RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta dissertação
será disponibilizado somente a partir
de 31/01/2024.

SHIRLEY ALVES CASTILHO

CASCATAS BIENZIMÁTICAS PARA A SÍNTESE DE β-HIDROXIAMIDAS QUIRAIS: AVALIAÇÃO DE ESCOPO DE SUBSTRATOS

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

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre

Araraquara

2022

C352c

Castilho, Shirley Alves
Cascatas bienzimáticas para a síntese de ß-Hidroxiamidas quirais : avaliação de escopo de substratos / Shirley Alves Castilho. -- Araraquara, 2022
95 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Cintia Duarte de Freitas Milagre

1. Biocatálise. 2. Enzimas. 3. Síntese orgânica. 4. Química verde. 5. Quiralidade. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Cascatas Bienzimáticas para a Síntese de β-hidroxiamidas Quirais: Avaliação de Escopo de Substratos"

AUTORA: SHIRLEY ALVES CASTILHO

ORIENTADORA: CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

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

Cíntia Duarte de Freitas Milagre

Profa. Dra. CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE (Participação Virtual)
Departamento de Bioquimica e Quimica Organica / Instituto de Quimica UNESP Araraquara

Bruno S. Amaral

Prof. Dr. BRUNO SERGIO DO AMARAL (Participação Virtual)
Departamento de Química / Instituto Federal de São Paulo - IFSP - São Paulo

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Professor Titular - UFC
Depto de Quimica Orgânica e Inorg.
Campos do Picí

Prof. Dr. MARCOS CARLOS MATTOS (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal do Ceará - IFCE

Araraquara, 31 de janeiro de 2022

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Shirley Alves Castilho

Nome em citações bibliográficas: CASTILHO, S. A.

Filiação: Amelia Moreira Alves

Luis Antônio Pinheiro Castilho

Data de nascimento: 20 de agosto de 1995

Naturalidade: Ouro Preto D'Oeste – RO

Nacionalidade: Brasileira

Formação Acadêmica

- Graduada em Licenciatura em Química, pela Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (FCT – UNESP), campus de Presidente Prudente – SP, de 2013 a 2018.

Formação Complementar

- Curso de curta duração "Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry" (Carga horária: 8h) na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2019.

Estágios e Bolsas Auxílio

- Bolsista de mestrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), no período de março/2019 a agosto/2021. (Processo: 88887.341669/2019-00)

- Estágio à docência durante o segundo semestre de 2019 na disciplina Quimica Orgânica Experimental, disciplina obrigatória para a turma do segundo ano do bacharelado, sob supervisão da Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento.

- Estágio em Iniciação Científica “Síntese e Estudo das Propriedades Ópticas e Estruturais de Complexos β-dicetonados de Eu(III) Luminescentes”, sob orientação da Profa. Dra. Ana Maria Pires, de 2015 a 2017, no Laboratório de Luminescência em Materiais e Sensores (LLuMeS)/FCT-UNESP.

Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados

- LEITE SILVA, C. M. B.; BISPO-JR, A. G.; CANISARES, F. S. M.; **CASTILHO, S. A.**; LIMA, S. A. M.; PIRES, A. M.; Eu^{3+}- tetrakis β-diketonate complexes for solid-state lighting application. Luminescence. 2019;1–10. https://doi.org/ 10.1002/bio.3686

- **CASTILHO, S. A**.; MILAGRE, H. M. S.; MILAGRE, C. D. F.; Reações em cascata enzimática, quimioenzimática e fotoenzimática: perspectivas para uma síntese orgânica mais sustentável. Química Nova, 2021. http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170829

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

- **CASTILHO, S. A.**; TORDATO, E. A.; MILAGRE, C. D. F.; “Síntese bienzimática em cascata para a obtenção de b-hidroxiamidas quirais”, I Simpósio do ACS UFRJ Student Chapter, 2021.

- SILVA, C. M. B. L.; **CASTILHO, S. A.** ; LIMA, S. A. M.; PIRES, A. M.; “Influence of the amphiphilic counter ion in the intensity parameters of Eu^{3+} tetrakis complexes”, 18th International Conference on Luminescence - ICL, 2017, João Pessoa - PB.

- SILVA, C. M. B. L. ; **CASTILHO, S. A.** ; LIMA, S. A. M. ; PIRES, A. M.; “The influence of different amphiphilic counterions in Eu^{3+} Tetrakis β-diketonate complexes on optical properties”, XVIII BMIC - Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2016, São Pedro - SP.

- **CASTILHO, S. A.**; SILVA, C. M. B. L.; PIRES, A. M.; LIMA, S. A. M.; “Preparação e caracterização de complexos luminescentes tetrakis-β- dicetonatos de Eu^{3+}”, CIC UNESP - Congresso de Iniciação Científica, 2016, Presidente Prudente - SP.

- NEVES, M. D.; YOSHIMURA, G. K.; **CASTILHO, S. A.** ; MESSIAS, I. A.; ARAYA, A. M. O.; “Meio Ambiente e Radiações Ionizantes e Não Ionizantes: Entrevista sobre

conhecimentos sobre radiação", 8º Congresso de Extensão Universitária da UNESP, 2015, Presidente Prudente - SP.

Apresentações de trabalho e/ou palestra

- Produção de vídeo de difusão de conhecimento científico para o quadro Pesquisa CERSusChem, "Reações em cascata enzimática, quimioenzimática e fotoenzimática: Perspectivas para uma síntese orgânica mais sustentável", disponível no canal do YouTube "CERSusChem – Difusão", 2022. (https://www.youtube.com/channel/UCrZVjDokUn1OwSw6t4MxtYQ/featured)

- Apresentação de trabalho em modalidade oral: CASTILHO, S. A.; TORDARO, E. A.; MILAGRE, C. D. F.; "Cascatas bienzimáticas para a síntese b-hidroxiamidas quirais" no I Simpósio do ACS UFRJ Student Chapter, de 15 a 18 de março de 2021.

- Apresentação de trabalho: CASTILHO, A. A.; TORDATO, E. A.; MACHADO, L. C.; MILAGRE, C. D. F; "Cascatas bienzimáticas para a síntese de hidroxiamidas quirais: avaliação do escopo de substratos" no II Workshop INCTBioNat, São Pedro-SP, de 13 a 15 de agosto de 2019.

- Apresentação de Trabalho: CASTILHO, S. A.; PIRES, A. M.; SILVA, C. M. B. L.; LIMA, S. A. M.; "Preparação e caracterização de complexos luminescentes tetrakis-b-dicetonados de Eu3+" no Congresso de Iniciação Científica (CIC), Presidente Prudente-SP, 2016.

Participação em eventos

- I Simpósio ACS Student Chapter – UFRJ, 2021.

- II Workshop INCTBioNat, São Pedro, 2019.

- II Simpósio de Pesquisa em Química, 2018.

- VII SEQUIPP – VII Semana da Química de Presidente Prudente, 2018.

- Congresso de Iniciação Científica – CIC, 2016.

- V SEQUIPP – V Semana da Química de Presidente Prudente, 2015.

- II SEQUIFISPP – II Semana da Química e Física de Presidente Prudente, 2013.

Aos meus pais,
Amélia e Luis.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Química e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela infraestrutura para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre, pelo acolhimento, confiança e ensinamentos concedidos a mim ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr. Humberto Marcio dos Santos Milagre, por todo apoio e contribuições diárias.

À FAPESP, CAPES, CNPq, CERSusChem e INCT-BioNat pelo apoio financeiro ao grupo de pesquisa.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial os amigos: Iris, Laíza, Thaís e Laerte, por todo o companheirismo, apoio, conforto nos momentos difíceis, cafés juntos na cantina e muitas risadas nos momentos de descontração.

Aos colaboradores do IQ, em especial Albertinho, Marquinhos e Nivaldo, pelo auxílio cotidiano com as atividades da pesquisa.

À Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento, pela disponibilização de seu equipamento para a realização das análises de HPLC, e à Doutoranda Camila pelo auxílio com a operação do equipamento. À Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos pelo empréstimo de colunas cromatográficas.

Ao Prof. Dr. Fernando Antônio Santos Coelho, pela disponibilização de seu equipamento para a realização das análises de HPLC, e ao Doutorando Lucas André Zeoly pela operação do equipamento.

Ao grupo NuBBE, pela disponibilização do espectrômetro de massas, e à Juliana e João pelo auxílio com as análises.

À minha família, em especial meus pais Amélia e Luis, e minhas irmãs Sheila e Sabrina, pelo amor de sempre e por seguirem me apoiando e acreditando em mim. Tudo o que sou é por vocês, sempre!

À minha segunda família, os companheiros de república que me trouxeram de volta o sentimento de lar quando eu mais precisei: Andressa, Felipe e Tamy. Obrigada pelas comidas, sonecas, filmes, bebidas, shows, conversas e amor... Obrigada por tudo e por sempre.

