cloning of the gene NHase of *Klebsiella oxytoca* was not observed. The second step of this work consisted in the synthesis of 4-(cyanomethyl)benzeneacetanamide an important intermediate in the synthesis of compounds of industrial interest and used as starting material in Grignard reactions and transamidation. A collection of enzymes NHase type obtained commercially were employed to catalyze the conversion reactions of nitrile to the corresponding amide, with high conversions and yields. For the reactions of Grignard and transamidation have not obtained good results in the conditions studied. In general, it was possible to obtain amides, which are of industrial interest, with high and low conversions by enzymatic catalysis.

Keywords: Biocatalysis, Nitrile hydratase, Cloning, Enzyme expression, nitrile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os 12 primeiros princípios da química verde.....	24
Figura 2. Duas rotas da natureza para a conversão de nitrilas em ácido carboxílico.....	32
Figura 3. NHase na síntese de amidas produzidas industrialmente	32
Figura 4. Representação tridimensional de uma NHase de <i>Rhodococcus erythropolis</i> AJ270. Em verde e azul estão representadas as subunidades α e β , respectivamente. A esfera vermelha representa o cofator Fe^{3+}	34
Figura 5. Mecanismo proposto para reação de hidratação de nitrila catalisada por NHase.....	36
Figura 6. Representação esquemática de clonagem RF. Primers híbridos são desenhados para se ligarem ao gene (verde) e ao plasmídeo (rosa). A primeira PCR leva ao megaprimer que possui em suas extremidades sequências que se flanqueiam ao plasmídeo. Na segunda PCR, o produto da primeira é usado para amplificação linear do vetor circular escolhido. Uma vez que todo plasmídeo é replicado, é realizado uma digestão com <i>DpnI</i> , para degradar seletivamente o DNA parental metilado e a mistura reacional é transformada em células competente de <i>E. coli</i>	40
Figura 7. Esquema do vetor recombinante pACYCDuet-1-NHase.....	47
Figura 8. Construção do plasmídeo recombinante por clonagem RF. (A) A primeira PCR amplifica os genes (ativador, subunidades α e β) que codificam a proteína de interesse. (B) Na segunda PCR, o produto da primeira PCR foi usado como megaprimer para amplificação linear do vetor escolhido. (C) O plasmídeo parental foi digerido com <i>DpnI</i> antes da transformação.....	48
Figura 9. (A) Esquema do vetor recombinante pkk223-3-NHase. (B) Eletroforese em gel de agarose das amplificações de NHase (entrada 1). A entrada 2 é controle negativo. M: marcador de massa molecular, bp: pares de base.....	49
Figura 10. Triagem branco-azul de <i>E. coli</i> JM109 para a presença do gene NHase.....	50
Figura 11. Sequências conservadas de aminoácidos da subunidade α de NHase de vários micro-organismos. Os padrões de ligação de cobalto (CTLCSC) ou ferro (CSLCSC) estão destacados. Idêntico (*), fortemente similar (:) e pouco semelhante (.).....	50

Figura 12. Análise filogenética da subunidade α de NHase de <i>R.erythropolis</i> comparada com outras reportadas na literatura.....	51
Figura 13. Análise por SDS-PAGE da expressão de NHase recombinante. M: marcador de proteína. As entradas indicam: 1 e 2 (pACYCDuet1-solúvel/insolúvel-24h), 3 e 4 (pACYCDuet1-solúvel/insolúvel-48h, 5 e 6 (pACYCDuet-NH-RE-solúvel/insolúvel-24h), 7 e 8 (pACYCDuet-NH-RE solúvel/insolúvel-48h).....	53
Figura 14. Curva Analítica - Ensaio de Bradford.....	54
Figura 15. Curva Analítica – Determinação da atividade enzimática.....	55
Figura 16. Cromatograma de separação dos enantiômeros de 6b por GC-FID.....	61
Figura 17. Cromatograma de separação dos enantiômeros de 7b por HPLC..	62
Figura 18. Cromatograma da reação de 5a com NHase 017.....	66
Figura 19. Cromatograma da reação de Grignard por CG-EM.....	69
Figura 20. Cromatograma da reação de transamidação analisada por CG-FID.....	70
Figura 21. Representação do ciclo de PCR utilizado para a amplificação dos genes de <i>R. erythropolis</i> (ativador e subunidades α e β) e o gene NHase de <i>K. oxytoca</i>	79

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese da hidroxinitrila (1) intermediário de atorvastatina.....	27
Esquema 2. Síntese da sitagliptina a partir da prositagliptina usando uma (<i>R</i>)-transaminase.....	29
Esquema 3. Biotransformação da rac-2,2-dimetilciclopropanocarbonitrila por <i>Rhodococcus boritolerans</i> FW815 para obtenção de um intermediário da cilastantina.....	30
Esquema 4. Versatilidade das nitrilas na obtenção de outros compostos.....	31
Esquema 5. Dessimetrização de adiponitrila para produzir 5-cianovaleramida um precursor do azafenidin.....	41
Esquema 6. Dessimetrização do 3-hidroxi-glutaronitrila por nitrilase.....	42
Esquema 7. Hidratação enzimática das nitrilas alifáticas.....	58
Esquema 8. Hidratação enzimática das nitrilas 4a e 9a	59
Esquema 9. Hidratação enzimática da nitrila 5a	60
Esquema 10. Hidratação enzimática da nitrila 6a	61
Esquema 11. Hidratação enzimática da nitrila 7a	62
Esquema 12. Hidratação enzimática da nitrila 8a	63
Esquema 13. Reações com os extratos enzimáticos.....	64
Esquema 14. Conversão do substrato (5a) para a respectiva amida (5b) por NHase.....	65
Esquema 15. Preparação geral de cetonas via adição nucleofílica de reagentes de Grignard a nitrila.....	68
Esquema 16. Síntese do intermediário 10	68
Esquema 17. Reação de transamidação do composto 5b	69
Esquema 18. Reação geral para hidrólise ácida da nitrila de 2a em 2b	86
Esquema 19. Reação geral para hidrólise ácida da nitrila de 3a em 3b	86
Esquema 20 Reação geral para hidrólise ácida da nitrila de 6a em 6b	87
Esquema 21. Reação geral para hidrólise ácida da nitrila de 7a em 7b	88
Esquema 22. Esquema geral das biotransformações.....	88
Esquema 23. Esquema para reação de Grignard com composto 5b	93
Esquema 24. Reação de Grignard com composto 5b	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Algumas métricas comuns de química verde e suas descrições.....	25
Tabela 2. Atividade de NHase de alguns micro-organismos.....	33
Tabela 3. NHases enantiosseletivas catalisam a transformação da nitrila (R ₁ R ₂ CHCN) para a correspondente amida.....	35
Tabela 4. Conversão de dinitrilas por <i>Rhodococcus</i> sp. AJ270.....	43
Tabela 5. Primers desenhados para a amplificação e sequenciamento dos genes que codificam NHase. Em vermelho, estão representadas as caudas que ficarão livres para se ligar ao vetor na segunda PCR. Os códons grifados representam start e stop.....	47
Tabela 6. Sequência de aminoácidos do gene ativador de NHase de alguns micro-organismos.....	52
Tabela 7. Curva analítica do Ensaio de Bradford.....	54
Tabela 8. Proteínas totais presentes no extrato enzimático pós diálise.....	55
Tabela 9. Dados para a construção da curva analítica para determinação da atividade.....	55
Tabela 10. Especificidade dos substratos utilizando <i>R.erythropolis</i> ATCC 4277.....	57
Tabela 11. Conversão de 5a em 5b catalisada por NHase.....	66
Tabela 12. Resultado das reações enzimáticas com NHase 001, 009 e 017.....	67
Tabela 13. Reagentes e quantidades utilizadas nas reações de PCR para amplificação do DNA genômico.....	78
Tabela 14. Reagentes e quantidades utilizadas nas reações de PCR.....	79

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Etapas para o desenvolvimento do trabalho.....	45
Fluxograma 2. Planejamento para o desenvolvimento do trabalho.....	46
Fluxograma 3. Etapas para análise do nível de proteínas em SDS-PAGE.....	84
Fluxograma 4. Etapas para a síntese das amidas padrões.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- Amp – Ampicilina
- ATR – Reflexão total atenuada (*Attenuated total reflection*)
- ATCC- Coleção de Cultura Tipo Americana (*American Type Culture Collection*)
- BSA – Soro albumina bovina (*Bovine serum albumine*)
- Can- Cloranfenicol
- CCD – Cromatografia em camada delgada
- CCT- Coleção de Culturas Tropicais
- CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa
- Clonagem RF- Clonagem livre de enzimas de restrição
- DMSO – Dimetilsulfoxido
- Dpnl- *Diplococcus pneumoniae* G41
- ee – excesso enantiomérico
- GC-FID – Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chama (*gas chromatography with flame ionization detector*)
- GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (*gas chromatography with mass spectrometer*)
- GDH - glicose desidrogenase
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High pressure liquid chromatography*)
- HHDH - halohidrina desalogenase
- IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
- IV – Infravermelho
- J – constante de acoplamento
- LB – Luria Broth
- m/z – razão massa carga
- MTBE- Éter metil terc-butílico
- NHase- Nitrila hidratase
- NHase-Co -Nitrila hidratase dependente de cobalto
- NHase-Fe- Nitrila hidratase dependente de ferro
- PCR- Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
- PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonila (*phenylmethylsulfonyl fluoride*)
- RMN de ^{13}C - Ressonância magnética nuclear de carbono 13
- RMN de ^1H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

rpm – rotações por minuto

SOC - *Super Optimal Broth*

t.a. - temperatura ambiente

TBE- Tampão Tris/borato/EDTA

TMS - Tetrametilsilano

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Biocatálise e Química verde.....	23
1.2 Aplicações da biocatálise na indústria farmacêutica.....	27
1.3 Nitrila Hidratase (NHase).....	30
1.4 Clonagem livre de restrição (Restriction Free (RF) Cloning).....	39
1.5 Biotransformação regiosseletiva de dinitrilas.....	41
2. OBJETIVOS	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1 Planejamento de trabalho.....	45
3.2 Construção do plasmídeo recombinante de <i>R. erythropolis</i> ATCC 4277..	46
3.3. Construção do plasmídeo recombinante de <i>K. oxytoca</i>	49
3.4 Análise da sequência de nucleotídeos.....	50
3.5. Expressão de NHase recombinante em <i>E. coli</i>	53
3.6 Determinação das proteínas totais - Ensaio de Bradford.....	53
3.7 Medida da atividade enzimática.....	55
3.8 Especificidade do Substrato.....	56
3.9 Reações com extratos enzimáticos.....	64
3.10 Reações de catálise enzimática para formação do 4-(cianometil)benzenoacetanamida.....	65
3.11 Reações com o composto 4-(cianometil)benzenoacetanamida (5b).....	67
4. CONCLUSÕES	71
5. PARTE EXPERIMENTAL	73
5.1 Considerações Gerais.....	73
5.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ¹ H e ¹³ C).....	73
5.1.2 Métodos Cromatográficos.....	73
5.1.3 Espectroscopia no Infravermelho - (IV).....	74
5.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	75
5.1.5 Polarimetria.....	75
5.2 Meios de cultura.....	75
5.3 Tampões.....	76
5.4 Micro-organismos.....	76

