

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Avaliação do potencial enzimático de micro-organismos conversores de nitrilas para a síntese
de compostos de interesse farmacêutico

FERNANDA ARAGÃO COYADO

Araraquara - SP

2016

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Avaliação do potencial enzimático de micro-organismos conversores de nitrilas para a síntese de compostos de interesse farmacêutico

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP para a obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Realizado no Instituto de Química, no Departamento de Química Orgânica – Milagre Research Group.

Fernanda Aragão Coyado
Graduanda

Cintia Duarte de Freitas Milagre
Orientadora

Humberto Márcio Santos Milagre
Co-orientador

Araraquara - SP

2016

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo o esforço, me proporcionando o possível e o impossível, para eu alcançar os meus sonhos. Além da paciência, amizade e amor que fizeram de mim um ser humano completo durante toda a vida.

A todos os familiares que são presentes – meus avós, tias e primos – que me enchem de amor e carinho.

À Profa. Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre, por ter me acolhido tão bem no laboratório e por ter me orientado tão pacientemente. Obrigada pela oportunidade e por todos os momentos vividos, esta experiência acrescentou muito para a minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre, pela paciência, ensinamentos e pensamentos críticos.

A todos os colegas que conheci e convivi no Milagre Research Group, pelas conversas, dúvidas sanadas e, principalmente, pelo maravilhoso ambiente de trabalho criado. Em especial agradeço à Luna, Maraylla, Íris e Carol.

À Profa. Kátia Ester pelas correções de português do Trabalho de Conclusão de Curso.

Ao João Fernando, pela paciência, companheirismo, amor, amizade, e, principalmente, por caminhar lado a lado comigo.

A todos os amigos que estiveram comigo, desde o início da faculdade. Em especial agradeço ao Danilo, por todas as broncas, risadas, parcerias e pelo infinito amor de irmão que criamos. Em especial também agradeço à Amanda e à Beatriz, por toda a paciência, amizade e momentos que só nós vivemos. Vocês duas me fortaleceram e me ensinaram muito nesses anos de faculdade.

Ao Instituto de Química – UNESP e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, pela infraestrutura para o desenvolvimento do trabalho.

E a todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Biocatálise.....	11
1.2. Biocatálise e a indústria farmacêutica.....	12
1.3. Compostos nitrilados como substratos enzimáticos.....	14
1.4. Enzimas.....	15
1.4.1. Fontes naturais de enzimas.....	15
1.4.2. Nitrilases (Nase).....	15
1.4.3. Nitrilas hidratases (NHases).....	17
1.5. Dessimetrização.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Procedimentos gerais adotados.....	21
3.2. Reagentes e solventes.....	22
3.3. Análises cromatográficas.....	22
3.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	22
3.3.2. Cromatografia gasosa com detecção por ionização de chamas (GC-FID).....	23
3.3.3. Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS).....	23
3.4. Seleção microbiana.....	23
3.4.1. Preparação do meio de cultura e solução de glicerol 20%.....	23
3.4.2. Preservação dos micro-organismos.....	24
3.5. Procedimento geral para as reações com os micro-organismos.....	24
3.5.1. Preparação da solução tampão.....	24
3.5.2. Experimentos.....	25
3.5.3. Controle de substrato.....	25
3.5.4. Controle do micro-organismo.....	26
3.6. Reação com enzima nitrilase.....	26
3.6.1. Preparo da solução tampão Sorensen.....	26

3.6.2. Experimento.....	26
3.7. Reações com enzimas nitrilas hidratases.....	27
3.7.1. Preparação da solução tampão enriquecida com solução traços.....	27
3.7.2. Preparação da solução traço.....	27
3.7.3. Experimento.....	27
3.8. Descarte de resíduos.....	27
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 28
4.1. Molécula alvo.....	28
4.2. Biocatalisadores.....	31
4.3. Reações biocatalíticas.....	33
4.3.1. Produtos esperados, enzimas envolvidas e indutores enzimáticos.....	33
4.3.2. Reações catalisadas por micro-organismos.....	35
4.3.3. Reações catalisadas por enzimas comerciais.....	37
4.3.3.1 Reações catalisadas por nitrilase (Nase).....	37
4.3.3.2 Reações catalisadas por nitrila hidratase (NHase).....	38
 5. CONCLUSÃO.....	 42
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 43

RESUMO

A biocatálise utiliza enzimas isoladas ou presentes em células de micro-organismos, plantas e animais para catalisar reações orgânicas. Estes catalisadores são responsáveis por transformações químicas de forma mais simples, seletiva e sustentável, quando comparados às metodologias químicas tradicionais. O primeiro passo em um processo biocatalítico consiste em selecionar micro-organismos que contenham a(s) enzima(s) de interesse e em seguida otimizar as condições reacionais a fim de se obter o produto com elevado rendimento e pureza enantiomérica, quando for o caso. Em compostos simétricos, as enzimas podem ser ferramentas poderosas na dessimetrização dos mesmos, ou seja, na eliminação de um ou mais elementos de simetria do composto, tornando-o assimétrico. Em continuidade ao estudo do nosso grupo de pesquisa – Milagre Research Group – esse trabalho tem como objetivo avaliar o potencial biocatalítico de micro-organismos quanto à presença de enzimas conversoras de nitrilas para a produção de intermediários sintéticos de interesse farmacológico e também por enzimas comerciais – nitrilases e nitrilas hidratases. Para contemplar este objetivo utilizou-se a dinitrila 1,4-fenilenodiacetonitrila como substância modelo para realizar reações de biocatálise com os dois tipos de biocatalisadores: células microbianas íntegras e enzimas isoladas (nitrilase e enzima nitrila hidratase). Na primeira etapa, realizou-se a triagem de micro-organismos e as reações com as respectivas células, empregando a dinitrila como substrato. Na segunda etapa, realizou-se as reações de biocatálise com as enzimas comerciais nitrilase e nitrila hidratases. Os resultados obtidos no decorrer da pesquisa foram analisados por cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Dos micro-organismos avaliados apenas 1 mostrou-se capaz de converter a dinitrila na respectiva amida com apenas 10% de conversão. Em contrapartida dentre as 22 nitrila hidratases investigadas, 06 foram capazes de produzir a amida desejada numa taxa de 100% de conversão, mostrando-se biocatalisadores promissores para tal reação em escala ampliada.