Aos meus queridos amigos: Yan, Natália, Talita, Pedro, Camila, Edineia, Letícia, Karol, Júlia, Silmara, Glauber, Heverton, Matheus, Renato, Karolaine, Koiti, Celso, Marina e tantos outros, por estarem sempre comigo, seja perto ou longe, me apoiando e me divertindo. Obrigada por tudo.

À minha amiga Andressa, um agradecimento especial por tantos dias e noites juntas, trabalhando, rindo, chorando... Obrigada pelas muitas horas online nas videochamadas, pelos vinhos, confidências e gargalhadas.

À minha amiga Natália, um agradecimento especial por tantas noites acordadas, rindo e chorando, pela companhia de estudos desde à graduação, e por estar sempre aqui.

Aos meus Pai e Mãe de Santo, Pai Weber e Mãe Marcia, e aos meus irmãos do Ilê Axé Ogum Mege Pai Joaquim de Aruanda, por serem sempre meu porto seguro. Asè. Epa Babá, Odoyá, Kaô Kabecilê! Laroyê Exu!

Aos meus companheiros de república João Antônio, Rodolpho e Alessandro, pela convivência ao longo da estadia em Araraquara. Aos nossos mascotes: o cachorro mais carinhoso do mundo, Nick, e aos meus gatos Sirius e Chico, que mesmo não estando mais presentes sempre foram meu conforto e afago, vocês estarão pra sempre em meu coração, obrigada por serem pra sempre amor.

Às minhas recentes, mas importantes amigas, que me deram todo o apoio que puderam na reta final deste trabalho, Amanda, Ariane, Letícia e Gabriela. Obrigada por se colocarem ao meu lado, mesmo com tão pouco tempo juntas, vocês foram essenciais.

Por fim, agradeço a todos os cientistas, professores e alunos que seguem acreditando e batalhando em prol da ciência e da educação, que seguem desenvolvendo trabalhos incríveis mesmo em meio aos desmontes arquitetados contra as instituições de pesquisa e ensino no Brasil. Não percamos as esperanças de que dias melhores virão, obrigada por permanecerem.

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

“Não sou esperançoso por pura teimosia, mas por imperativo existencial e histórico. [...]Minha esperança é necessária mas não é suficiente. Ela, só, não ganha a luta, mas sem ela a luta fraqueja e titubeia. Precisamos da esperança crítica, como o peixe necessita de água despoluída.”

“Num país como o Brasil, manter a esperança viva é, em si, um ato revolucionário.”

– Paulo Freire

RESUMO

A sociedade, bem como as indústrias química e farmacêutica modernas, têm exigido o desenvolvimento e a implementação de metodologias sintéticas que sejam eficientes dos pontos de vista energético, produtivo e ambiental. A fim de atender parte desta demanda, propomos neste trabalho o estudo de sistemas enzimáticos em cascata que possam ser aplicados na síntese de β-hidroxiamidas quirais de interesse econômico. A opção pelo uso de catalisadores enzimáticos atende ao princípio da química verde que recomenda o desenvolvimento de reações em condições catalíticas em detrimento às reações em condições estequiométricas, sempre que possível. Algumas vantagens competitivas são inerentes ao uso de biocatalisadores como o fato de serem originários de fontes renováveis de matéria-prima, serem biodegradáveis, requererem condições reacionais brandas, além de utilizarem solventes não tóxicos como os sistemas aquosos tamponados. Como os biocatalisadores são potencialmente regio-, quimio- e enantiosseletivos, o número de etapas reacionais é reduzido por não requerer etapas de proteção/desproteção de grupos funcionais. Aliado às estas vantagens, o uso de sistemas multienzimáticos em cascata ainda propicia menor geração de resíduos, uma vez que dispensa o isolamento e purificação dos intermediários sintéticos. Um trabalho anterior desenvolvido em nosso grupo de pesquisa estudou sistemas em cascata sequencial e simultânea para a síntese das β-hidroxiamidas quirais a partir da benzoilacetonitrila, tendo resultados bastante promissores utilizando as enzimas nitrilas hidratases e cetorredutases como catalisadores. Buscando avaliar o escopo de substratos para as cascatas desenvolvidas, o presente trabalho trata da avaliação das influências estereoeletrônicas de grupos doadores e retiradores de elétrons ligados nas posições *orto*, *meta* e *para* do anel aromático da benzoilacetonitrila sobre a atividade das enzimas envolvidas nas cascatas desenvolvidas anteriormente. Através das reações em cascata apresentadas neste trabalho, foi possível observar a supressão da atividade da cetorredutase frente à substratos orto e meta substituídos, sugerindo impedimentos estéricos, observados também para as nitrilas hidratases avaliadas. Assim, os substratos para-substituídos foram submetidos às reações em cascata, onde as β-hidroxiamidas para-substituídas foram obtidas com conversões acima de 87%.

Palavras-chave: biocatálise; reação em cascata; β-hidroxiamidas; NHase; KRED.

ABSTRACT

Society, as well as the modern chemical and pharmaceutical industries, have demanded the development and implementation of synthetic methodologies that are efficient from an energy, production and environmental point of view. In order to meet part of this demand, we propose in this work the study of cascade enzyme systems that can be applied in the synthesis of chiral β-hydroxyamides of economic interest. The option to use enzymatic catalysts meets the principle of green chemistry, which recommends the development of reactions under catalytic conditions instead of reactions under stoichiometric conditions, whenever possible. Some competitive advantages are inherent to the use of biocatalysts, for example, these catalysts originate from renewable sources of raw material, are biodegradable, require mild reaction conditions in terms of pH, temperature and pressure, in addition to using non-toxic solvents such as buffered aqueous systems. As biocatalysts are potentially regiochemo- and enantioselective, the number of reaction steps is reduced as they do not require functional group protection/deprotection steps. Allied to these advantages, the use of cascaded multienzymatic systems also provides less waste generation, as it does not require the isolation and purification of synthetic intermediates. Previous work developed in our research group studied sequential and simultaneous cascade systems for the synthesis of chiral β-hydroxyamides from benzoylacetonitrile, with very promising results using the enzymes nitrile hydratase and ketoreductase as catalysts. Seeking to evaluate the scope of substrates for the developed cascades, the present work deals with the evaluation of the stereoelectronic influences of electron donor and withdrawn groups linked in the ortho, meta and para positions of the benzoylacetonirile substrate's aromatic ring, on the activity of enzymes involved in the developed cascades previously. Through the cascade reactions presented in this work, it was possible to observe the suppression of ketoreductase activity agains ortho and meta substituted substrates, suggesting steric impediments, also observed for the evaluetade nitrile hydratases. Thus, the para-substituted substrates were subjected to cascade reactions, where the para-substituted β-hydroxyamides were obtained with consersions abose 87%.

Keywords: biocatalysis; cascade reaction; β-hydroxyamides; NHase; KRED.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular do Levamisol, Fluoxetina e análogos 22

Figura 2 – Esquema geral para uma cascata (a) simultânea e (b) sequencial 26

Figura 3 – Representação estrutural de uma NHase ferro-dependente 30

Figura 4 – Representação estrutural de uma cetorredutase 33

Figura 5 – Cromatograma (CG-FID) obtido para o produto 2g 53

Figura 6 – Cromatograma (GC-FID) obtido para o produto 2e 55

Figura 7 – Cromatograma (CG-FID) obtido para o produto *rac*-3g em coluna Restek® RTX-5 57

Figura 8 – Cromatograma (HPLC-DAD) obtido para o produto *rac*-3g em coluna quiral Chiralpak® IB 59

Figura 9 – Cromatogramas (HPLC-DAD) obtidos em coluna quiral Chiralpak® IB para os produtos *rac*-3g e 3g 61

Figura 10 – Cromatograma (CG-FID) obtido para o produto *rac*-4f 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Programação dos métodos cromatográficos em CG-FID utilizando as colunas A e B 40

Tabela 2 – Programação dos métodos cromatográficos em HPLC-UV, em modo isocrático 42

Tabela 3 – Dados obtidos para a síntese dos produtos 2a-h 53

Tabela 4 – Conversão dos substratos em 2a-h utilizando NHase 0257 e NHase 016 ... 54

Tabela 5 – Dados das sínteses dos compostos *rac*-3a-h 58

Tabela 6 – Conversão dos substratos 1a-h catalisada por KRED recombinante 60

Tabela 7 – Avaliação da atividade da KRED em 8 horas de reação 62

Tabela 8 – Dados obtidos para a síntese dos produtos *rac*-4f-h 64

Tabela 9 – Resultados obtidos na avaliação dos sistemas em cascata 66

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Esquema geral para a obtenção das β-hidroxiamidas (4a–h) 22

Esquema 2 – Representação geral da cascata multienzimática para a síntese da L-ribulose 25

Esquema 3 – Síntese de β-hidroxiamidas catalisada por complexo de rutênio 26

Esquema 4 – Síntese de β-hidroxiamidas por via quimioenzimática 27

Esquema 5 – Reações em cascata sequencial e simultânea para a obtenção da β-hidroxinitrila de interesse 28

Esquema 6 – Hidratação de nitrilas para a obtenção de amidas através da enzima NHase 29