5.5 Extração de DNA genômico.....	76
5.6 Análise do DNA em gel de agarose.....	77
5.7 Amplificação por PCR.....	78
5.8 Reação de amplificação linear.....	79
5.9 Preparo de bactérias eletrocompetentes.....	80
5.10 Transformação de células de <i>E. coli</i> por eletroporação.....	81
5.11 Análise dos transformantes de <i>E. coli</i>	81
5.12 Análise das sequências de DNA.....	83
5.13 Análise da expressão de proteínas.....	83
5.14 Metodologia para a síntese dos padrões e dados espectroscópicos dos compostos.....	84
5.14.1 Síntese do composto butanamida (2b).....	85
5.14.2 Síntese do composto isobutanamida (3b).....	86
5.14.3 Síntese do composto 2-amino-2-(4-fluorofenil)acetanamida (6b).....	87
5.14.4 Síntese do composto 2-fenilbutanamida (7b).....	87
5.15 Procedimento geral para as biotransformações e dados espectroscópicos das amidas.....	88
5.16 Quantificação das proteínas- Método de Bradford.....	90
5.17 Procedimento para as reações com extratos enzimáticos.....	91
5.17.1 Lise celular.....	91
5.17.2 Diálise dos extratos enzimáticos.....	91
5.17.3 Reações com extratos enzimáticos dialisados.....	91
5.18 Determinação da atividade enzimática.....	91
5.19 Reações de biocatálise com NHase comercial.....	92
5.20 Procedimento geral para obtenção do composto 4-(2-propanona)benzenoacetanamida (10).....	93
5.21 Reação de transaminação do 4-(cianometil)benzenoacetanamida.....	94
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
7. APÊNDICES.....	103

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biocatálise e Química Verde

O termo biocatálise abrange processos através dos quais as enzimas ou outros catalisadores biológicos são utilizados para catalisar reações químicas em compostos orgânicos (BIROLLI *et al.*, 2015). O uso de enzimas como catalisadores vem crescendo nos últimos anos em diferentes campos de aplicação, tais como a indústria química, farmacêutica, cosmética e de alimentos, dentre outras (ILLANES *et al.*, 2012; TURNER; TRUPPO, 2013). Este crescimento deve-se ao fato de que a biocatálise viabiliza a produção de compostos intermediários oticamente ativos ou não, em condições ambientalmente sustentáveis, o que a coloca como uma ferramenta importante na química orgânica sintética (MIRABAL-GALLARDO; SORIANO; SANTOS, 2013).

Nos anos 1980 e 1990, vários termos foram introduzidos no cenário da química, tais como química limpa, química ambiental, química verde, química benigna e química sustentável. A expressão “Química Verde” foi usada pela primeira vez em 1991 por P. T. Anastas e J. C. Warner em um programa especial lançado pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (ILLANES *et al.*, 2012).

A lei ambiental dos EUA “A Lei de Prevenção da Poluição de 1990” afirmou que a primeira escolha para prevenir a poluição é projetar processos industriais que não levam à produção de resíduos em especial os resíduos tóxicos (LLEVOT; MEIER, 2016). A agência de proteção ambiental (EPA) define a Química Verde (QV) como o design de produtos químicos e processos que reduzem ou erradicam o uso ou a geração de substâncias perigosas (SAINI, 2018).

Na década de 1990, John Warner e Paul Anastas propuseram os 12 princípios da química verde (Figura 1) para nortear a pesquisa e para que os químicos pudessem ter diretrizes para a avaliação do impacto ambiental de suas pesquisas (ERYTHROPEL *et al.*, 2018).



Figura 1. Os 12 primeiros princípios da química verde

Fonte: Adaptado de Erythropel e colaboradores (ERYTHROPEL *et al.*, 2018)

Os princípios da química sustentável também incluem preocupações com a conservação de energia, redução da geração de resíduos e considerações sobre o uso de matérias-primas renováveis, dentre outros. O desenvolvimento da química verde passa por uma transição, a partir de descrições qualitativas gerais para comparações quantitativas baseadas em resultados mensuráveis (LLEVOT; MEIER, 2016).

Melhorias na sustentabilidade dos processos de fabricação, incluindo os biocatalíticos, precisam ser medidos quantitativamente. De fato, se não for possível medir a sustentabilidade de um processo, não é possível definir metas para melhoria (SHELDON; WOODLEY, 2018). Medir o rendimento de uma reação pode ser uma boa indicação da economia do processo; no entanto, não fornece informações suficientes para promover práticas sustentáveis. Felizmente, uma ampla gama de métricas de química verde está agora disponível para os pesquisadores compararem rotas sintéticas e metodologias em termos de sustentabilidade das reações e/ou processos químicos (CLARKE *et al.*, 2018) (Tabela 1).

Tabela 1: Algumas métricas comuns da química verde e suas descrições

Métrica	Abreviatura	Descrição	Meta
Economia Atômica	AE	Massa molar (MM) do produto dividido pela soma das MM dos reagentes	100%
Eficiência de carbono	CE	Porcentagem de carbono dos reagentes que permanecem no produto final	100%
Eficiência de massa da reação	RME	Razão da massa do produto pela massa de todos os reagentes do processo.	100%
Fator ambiental	Fator E	Razão da massa dos resíduos pela massa do produto desejado	0
Intensidade de massa do processo	PMI	Relação entre a massa total utilizada no processo e a massa do produto	1

Fonte: Adaptado de Clarke e colaboradores (CLARKE *et al.*, 2018)

As concepções de economia atômica (EA) e eficiência de carbono (CE) foram feitas em contexto laboratorial e a do fator E na fronteira laboratório-indústria, datando ambas do início da década de noventa. A intensidade de massa do processo (PMI) teve origem industrial – fez parte das métricas de consumo de recursos incluídas nas métricas de sustentabilidade concebidas no âmbito da Engenharia Química. A eficiência de massa da reação (RME) foi introduzida por se ter verificado que a economia atômica, de natureza teórica, tinha limitações práticas (CONSTABLE; CURZONS; CUNNINGHAM, 2002; MACHADO, 2014).

As métricas permitem a avaliação do bom uso da matéria nas reações químicas: as três primeiras (AE, CE e RME) visam a aferição do sucesso na passagem dos átomos dos reagentes para o produto final; as duas últimas (PMI e fator E) focam globalmente na produção de resíduos nos processos industriais (MACHADO, 2014).

Uma das principais causas de geração de resíduos, particularmente na fabricação de produtos de química fina e farmacêutica, é o uso de proporções estequiométricas entre reagentes e o uso de solventes em síntese orgânica. Exemplos pertinentes são as reduções com metais (Na, Mg, Zn, Fe) e hidretos de metal (LiAlH₄, NaBH₄); e oxidações com permanganato, dióxido de manganês e reagentes de cromo (VI); e ácidos de Lewis (AlCl₃, ZnCl₂, BF₃), empregados como reagentes nas reações ou em etapas posteriores do processo. Além disso, devido à complexidade molecular da maioria dos produtos farmacêuticos, sua

síntese envolve várias etapas, que provavelmente geram mais resíduos do que a síntese de produtos químicos mais simples. A solução para esses problemas é a substituição das metodologias estequiométricas dispendiosas. Logo, uma das principais alternativas para a química verde e sustentável é o uso da catálise heterogênea e catálise homogênea em síntese orgânica (SHELDON; BRADY, 2018; SHELDON; WOODLEY, 2018).

Dentro desse contexto, a biocatálise apresenta muitas características atraentes especialmente para a síntese de compostos quirais enantiomericamente puros como as condições brandas de reação (pressão, temperatura e pH), uso de solventes ambientalmente amigáveis (água, fluidos supercríticos, solventes com baixa toxicidade e pressão de vapor) e utilização de biocatalisadores oriundos de fontes renováveis (micro-organismos e plantas) que são biodegradáveis, não tóxicos e que podem ser quimio-, regio- e estereosseletivos. Conseqüentemente, os processos biocatalíticos geram menos resíduos e são, portanto, ambientalmente e economicamente mais atrativos do que as rotas convencionais (MUÑOZ SOLANO *et al.*, 2012, NESTL; NEBEL; HAUER, 2011; SIMON; MUTTI; KROUTIL, 2013). Além das vantagens mencionadas anteriormente, o emprego de sistemas multienzimáticos em cascata e o desenvolvimento de processos em regime de fluxo contínuo miniaturizado incrementam sobremaneira as características de sustentabilidade ambiental dos processos biocatalíticos (SIMON; MUTTI; KROUTIL, 2013).

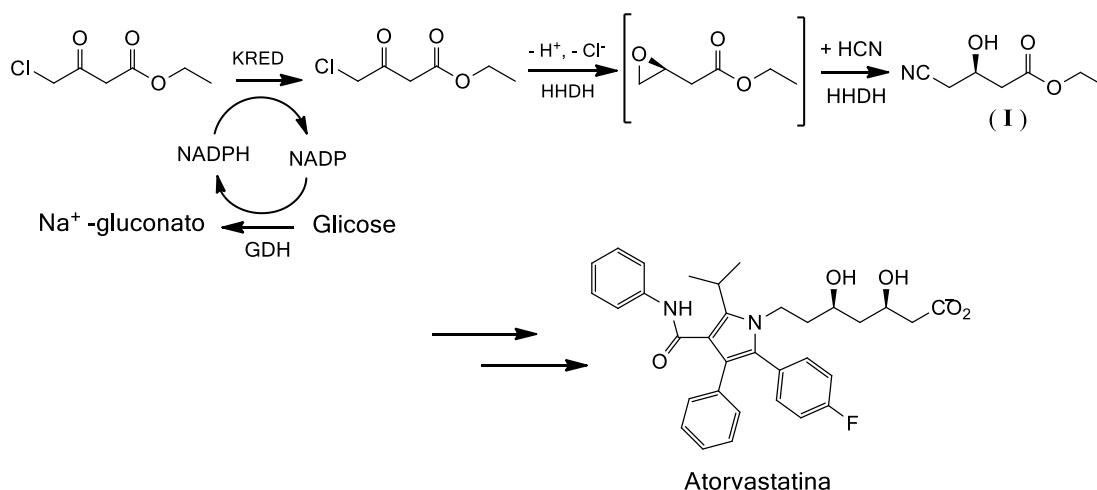
A química verde já existe há décadas e vem fazendo uma diferença real no mundo. Empresas e organizações bem conhecidas que a adotaram incluem Nike, BASF, Pfizer, Agência de Proteção Ambiental Americana, Bayer, Codexis, Johnson & Johnson e outras. O mercado global de química verde está previsto para crescer exponencialmente nos próximos anos, para US \$ 98,5 bilhões até 2020 (CLARKE *et al.*, 2018). Assim, a biocatálise tem sido utilizada com sucesso na fabricação de uma grande variedade de produtos químicos necessários para a produção de medicamentos, biodiesel, detergentes, biossurfactantes, aditivos alimentares, biopolímeros funcionalizados, de forma mais sustentável que as metodologias tradicionais (PRASAD; BHALLA, 2010).