Palavras-chave: biocatálise, dessimetrização, triagem, micro-organismos, nitrilase, nitrila hidratase, compostos nitrilados.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Síntese enzimática de (<i>R</i>)-mandelonitrila partindo de benzaldeído e CN-.....	12
Esquema 2: Diversidade estrutural acessível através da manipulação de nitrilas. R e R' representam quaisquer grupos alquil ou aril.....	14
Esquema 3: Enzimas responsáveis pelo catabolismo de nitrilas.....	15
Esquema 4: Conversão da nitrila em ácido carboxílico, mediada pela nitrilase.....	16
Esquema 5: Reação de hidrólise enzimática catalisada pela nitrilase.....	16
Esquema 6: Conversão da nitrila em amida, mediada pela nitrila hidratase.....	17
Esquema 7: Reação de hidrólise enzimática catalisada pela nitrila hidratase.....	18
Esquema 8: Dessimetrização de 3-alkil e 3-arylglutaronitrilas.....	19
Esquema 9: Rota quimioenzimática de preparação de um álcool.....	19
Esquema 10: Agonista de receptor β -3.....	20
Esquema 11: Reações enzimáticas de dessimetrização partindo da 1,4-fenilenodiacetonitrila.....	21
Esquema 12: Possíveis produtos esperados nas reações de biocatálise a partir de 1 (1,4-fenilenodiacetonitrila).....	34
Esquema 13: Reação enzimática de 1 catalisada por uma nitrilase.....	37
Esquema 14: Conversão da butironitrila em ácido carboxílico.....	38
Esquema 15: Reação enzimática esperada.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização do reagente.....	28
Tabela 2: Informações físico-químicas da isobutironitrila.....	34
Tabela 3: Biotransformação da 1,4-fenilenodiconitrila por células microbianas.....	35
Tabela 4: Relação de nitrilas hidratases.....	39
Tabela 5: Resultados da reação de conversão de 1 em 2 catalisada por nitrilas hidratases (NHases).....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Composição dos fármacos aprovados pelo FDA no período de 1992 a 2008.....	13
Figura 2: Cromatograma do material de partida 1,4-fenilenodiacetonitrila.....	29
Figura 3: Espectro de massas (ionização por impacto de elétrons 70 eV) do material de partida 1,4-fenilenodiacetonitrila.....	30
Figura 4: Cromatograma do experimento controle de estabilidade físico-química do material de partida 1,4-fenilenodiacetonitrila.....	31
Figura 5: Cromatograma relativo ao experimento de controle microbiano do micro-organismo MLH-08.....	33
Figura 6: Espectro de massas (ionização por impacto de elétrons, 70 eV) do composto com tempo de retenção de 9,70 minutos produzido na reação como micro-organismo MLH-08...	36
Figura 7: Cromatogramas da conversão da dinitrila pela nitrila hidratase – NHase 001 (tipo Fe) e NHase 002 (tipo Co).....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BOD – Biochemist Oxygen Demand

CCD – Cromatografia em camada delgada

CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa

cm³ - centímetro cúbico

eV - eletrovolt

FDA – Food and Drug Administration

g – gramas

GC-FID – Cromatografia Gasosa acoplada ao detector de ionização em chamas

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada ao Espectro de massas

h – horas

kPa – quilopascal

M – molar

mg – miligramas

mL – mililitros

mM – milimolar

Nase – Nitrilase

NB – Nutrient Broth

NHase – Nitrila hidratase

NHclea – Nitrila hidratase imobilizada

rpm – rotação por minuto

ton – tonelada

uL – microlitros

UV – ultra violeta

1. INTRODUÇÃO

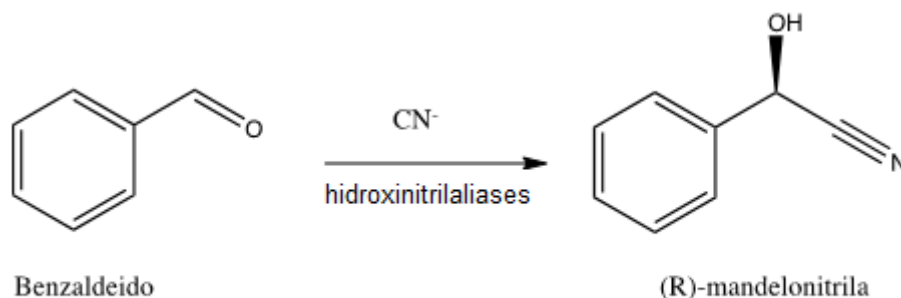
1.1. Biocatálise

O termo “biocatálise” é utilizado para descrever o uso de enzimas ou outras moléculas biológicas com função catalítica (como por exemplo, RNAses, DNAses e anticorpos) para catalisar reações químicas orgânicas. Atualmente, tem sido um campo de pesquisa bastante atrativo devido às características de reação como: uso de solventes com pouco impacto ambiental, condições reacionais mais brandas como temperaturas e pressões ambientes, pH próximo ao pH fisiológico e o uso de biocatalisadores biodegradáveis e provenientes de fontes naturais e renováveis (micro-organismos e plantas). (TORRELO, HANEFELD & HOLLMAN, 2014). Além disso, as reações catalisadas por enzimas possuem potencial para elevada quimiosseletividade, regioseletividade e estereosseletividade, com possibilidade de reuso dos biocatalisadores em diversos ciclos, tornando este processo eficiente economicamente. (PATEL, 2008).

Para alguns autores, a biocatálise por si só se enquadra dentro da química verde por atender alguns dos preceitos da mesma. Porém, esta é uma visão simplória e insuficiente para avaliar o impacto ambiental destes processos. Para tanto é necessário realizar uma avaliação crítica e qualitativa dos processos biocatalíticos baseado nas métricas utilizadas para avaliar o grau de sustentabilidade de processos químicos e biotecnológicos. Todavia, muitas vezes os processos biocatalíticos são uma alternativa mais sustentável quando comparado às reações químicas convencionais. (TORRELO, HANEFELD & HOLLMAN, 2014).

No início do século passado, a biocatálise foi pouco aplicada em escala industrial devido à baixa disponibilidade das enzimas em quantidades suficientes. Um dos exemplos foi realizado em 1913 quando Ludwig Rosenthaler utilizou uma emulsão de extrato celular de amêndoas para catalisar a síntese da (*R*)-mandelonitrila a partir do benzaldeído. Esta versão assimétrica para a obtenção da (*R*)-mandelonitrila em elevado excesso enantiomérico, foi alcançada devido à presença de enzimas hidroxinitrilaliasas (E.C. 4. 1.2.10) no extrato celular de amêndoas, conforme representado no Esquema 1. (GLASER, 2014).

Esquema 1: Síntese enzimática de (*R*)-mandelonitrila partindo de benzaldeído e CN^- .



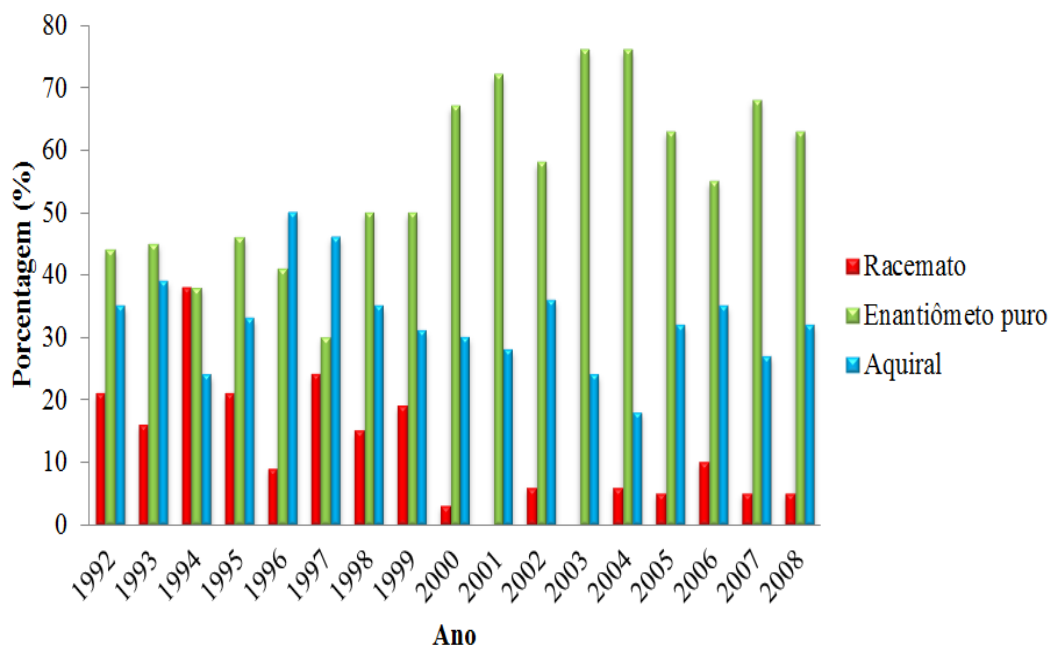
Fonte: Adaptado de Glaser, 2014.