Esquema 7 – Uma das propostas mecanísticas para a hidratação de uma nitrila promovida pela enzima NHase 32

Esquema 8 – Reação geral para a redução de carbonilas por KRED 33

Esquema 9 – Mecanismo da redução da carbonila promovida por uma KRED 34

Esquema 10 – Reação geral para a síntese dos produtos 2a-h 52

Esquema 11 – Esquema geral para as reações dos substratos 1a-h com a NHase 54

Esquema 12 – Reação geral para a síntese dos produtos *rac*-3a-h 57

Esquema 13 – Biorredução de 1a-h catalisada por KRED recombinante 59

Esquema 14 – Esquema geral para a hidratação de β-hidroxinitrilas para a obtenção de β-hidroxiamidas 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC – Do inglês *Dry Silica Cromatography* – Cromatografia em sílica seca

ee – Excesso enantiomérico

GC-FID – Do inglês *Gas Chromatography – Flame Ionization Detector* – Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chama

GC-MS – Do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry* – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

HPLC – Do inglês *High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Performance

HRMS – Do inglês *High Resolution Mass Spectrometry* – Espectrometria de Massas de Alta Resolução

IPA – Do inglês *Isopropyl alcohol* – Álcool isopropílico

IUBMB – Do inglês *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

J – Constante de acoplamento

KRED – Do inglês *Ketoreductases* – Cetorredutases

m/z – Razão massa carga

NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NHases – Nitrila Hidratases

PBS – Do inglês *Phosphate-Buffered Saline* – Tampão fosfato-salino

ppm – Partes por milhão

RMN de ^{1}H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono

rpm – Rotações por minuto

t.a. – Temperatura ambiente

TMS – Tetrametilsilano

*t*R – Tempo de retenção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22

1.1 Aspectos Gerais 22

1.2 Resultados anteriores 27

1.3 Sobre as Enzimas 29

1.3.1 Nitrila Hidratase (NHase) 29

1.3.2 Cetorredutase (KRED) 32

2 OBJETIVOS 36

2.1.1 Estratégia para o desenvolvimento do trabalho 36

3 PARTE EXPERIMENTAL 37

3.1 Considerações Gerais 37

3.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^{1}H e ^{13}C) 37

3.1.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS) 37

3.1.3 Métodos Cromatográficos 38

3.1.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) 38

3.1.3.2 Cromatografia Flash em Sílica Seca (DSC) 38

3.1.3.3 Cromatografia Gasosa Acoplada ao Detector de Ionização em Chama (GC-FID) 38

3.1.3.4 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) 40

3.1.3.5 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) 41

3.1.4 Biocatalisadores 42

3.1.5 Reagentes e Solventes.....42

3.2 Procedimentos Experimentais 43

3.2.1 Síntese das β-cetoamidas (2a-h).....43

3.2.1.1 Via química.....43

3.2.1.2 Via enzimática 43

3.2.1.3 Dados espectroscópicos e espectrométricos 44

3.2.2 Síntese das β-hidroxinitrilas (3a-h) 46

3.2.2.1 Via química.....46

3.2.2.2 Via enzimática 47

3.2.2.3 Dados espectroscópicos e espectrométricos 47

3.2.3 Síntese das β-hidroxiamidas (4f-h).....48

3.2.3.1 Via química.....48

3.2.3.2 Via enzimática: Reações em Cascata 48

3.2.3.2.1 Cascata Simultânea.....48

3.2.3.2.2 Cascata Sequencial.....49

3.2.3.2.3 Dados Espectroscópicos e espectrométricos 50

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 51

4.1 Síntese das β-cetoamidas (2a-h).....52

4.1.1 Via Química 52

4.1.2 Via Enzimática.....54

4.2 Síntese das β-hidroxinitrilas (3a-h) 56

4.2.1 Via Química 56

4.2.2 Via Enzimática 59

4.3 Síntese das β-hidroxiamidas (4f-h) 63

4.3.1 Via Química 63

4.3.2 Via enzimática: Avaliação dos sistemas em cascata 65

5 CONCLUSÕES 68

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70

6 APÊNDICE 75

6.1 Cromatogramas 75

6.2 Espectros de Massas 78

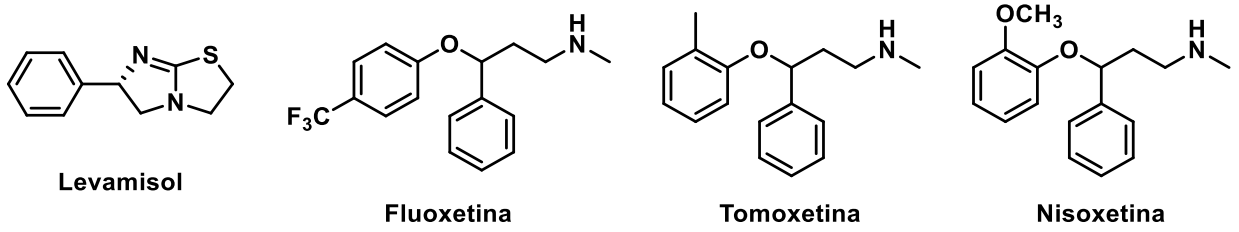
6.3 Espectros de RMN 90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

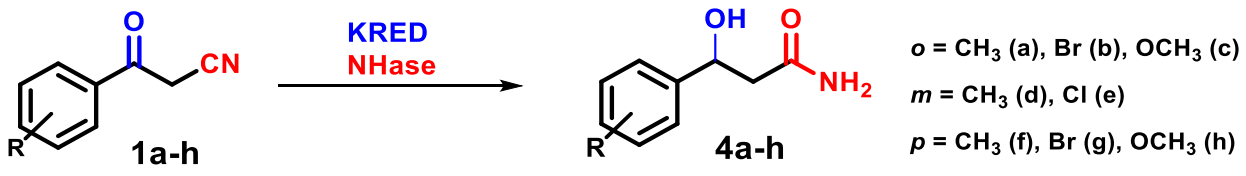
A obtenção de β-hidroxiamidas quirais tem sido de grande interesse para a indústria química, visto que a relativa facilidade de transformação de seus grupos funcionais torna possível a síntese de diversos materiais economicamente atrativos, como polímeros (SANZ SHARLEY; WILLIAMS, 2017; SATHE et al., 2018) e heterociclos (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2016). Dentre as aplicações, estes compostos contam ainda com interesse especial da indústria farmacêutica, onde são considerados blocos construtores viabilizando a síntese de fármacos amplamente utilizados como, por exemplo, o levamisol (KAMAL et al., 2005), a fluoxetina e análogos (KAMAL; KHANNA; RAMU, 2002; SCHRITTWIESER et al., 2009; XU et al., 2013) (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura molecular do Levamisol, Fluoxetina e análogos



Para este fim, uma das estratégias de obtenção destes compostos dá-se através da redução de cetonas pró-quirais e hidratação de nitrilas. Um anel aromático contendo diferentes grupos funcionais como substituintes proporciona, ainda, uma maior variedade quanto às possibilidades de produtos formados, visando a síntese de compostos já conhecidos, ou mesmo novos produtos. Assim, os substratos de interesse no desenvolvimento deste trabalho são derivados *orto*-, *meta*-, e *para*- substituídos da benzoilacetonitrila (**1a–h**) (Esquema 1).

Esquema 1 – Esquema geral para a obtenção das β-hidroxiamidas (**4a–h**)



Contudo, a obtenção destes compostos via síntese química possui alguns aspectos pouco atrativos do ponto de vista econômico e ambiental. Isto porque, de maneira geral, as metodologias já descritas contam, em sua grande maioria, com a utilização de condições reacionais drásticas em termos de temperatura, pH e pressão, reagentes tóxicos e escassos, associadas a etapas de purificação (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2016; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; CROCHET; CADIERNO, 2016; VARJOSAARI et al., 2018). Além disso, um dos maiores desafios das reações de redução de carbonilas pró-quirais à suas respectivas hidroxilas é alcançar uma elevada estereosseletividade, em casos que requerem produtos enantiomericamente puros, visto que as metodologias mais comuns levam à produtos racêmicos ou com excessos enantioméricos moderados (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2016; KITANOSONO; XU; KOBAYASHI, 2014). Na síntese química de amidas primárias a partir de nitrilas, o desafio é a seletividade da reação, uma vez que o respectivo ácido carboxílico pode ser formado como subproduto e consequente redução dos rendimentos (ZHAN et al., 2018). Assim, além de não garantir resultados plenamente satisfatórios quanto aos produtos, estas metodologias ainda demandam de uma elevada utilização de recursos, tornando altos os custos envolvidos nos processos e gerando uma grande quantidade de resíduos, ambos causando impactos preocupantes ao meio ambiente.