1.2. Aplicações da biocatálise na indústria farmacêutica

Nos últimos anos observa-se um emprego crescente de processos biocatalíticos, principalmente em áreas como química fina e farmacêutica (BARREIRO; FRAGA, 2015). A biocatálise está evoluindo rapidamente como uma tecnologia-chave para a indústria farmacêutica, devido à elevada enantiosseletividade, condições de reação suaves e respeito ao ambiente (ZHENG *et al.*, 2014). Nos últimos anos, os processos químicos da indústria farmacêutica têm voltado sua atenção para a aplicação da biocatálise utilizando tanto enzimas isoladas, ou mais comumente, enzimas imobilizadas ou células íntegras de micro-organismos (WOODLEY, 2008).

Na década de 1980 a redução de cetonas foi amplamente investigada utilizando cetorredutases/álcool desidrogenases isoladas de levedura, fígado de cavalo, ou *Thermoanaerobium brockii*. Nos últimos anos, cientistas da Codexis desenvolveram processos com base em cetorredutase para a produção de intermediários de fármacos de sucesso como atorvastatina, montelucaste, duloxetina, fenilefrina, ezetimiba e crizotinibe. A atorvastatina é um fármaco membro da família das estatinas que reduz o colesterol através do bloqueio da síntese do colesterol no fígado, e é atualmente comercializado pela Pfizer sob o nome comercial de *Lipitor*®. A Codexis desenvolveu um processo em duas etapas para a síntese de um intermediário chave na produção da atorvastatina utilizando enzimas geneticamente modificadas (CHOI; HAN; KIM, 2015; HUISMAN; COLLIER, 2013) (Esquema 1).

Esquema 1. Síntese da hidroxinitrila (I) intermediário de atorvastatina



Fonte: Adaptado de Choi e colaboradores (CHOI *et al.*, 2015)

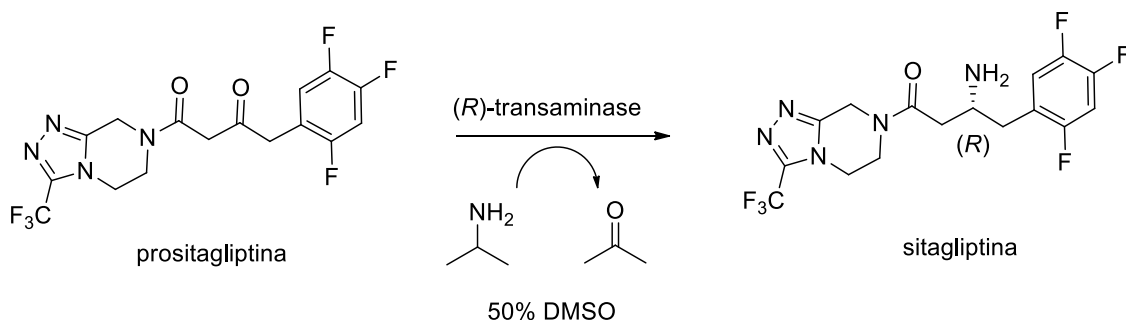
Na primeira etapa, 4-cloroacetoacetato de etila sofre uma redução enantiosseletiva catalisada por cetorreductase (KRED). A regeneração do cofator é realizada com glicose como doador de hidrogênio e NADP dependente de glicose desidrogenase (GDH) com catalisador. No segundo passo, uma halohidrina desalogenase (HHDH) é empregada para catalisar a substituição nucleofílica do cloro pelo grupo ciano por reação com HCN em pH neutro e temperatura ambiente (MA *et al.*, 2010)

Devido à elevada quimio-, regio- e estereosseletividade natural das enzimas, as reações enzimáticas foram altamente seletivas e proporcionaram uma redução substancial na produção de resíduos. O fator E (kg de resíduos/Kg de produto) para o processo global de síntese da hidroxinitrila foi de 5,8. Avanços na tecnologia de engenharia de proteínas permitiram a síntese em larga escala do intermediário **I**, e o processo multienzimático provou ser ambientalmente atrativo e economicamente viável em comparação com processos químicos tradicionais (MA *et al.*, 2010; PATEL, 2009; ROSCHANGAR; SHELDON; SENANAYAKE, 2015).

Outro exemplo da aplicação prática do uso de enzimas na indústria farmacêutica é o composto antidiabético sitagliptina. A sitagliptina é um medicamento para diabetes tipo II que foi comercializado sob o nome comercial Januvia pela Merck. Pesquisadores da Codexis e da Merck usaram uma combinação de técnicas de engenharia de proteínas para obter uma transaminase (*R*)-seletiva de *Arthrobacter* sp. para a conversão da cetona precursora, a prositagliptina (CHOI; HAS; KIM, 2015).

A transaminase (*R*)-seletiva de *Arthrobacter* sp. continha 27 mutações e converteu 200 g/L da cetona prositagliptina em sitagliptina com um excesso enantiomérico superior a 99,95%, na presença de isopropilamina, com 50% de DMSO a uma temperatura superior a 40 °C (Esquema 2) (BORNSCHEUER *et al.*, 2012).

Esquema 2. Síntese da sitagliptina a partir da prositagliptina usando uma (*R*)-transaminase



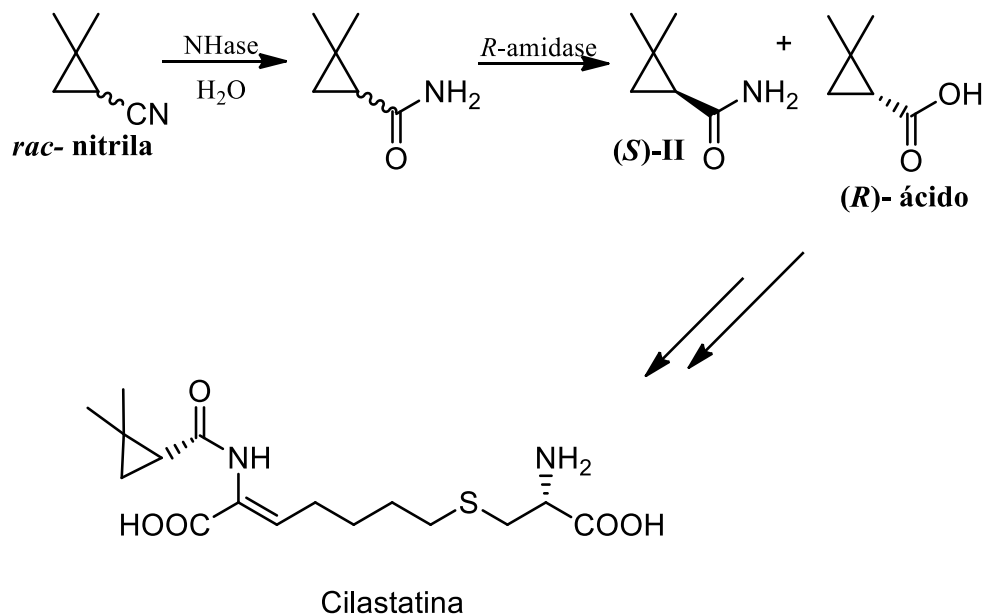
Fonte: Adaptado de Bornscheuer e colaboradores (BORNSCHEUER *et al.*, 2012)

Comparado com o processo catalisado por ródio (Rh), o processo biocatalítico não só reduziu o total de resíduos e eliminou a necessidade de um metal pesado (Rh), como também aumentou o rendimento total em 10% e a produtividade (kg/L por dia) em 53%. A imobilização da transaminase (*R*)-seletiva permitiu a manutenção da atividade e estabilidade da enzima em solvente orgânico e o uso repetitivo da enzima (BORNSCHEUER *et al.*, 2012; CHOI; HAS; KIM, 2015).

As possíveis rotas sintéticas para cada molécula alvo são avaliadas a fim de encontrar a melhor rota global. A disponibilidade de materiais de partida, o número de etapas envolvidas, considerações ambientais, escalabilidade, tempo de desenvolvimento e qualidade dos produtos são todos levados em consideração. A rota de escolha pode ser química ou uma combinação de química e biocatálise (SHAW; ROBINS; KIENER, 2003).

O composto (*S*)-2,2-dimetilciclopropanocarboxamida (II) é um intermediário sintético quiral da cilastatina (Esquema 3). Nos últimos anos, esforços consideráveis foram dedicados à síntese desse importante bloco de construção. A cilastatina é comumente administrada em associação ao antibiótico imipenem, no tratamento de infecções bacterianas graves que afetam o sistema respiratório e urinário. Zheng e colaboradores (2014) descrevem um processo *one-pot* em duas etapas, catalisada por nitrila hidratase (*Rhodococcus boritolerans* FW815) e amidase (*Delftia tsuruhatensis* ZJB-05174) que forneceu o (*S*)-2,2-dimetilciclopropanocarboxamida com rendimento de 38% e excesso enantiomérico maior que 99,5% (ZHENG *et al.*, 2014).

Esquema 3. Biotransformação da *rac*-2,2-dimetilciclopropanocarbonitrila por *Rhodococcus boritolerans* FW815 para obtenção de um intermediário da cilastatina.



Fonte: Adaptado de Zheng e colaboradores (ZHENG *et al.*, 2014)

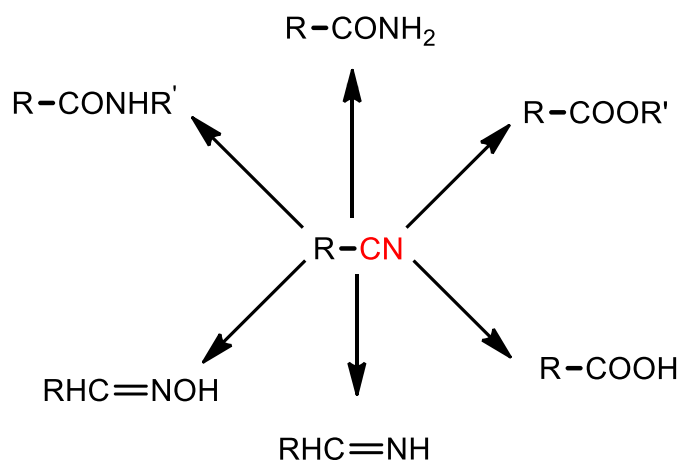
A rota biocatalítica melhorou drasticamente a eficiência do processo em comparação com a rota química, eliminando seis etapas. O bioprocesso evitou o uso de auxiliares quirais e redução no uso de solventes orgânicos. A reação foi realizada sob condições brandas, reduzindo a energia consumida no processo. A síntese do composto II é um exemplo de sucesso de processo farmacêutico ambientalmente benigno por combinação de NHase e amidase (ZHENG *et al.*, 2014).

1.3. Nitrila Hidratase (NHase)

As nitrilas são compostos orgânicos com um grupo $-C\equiv N$; eles são frequentemente conhecidos por ocorrerem naturalmente tanto na fauna como na flora e também são sintetizados quimicamente. Eles têm ampla aplicabilidade nos campos da medicina, indústria e monitoramento ambiental. No entanto, grande parte dos compostos nitrílicos são considerados letais, mutagênicos e carcinogênicos na natureza, e são conhecidos por causar problemas de saúde tais como náuseas, desconforto respiratório, convulsões e outros (RAMAKRISHNA; DAVE; RAVINDRANATHAN, 1999).