A partir de então, a biocatálise passou a ser considerada como uma estratégia sintética promissora, principalmente para a indústria farmacêutica.

1.2. Biocatálise e a indústria farmacêutica

O setor farmacêutico possui um grande interesse em processos biocatalíticos, visto que estes podem ser utilizadas para criar novas rotas sintéticas, principalmente quando o objetivo é a obtenção de blocos construtores quirais para a produção de substâncias farmacologicamente ativas (POLLARD & WOODLEY, 2006). A produção de fármacos em suas formas enantiomericamente puras tem sido requerida pelos órgãos reguladores como ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e FDA (Food and Drug Administration). Os estudos biológicos e farmacocinéticos para cada um dos enantiômeros puros de fármacos contendo centros estereogênicos passou a ser exigência das agências reguladoras a partir da ocorrência dos problemas causados pelo uso da talidomida, na forma racêmica por gestantes na década de 60. Enquanto o enantiômero (*R*) apresentava os efeitos sedativos esperados, a presença do enantiômero (*S*) provocou os efeitos mutagênicos indesejados (POLLARD & WOODLEY, 2006). Vale ressaltar que, ainda que a talidomida tivesse sido administrada em sua forma enantiomérica (*R*) pura, os mesmos problemas teriam sido observados devido a sua racemização no corpo humano, levando à formação de ambos enantiômeros na corrente sanguínea. A Figura 1 apresenta a tendência dos tipos de fármacos (racemato, enantiômeros puro ou fármacos aquirais) que têm sido aprovados pelo FDA entre os anos 1992-2008.

Figura 1: Composição dos fármacos aprovados pelo FDA no período de 1992 a 2008.



Fonte: Adaptado de LIN et al., 2011 e WU e VOGT, 2012.

A indústria farmacêutica possui algumas exigências para a síntese de fármacos em relação à viabilidade econômica, e para verificar se um determinado processo será ou não rentável, alguns fatores são levados em consideração, como: (POLLARD & WOODLEY, 2006)

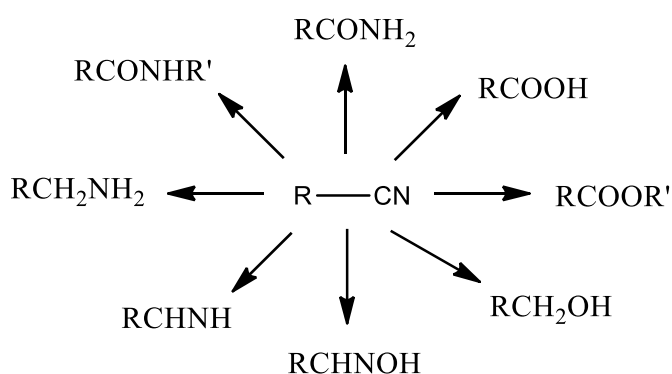
- Custo do catalisador;
- Pureza enantiomérica e regiômérica;
- Rendimento da reação;
- Grau de facilidade/dificuldade das etapas “downstream”;
- Velocidade do desenvolvimento e otimização do processo;
- Escalonamento do processo;
- Produção em escala industrial.

Atualmente, acoplado à viabilidade econômica, está a viabilidade em relação a parâmetros de sustentabilidade ambiental e ocupacional.

1.3. Compostos nitrilados como substratos enzimáticos

As nitrilas são moléculas versáteis podendo ser convertidos não só em amidas, mas também em aminas, iminas, oximas, ácidos carboxílicos, ésteres e alcoóis que juntos correspondem a um grupo economicamente importante de intermediários sintéticos, conforme representado no Esquema 2. (WOODLEY, 2008).

Esquema 2: Diversidade estrutural acessível através da manipulação de nitrilas. R e R' representam quaisquer grupos alquil ou aril.



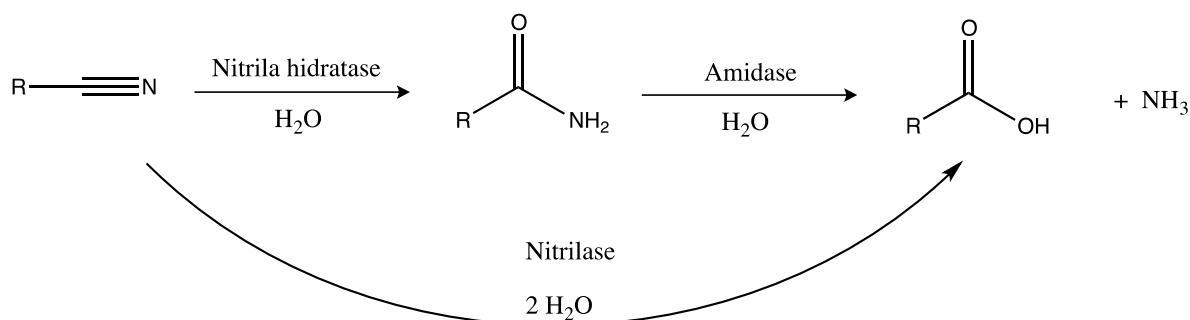
Fonte: O autor

Entretanto, a maioria das nitrilas são tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas. (GONG et al., 2012). Na natureza, a maioria das nitrilas são empregadas como fonte de substâncias cianogênicas, biossintetizadas como metabólitos secundários e utilizados em estratégias de defesa de plantas e animais.

O catabolismo das nitrilas envolve a ação de enzimas distintas, como representado no Esquema 3: (GONG et al., 2012)

- A conversão das nitrilas na presença das nitrilases (E.C. 3.5.5.1), nos correspondentes ácidos carboxílicos e liberação de NH_3 .
- A conversão das nitrilas, na presença de nitrila hidratases (E.C. 4.2.1.84), nas correspondentes amidas, seguida da hidrólise destas catalisada por amidases (E.C.3.5.1.4) formando ácido carboxílico e NH_3 .

Esquema 3: Enzimas responsáveis pelo catabolismo de nitrilas.



Fonte: O autor

1.4. Enzimas

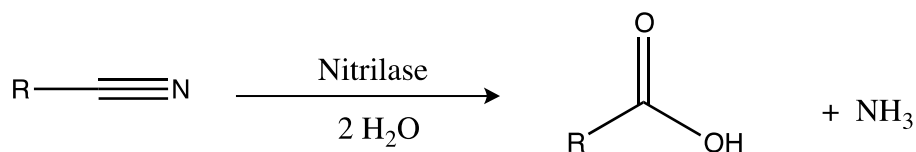
1.4.1. Fontes naturais de enzimas

Desde a década de 60 têm-se buscado nos micro-organismos a produção de diversas enzimas, principalmente nas bactérias. A primeira linhagem a hidrolisar um grupo nitrila foi isolada do solo e identificada como *Pseudomonas*. Após esse período, muitas outras linhagens foram identificadas com atividades enzimáticas conversoras de nitrilas, tais como: *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*. (GONG et al., 2012).

O maior êxito de conversão de nitrilas através de enzimas foi com a bactéria *Rhodococcus rhodochrous*, que foi modificada geneticamente e usada em escala industrial para a produção de amidas e ácidos carboxílicos, como a nicotinamida e o ácido nicotínico (vitamina B3/niacina) (GONG et al., 2012). Em 2012, a Empresa Multinacional Lonza, começou a operar sua nova planta de produção enzimática de nicotinados (em Nansha, China) aumentando em 15.000 ton/m sua produção anual desta classe de compostos. (LONZA, 2010).