Frente a isto, além da constante busca pela redução de custos, a comunidade científica tem se mostrado cada vez mais empenhada na otimização de suas metodologias visando também a redução dos impactos ambientais causados pelos processos químicos, utilizados em larga escala atualmente. Deste modo, em 1998, foram postulados pelos pesquisadores John Warner e Paul Anastas os doze princípios da química verde, cujos fundamentos incluem a modificação dos processos mais tradicionais por métodos que empreguem a utilização de catalisadores, condições reacionais mais brandas, compostos oriundos de fontes renováveis, prevenção à geração de resíduos, entre outros (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

Assim, definida como a transformação de um substrato não-natural através de etapas catalisadas por células íntegras, enzimas isoladas ou outros catalisadores biológicos, a biocatálise tornou-se uma ferramenta atrativa na busca de processos sintéticos mais ambientalmente amigáveis (SHELDON; WOODLEY, 2018). Isto porque

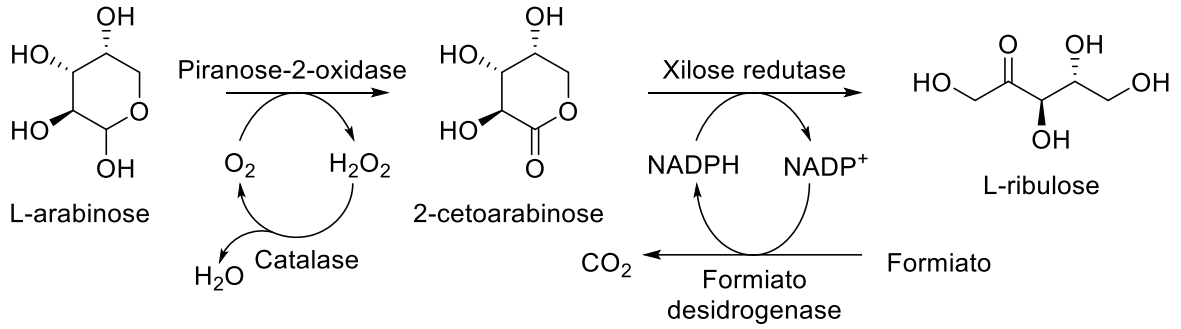
as enzimas utilizadas costumam funcionar em condições reacionais brandas, como temperatura e pressão ambiente, soluções aquosas tamponadas com pH próximo ao fisiológico, além da utilização de pouca ou nenhuma quantidade de cossolvente para a solubilização do substrato. Além dos requerimentos de condições reacionais brandas, as enzimas possuem ainda a vantagem de serem biodegradáveis e oriundas de fontes renováveis de matéria-prima, podendo ainda ser regio-, quimio- e enantiosseletivas frente a transformação de substratos polifuncionalizados. A junção destes aspectos possibilita que sínteses mais elaboradas sejam realizadas com relativa facilidade, já que evita etapas de proteção e desproteção comumente necessárias nas sínteses por vias químicas, além de prevenir a formação de subprodutos como isômeros ou produtos de rearranjos indesejados (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013), como por exemplo a transformação de amidas em seus respectivos ácidos carboxílicos ou a redução da cetona de forma racêmica na obtenção das β-hidroxiamidas alvos deste estudo, resultando, portanto, em uma redução significativa de custos e esforços além da consequente redução de resíduos gerados no processo.

Outra ferramenta promissora para o desenvolvimento de rotas sintéticas mais ambientalmente amigáveis para sínteses com múltiplas etapas de transformação são as reações em cascata, que consistem em proporcionar condições para que mais de uma reação aconteça em um mesmo frasco reacional (SCHRITTWIESER et al., 2018; SPERL; SIEBER, 2018). Em células, transformações devem ocorrer de maneira sinérgica para a promoção das sínteses ou decomposições necessárias à manutenção do metabolismo celular, e inspirando-se nestes sistemas, diversos estudos vêm sendo reportados acerca do desenvolvimento de reações artificiais em cascata, possibilitando o acesso a compostos de interesse comercial de difícil acesso, podendo ser eles até mesmo instáveis ou tóxicos (CASTILHO; MILAGRE; MILAGRE, 2021; RICCA; BRUCHER; SCHRITTWIESER, 2011) . Apesar do desafio de um sistema reacional unificado, onde todos os componentes devem ser compatíveis entre si, a utilização de sistemas reacionais em cascata demonstra ser uma ferramenta bastante vantajosa na busca por processos mais verdes, pois a junção das etapas reacionais evita a extração e purificação dos intermediários sintéticos. Assim, além da prevenção à diminuição dos rendimentos devido às perdas nos processos de isolamento dos mesmos, há uma redução

significativa na geração de resíduos e custos relacionados ao seu tratamento e, consequentemente, o consumo de recursos como solventes, energia, espaço e tempo.

A exemplo disto, recentemente Chuaboon e colaboradores (2019) desenvolveram um elegante sistema multienzimático em cascata para síntese de L-ribulose a partir da L-arabinose (Esquema 2), utilizando quatro enzimas, onde o produto foi obtido com cerca de 80% de rendimento em aproximadamente 7 horas reacionais, contornando os problemas de operação e custo reportados anteriormente para a síntese deste produto em metodologias mais usuais, inclusive as que dispunham de enzimas em etapas isoladas (CHUABOON et al., 2019).

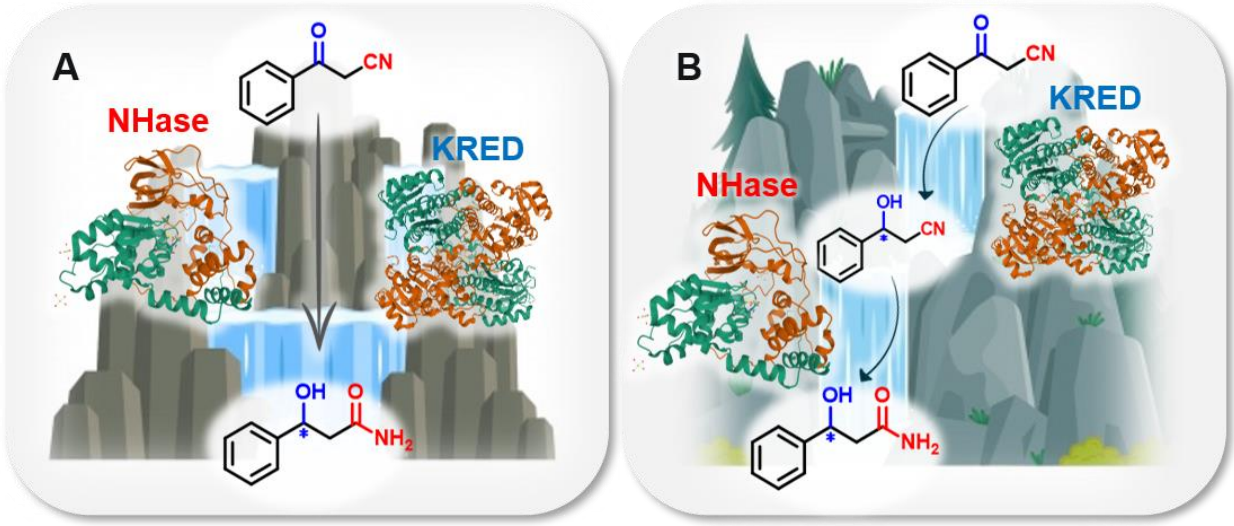
Esquema 2 – Representação geral da cascata multienzimática para a síntese da L-ribulose



Fonte: Adaptado de (CASTILHO; MILAGRE; MILAGRE, 2021)

As reações em cascata podem ser classificadas por vários parâmetros, indo desde o número de etapas, tipos de reações envolvidas, até o número e tipos de catalisadores utilizados (CASTILHO; MILAGRE; MILAGRE, 2021). No presente trabalho foram empregadas duas enzimas, nitrila hidratase (NHase) e cetorredutase (KRED) como catalisadores em duas diferentes configurações de cascata, objetivando avaliar o efeito da cronologia frente às reações de interesse. Para isto, avaliou-se um sistema em cascata simultânea, isto é, quando as duas enzimas são adicionadas ao frasco reacional ao mesmo tempo (Figura 2a), além de uma cascata sequencial, quando a segunda enzima é adicionada ao frasco reacional somente após a completude da primeira transformação. (Figura 2b).

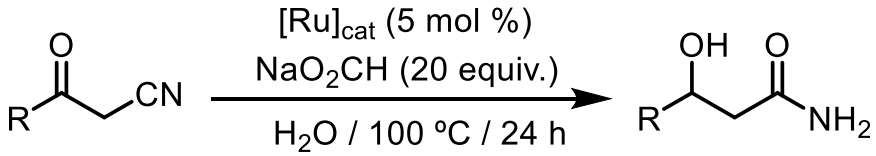
Figura 2 – Esquema geral para uma cascata (a) simultânea e (b) sequencial



Fonte: Adaptado de (CASTILHO; MILAGRE; MILAGRE, 2021).