As nitrilas são compostos versáteis, podendo ser convertidas em amidas, aminas, iminas, oximas, ácidos carboxílicos, ésteres e álcoois (Esquema 4). São amplamente utilizadas como materiais de partida e intermediários em síntese orgânica, sobretudo, devido à hidratação de nitrilas para amidas correspondentes. As enzimas conversoras de nitrila são extraídas de vários micro-organismos e vegetais e têm chamado a atenção de pesquisadores de todo o mundo (RAMTEKE *et al.*, 2013).

Esquema 4. Versatilidade das nitrilas na obtenção de outros compostos



Fonte: Adaptado de Ramteke e colaboradores (RAMTEKE *et al.*, 2013)

Na Natureza, a biotransformação das nitrilas ocorre através de duas rotas enzimáticas (Figura 2).

i) reação direta catalisada pela nitrilase (Nase, EC 3.5.5.1) para produzir os correspondentes ácidos carboxílicos e amônia;

ii) reação indireta em duas etapas, na qual as nitrilas são primeiramente transformadas em amidas por nitrila hidratase (NHase, EC 4.2.1.84), e depois as amidas são transformadas para os correspondentes ácidos carboxílicos e amônia por amidase (EC 3.5.1.4) (D'ANTONA *et al.*, 2010).

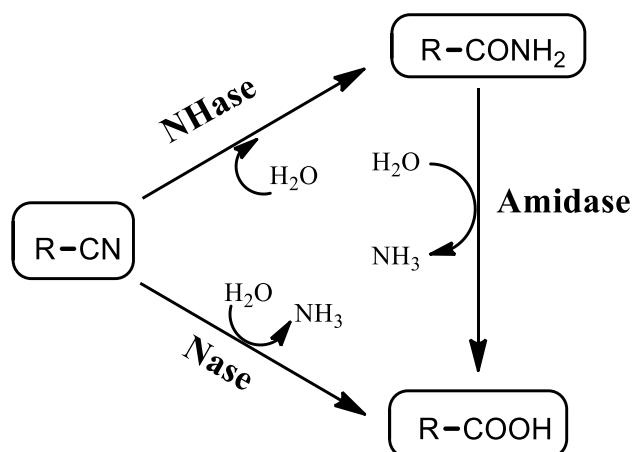


Figura 2. Duas rotas da natureza para a conversão de nitrilas em ácido carboxílico

A primeira ocorrência de nitrila hidratase foi reportada em *Rhodococcus rhodochrous* J-1, a princípio esta bactéria foi identificada como *Arthrobacter* sp. J-1, a qual degradou acetonitrila (ASANO, TANI; YAMADO, 1980; CHEN *et al.*, 2009). A nitrila hidratase é uma enzima chave envolvida no metabolismo microbiano que catalisa a hidratação de nitrilas para amidas. Este biocatalisador tem sido utilizado para a produção industrial de diversas amidas, tais como acrilamida, nicotinamida e 5-cianovaleramida (Figura 3) (BLACK *et al.*, 2010; CUI *et al.*, 2014; KAYANUMA *et al.*, 2015).

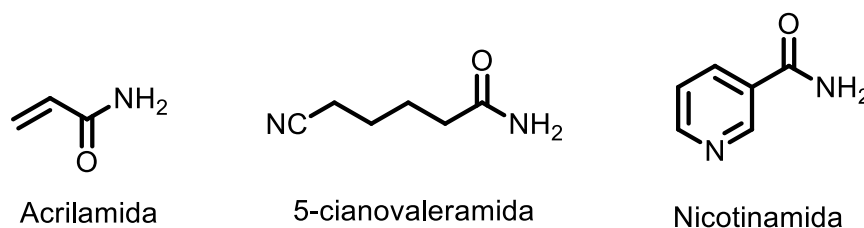


Figura 3. NHase na síntese de amidas produzidas industrialmente

Muitos micro-organismos exibem atividade NHase, tal como *Rhodococcus equi* TG3282, (RZEZNICKA *et al.*, 2010), *Klebsiella oxytoca* KCTC 1686 (GUO *et al.*, 2015), *Aurantimonas manganoxydans* ATCC BAA-1229 (PEI *et al.*, 2013), *Pseudomonas chlororaphis* B23 (NAGASAWA *et al.*, 1987) e outros. Até agora, um número considerável de micro-organismos foi rastreado com sucesso por catalisar a hidratação de nitrilas (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade de NHase de alguns micro-organismos

Micro-organismo	Especificidade do substrato
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> d3	Nitrilas alifáticas e aromáticas
<i>Arthrobacter</i> sp. J-1	Nitrilas alifáticas
<i>Bacillus cereus</i>	Acrilonitrila
<i>Bacillus</i> sp. BR 449	Acrilonitrila
<i>Bacillus smithii</i> SC-J05-1	Nitrilas aromáticas
<i>Brevibacterium imperialis</i> CBS 489-74	Acrilonitrila
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> B23	Nitrilas alifáticas
<i>Pseudomonas putida</i>	Acetonitrila
<i>Pseudonocardia thermophila</i> JCM 3095	Acrilonitrila
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J-1	Nitrilas alifáticas e aromáticas
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> R312	Nitrilas alifáticas e benzonitrila
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> LL 100-21	Nitrilas alifáticas e aromáticas
<i>Rhodococcus erythropolis</i> BL1	Nitrilas alifáticas e aromáticas
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> A4	Nitrilas alifáticas e aromáticas
<i>Cryptococcus flavus</i> UFMG-Y61	Isobutironitrila
<i>Rhodococcus</i> sp. N 774	Nitrilas alifáticas

Fonte: Adaptado de Chen e colaboradores (CHEN *et al.*, 2009)

Estudos demonstraram que o gene cluster das NHase consistem de um gene amidase e um gene ativador, além dos genes das subunidades α e β (ZHANG *et al.*, 2017). As NHases consistem em duas subunidades, α e β , sem homologia na sequência de aminoácidos (Figura 4), com uma massa molecular de aproximadamente 23 kD por subunidade, e geralmente existem como dímeros $\alpha\beta$ ou tetrâmeros $\alpha_2\beta_2$ (KANG *et al.*, 2014; PEI *et al.*, 2014). NHases podem ser classificadas em dois grandes grupos, com base no componente íon metálico: tipo Fe e tipo Co. Estes dois grupos exibem diferentes propriedades enzimáticas, em particular a especificidade pelo substrato (PEI *et al.*, 2014)

Trabalhos iniciais apontaram que as NHases-Fe hidratam preferencialmente nitrilas alifáticas pequenas, enquanto a NHases-Co exibem uma elevada afinidade pelas nitrilas aromáticas. No entanto, vários estudos têm mostrado que a especificidade pelo substrato não está relacionada ao tipo de componente metálico da enzima. A atividade da NHase possui características

únicas quando exposta à luz. As NHases dependentes de ferro (NHases-Fe) apresentam fotorreatividade regulada por óxido nítrico (NO), enquanto as dependentes de cobalto (NHases-Co) não. Por causa disso, micro-organismos que possuem NHase-Fe, a molécula de NO endógena permanece ligada ao Fe^{3+} no sítio ativo até receber irradiação pela luz, quando é substituído por uma molécula de água ou OH^- , resultando na recuperação da atividade original do NHase (BANERJEE; SHARMA; BANERJEE, 2002).

Existem duas principais razões da presença do íon metálico no sítio ativo dessas enzimas: (1) os íons metálicos são bons catalisadores para hidratação da ligação $-\text{CN}$ e (2) são necessários para a flexibilidade da enzima. Os complexos do sítio ativo de ambos os metais são semelhantes em alguns aspectos: são de baixo spin, apresentam baixo potencial redox e compartilham um conjunto de ligantes comum, que são três tiolatos de cisteína (Cis110, Cis112, Cis114) e dois átomos de nitrogênio (Ser113, Cis112) (BANERJEE; SHARMA; BANERJEE, 2002; NELP *et al.*, 2014).

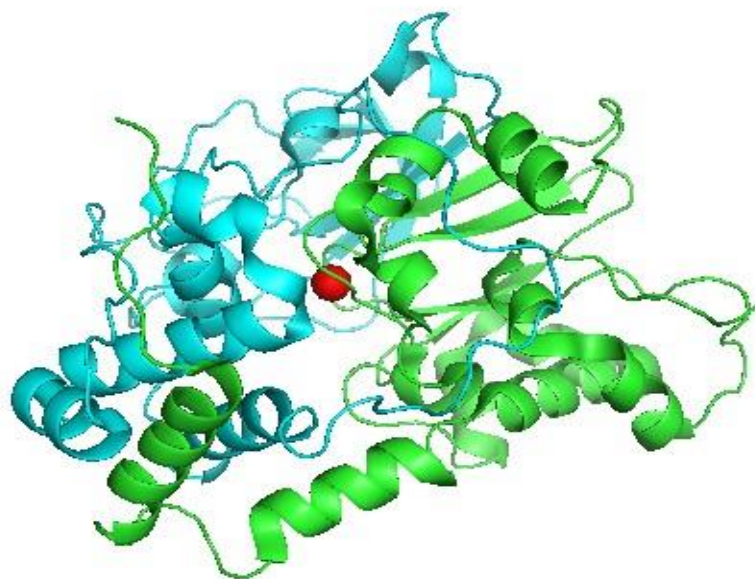


Figura 4. Representação tridimensional de uma NHase de *Rhodococcus erythropolis* AJ270. Em verde e azul estão representadas as subunidades α e β , respectivamente.

A esfera vermelha representa o cofator Fe^{3+}

Fonte: Adaptado do PDB (2QDY) utilizando o software PyMol

Em relação à estereosseletividade, os trabalhos iniciais apontaram uma baixa estereosseletividade para a enzima conversora da nitrila (PRÊPECHALOVÁ *et al.*, 2001). No entanto, mais e mais relatos tiveram sucesso

na bioconversão enantiosseletiva de nitrilas, através de técnicas de evolução dirigida de enzimas, que introduz mutações nas proteínas, adaptando os biocatalisadores para as condições do processo (Tabela 3). Uma das primeiras NHases enantiosseletivas foi isolada a partir de *Pseudomonas putida* NRRL-18668. Esta NHase dependente de cobalto catalisou a hidratação de (*S*)-2-(40-clorofenil)-3-metilbutironitrila pelo menos 50 vezes mais rápido do que o de (*R*)-2-(40-clorofenil)-3-metilbutironitrila (EWERT; LUTZ-WAHL; FISCHER, 2008). A NHase de *Agrobacterium tumefaciens* d3 hidratou várias 2-arilpropionitrilas e outras nitrilas aromáticas e heterocíclicas enantiosseletivamente à respetiva (*S*)-amida (BAUER; KNACKMUSS; STOLZ, 1998).