1.4.2. Nitrilases (Nase)

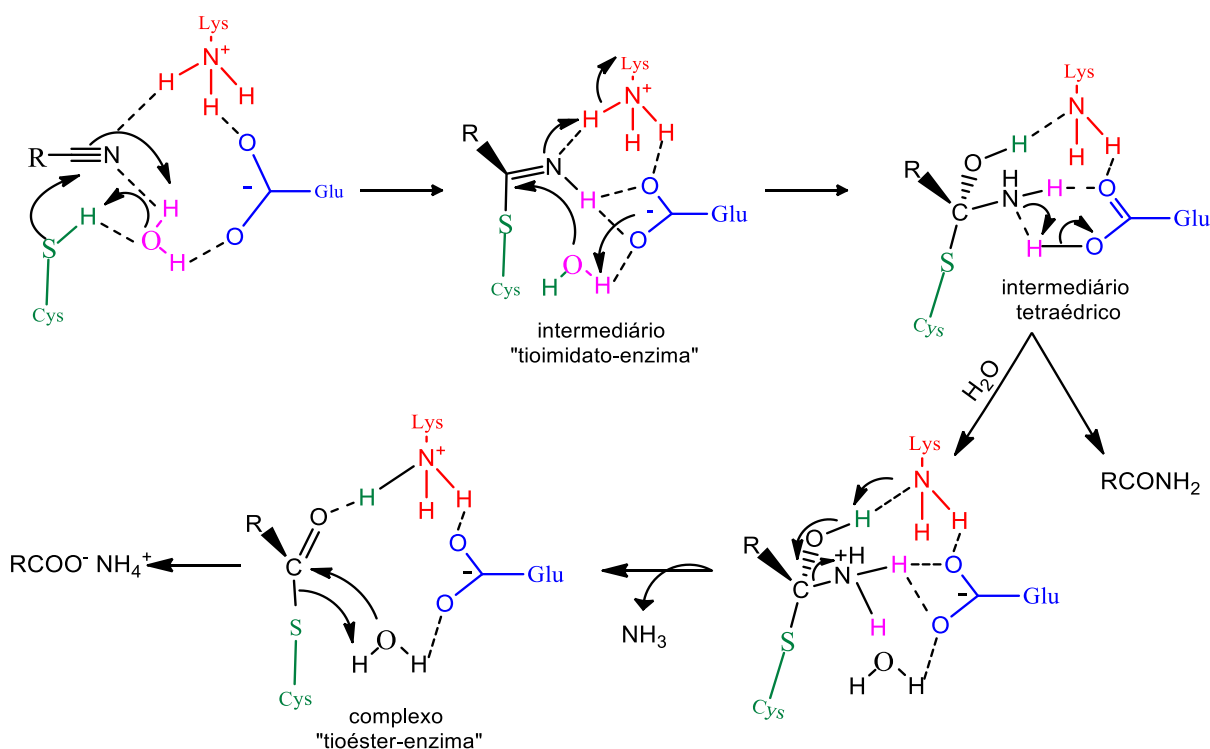
As nitrilases (EC 3.5.5.xx) pertencem à classe das hidrolases e são enzimas que catalisam a hidrólise direta de nitrilas em seus respectivos ácidos carboxílicos, como representado no Esquema 4. (MARTÍNKOVÁ & KREN, 2010).

Esquema 4: Conversão da nitrila em ácido carboxílico, mediada pela nitrilase.

Fonte: O autor

A reação de hidrólise enzimática catalisada por nitrilases envolve três resíduos de aminoácidos no sítio ativo da enzima – ácido glutâmico (Glu), cisteína (Cis) e lisina (Lis) – e uma molécula de água. (MARTÍNKOVÁ & KREN, 2010).

Inicialmente, um grupo sulfídrico da cisteína ataca, nucleofílicamente, o carbono eletrofílico do grupo ciano, levando a formação de um intermediário “tioimidato-enzima”. Este é hidrolisado por uma molécula de água, formando um intermediário tetraédrico. O nitrogênio deste intermediário é protonado por um próton do ácido glutâmico. Esta protonação favorece a eliminação da amônia, levando a formação do complexo covalente “tioéster-enzima”. Por fim, o complexo tioéster-enzima é hidrolisado pela molécula de água, formando seu carboxilato correspondente. (MARTÍNKOVÁ & KREN, 2010). A reação de hidrólise enzimática catalisada por nitrilases está representada no Esquema 5.

Esquema 5: Reação de hidrólise enzimática catalisada pela nitrilase.

Fonte: Adaptado de MARTÍNKOVÁ & KREN, 2010

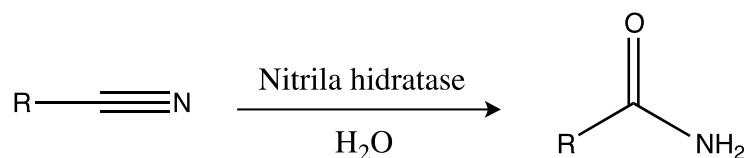
As nitrilases podem ser encontradas na natureza em bactérias dos gêneros *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, fungos dos gêneros *Fusarium*, *Gibberella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, leveduras dos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Debaryomyces* e plantas das espécies *Sinapis alba* e *Brassica rapa*. (GONG et al., 2012).

Existem alguns fatores que influenciam a produção e a atividade das enzimas nitrilases, como: as fontes de carbono e nitrogênio presentes, o indutor da reação, temperatura, pH, modificador enzimático e o tipo de solvente orgânico. (GONG et al., 2012).

1.4.3. Nitrilas hidratases (NHases)

As nitrila hidratases (EC 4.2.1.xx) pertencem à classe das liases e são enzimas que catalisam a conversão de nitrilas em suas respectivas amidas, conforme representada no Esquema 6. (CHEN et al, 2009).

Esquema 6: Conversão da nitrila em amida, mediada pela nitrila hidratase.