Abordagens envolvendo processos catalíticos em cascatas e/ou enzimáticos já vem sendo objeto de estudo inclusive para a síntese de β-hidroxiamidas. Como um exemplo disto, em uma estratégia recente, González-Fernándes e colaboradores (2016) conseguiram realizar a síntese tandem de β-hidroxiamidas em meio aquoso utilizando um catalisador metálico à base de rutênio combinado com formiato de sódio (Esquema 3). Contudo, apesar do aspecto promissor quanto aos bons rendimentos (>70%) e sem utilização de solventes orgânicos, a metodologia conta com a necessidade de um sistema reacional sob atmosfera inerte, temperaturas elevadas, além de uma grande quantidade de formiato de sódio e do alto custo dos compostos de rutênio (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; CROCHET; CADIERNO, 2016).

Esquema 3 – Síntese de β-hidroxiamidas catalisada por complexo de rutênio

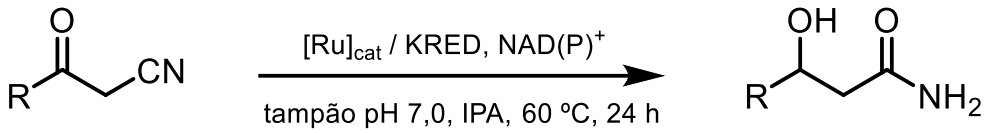


Fonte: Adaptado de (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; CROCHET; CADIERNO, 2016).

Uma segunda estratégia publicada recentemente demonstra a utilização de um catalisador metálico juntamente com uma enzima para a obtenção das β-hidroxiamidas.

Liardo e colaboradores (2018) conseguiram, através da utilização de um complexo de rutênio e variando diferentes cetorredutases (KRED), sintetizar diferentes β-hidroxiamidas com conversões a partir de 74% e com *ee* >99% (Esquema 4). Estes compostos foram obtidos em meio tamponado e por meio de uma cascata simultânea. Contudo, para um bom desempenho do catalisador metálico foi necessário que o sistema atuasse sob a temperatura de 60 ºC (LIARDO et al., 2018a). Assim, novamente o custo elevado deste tipo de catalisador, somado a necessidade de temperaturas relativamente elevadas, além de promover um maior gasto energético pode ocasionar a desnaturação da estrutura enzimática dependendo da estabilidade térmica da enzima em questão.

Esquema 4 – Síntese de β-hidroxiamidas por via quimioenzimática

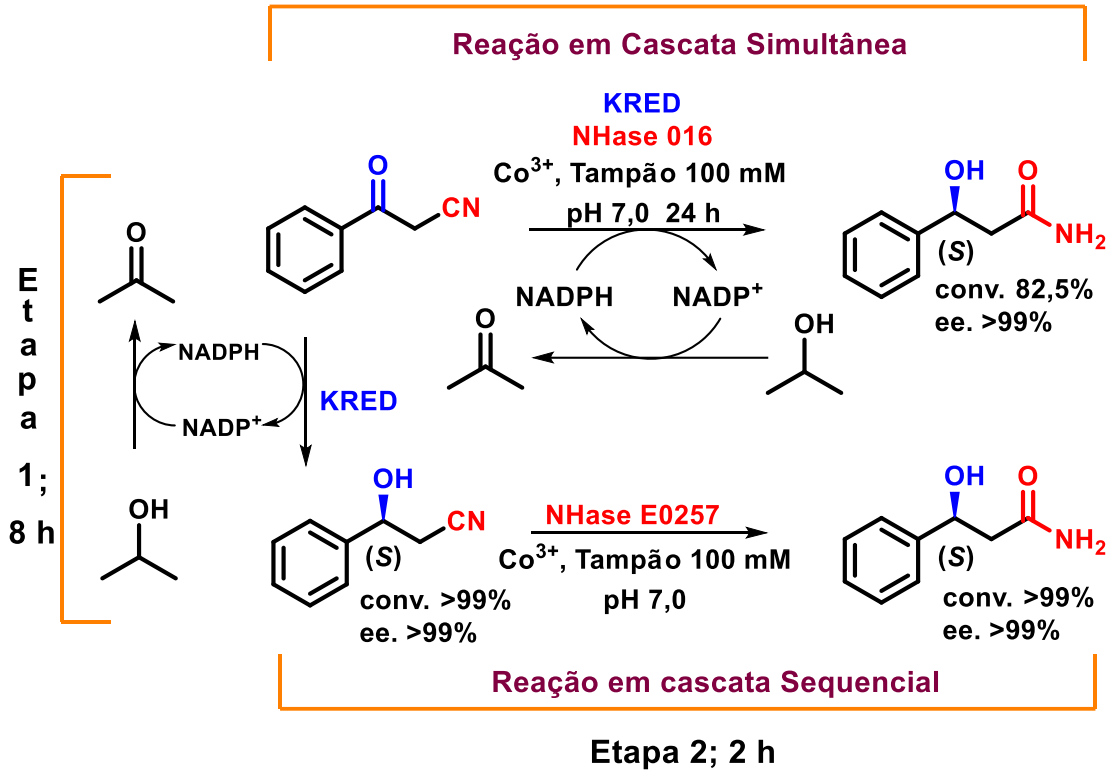


Fonte: Adaptado de (LIARDO et al.; 2018).

1.2 Resultados anteriores

Diante da busca pelo aprimoramento dos processos para obtenção destes compostos, recentemente em nosso grupo desenvolveu-se um trabalho cujo objetivo foi avaliar a utilização de cascatas enzimáticas sequenciais e simultâneas envolvendo transformações no substrato benzoilacetonitrila, cuja estrutura não possui substituintes ligados ao anel aromático, empregando para isto as enzimas nitrilas hidratases (NHases), cetorredutase (KRED) e ω-transaminases (ω-TA). No trabalho em questão, foram realizadas triagens de atividades enzimáticas frente ao substrato benzoilacetonitrila, entre elas a avaliação de 13 diferentes NHases, além de 3 diferentes KRED isoladas, para posterior desenvolvimento de reações em cascatas simultâneas e sequenciais. Resultados bastante positivos foram obtidos para ambos os sistemas em cascata utilizando NHases e KRED, nos quais obtiveram-se elevadas conversões e excessos enantioméricos para o produto de interesse (Esquema **5**).

Esquema 5 – Reações em cascata sequencial e simultânea para a obtenção da β-hidroxinitrila de interesse



Fonte: Adaptado de (TORDATO, E. A.; 2018).

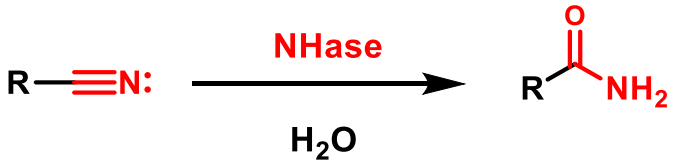
Entretanto, ainda não se tem o conhecimento acerca do comportamento enzimático observado frente a substratos análogos substituídos no anel aromático e, nos casos promissores, como será a influência destes grupos substituintes quanto ao andamento da reação. Assim, o presente trabalho segue em continuidade ao estudo anterior, na intenção de avaliar os efeitos estereoeletrônicos de substituintes doadores e retiradores de elétrons nas posições *orto*, *meta* e *para* do anel aromático em relação à cetonitrila, sendo também o primeiro estudo a ser reportado envolvendo a utilização de KRED e NHase em sistemas reacionais em cascata para a obtenção de β-hidroxiamidas (Esquema 1).

1.3 Sobre as Enzimas

1.3.1 Nitrila Hidratase (NHase)

Classificada pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, do inglês *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) como EC 4.2.1.84, a Nitrila Hidratase, cuja presença foi identificada pela primeira vez em 1980, em *Rhodococcus rhodochrous* J1 (ASANO; TANI; YAMADA, 1980), é uma importante enzima para a indústria química. Sua atividade, responsável por promover a reação de hidratação de uma nitrila em sua amida correspondente (Esquema 6), sem ocasionar a formação do seu respectivo ácido carboxílico, despertou o interesse em sua utilização para a síntese de compostos de interesse comercial. Neste sentido, as NHases tornaram-se uma importante ferramenta para a indústria na produção em larga escala de produtos como a acrilamida e nicotinamida (ASANO et al., 1982; MATHEW et al., 1988; PRASAD; SHARMA; BHALLA, 2005).