Tabela 3. NHases enantiosseletivas catalisam a transformação da nitrila (R_1R_2CHCN) para a correspondente amida

Micro-organismo	R1	R2	Seletividade (razão E ou ee)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> d3	Ph-	CH ₃ -	S (253)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> d3	Ph-	CH ₃ CH ₂ -	S (58)
<i>P. putida</i> NRRL18668	4-(Cl)Ph-	(CH ₃) ₂ CH-	S (50)
<i>P. putida</i> 13-5 S-CAN-2a	4-(Cl)Ph-	(CH ₃) ₂ CH-	S
<i>Pseudomonas</i> sp. 2D-11-5-1c	4-(Cl)Ph-	(CH ₃) ₂ CH-	S
<i>Rhodococcus</i> sp. AJ270	Ph-	CH ₃ CH ₂ -	R (ee 83%)
<i>Rhodococcus equi</i> TG328	Ph-	CH ₃ CH ₂ -	R
<i>Rhodococcus</i> sp. HT40-6	Ph-	OH-	S (ee 95%)
<i>R. equi</i> A4	Ph-	(CH ₃) ₂ CH-	S (5)

Fonte: Adaptado de Prasad e Bhalla (PRASAD; BHALLA, 2010)

Apesar do aumento nos relatos da literatura descrevendo NHases enantiosseletivas nos últimos anos, o escopo dos substratos testados ainda é estreito e muitas vezes os dados disponíveis não são suficientes para calcular os valores de E (TUCKER *et al.*, 2009).

Embora a estrutura da NHase já tenha sido definida, o mecanismo catalítico exato das NHases ainda não foi elucidado. Vários mecanismos plausíveis da reação catalítica da NHase foram propostos. Huang e colaboradores (1997) propõem três mecanismos:

i) a nitrila, então ligada ao metal, sofre hidrólise por uma molécula de água (mecanismo de esfera interna),

ii) a nitrila sofre um ataque nucleofílico do hidróxido ligado ao metal no sítio ativo (mecanismo de esfera externa),

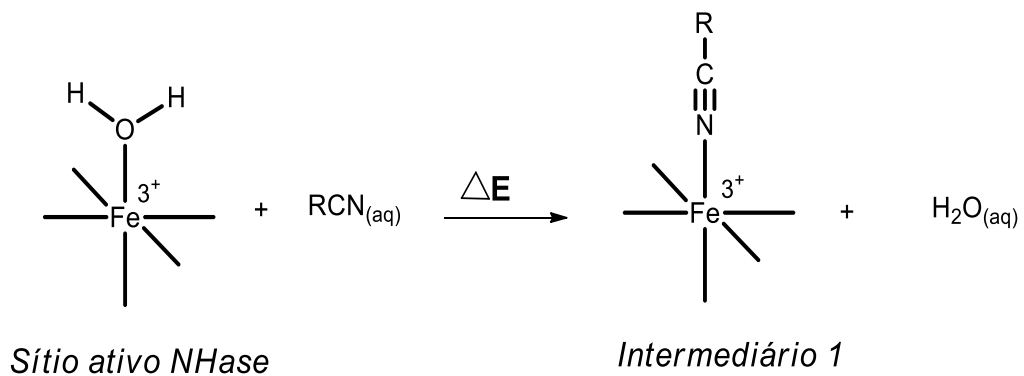
iii) o hidróxido ligado ao metal ativa uma molécula de água livre, que por sua vez atua como um nucleófilo (mecanismo de segunda esfera externa) (HUANG *et al.*, 1997).

Estudos experimentais recentes apoiaram a coordenação direta do substrato nitrila ao centro do metal durante a reação de hidratação catalítica. Hashimoto e colaboradores (2008) analisaram o mecanismo de reação da conversão do *tert*-butilisonitrila (tBuCN) catalisada por NHase usando cristalografia de raio-X com resolução temporal e sugeriu que o substrato estava coordenado com o íon metálico e atacado por molécula de água ativada por Cys-SO (HASHIMOTO *et al.*, 2008).

Os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da NHase estão localizados na subunidade α da enzima com uma sequência altamente conservada. Os estudos experimentais de cristalografia por raios X feitos com a enzima de *Pseudonocardia thermophila* JCM3095 sugeriram que o transporte tanto do substrato quanto do produto ocorre através de um canal localizado ao longo da interface das subunidades α e β . Um certo número de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos revestem as paredes deste canal. Estes incluem Phe 37, Pro 38, Phe 41, Leu 48, Phe 51, Arg 52, Tyr 68, Trp 72, Phe 118, Ala 122 e Leu 127 (presente na subunidade β) e Leu 88, Gln 89 e Trp 116 (presente na subunidade α) (Huang *et al.*, 1997).

Hopmann (2014) propôs um possível mecanismo de ação em que a nitrila hidratase converte nitrilas em suas respectivas amidas (Figura 5).

i)



ii)

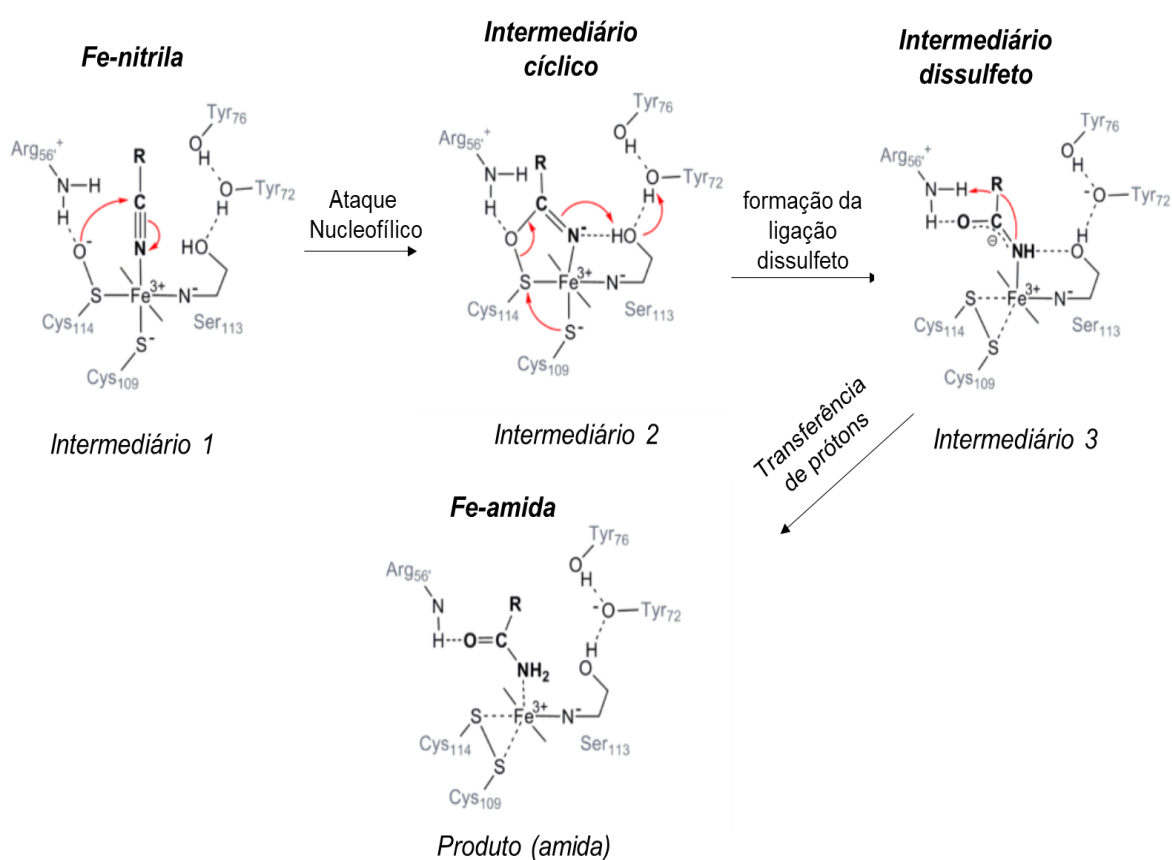


Figura 5. Mecanismo proposto para reação de hidratação de nitrila catalisada por NHase

Fonte: Adaptado de Hopmann (HOPMANN, 2014)

As principais etapas desses mecanismos são:

i) O metal inicialmente se coordena com uma molécula de água (Fe-H₂O) e uma barreira de entalpia de 13,8 Kcal/mol é suficiente para deslocar a molécula de água pela de nitrila da esfera de coordenação do Fe³⁺ (intermediário 1).

ii) Na etapa seguinte da catálise ocorre a formação de um intermediário cíclico a partir de um ataque nucleofílico do átomo de oxigênio de Cys-SO- ao substrato coordenado com o metal. Logo após, ocorre a formação da ligação dissulfeto (Intermediário 2) entre a Cys109 e Cys114, a partir de um ataque nucleofílico do átomo de enxofre ligado ao resíduo Cys109. Concomitante com a clivagem da ligação Cys114-substrato e transferência de próton entre os resíduos Try72 → Ser113 → substrato, resultando na formação do intermediário cíclico protonado (Intermediário 3). Após a formação do intermediário dissulfeto o nitrogênio do substrato abstrai um próton de Arg56 e protonação do oxigênio do substrato, formando um iminol, é energeticamente menos preferível. Após o deslocamento da amida, o sítio ativo é regenerado através de etapas sequenciais de transferência de prótons para Tyr72, ataque de uma molécula água no dissulfeto e transferência de prótons para Arg56.

O interesse nas NHases cresceu desde sua aplicação bem-sucedida na produção industrial de amidas (PRASAD; BHALLA, 2010). No entanto, as cepas originais também transformam amidas em ácidos carboxílicos usando amidase, que é expressa junto com as NHases no mesmo operon. Conseqüentemente, a pureza e o rendimento da amida alvo é reduzido. Para resolver este problema, o gene NHase é tipicamente clonado em células heterólogas. A clonagem facilita a expressão da enzima, que é um método alternativo para a produção de amida como o único produto. Além disso, NHases recombinantes podem ser convenientemente adaptadas e melhoradas através de engenharia de proteínas. A *Escherichia coli* é o hospedeiro procariótico mais utilizado para a expressão de proteínas e biocatalisadores (PEI *et al.*, 2013).

1.4. Clonagem livre de restrição (Restriction Free (RF) Cloning)

As técnicas de clonagem molecular avançaram dramaticamente desde a descoberta das primeiras endonucleases de restrição. A tecnologia de DNA recombinante é hoje considerada uma prática de rotina. Isolamento e amplificação do DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR), clonagem molecular e anotação do genoma tornaram-se procedimentos padrões (CELIE; PARRET; PERRAKIS, 2016).

A manipulação de moléculas de DNA recombinante é um passo indispensável em estudos modernos de cristalização de proteínas de alto rendimento. O uso de enzima de restrição se baseia na digestão com as enzimas que reconhecem determinada sequência de nucleotídeo, seguido do uso de uma enzima de ligação (DNA ligase) que catalisa a união de cadeias de DNA, é uma maneira simples e fácil de mover um fragmento de DNA de fita dupla de um plasmídeo para outro. No entanto, esta técnica tem duas limitações: é ineficaz quando há falta de sites de restrição exclusivos e as vezes resulta na introdução de uma sequência extra indesejada. Para contornar essas limitações, vários métodos de clonagem independentes do local de clivagem pela endonuclease de restrição foram recentemente desenvolvidos (SOUIL; M'HADHEB-GHARBI; GHARBI, 2013).