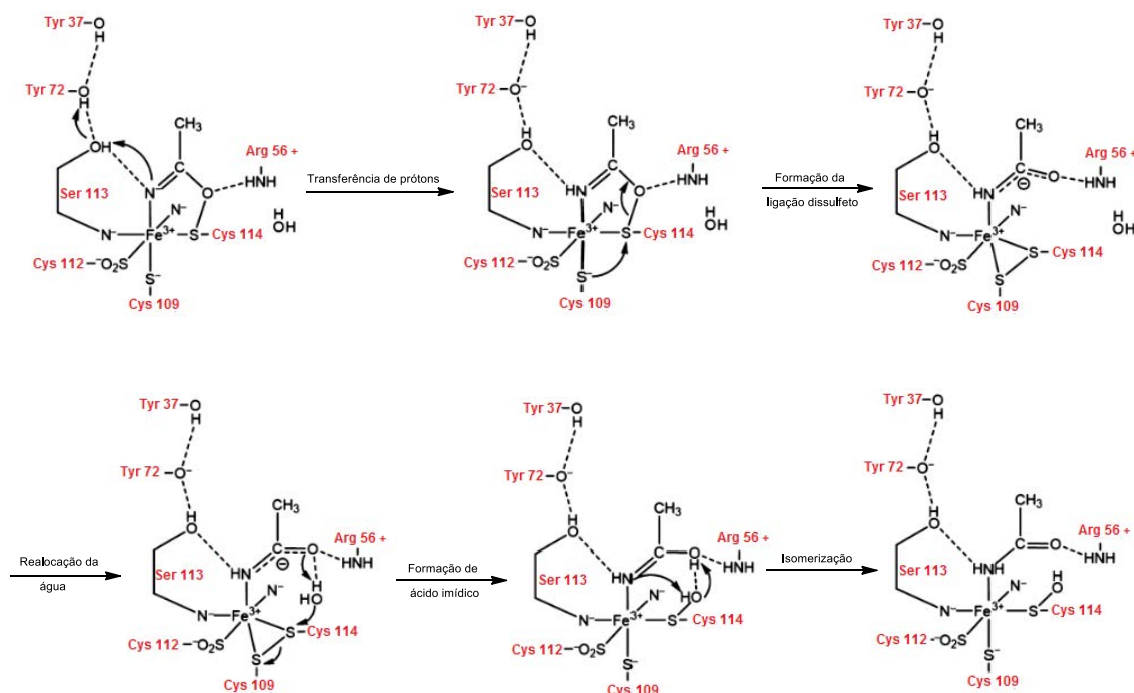
Fonte: O autor

As nitrila hidratases são enzimas dependentes dos cofatores Ferro (Fe^{+3}) ou Cobalto (Co^{+3}) e, em função desta dependência, são classificadas como NHases dependentes de ferro e NHases dependentes de cobalto. (RUCKÁ et al, 2013). Tais íons metálicos estão envolvidos na catálise para hidratação da ligação $-\text{CN}$, por isso são importantes no sítio ativo da enzima. Além disso, são essenciais para unir e dar reforço à flexibilidade e estabilidade às subunidades α da cadeia polipeptídica das NHases. (CHEN et al, 2009).

A reação de hidrólise enzimática catalisada pelas nitrilas hidratases envolve os resíduos de aminoácidos cisteína (Cis) e serina (Ser), e uma das propostas de mecanismo de reação está representada no Esquema 7. (CHEN et al, 2009).

Inicialmente o carbono do grupo ciano sofre um ataque nucleofílico do íon hidróxido que está ligado ao metal, que se encontra no sítio catalítico da enzima, formando um imidato. Por fim, este imidato sofre tautomerização, formando uma amida. (CHEN et al, 2009).

Esquema 7: Reação de hidrólise enzimática catalisada pela nitrila hidratase.



Fonte: Retirado de KAYANUMA et al, 2016.

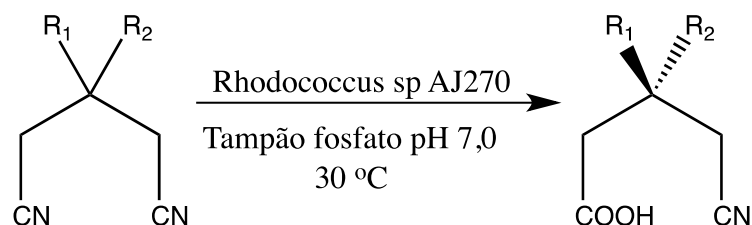
As nitrila hidratases podem ser encontradas principalmente em bactérias, como *Pseudomonas* e *Rhodococcus*, e em alguns fungos, como *Candida*. (RUCKÁ et al, 2014).

1.5. Dessimetriação

Dessimetriação de uma molécula aquiral ou compostos meso para obtenção de produtos enantiomericamente enriquecidos têm se tornado uma poderosa estratégia sintética. (WILLIS, 1999). Li e colaboradores empregaram a dessimetriação de 3-alkil e 3-arylglutaronitrilas para produção de ácidos cianobutanoicos opticamente ativos, importantes blocos construtores quirais em sínteses orgânicas (Esquema 8). A dessimetriação dos materiais de partidas foi catalisada por células microbianas de *Rhodococcus* sp AJ270, em meio aquoso (tampão fosfato pH 7,0) a 30 °C. Os rendimentos variaram de 15-90%,

dependendo do grupo substituinte no anel aromático e de sua posição (orto, meta ou para) e os excessos enantioméricos chegaram em 95% de pureza do enantiômeros (*S*). (WANG et al., 2002).

Esquema 8: Dessimetração de 3-alkil e 3-arylglutaronitrilas.



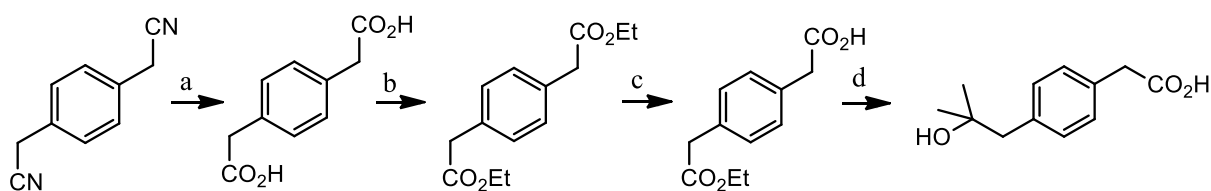
Fonte: Adaptado de WANG et al, 2002.

A dessimetração utilizando enzimas tem se tornado muito frequente visto que apresenta uma grande vantagem, quando comparada com as reações convencionais, pois possui a habilidade de alcançar um elevado excesso enantiomérico. (NERI & WILLIAMS, 2003).

A dessimetração pode ser empregada em diversos tipos de moléculas, como por exemplo: anidridos, epóxidos, aziridinas, alcenos, dióis e polióis, cetonas e dialdeídos, dentre outros. (WILLIS, 1999).

Um exemplo de aplicação de dessimetração na síntese de compostos farmacologicamente ativos é proposto por Badland e colaboradores, representada pelo Esquema 9.

Esquema 9: Rota quimioenzimática de preparação de um álcool.



(a) H_2O , HCl , 100°C

(b) EtOH , H_2SO_4 , 100°C

(c) Lipase TL 100L, pH 6.0 tampão acetato-cálcio (0,2M), MeCN , 35°C

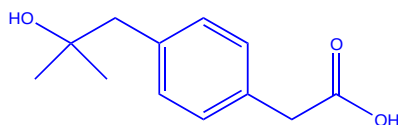
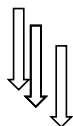
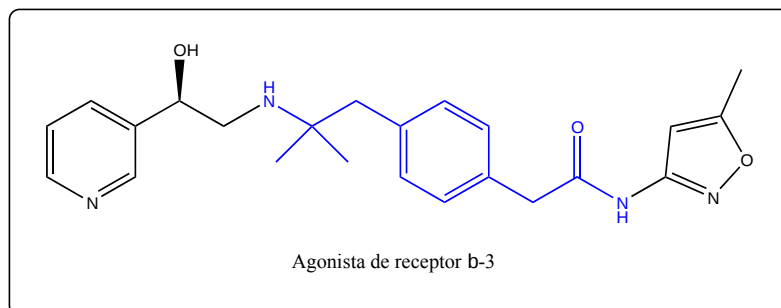
(d) THF , MeMgBr , 0°C

Fonte: Adaptado de BADLAND et al, 2011.

Neste estudo, os pesquisadores também aplicaram a técnica de dessimetração de um composto dinitrilado através do uso de lipases (etapa c), seguida da homologação da cadeia

contendo o grupo éster, a fim de gerar um álcool intermediário que pode ser usado como um intermediário na síntese de um potente fármaco agonista de receptor β -3, representado no Esquema 10. (BADLAND et al, 2011).

Esquema 10: Agonista de receptor β -3.



Fonte: Adaptado de BADLAND et al, 2011.

Neste contexto, o desenvolvimento de metodologias para dessimetrização de substâncias orgânicas apresenta enorme relevância para as sínteses orgânicas assimétricas, em especial quando se pretende produzir blocos construtores quirais bioativos.