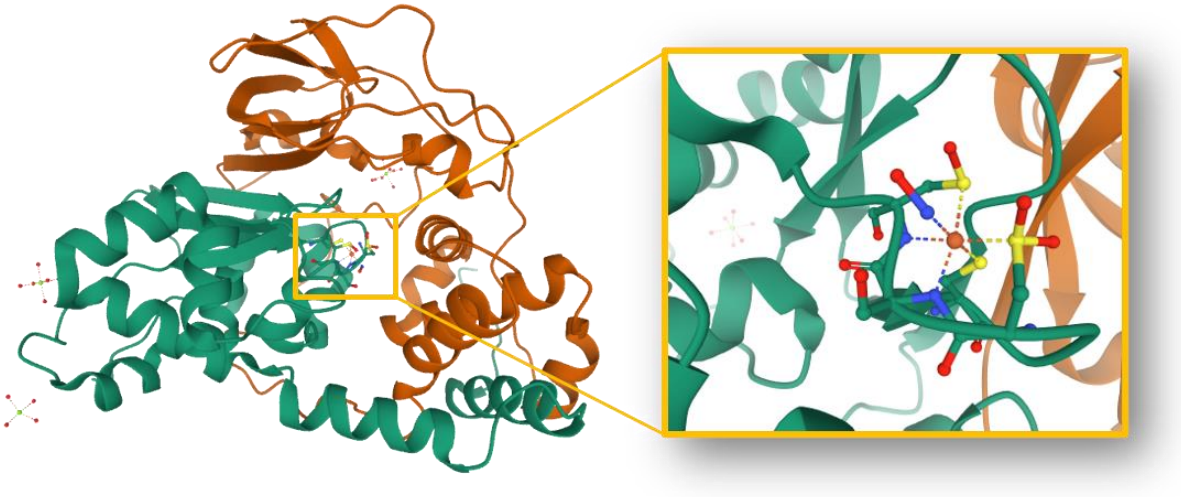
Esquema 6 – Hidratação de nitrilas para a obtenção de amidas através da enzima NHase



Em termos estruturais, trata-se de uma enzima que contém duas subunidades heterólogas α e β, que normalmente são observadas com massas moleculares similares e equimolares, podendo variar dependendo de sua fonte (CHENG; XIA; ZHOU, 2020). É também uma metaloenzima, contendo como outra variável de sua origem a presença em sua estrutura de um grupo ferro não-heme (Fe^{3+}) ou cobalto não-corrinóide (Co^{3+}) no centro catalítico (Figura 3), contando com algumas exceções como a NHase de *Rhodococcus jostii*, que possui três íons (Co, Cu e Zn) em seu sítio ativo, enquanto outros exemplos podem conter íons manganês, por exemplo (OKAMOTO; ELTIS, 2007). Tendo como função auxiliar a hidratação das nitrilas, além de poder auxiliar no dobramento da enzima (CHENG; XIA; ZHOU, 2020), a identificação do centro metálico de uma NHase é uma característica importante também por ser responsável por definir se a enzima será ou não suscetível à fotoativação, visto que este é um fenômeno observado somente para

as NHases do tipo ferro. Isto ocorre porque o complexo não-heme promove a fotoativação através de uma alteração conformacional na subunidade β, o que faz com que a molécula de óxido nítrico presente na forma endógena seja liberada a partir do centro metálico não-heme, tornando a enzima ativada ao ligar-se agora a uma molécula de água ou íon hidróxido, de acordo com o pH do meio (KAYANUMA et al., 2016; SUPREETHA et al., 2019)

Figura 3 – Representação estrutural de uma NHase ferro-dependente



Fonte: Protein Data Bank (PDB) – Nitrosylated Fe-type nitrile hydratase – 2ZPB

O sítio ativo das NHases, sejam elas dependentes de ferro ou cobalto, é constituído por quatro resíduos de aminoácidos conservados pertencentes à subunidade α, sendo eles três cisteínas e uma serina, que desempenham o papel de coordenar-se ao centro metálico, de forma que os átomos de enxofre de dois resíduos de cisteína ligam-se ao metal equatorialmente, enquanto o terceiro liga-se na direção axial (YANO; OZAWA; MASUDA, 2008). Pode-se observar também um resíduo de tirosina na região de ligação do substrato e, proveniente da subunidade β, os resíduos de Arg56 e Arg141, fornecendo estabilidade ao sítio ativo por meio de ligações de hidrogênio (SUPREETHA et al., 2019).

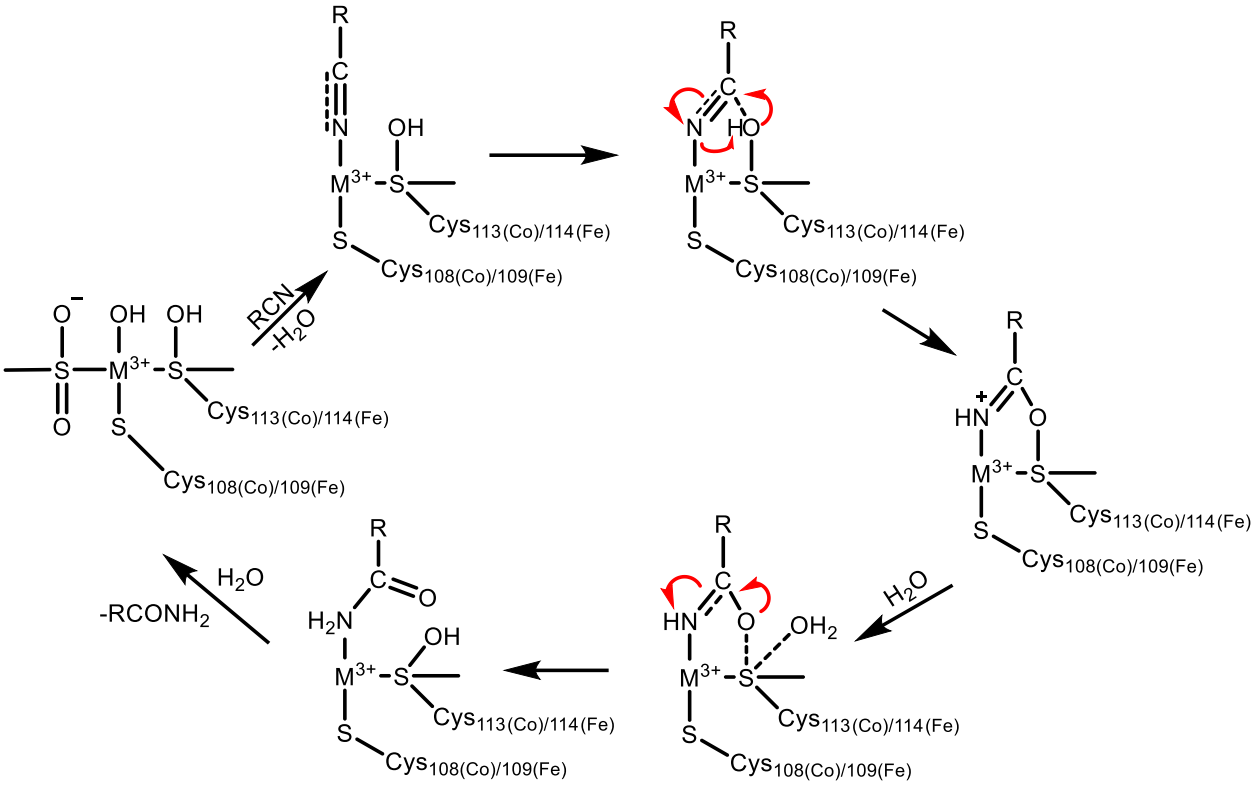
O mecanismo catalítico das NHases (Esquema 7) ainda não foi completamente elucidado e, diante disto, diversas propostas mecanísticas foram reportadas, incluindo

três hipóteses mais convencionais (CHENG; XIA; ZHOU, 2020). Dentre estas, as propostas mais recentes sugerem que a primeira etapa do mecanismo se dá através da aproximação do substrato ao centro metálico do sítio ativo, cuja ligação ocorre a partir do nitrogênio nitrílico, substituindo assim a molécula de água ou hidróxido anteriormente ligados ao íon metálico (HOPMANN; GUO; HIMO, 2007). Diante disto, o carbono nitrílico sofre um ataque para dar origem ao intermediário cíclico, sendo propostos por diferentes autores três possibilidades de aminoácidos conservados para exercer o papel de nucleófilo, sendo βTyr72, αSer e αCys-SOH (HOPMANN; HIMO, 2008; MITRA; HOLZ, 2007; YAMANAKA et al., 2015).

A partir destas hipóteses, Shigeta e colaboradores (2015) desenvolveram um estudo buscando avaliar as etapas iniciais deste mecanismo, e os resultados obtidos não só suportaram a teoria de Hopmann (2008) de que a transformação se inicia com a formação do intermediário cíclico, como também determinaram que o ataque nucleofílico ao substrato é realizado pelo resíduo de aminoácido Cys114-SO^- (KAYANUMA et al., 2016). Este resultado vai, ainda, de encontro com um interessante estudo publicado posteriormente por Nelp e colaboradores (2016), em que um isótopo do oxigênio (^{18}O) foi utilizado como marcador no monitoramento de uma transformação promovida pela NHase, que concluiu que o oxigênio incorporado à nitrila do substrato para dar origem à amida provém da proteína (NELP et al., 2016).

Posteriormente, foi reportada ainda por Shigeta e colaboradores (2016) uma análise das etapas seguintes desta transformação, desta vez divergindo da proposta de Hopmann (2008) que ilustra a formação de um segundo intermediário dissulfeto, sugerindo a formação do intermediário ácido imídico através do ataque direto da molécula de água ao enxofre da αCys114 (KAYANUMA et al., 2016). Assim, após a abstração do segundo próton pelo nitrogênio do substrato, o produto é liberado, e o sítio ativo da enzima é restaurado para a disposição de um novo ciclo catalítico (PREJANÒ et al., 2017).