A clonagem Clássica Dependente de Ligação (Ligation-Dependent Cloning, LDC) é gradualmente substituída por técnicas de Clonagem Independente de Ligação (Ligation-Independent Cloning, LIC). A Clonagem Livre de Restrição (RF) foi originalmente desenvolvida para a introdução de um DNA alvo em um plasmídeo em qualquer posição desejada (VAN DEN ENT; LOWE, 2006).

A clonagem RF é uma abordagem simples baseada na realização de duas reações em cadeia da polimerase (PCR) para inserir qualquer fragmento de DNA em qualquer posição de um vetor, independentemente dos sítios de restrição e ligações (LUND; LEIROS; BJERGA, 2014; VAN DEN ENT; LOWE, 2006). Na primeira PCR, o gene de interesse é amplificado usando um par de primers; cada um contendo sequência complementar tanto para a inserção desejada quanto para o plasmídeo alvo. Na segunda PCR, o produto da primeira é utilizado como megaprimer para amplificação linear do vetor escolhido. O produto da segunda PCR possui sítios de ligações únicos nas extremidades, que são

complementares a sequências que flanqueiam o sítio de inserção no vetor. O DNA parental é então removido pelo tratamento com *DpnI* e o plasmídeo recém-sintetizado, contendo a inserção de DNA, é introduzido nas células de *Escherichia coli* (Figura 6) (BOND; NAUS, 2012; CHEN *et al.*, 2000; UNGER *et al.*, 2010; VAN DEN ENT; LOWE, 2006).

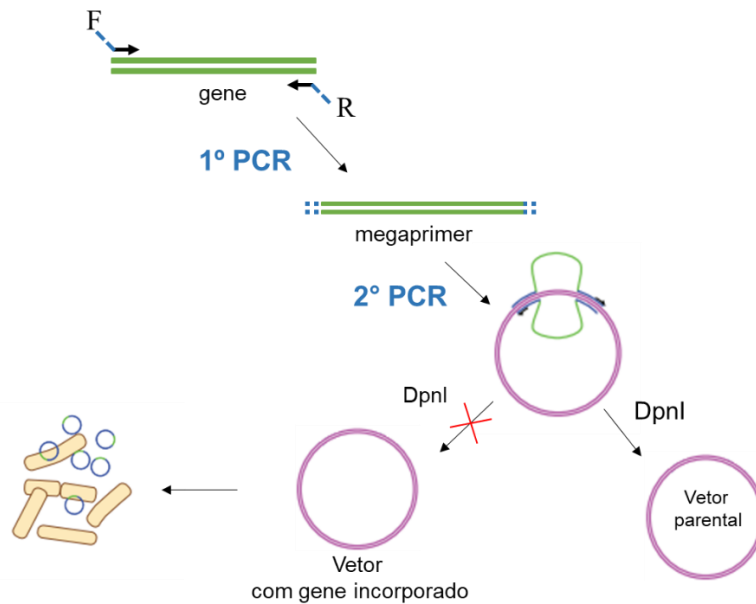


Figura 6. Representação esquemática de clonagem RF. Primers híbridos são desenhados para se ligarem ao gene (verde) e ao plasmídeo (rosa). A primeira PCR leva ao megaprimer que possui em suas extremidades sequências que se flanqueiam ao plasmídeo. Na segunda PCR, o produto da primeira é usado para amplificação linear do vetor circular escolhido. Uma vez que todo plasmídeo é replicado, é realizada uma digestão com *DpnI*, para degradar seletivamente o DNA parental metilado e a mistura reacional é transformada em células competente de *E. coli*.

Fonte: Adaptado de Bond e Naus (BOND e NAUS, 2012)

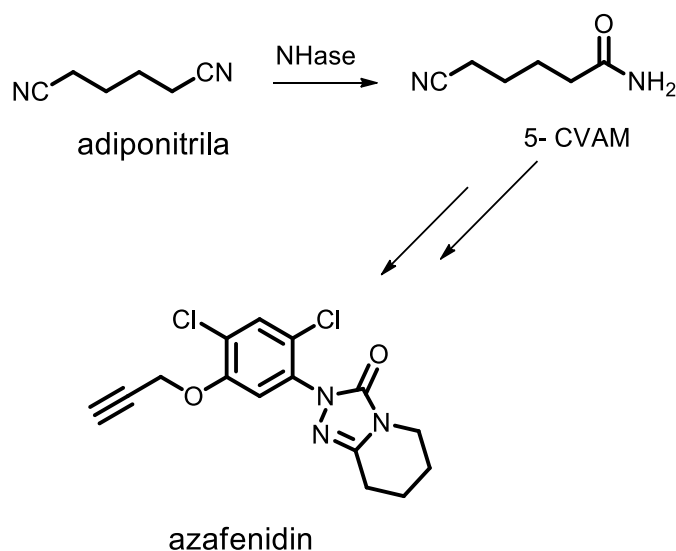
O método de clonagem RF apresenta vantagens, que o torna uma alternativa atraente em relação a outros procedimentos de clonagem. Este método permite uma inserção precisa e perfeita do inserto de DNA sem quaisquer sequências adicionais desnecessárias. Além disso, a reação é altamente eficiente e adequada para clonagem de alto rendimento (UNGER *et al.*, 2010). Conhecendo as vantagens do método de clonagem RF suas aplicações incluem a clonagem simultânea de vários fragmentos de DNA em posições distintas dentro de um vetor de expressão, clonagem paralela do mesmo produto de PCR em uma série de vetores diferentes e montagem multicomponente (ULRICH; ANDERSEN; SCHWARTZ, 2012; UNGER *et al.*, 2010).

1.5. Biotransformação regioseletiva de dinitrila

A hidratação química de nitrilas geralmente requer condições vigorosas tais como ácidos ou bases fortes e prossegue sem regioseletividade quando um dinitrila é empregada. Uma abordagem enzimática, no entanto, oferece vantagens significativas, uma vez que a enzima pode hidratar seletivamente um grupo ciano de uma dinitrila (CHEN *et al.*, 2009).

A produção de 5-cianovaleramida (5-CVAM) a partir da adiponitrila é um exemplo do uso da propriedade regioseletiva das NHases. O 5-CVAM é um intermediário para a produção do herbicida azafenidin (Esquema 5) e é produzido pela DuPont usando células imobilizadas de *Pseudomonas chlororaphis* B23 com conversão de 97%, alto rendimento (93%) e alta seletividade de 96%. O processo usando o biocatalisador resulta em maiores rendimentos, maior produtividade do catalisador, menor formação de subprodutos, e gera significativamente menos resíduos do que métodos químicos alternativos, como a catálise com dióxido de manganês (SHAPIRO *et al.*, 2001)

Esquema 5. Dessimetrização de adiponitrila para produzir 5-cianovaleramida, um precursor do azafenidin.

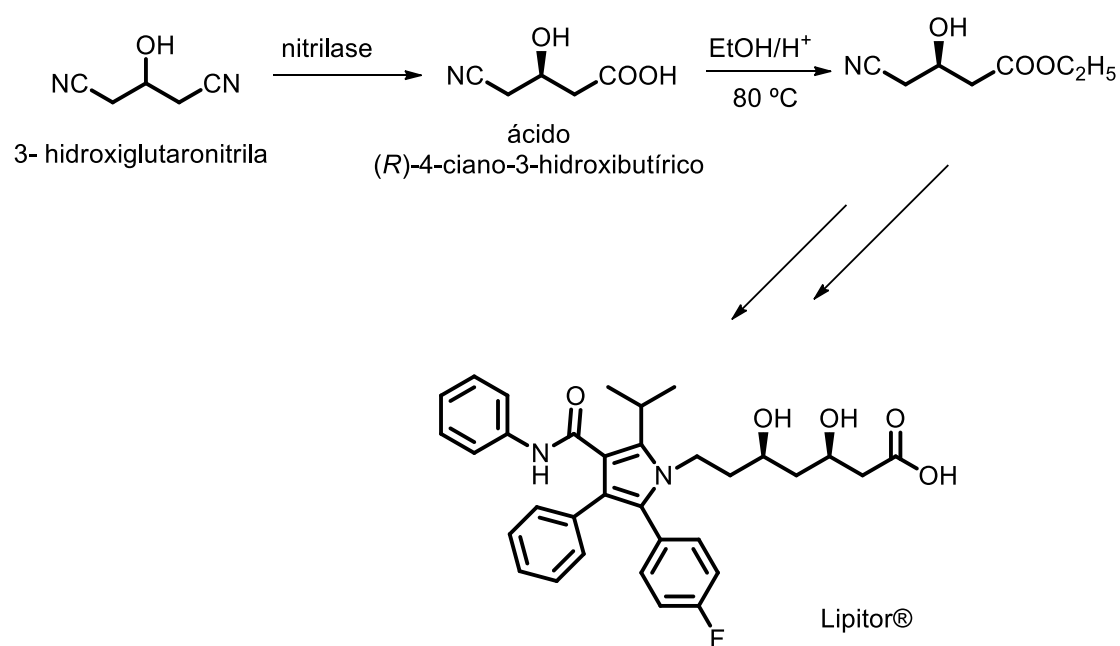


Fonte: Adaptado de Shapiro e colaboradores (SHAPIRO *et al.*, 2001)

A dessimetrização de dinitrilas também foi investigada por Bergeron e colaboradores (2006), em cujo o estudo, o 3-hidroxi glutaronitrila foi

biotransformado no ácido (*R*)-4-ciano-3-hidroxi-butírico pela nitrilase *R*-específica, a qual foi expressa de *Pseudomonas fluorescens* BD9570. O ácido foi obtido com uma conversão de aproximadamente 99% e excesso enantiomérico variando de 98,6% a 99,4% (Esquema 6). A esterificação do ácido (*R*)-4-ciano-3-hidroxi-butírico é usado como um intermediário para a síntese do Lipitor[®], fármaco que atua no controle do colesterol e comercializado pela Pfizer (BERGERON *et al.*, 2006)

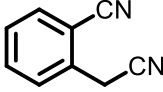
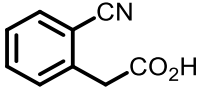
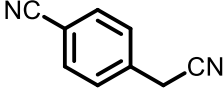
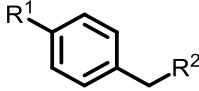
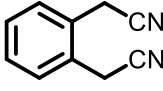
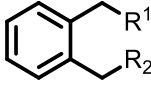
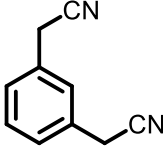
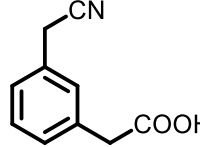
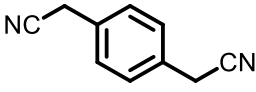
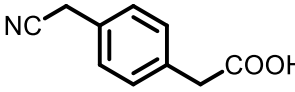
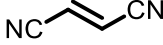



Esquema 6. Dessimetrização do 3-hidroxi-glutaronitrila por nitrilase



Fonte: Adaptado de Bergeron e colaboradores (BERGERON *et al.*, 2006)

A natureza regioseletiva das enzimas conversoras de nitrila foi investigada utilizando vários compostos de dinitrila como substratos. Células íntegras de *Rhodococcus* sp. AJ270 catalisaram eficazmente a hidratação das dinitrilas alifáticas em diversos monoácidos, com a exceção de *o*-fenilenodiacetonitrila em que a *o*-fenilenodiacetamida foi obtida como produto principal (Tabela 4) (CHEN *et al.*, 2009).