2. OBJETIVOS

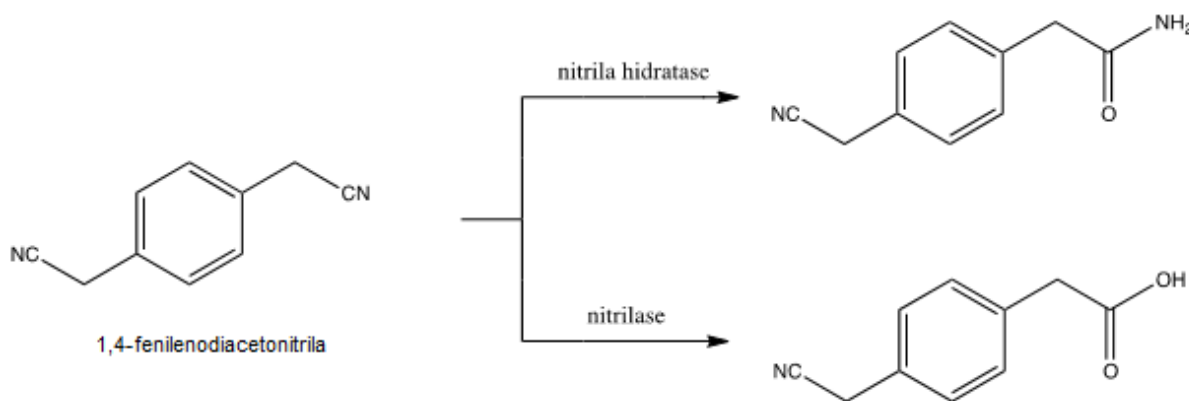
2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial biocatalítico da Coleção de Micro-organismos do Milagre Research Group quanto à presença de enzimas conversoras de nitrilas para dessimetrização de dinitrilas visando à produção de intermediários sintéticos de interesse farmacológico.

2.2. Objetivos específicos

- Triagem dos micro-organismos quanto à presença de enzimas conversoras de nitrilas, em especial, nitrilases e nitrila hidratases;
- Avaliação da capacidade de dessimetrização do composto 1,4-fenilenodiacetonitrila, pelos micro-organismos selecionados no item acima e também por enzimas comerciais (nitrilase e nitrila hidratases), representado no Esquema 11;
- Identificação do(s) composto(s) obtido(s) nas reações de biocatálise.

Esquema 11: Reações enzimáticas de dessimetrização partindo da 1,4-fenildiacetonitrila.



Fonte: O autor.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Procedimentos gerais adotados

Os materiais a serem utilizados em contato direto com os micro-organismos foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C, 1,5Kpa por 15 min.

A esterilização de bancadas foi feita utilizando álcool 70% e, para o fluxo laminar, também a luz ultravioleta germicida.

3.2. Reagentes e solventes

Os reagentes 1,4-fenilenodiacetonitrila e isobutironitrila foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Os solventes acetato de etila, hexano e dimetilsulfóxido foram obtidos da Synth.

A enzima nitrilase foi obtida da Sigma Aldrich (cod 04529).

As enzimas nitrilas hidratases utilizadas foram NHase (001, 002, 003, 004, 007, 008, 009, 010, 011, 012, 013, 014, 015, 016, 017, 018, E0256, E0257, E0258, E0259) e NHclea (002 e 003). Todas foram obtidas da Prozomix– kit nitrile hydratase Panel.

Para as reações foram utilizados os seguintes micro-organismos: MLH 08, MLH 09, MLH 10, MLH 12, MLH 15 e MLH 18. Estes foram coletados e isolados de solos contaminados com herbicidas benzonitrilados.

A escolha destes micro-organismos foi baseada em um ensaio enzimático realizado anteriormente no grupo de pesquisa Milagre Research Group pela aluna Letícia Mara Lima Angelini (ANGELINI et al, 2015).

3.3. Análises cromatográficas

3.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As placas cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas com sílica gel com indicador de fluorescência da marca Sigma-Aldrich (288586) com 1 mm de espessura, sobre placas de vidro de 20 x 20 cm.

Algumas reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD) em cromatoplas de 20 x 20 cm, da marca Macherey-Nagel, sobre suporte de alumínio com filme de sílica gel 60 F₂₅₄.

A detecção nas placas dos compostos com grupos cromóforos foi feita utilizando-se irradiação ultravioleta no equipamento Solab SL-204 com irradiação no comprimento de onda (λ) de 254 nm.

3.3.2. Cromatografia gasosa com detecção por ionização de chamas (GC-FID)

As análises por GC-FID foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo Shimadzu GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i e acoplado a um detector de ionização em chamas FID1. O injetor operou a um fluxo constante de gás H₂ de 1,22 mL min⁻¹, fluxo total de 126,7 mL min⁻¹ e temperatura igual a 260 °C. O detector operou a um fluxo constante de gás H₂ de 40 mL min⁻¹, fluxo constante de gás N₂ de 30 mL min⁻¹, fluxo de ar de 400 mL min⁻¹ e temperatura de 300°C. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida Restek Rtx[®]-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano), com temperatura inicial de 80°C por 3 minutos, aumento de temperatura em uma taxa de 30 °C/min até 280°C, seguido por 6,8 minutos a 280 °C. Foram injetados 1 µL da amostra na concentração de 0,5 – 1 mg mL⁻¹.

3.3.3. Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

As análises foram realizadas em um GC-MS Agilent, com um cromatógrafo gasoso Modelo 7890B e um espectrômetro de massas Modelo 5977. A coluna utilizada foi a HP5MS. As condições de análise foram idênticas às descritas para as análises por GC-FID.

3.4. Seleção microbiana

3.4.1. Preparação do meio de cultura e solução de glicerol 20%

Nutrient Ágar (NA):

Preparou-se 100 mL do meio NB (nutrient broth), conforme instruções do fabricante, em frasco Schott de 200 mL e adicionou-se 1,5g de ágar-ágar. Após o preparo, o meio foi transferido para tubos de ensaio, contendo aproximadamente 5 mL de meio em cada tubo e foram autoclavados.

O meio NB apresenta a seguinte composição:

Peptona ----- 5g

Extrato de carne ----- 3g

NaCl ----- 5g

Água destilada ----- 800 mL

Após esterilização, os tubos de ensaio foram inclinados até solidificação do mesmo.

Solução de glicerol 20%:

Adicionou-se 20 mL de glicerol em 80 mL de água destilada esterilizada. A solução foi preparada no fluxo laminar sob condições estéreis e depois protegidas da luz e armazenadas em geladeira.

3.4.2. Preservação dos micro-organismos

A curto prazo:

Para a preservação a curto prazo os micro-organismos foram repicados nos tubos de ensaio com ágar inclinado, descrito no item acima. Os tubos foram levados para a B.O.D (Biochemist Oxygen Demand) por 24h a 30°C. Após a verificação do crescimento dos micro-organismos, os tubos foram armazenados em geladeira (4 °C).

A médio prazo:

Para preservação a médio prazo foram preparados tubos tipo Eppendorf contendo o meio NA. Estes foram inclinados até a solidificação do meio. Os micro-organismos foram repicados pela técnica de estriamento superficial utilizando a alça de inoculação, e estes foram incubados na B.O.D por 24h a 30°C. Após a verificação do crescimento dos micro-organismos foram adicionados solução de glicerol 20%, num volume suficiente para cobrir todo o ágar.

Os micro-organismos foram armazenados em geladeira por algumas horas, e em seguida foram armazenados em superfreezer a -20°C.