Esquema 7 – Uma das propostas mecanísticas para a hidratação de uma nitrila promovida pela enzima NHase



Fonte: Adaptado de (CHENG; XIA; ZHOU, 2020)

1.3.2 Cetorredutase (KRED)

Também conhecida como álcool desidrogenase (ADH) ou carbonil redutase (CR), a cetorredutase (KRED) (Figura 4) é uma enzima pertencente à classe das oxidorredutases (EC 1.1.1.1), responsável por catalisar a reação de redução da carbonila de aldeídos e de cetonas, formando álcool primário e secundário, respectivamente (Esquema 8). Para possibilitar esta transformação, contudo, as cetorredutases são dependentes dos cofatores NAD(P)H, (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) ou FADH (dinucleotídeo de flavina e adenina), podendo também utilizar a forma oxidada dos cofatores para catalisar as reações inversas, promovendo a formação de aldeídos e cetonas a partir dos respectivos álcoois (HOLLMANN; ARENDS; HOLTMANN, 2011). Sua utilização é considerada atrativa devido à sua regio- e enantiosseletividade,

cujos resultados normalmente superam os obtidos através de catalisadores químicos (ZEROR et al., 2010).

Esquema 8 – Reação geral para a redução de carbonilas por KRED

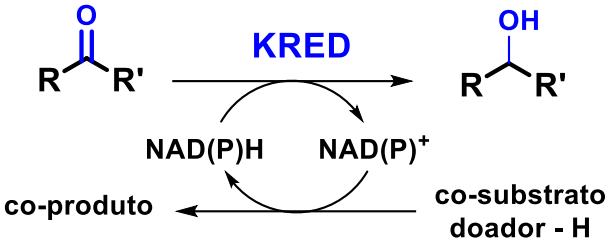
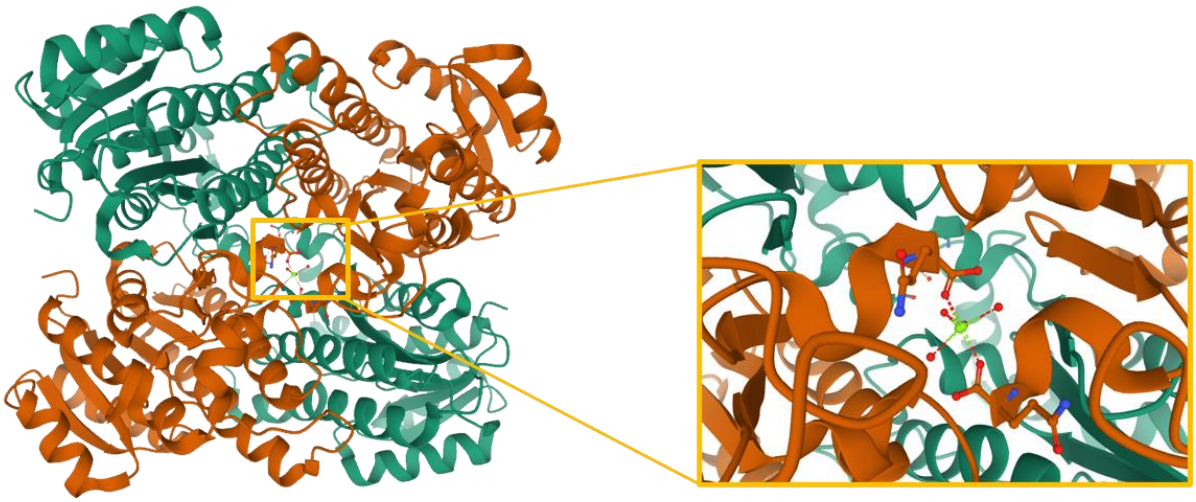


Figura 4 – Representação estrutural de uma cetorredutase

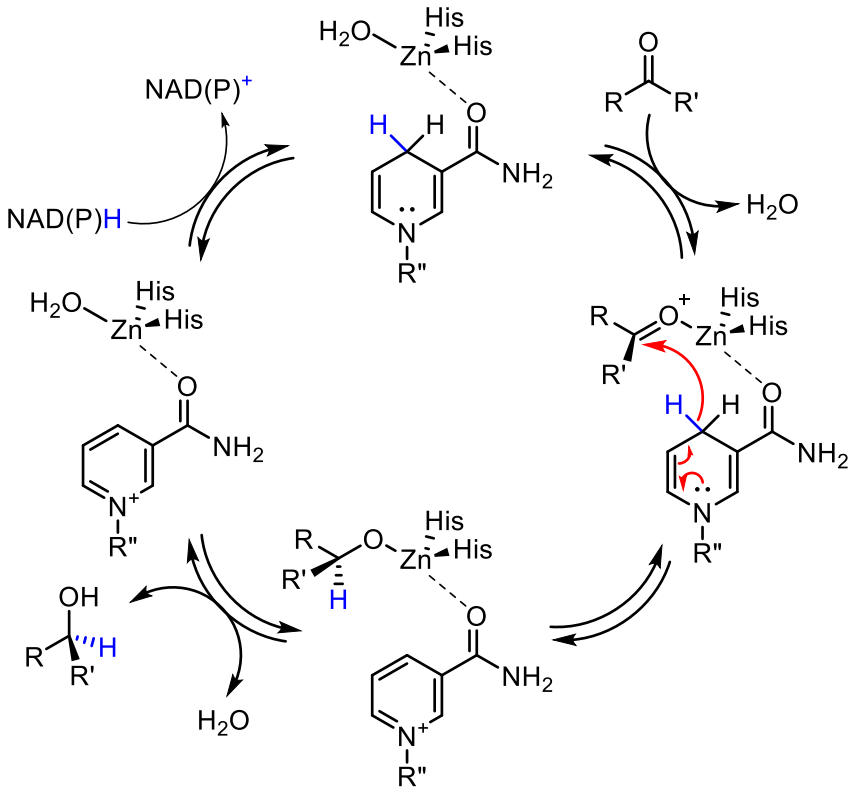


Fonte: Protein Data Bank (PDB) – Crystal stcucture of ketoreductase from *Lactobacillus kefir* – 4RF4

Apesar de constituírem uma superfamília com componentes que apresentam baixa identidade em sua estrutura primária, existem regiões conservadas entre elas, como uma região envolvida por duas ou três α-hélices de cada lado, onde se liga ao cofator (HANUKOGLU, 2015).

Seu mecanismo (Esquema 9) é dado através de uma transferência reversível de hidreto para o carbono carbonílico do substrato a partir do cofator, que se oxida a $NAD^+/NADP^+$. Em mecanismos de KRED dependentes de um íon metálico, o processo se inicia quando o íon (neste caso, Zn^{2+}) se complexa ao oxigênio carbonílico, fazendo com que este fique com uma densidade eletrônica positiva, tornando o carbono carbonílico mais eletrofílico. Assim, este carbono torna-se mais suscetível a um ataque nucleofílico promovido pelo hidreto do cofator. Frente a isto, o par de elétrons não-ligantes presentes no nitrogênio do cofator é deslocado a fim de manter a aromaticidade do anel, possibilitando a transferência do hidreto para o substrato, resultando no respectivo alcóxido, sendo, desta forma, a etapa enantiosseletiva da transformação, na qual a determinação da configuração do centro estereogênico formado é dada pelo impedimento estérico dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo. Por fim, uma molécula de água complexada ao metal realiza a protonação do alcóxido, dando origem ao produto hidroxilado, que é liberado do sítio ativo encerrando o ciclo catalítico (HOLLMANN; ARENDS; HOLTMANN, 2011).

Esquema 9 – Mecanismo da redução da carbonila promovida por uma KRED



Fonte: Adaptado de (HOLLMANN; ARENDS; HOLTMANN, 2011)

É válido ressaltar aqui a reversibilidade deste mecanismo como um todo, possibilitando, como mencionado anteriormente, a obtenção de aldeídos ou cetonas partindo do respectivo álcool quando utilizado o cofator em sua forma oxidada.

5 CONCLUSÕES

Inicialmente, foram sintetizados os respectivos padrões para cada produto de interesse, que foram caracterizados e comparados com os produtos obtidos via síntese enzimática, constatando a eficácia da ação dos biocatalisadores para a obtenção destes compostos, de forma eficiente e sustentável.

Para as sínteses dos intermediários -hidroxinitrilas, promovidas pela KRED, foi possível observar uma influência bastante pronunciada de efeitos estéricos, visto que os produtos para-substituídos, **3f-h,** foram obtidos com conversão acima de >99%, enquanto os produtos orto− e meta−substituídos demonstraram baixa ou nenhuma conversão frente a esta enzima.

Quanto à avaliação das NHases na síntese dos intermediários -cetoamidas, observou-se também a influência de efeitos estéricos para ambas as NHases, visto que os produtos obtidos com conversões reduzidas possuem substituintes orto-localizados, sugerindo que esta posição é mais estericamente impedida que as posições meta e para. Com exceção a estes casos, observou-se uma elevada conversão para o produto **2c**, que apesar de possuir um grupo metoxila localizado em posição orto no anel aromático, foi obtido com conversão >99% para a NHase E0257, comportamento este que pode supor a formação de ligações de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da metoxila com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo desta enzima, o que estabilizaria o complexo enzima-substrato, favorecendo a conversão. De modo oposto, o produto **2g**, que possui um átomo de bromo em posição para foi obtido com conversão de 36% utilizando a NHase 016, sugerindo um sítio ativo menos espaçoso para a acomodação de substratos substituídos também nesta posição, além da posição orto, em comparação à NHase E0257.