Tabela 4. Conversão de dinitrilas por *Rhodococcus* sp. AJ270

Substrato	Tempo (h)	Produto e rendimento
	24	 80%
	24	 R ¹ =CN R ² =COOH 65% R ¹ =COOH R ² =CN 16%
	24	 R ¹ =CN R ² =COOH 11% R ¹ =CN R ² =CONH ₂ 65%
	30	 67%
	30	 69%
	14	 99%
	14	 86%

Fonte: Adaptado de Chen e colaboradores (CHEN *et al.*, 2009)

5. CONCLUSÕES

O gene nitrila hidratase dos micro-organismos *Klebsiella oxytoca* e *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 foi clonado, a partir do DNA genômico dos respectivos micro-organismos pela estratégia de clonagem livre de restrição (*Restriction free cloning*).

O DNA de um clone positivo de *R. erythropolis* ATCC 4277 foi enviado para sequenciamento e o resultado confirmou que a NHase de *R. erythropolis* é do tipo Ferro e a presença de duas subunidades (subunidades α e β) e de um gene ativador. Os clones de *K. oxytoca* enviados para sequenciamento foram selecionados pela técnica azul-branco, que é apenas um procedimento de triagem e não é uma técnica de seleção. Contudo, uma análise de sequenciamento revelou que os possíveis clones selecionados não apresentam homologia com a sequência do gene NHase de *K. oxytoca*.

Reações com células integras de *E. coli* recombinante (NHase-*Rhodococcus*) foram realizadas para avaliar a especificidade dos substratos frente a NHase. As amidas **2b**, **3b** e **4b** foram obtidas com conversões acima de 99%. O composto **5b** foi obtido com moderada conversão, mas de forma regioseletiva na obtenção da monoamida. As amidas **6b** e **7b** foram obtidas com conversões de 88% e 11%, respectivamente, e excessos enantioméricos baixo e moderado. No caso da amida **7b** o ee foi 60% do enantiômero (S). Para as amidas **1b**, **8b** e **9b** não houve formação da amida ou conversões muito baixas foram observadas. Logo, a NHase do tipo Fe de *Rhodococcus* não tem uma preferência na hidratação de nitrilas alifáticas ou aromáticas.

A fim de caracterização das amidas obtidas nas reações de biotransformação, as amidas **2b**, **3b**, **6b** e **7b** foram sintetizadas via química. Os compostos foram caracterizados a partir de espectrometria de massas, espectroscopia no infravermelho, e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C . Foram também desenvolvidos os métodos de separação em colunas quirais (de GC e HPLC) das amidas **6b** e **7b**.

Por fim, os extratos enzimáticos com a *E. coli* recombinante não apresentaram potencial para a hidratação das nitrilas, mesmo não sendo tão baixa a concentração de enzima presente nos extratos enzimáticos produzidos, de acordo com a dosagem realizada pelo Ensaio de Bradford.

As reações de catálise enzimática realizadas com NHases comerciais apresentaram boas conversões e rendimentos para formação do 4-(cianometil)benzenoacetanamida, que foi utilizado como intermediário em reações de Grignard e reações de transamidação.

No decorrer desse trabalho exploramos a utilização das NHases que demonstraram sua capacidade estereosseletiva e regioseletiva como biocatalisador versátil e com potencial para aplicações comerciais. E acreditamos que ainda existe uma necessidade de trabalhos de engenhejamento das NHases, a fim de se obter melhores resultados.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, M.; MACCOLL, A.; BOWEN, R. D. Part 17 : 1 selected aliphatic amides. v. 208, p. 197–208, 1997.
- ASANO, Y.; TANI, Y.; YAMADA, H. A new enzyme “nitrile hydratase” which degrades acetonitrile in combination with amidase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2251-2252, 1980.
- BANERJEE, A.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. The nitrile-degrading enzymes: Current status and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1–2, p. 33–44, 2002.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3ª ed. Editora Artmed, 2015.
- BAUER, R.; KNACKMUSS, H. J.; STOLZ, A. Enantioselective hydration of arylpropionitriles by a nitrile hydratase from *Agrobacterium tumefaciens strain d3*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 89–95, 1998.
- BEARD, T.; COHEN, M. A.; PARRATT, J. S.; TURNER, N. J.; CROSBY, J.; MOILLIET, J. Stereoselective hydrolysis of nitriles and amides under mild conditions using a whole cell catalyst. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 4, n. 6, p. 1085–1104, 1993.
- BERGERON, S.; CHAPLIN, D. A.; EDWARDS, J. H.; ELLIS, B.S.W.; HILL, C. L.; HOLT-TIFFIN, K.; KNIGHT, J. R.; MAHONEY, T.; OSBORNE, A. P.; RUECROFT, G. Nitrilase-Catalysed Desymmetrisation of 3-Hydroxyglutaronitrile: Preparation of a Statin Side-Chain Intermediate. **Organic Process Research and Development**, v. 10, n. 3, p. 661–665, 2006.
- BIROLI, W. G.; ALVARENGA, N.; FERREIRA, I. M.; BIROLI, W. G.; SANTOS, D. DE A.; MATOS, I. L. DE; COMASSETO, J. V.; PORTO, A. L. M. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 481–510, 2015.
- BLACK, G. W.; GREGSON, T.; MCPAKE, C. B.; PERRY, J. J.; ZHANG, M. Biotransformation of nitriles using the solvent-tolerant nitrile hydratase from *Rhodospseudomonas palustris* CGA009. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 13, p. 1639–1641, 2010.
- BLAKEY, A. J.; COLBY, J.; WILLIAMS, E.; O'REILLY, C. Regio- and stereo-

specific nitrile hydrolysis by the nitrile hydratase from *Rhodococcus* AJ270.

FEMS Microbiology Letters, v. 129, n. 1, p. 57–61, 1995.

BOLYOG-NAGY, E.; UDVARDY, A.; JOÓ, F.; KATHÓ, Á. Efficient and selective hydration of nitriles to amides in aqueous systems with Ru(II)-phosphaurotropine catalysts. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 26, p. 3615–3617, 2014.

BOND, S. R.; NAUS, C. C. RF-Cloning.org: An online tool for the design of restriction-free cloning projects. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. 209–213, 2012.

BRADY, D.; BEETON, A.; ZEEVAART, J.; KGAJE, C.; RANTWIJK, F. VAN; CELIE, P. H. N.; PARRET, A. H. A.; PERRAKIS, A. Recombinant cloning strategies for protein expression. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 38, p. 145–154, 2016.

BORNSCHEUER, U. T.; LUTZ, S.; ROBINS, K.; KAZLAUSKAS, R. J.; HUISMAN, G. W.; MOORE, J. C. Engineering the third wave of biocatalysis. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 185–194, 2012.

CHEN, G.; QUI, N.; KARRER, C.; CASPERS, P.; PAGE, M. G. P. Restriction Site-Free Insertion of PCR Products Directionally into Vectors BioTechniques. **BioTechniques**, v. 28, n. 3, p. 498–505, 2000.

CHEN, J.; ZHENG, R. C.; ZHENG, Y. G.; SHEN, Y. C. Microbial Transformation of Nitriles to High-Value Acids or Amides. **Adv Biochem Engin/Biotechnol**, v. 113, p. 33–77, 2009.

CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, 2015.

CLARKE, C. J.; TU, W. C.; LEVERS, O.; BRÖHL, A.; HALLETT, J. P. Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 2, p. 747–800, 2018.

CONSTABLE, D. J. C.; CURZONS, A. D.; CUNNINGHAM, V. L. Metrics to “green” chemistry - Which are the best? **Green Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 521–527, 2002.

CUI, Y.; CUI, W.; LIU, Z.; ZHOU, L.; KOBAYASHI, M.; ZHOU, Z. Improvement of stability of nitrile hydratase via protein fragment swapping. **Biochemical and**

Biophysical Research Communications, v. 450, n. 1, p. 401–408, 2014.

D'ANTONA, N.; NICOLOSI, G.; MORRONE, R.; KUBÁČ, D.; KAPLAN, O.; MARTÍNKOVÁ, L. Synthesis of novel cyano-cyclitols and their stereoselective biotransformation catalyzed by *Rhodococcus erythropolis* A4. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 21, n. 6, p. 695–702, 2010.

DUARTE, R. C. C.; RIBEIRO, M. G. T. C.; MACHADO, A. A. S. C. Using Green Star Metrics To Optimize the Greenness of Literature Protocols for Syntheses. **Journal of Chemical Education**, v. 92, n. 6, p. 1024–1034, 2015.

DURAN, R.; NISHIYAMA, M.; HORINOUCI, S.; BEPPU, T. Characterization of nitrile hydratase genes cloned by DNA screening from *Rhodococcus erythropolis*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 57, n. 8, p. 1323–1328, 1993.

ENDO, I.; NOJIRI, M.; TSUJIMURA, M.; NAKASAKO, M.; NAGASHIMA, S.; YOHDA, M.; ODAKA, M. Fe-type nitrile hydratase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 83, n. 4, p. 247–253, 2001.

ERYTHROPEL, H. C.; ZIMMERMAN, J. B.; De WINTER, T. M.; PETITJEAN, L.; MELNIKOV, F.; LAM, C. H.; LOUNSBURY, A. W.; MELLOR, K. C.; JANKOVIĆ, N. Z.; TU, Q.; PINCUS, L. N.; FALINSKI, M. M.; SHI, W.; COISH, P.; PLATAAB, D. L.; ANASTAS, P. T. The Green ChemistREE: 20 years after taking root with the 12 principles. **Green Chemistry**, v. 20, n. 9, p. 1929–1961, 2018.

EWERT, C.; LUTZ-WAHL, S.; FISCHER, L. Enantioselective conversion of α -arylnitriles by *Klebsiella oxytoca*. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 19, n. 22, p. 2573–2578, 2008.

FALLON, R. D.; STIEGLITZ, B.; TURNER, I. A. *Pseudomonas putida* capable of stereoselective hydrolysis of nitriles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 156–161, 1997.

GUO, F. M.; WU, J. P.; YANG, L. R.; XU, G. Overexpression of a nitrile hydratase from *Klebsiella oxytoca* KCTC 1686 in *Escherichia coli* and its biochemical characterization. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, n. 6, p. 995–1004, 2015.

HASHIMOTO, K.; SUZUKI, H.; TANIGUCHI, K.; NOGUCHI, T.; YOHDA, M.; ODAKA, M. Catalytic mechanism of nitrile hydratase proposed by time-resolved X-ray crystallography using a novel substrate, tert-butylisonitrile. **Journal of**

Biological Chemistry, v. 283, n. 52, p. 36617–36623, 2008.