3.5. Procedimento geral para as reações com os micro-organismos

3.5.1. Preparação da solução tampão

Foram preparadas soluções estoque de fosfato de sódio dibásico (0,2 M) e ácido cítrico (0,1 M). Em seguida foram combinados volumes suficiente de cada solução estoque para que

fosse atingido o pH desejado, conforme descrito por Pearse. (PEARSE, 1980). Em seguida, a solução tampão foi autoclavada e após o resfriamento armazenada em geladeira.

3.5.2. Experimentos

Cada micro-organismo que estava armazenado em tubos de ensaio na geladeira foi inoculado em erlenmeyer contendo 30 mL de meio Nutrient Broth e incubado sob agitação orbital por 24h a 160 rpm e 28°C.

Após o crescimento dos micro-organismos, adicionou-se 0,5 mmol do agente indutor (isobutironitrila). Em seguida, incubou-se a suspensão celular sob agitação orbital por mais 24h a 160 rpm e 28°C.

Após este período, a suspensão microbiana foi centrifugada sob rotação de 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi ressuspensa em solução tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,5 (21 mL de solução de ácido cítrico + 29 mL de solução de fosfato de sódio dibásico). A este erlenmeyer foram adicionados 1,4-fenilenodiacetonitrila (80 mg) solubilizada em dimetilsulfóxido (1 gota). A reação foi incubada sob agitação orbital a 160 rpm e 28°C e monitorada em 72h, 96h e 120h. Após estes períodos, o meio foi centrifugado e a biomassa desprezada. O sobrenadante foi extraído com acetato de etila (3 x), seco sob sulfato de sódio anidro e analisado por GC-FID (cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização de chama).

Paralelamente às reações de dessimetrização realizou-se os experimentos controle de substrato e controle microbiano.

3.5.3. Controle de substrato

Em um erlenmeyer contendo 50 mL de solução tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,5 foram adicionados 1,4-fenilenodiacetonitrila (80 mg) solubilizada em dimetilsulfóxido (1 gota). Este erlenmeyer foi mantido sob agitação orbital a 160 rpm e 28°C por 24h e sete dias. Após estes períodos a solução aquosa foi extraída com acetato de etila (3x), seca sob sulfato de sódio anidro e analisada por GC-FID.

3.5.4. Controle do micro-organismo

Em um erlenmeyer contendo 50 mL de solução tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,5 foram adicionadas biomassa microbiana recém obtida por fermentação em meio NB, conforme descrito anteriormente. Este erlenmeyer foi mantido sob agitação orbital a 160 rpm e 28°C por 24h e sete dias. Após estes períodos a solução aquosa foi extraída com acetato de etila (3x), seca sob sulfato de sódio anidro e analisada por GC-FID.

3.6. Reação com enzima nitrilase

3.6.1. Preparo da solução tampão Sorensen

Foram preparadas soluções estoque de fosfato de sódio monobásico (0,2 M) e fosfato de sódio dibásico (0,2 M). Em seguida foram combinados volumes suficientes de cada solução estoque para que fosse atingido o pH desejado, conforme descrito por Sabatini (SABATINI et al, 1962). Em seguida, a solução tampão foi autoclavada e após o resfriamento armazenada em geladeira.

3.6.2. Experimento

A reação foi realizada em microtubos tipo Eppendorf de 1,5 mL. Inicialmente pesou-se 30 mg de 1,4-fenilenodiacetonitrila e solubilizou em uma gota de dimetilsulfóxido. Em seguida adicionou-se duas gotas de solução tampão pH 7,2, para assim adicionar 4 mg da enzima nitrilase comercial. Por fim, completou o volume dos microtubos para 1 mL com a solução tampão Sorensen pH 7,2. Os microtubos (quadruplicatas) foram incubados em Termomixer a 1000 rpm e 25°C, por períodos de tempo diferentes (2h, 4h, 8h e 12h). Após o tempo de incubação, os tubos tipo Eppendorf foram extraídos com acetato de etila (3x), secos sob sulfato de sódio anidro e centrifugados e o sobrenadante para posterior extração e análise cromatográfica.

3.7. Reações com enzimas nitrilas hidratases

3.7.1. *Preparação da solução tampão enriquecida com solução traços*

A solução tampão Sorensen 0,1M, pH 7,2 foi preparada conforme descrito anteriormente. À solução tampão foram adicionados 200 µL de solução traços.

3.7.2. *Preparação da solução traço*

Para a solução traço, pesou-se 0,004g de cloreto de cobalto hexahidratado e 0,004g de cloreto de ferro (III) hexahidratado e adicionou-se em 1000 ml de água destilada. Em seguida, adicionou-se 200 µL desta solução ao tampão pH 7.

3.7.3. *Experimento*

As reações foram realizadas em microtubos de 1,5 mL. Foram avaliadas 22 enzimas nitrila hidratases diferentes.

Inicialmente, adicionou 1 mL de solução tampão pH 7 a cada microtubo, junto de 5 uL de enzima. Estes foram deixados por uma hora e meia em banho de gelo sob luz natural. Em seguida, os microtubos foram levados ao Termomixer, e após atingirem a temperatura de 25°C, adicionou-se 1 mg de 1,4-fenilenodiacetonitrila a cada um dos 22 microtubos.

Os microtubos foram incubados a 1000 rpm e 25°C por 8h. Após o tempo de incubação, os tubos tipo eppendorf foram extraídos com acetato de etila (3x), secos sob sulfato de sódio anidro e centrifugados e o sobrenadante para posterior extração e análise cromatográfica.

3.8. Descarte de resíduos

Para o descarte biológico foi realizada a descontaminação em autoclave a 121°C, 1,5kPa por 40 min.

Já para o descarte químico, os resíduos gerados foram acondicionados em frascos âmbar, devidamente rotulados que em seguida foram encaminhados para o entreposto de resíduos do Instituto de Química da UNESP – no qual foram posteriormente incinerados.

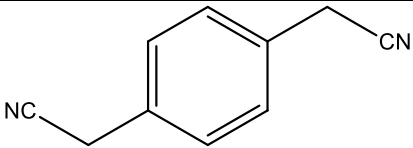
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Molécula alvo

O alvo molecular escolhido para este estudo foi a dinitrila 1,4-fenilenodiacetonitrila (Número CAS 622-75-3), que é um importante bloco construtor na síntese de APIs (do inglês: active pharmaceutical ingredient) (BADLAND, 2011).

A primeira etapa deste trabalho envolveu a caracterização do material de partida conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização do reagente.

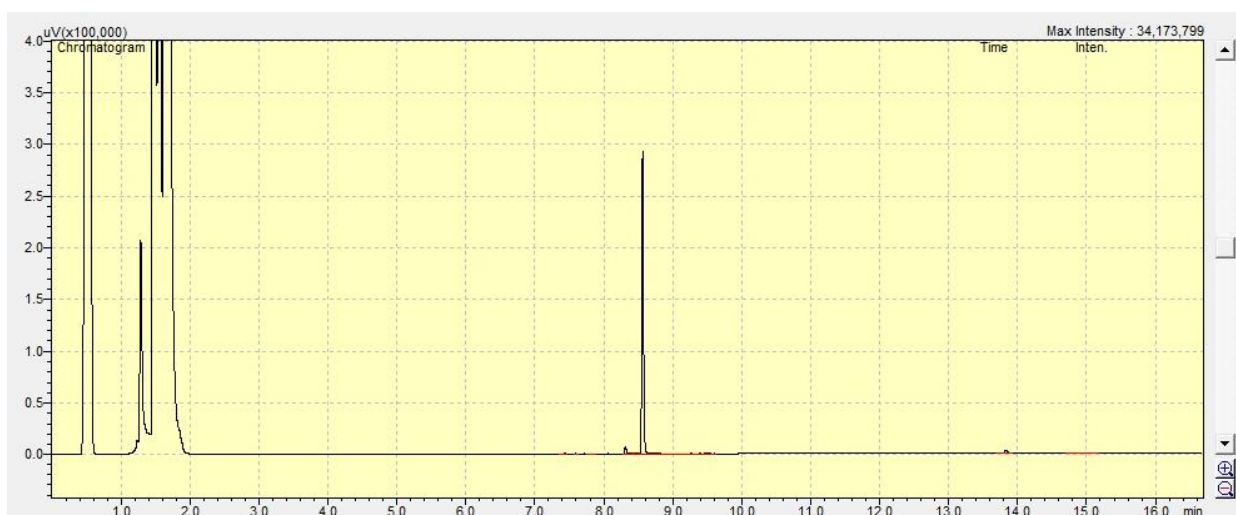
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₈ N ₂
Nomenclatura IUPAC	1-[4-(cianometil)fenil]acetonitrila
Número CAS	622-75-3
Estrutura molecular	
Massa molar	156,18 g/mol
Estado físico	Sólido branco
Ponto de fusão	95-99°C