De modo geral, os resultados obtidos evidenciaram que ambas as NHases avaliadas neste estudo são opções válidas para o desenvolvimento de cascatas sequenciais para os substratos 1f-h. Para as cascatas simultâneas, os produtos **4f e 4g** foram obtidos com conversões >99% demonstrando que, conforme o esperado, a NHase 016 foi uma excelente alternativa para este tipo de sistema.

Assim, foi possível constatar que os sistemas em cascata desenvolvidos foram bastante eficientes para a síntese de β-hidroxiamidas *para*-substituídas, tratando-se de uma nova rota elegante e sustentável para a promoção destas transformações, indo de encontro aos princípios da química verde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, B. S. Síntese quimioenzimática do levetiracetam e análogos. 2015. 212 f. Dissertação (mestrado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: Principles and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.

ASANO, Y. et al. A New Enzymatic Method of Acrylamide Production. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1183–1189, 1982.

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.

CASTILHO, S.; MILAGRE, H.; MILAGRE, C. Reações em cascata enzimática, quimioenzimática e fotoenzimática: Perspectivas para uma síntese orgânica mais sustentável. **Química Nova**, publicação online, 2021.

CHENG, Z.; XIA, Y.; ZHOU, Z. Recent Advances and Promises in Nitrile Hydratase: From Mechanism to Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. April, p. 1–18, 2020.

CHUABOON, L. et al. One-Pot Bioconversion of l-Arabinose to l-Ribulose in an Enzymatic CascadeAngewandte Chemie**. International Edition**, v. 58, n. 12, p. 2428-2432, 2019.

COADY, T. M. et al. Substrate evaluation of *Rhodococcus erythropolis* SET1, a nitrile hydrolysing bacterium, demonstrating dual activity strongly dependent on nitrile sub-structure. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 5, p. 1108–1116, 2015.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R. et al. Chlorophosphines as auxiliary ligands in ruthenium-catalyzed nitrile hydration reactions: Application to the preparation of β-ketoamides. **Catalysis Science and Technology**, v. 6, n. 12, p. 4398–4409, 2016.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; CROCHET, P.; CADIERNO, V. Ruthenium-Catalyzed

Synthesis of β-Hydroxyamides from β-Ketonitriles in Water. **Organic Letters**, v. 18, n. 23, p. 6164–6167, 2016.

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. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 9, p. 3660–3666, 2005.

GOTOR, V.; LIZ, R.; TESTERA, A. M. Preparation of *N*-unsubstituted β-ketoamides by Rhodococcus *rhodochrous-catalysed hydration* of β-ketonitriles. **Tetrahedron**, v. 60, n. 3, p. 607-618, 2004.

HANUKOGLU, I. Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 43, n. 3, p. 206–209, 2015.

HIROTA, A. et al. New Indophenol-reducing 1,3-Dicarbonyl Compound from Streptomyces. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 4, 792-793, 1994.

HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E.; HOLTMANN, D. Enzymatic reductions for the chemist. **Green Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 2285–2313, 2011.

HOPMANN, K. H.; GUO, J.-D.; HIMO, F. Theoretical Investigation of the First-Shell Mechanism of Nitrile Hydratase. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 4850–4856, 2007.

HOPMANN, K. H.; HIMO, F. On the Role of Tyrosine as Catalytic Base in Nitrile Hydratase. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2008, n. 22, p. 3452–3459, 2008.

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, 2013.

KAMAL, A. et al. A new facile chemoenzymatic synthesis of levamisole. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 3, p. 613–615, 2005.

KAMAL, A.; KHANNA, G. B. R.; 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, 2002.

KAMILA, S. et al. Unexpected stereorecognition in nitrilase-catalyzed hydrolysis of β-hydroxy nitriles. **Organic Letters**, v. 8, n. 20, p. 4429–4431, 2006.

KAYANUMA, M. et al. Catalytic Mechanism of Nitrile Hydratase Subsequent to Cyclic Intermediate Formation: A QM/MM Study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 13, p. 3259–3266, 2016.

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, 2014.

LIARDO, E. et al. Strengthening the Combination between Enzymes and Metals in Aqueous Medium: Concurrent Ruthenium-Catalyzed Nitrile Hydration - Asymmetric Ketone Bioreduction. **ChemCatChem**, v. 10, n. 20, p. 4676–4682, 2018a.

MATHEW, C. D. et al. Nitrilase-Catalyzed Production of Nicotinic Acid from 3-Cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous* J1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1030–1032, 1988.

MITRA, S.; HOLZ, R. C. Unraveling the Catalytic Mechanism of Nitrile Hydratases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7397–7404, 2007.

NELP, M. T. et al. A Protein-derived Oxygen Is the Source of the Amide Oxygen of Nitrile Hydratases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 15, p. 7822–7829, 2016.

OKAMOTO, S.; ELTIS, L. D. Purification and characterization of a novel nitrile hydratase from *Rhodococcus sp*. RHA1. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 828–838, 2007.

PRASAD, S.; SHARMA, D. R.; BHALLA, T. C. Nitrile- and Amide-hydrolysing Activity in Kluyveromyces thermotolerans MGBY 37. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8–9, p. 1447–1450, 2005.

PREJANÒ, M. et al. Reaction Mechanism of Low-Spin Iron(III)- and Cobalt(III)-Containing Nitrile Hydratases: A Quantum Mechanics Investigation. **Inorganic Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 13390–13400, 2017.

RICCA, E.; BRUCHER, B.; SCHRITTWIESER, J. H. Multi-enzymatic cascade reactions: Overview and perspectives. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2239-2262, 2011.

SAITO, A. et al. Direct Catalytic Asymmetric Addition of Alkylnitriles to Aldehydes with Designed Nickel–Carbene Complexes. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 133, n. 16, p. 8821-8825, 2021.

SANZ SHARLEY, D. D.; WILLIAMS, J. M. J. A selective hydration of nitriles catalysed by a Pd(OAc)2-based system in water. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 43, p. 4090–4093, 2017.

SATHE, P. A. et al. Tandem synthesis of aromatic amides from styrenes in water. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 29, p. 2820–2823, 2018.

SCHRITTWIESER, J. H. et al. Biocatalytic cascade for the synthesis of enantiopure β-azidoalcohols and β-hydroxynitriles. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 14, p. 2293–2298, 2009.

SCHRITTWIESER, J. H. et al. Artificial Biocatalytic Linear Cascades for Preparation of Organic Molecules. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 1, p. 270–348, 2018.

SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 2, p. 801–838, 2018.

SPERL, J. M.; SIEBER, V. Multienzyme Cascade Reactions - Status and Recent Advances. **ACS Catalysis**, v. 8, n. 3, p. 2385–2396, 2018.

SUPREETHA, K. et al. Advances in cloning, structural and bioremediation aspects of nitrile hydratases. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 4, p. 4661–4673, 2019.

TORDATO, E. A. Cascatas multienzimáticas aplicadas na síntese estereosseletiva de beta-hidroxiamidas. 2018. 100 f. Dissertação (mestrado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

VARJOSAARI, S. E. et al. 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, 2018.

VÁZQUEZ-VILLA, H. et al. Iridium diamine catalyst for the asymmetric transfer hydrogenation of ketones. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 38, p. 8979-8981, 2011.

XU, G. C. et al. Stereocomplementary bioreduction of β-ketonitrile without ethylated byproduct. **Organic Letters**, v. 15, n. 21, p. 5408–5411, 2013.

YAMANAKA, Y. et al. Time-Resolved Crystallography of the Reaction Intermediate of Nitrile Hydratase: Revealing a Role for the Cysteinesulfenic Acid Ligand as a Catalytic Nucleophile. **Angewandte Chemie**, v. 127, n. 37, p. 10913–10917, 2015.

YANO, T.; OZAWA, T.; MASUDA, H. Structural and Functional Model Systems for Analysis of the Active Center of Nitrile Hydratase. **Chemistry Letters**, v. 37, n. 7, p. 672–677, 2008.

ZEROR, S. et al. Enantioselective ketoester reductions in water: A comparison between microorganism-and ruthenium-catalyzed reactions. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 21, n. 9–10, p. 1211–1215, 2010.

ZHAN, W. et al. A continuous-flow synthesis of primary amides from hydrolysis of nitriles using hydrogen peroxide as oxidant. **Tetrahedron**, v. 74, n. 13, p. 1527–1532, 2018.

ZHENG, D.; ASANO, Y. Biocatalytic asymmetric ring-opening of dihydroisoxazoles: a cyanide-free route to complementary enantiomers of β-hydroxy nitriles from olefins. **Green Chemistry**, v. 22, p. 4930-4936, 2020.