HOPMANN, K. H. Full reaction mechanism of nitrile hydratase: A cyclic intermediate and an unexpected disulfide switch. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2760–2762, 2014.

HUANG, W.; LINDQVIST, Y.; CUMMINGS, J.; SCHNEIDER, G.; NELSON, M.; JIA, J. Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron centre in a novel fold. **Structure**, v. 5, n. 5, p. 691–699, 1997.

HUISMAN, G. W.; COLLIER, S. J. On the development of new biocatalytic processes for practical pharmaceutical synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, n. 2, p. 284–292, 2013.

ILLANES, A.; CAUERHFF, A.; WILSON, L.; CASTRO, G. R. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 48–57, 2012.

KANG, M. S.; HAN, S. S.; KIM, M. Y.; KIM, B. Y.; HUH, J. P.; KIM, H. S.; LEE, J. H. High-level expression in *Corynebacterium glutamicum* of nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* for acrylamide production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 10, p. 4379–4387, 2014.

KAYANUMA, M.; HANAOKA, K.; SHOJI, M.; SHIGETA, Y. A QM/MM study of the initial steps of catalytic mechanism of nitrile hydratase. **Chemical Physics Letters**, v. 623, p. 8–13, 2015.

KIM, S. H.; ORIEL, P. Cloning and expression of the nitrile hydratase and amidase genes from *Bacillus* sp. BR449 into *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 7, p. 492–501, 2000.

LLEVOT, A.; MEIER, M. A. R. Renewability—a principle of utmost importance! **Green Chemistry**, v. 18, n. 18, p. 4800–4803, 2016.

LU, J.; ZHENG, Y.; YAMAGISHI, H.; ODAKA, M.; TSUJIMURA, M.; MAEDA, M.; ENDO, I. Motif CXCC in nitrile hydratase activator is critical for NHase biogenesis in vivo. **FEBS Letters**, v. 553, n. 3, p. 391–396, 2003.

LUND, B. A.; LEIROS, H. K. S.; BJERGA, G. E. K. A high-throughput, restriction-free cloning and screening strategy based on *ccdB*-gene replacement. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2014.

MA, Y.; YU, H.; PAN, W.; LIU, C.; ZHANG, S.; SHEN, Z. Identification of nitrile hydratase-producing *Rhodococcus ruber* TH and characterization of an *amiE*-

negative mutant. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 285–291, 2010.

MACHADO, A. A. S. C. BATERIA DE MÉTRICAS PARA AVALIAÇÃO DA VERDURA MATERIAL DE REAÇÕES DE SÍNTESE. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 1094–1109, 2014.

MATEOS, C.; RINCÓN, J. A.; VILLANUEVA, J. Efficient and scalable synthesis of ketones via nucleophilic Grignard addition to nitriles using continuous flow chemistry. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 18, p. 2226–2230, 2013.

MIRABAL-GALLARDO, Y.; SORIANO, M. D. P. C.; SANTOS, L. S. Stereoselective bioreduction of β -carboline imines through cell-free extracts from earthworms (*Eisenia foetida*). **Tetrahedron Asymmetry**, v. 24, n. 8, p. 440–443, 2013.

MUÑOZ SOLANO, D.; HOYOS, P.; HERNÁIZ, M. J.; ALCÁNTARA, A. R.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 196–207, 2012.

NAGASAWA, T.; NANBA, H.; RYUNO, K.; TAKEUCHI, K.; YAMADA, H. Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23. v. 162, p. 691–698, 1987.

NELP, M. T.; ASTASHKIN, A. V.; BRECI, L. A.; MCCARTY, R. M.; BANDARIAN, V. The alpha subunit of nitrile hydratase is sufficient for catalytic activity and post-translational modification. **Biochemistry**, v. 53, n. 24, p. 3990–3994, 2014.

NESTL, B. M.; NEBEL, B. A.; HAUER, B. Recent progress in industrial biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 2, p. 187–193, 2011.

PATEL, J. M. Biocatalytic synthesis of atorvastatin intermediates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, n. 3–4, p. 123–128, 2009.

PEI, X.; YANG, L.; XU, G.; WANG, Q.; WU, J. Discovery of a new Fe-type nitrile hydratase efficiently hydrating aliphatic and aromatic nitriles by genome mining. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 26–33, 2014.

PEI, X.; ZHANG, H.; MENG, L.; XU, G.; YANG, L.; WU, J. Efficient cloning and expression of a thermostable nitrile hydratase in *Escherichia coli* using an auto-induction fed-batch strategy. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 1921–1927, 2013.

- PRASAD, S.; BHALLA, T. C. Nitrile hydratases (NHases): At the interface of academia and industry. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 725–741, 2010.
- PRÊPECHALOVÁ, I.; MARTÍNKOVÁ, L.; STOLZ, A.; OVESNÁ, M.; BEZOUŠKA, K.; KOPECKY, J.; KREN, V. Purification and characterization of the enantioselective nitrile hydratase from *Rhodococcus equi* A4 T. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 55, p. 150–156, 2001.
- RAMTEKE, P. W.; MAURICE, N. G.; JOSEPH, B.; WADHER, B. J. Nitrile-converting enzymes: An eco-friendly tool for industrial biocatalysis. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 60, n. 5, p. 459–481, 2013.
- RAMAKRISHNA, C.; DAVE, H.; RAVINDRANATHAN, M. Microbial Metabolism of Nitriles and Its Biotechnological Potential. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 58, n. 12, p. 925–947, 1999.
- RITTER, S. K. The 2016 Presidential Green Chemistry Challenge Awards Annual. **C&EN**, v. 94, p. 20–23, 2016.
- RIVA, E.; GAGLIARDI, S.; MARTINELLI, M.; PASSARELLA, D.; VIGO, D.; RENCUROSÌ, A. Reaction of Grignard reagents with carbonyl compounds under continuous flow conditions. **Tetrahedron**, v. 66, n. 17, p. 3242–3247, 2010.
- ROSHANGAR, F.; SHELDON, R. A.; SENANAYAKE, C. H. Overcoming barriers to green chemistry in the pharmaceutical industry-the Green Aspiration Level™ concept. **Green Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 752–768, 2015.
- RZEZNICKA, K.; SCHÄTZLE, S.; BÖTTCHER, D.; KLEIN, J.; BORNSCHEUER, U. T. Cloning and functional expression of a nitrile hydratase (NHase) from *Rhodococcus equi* TG328-2 in *Escherichia coli*, its purification and biochemical characterisation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1417–1425, 2010.
- SAINI, R. D. Green Chemistry in Daily Life. **International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology**, v. 6, n. 2, p. 70–73, 2018.
- SERGEEVA, M. V.; MOZHAEV, V. V.; RICH, J. O.; KHMELNITSKY, Y. L. Lipase-catalyzed transamidation of non-activated amides in organic solvent. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 17, p. 1419–1422, 2000.
- SHAPIRO, R.; DICOSIMO, R.; CAMPOPIANO, O.; HENNESSEY, S. M.; STIEGLITZ, B.; CHIANG, G. C. Discovery and Development of a Commercial

- Synthesis of Azafenidin. **ChemInform**, v. 5, p. 593–598, 2001.
- SHARIF, M.; WU, X. F. Palladium-catalyzed synthesis of primary benzamides from aryl bromides via a cyanation and hydration sequence. **RSC Advances**, v. 5, n. 27, p. 21001–21004, 2015.
- Shaw, N.M.; Robins, K.T.; Kiener, A. Lonza: 20 Years of Biotransformations. **Adv. Synth. Catal.** v.345, p. 425–435, 2003.
- SHELDON, R. A.; BRADY, D. The limits to biocatalysis: Pushing the envelope. **Chemical Communications**, v. 54, n. 48, p. 6088–6104, 2018.
- SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 2, p. 801–838, 2018.
- SIMON, R. C.; MUTTI, F. G.; KROUTIL, W. Biocatalytic synthesis of enantiopure building blocks for pharmaceuticals. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 10, n. 1, p. 37–44, 2013.
- SINGH, K.; SARBAJNA, A.; DUTTA, I.; PANDEY, P.; BERA, J. K. Hemilability-Driven Water Activation: A NiII Catalyst for Base-Free Hydration of Nitriles to Amides. **Chemistry - A European Journal**, v. 23, n. 32, p. 7761–7771, 2017.
- SONG, L.; YUAN, H. J.; COFFEY, L.; DORAN, J.; WANG, M. X.; QIAN, S.; O'REILLY, C. Efficient expression in *E. coli* of an enantioselective nitrile hydratase from *Rhodococcus erythropolis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 4, p. 755–762, 2008.
- SOUII, A.; M'HADHEB-GHARBI, M.; GHARBI, J. Gene Cloning: a Frequently Used Technology in a Molecular Biology Laboratory - Alternative Approaches, Advantages. **American Journal of Research Communication**, v. 1, n. 5, p. 18–35, 2013.
- TORDATO, E. A. **Cascatas multienzimáticas aplicadas na síntese estereosseletiva de β -hidroxi amidas**. 2018. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.
- TUCKER, J.; XU, L.; YU, W.; SCOTT, R. W.; ZHAO, L.; RAN, N. **Chemoenzymatic processes for preparation of levetiracetam** (Bioverdant, Inc.), WO2009009117, 2009.
- TURNER, N. J.; TRUPPO, M. D. Biocatalysis enters a new era. **Current Opinion**

in **Chemical Biology**, v. 17, n. 2, p. 212–214, 2013.

ULRICH, A.; ANDERSEN, K. R.; SCHWARTZ, T. U. Exponential Megaprimer PCR (EMP) Cloning-Seamless DNA Insertion into Any Target Plasmid without Sequence Constraints. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–9, 2012.

UNGER, T.; JACOBOVITCH, Y.; DANTES, A.; BERNHEIM, R.; PELEG, Y. Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. **Journal of Structural Biology**, v. 172, n. 1, p. 34–44, 2010.

VAN DEN ENT, F.; LÖWE, J. RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 67, n. 1, p. 67–74, 2006.

VEMULA, P. K.; JOHN, G. ChemInform Abstract: Crops: A Green Approach Toward Self-Assembled Soft Materials. **ChemInform**, v. 41, n. 6, p. 769–782, 2008.

WANG, M. X.; LU, G.; JI, G. J.; HUANG, Z. T.; METH-COHN, O.; COLBY, J. Enantioselective biotransformations of racemic α -substituted phenylacetonitriles and phenylacetamides using. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 11, p. 1123–1135, 2000.

WOODLEY, J. M. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 321–327, 2008.

ZHANG, H.; LI, M.; LI, J.; WANG, G.; LI, F.; XIONG, M. Chaperone-assisted maturation of the recombinant Fe-type nitrile hydratase is insufficient for fully active expression in *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 56, p. 37–44, 2017.

ZHENG, R. C.; YANG, Z. Y.; LI, C. C.; ZHENG, Y. G.; SHEN, Y. C. Industrial production of chiral intermediate of cilastatin by nitrile hydratase and amidase catalyzed one-pot, two-step biotransformation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 161–166, 2014.