Solubilidade	Etanol (0,5 mg/mL)
(à temperatura ambiente)	Acetato de etila (2 mg/mL)
	Dimetilsulfóxido (2 mg/mL)
Fase móvel para CCD	Hexano/Acetato de etila – 1:1
Revelador para CCD	Câmara UV (λ 264 nm)
Valor de Rf	0,5 (Hexano/Acetato de etila (1:1))

Fonte: O autor e Sigma-Aldrich.

Além destas caracterizações, o reagente foi analisado por GC-FID (cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização de chamas) para que assim fossem monitoradas as reações de biocatálise com micro-organismos e enzimas e os resultados das mesmas pudessem ser comparados com a análise da substância padrão. A Figura 2 representa o cromatograma da 1,4-fenilenodiacetonitrila nas condições cromatográficas descritas na parte experimental. Nestas condições observamos um pico com tempo de retenção de 1,90 minutos corresponde ao solvente (acetato de etila) utilizado no preparo da amostra e o pico em 8,64 minutos corresponde à dinitrila 1,4-fenilenodiacetonitrila.

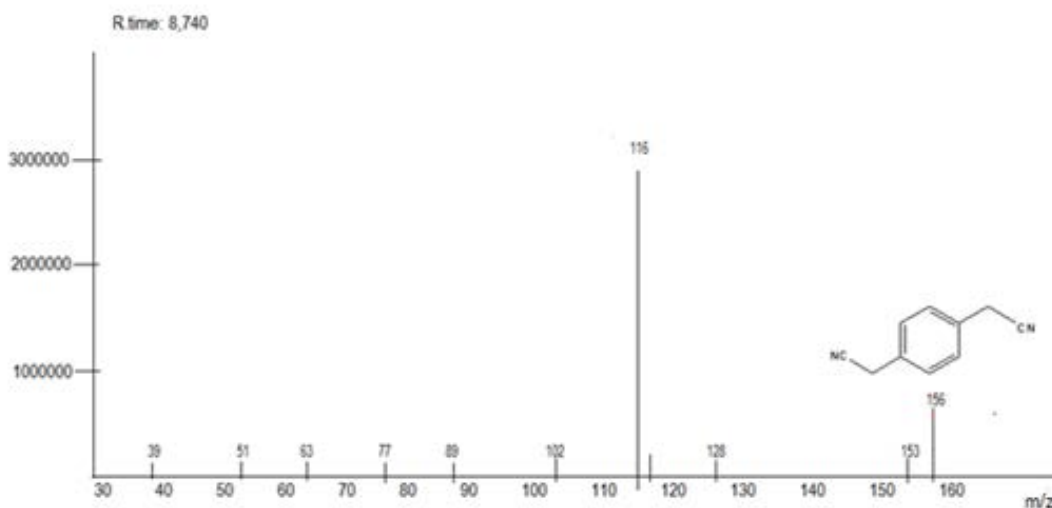
Figura 2: Cromatograma do material de partida 1,4-fenilenodiacetonitrila.



Fonte: O autor.

Uma vez estabelecido o método cromatográfico para cromatografia gasosa, foi realizada uma análise por GC-MS (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) a fim de obtermos o espectro de massas da substância padrão (Figura 3).

Figura 3: Espectro de massas (ionização por impacto de elétrons 70 eV) do material de partida 1,4-fenilenodiacetonitrila.



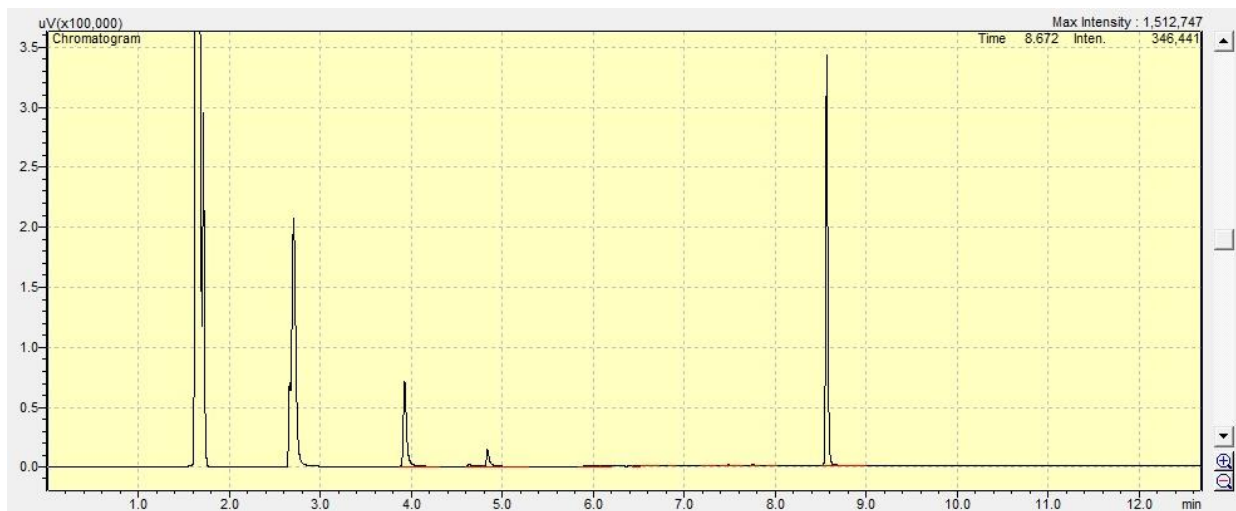
Fonte: O autor.

O sinal m/z 156 corresponde ao íon molecular ($M^{\bullet+}$) da 1,4-fenilenodiacetonitrila. O sinal m/z 116, pico base do espectro, corresponde à perda de uma das cadeias laterais $[M-CH_2CN]^+$.

Adicionalmente foi realizado um experimento para verificar a estabilidade físico-química do substrato nas condições (pH, temperatura, tempo reacional) em que seriam realizadas as reações de biocatálise. Este procedimento é importante, pois permite que sejam verificadas e há ou não formação de produtos de degradação, evitando que, no caso da formação destes, os mesmos não sejam confundidos com os produtos de interesse.

Neste experimento controle, o substrato foi adicionado a uma solução tampão citrato-fosfato pH 5,5 e incubado sob agitação orbital por 24h e sete dias. Em seguida realizou-se a extração da fase aquosa com acetato de etila e a análise cromatográfica em CG-FID (Figura 4).

Figura 4: Cromatograma do experimento controle de estabilidade físico-química do material de partida 1,4-fenilenodiacetonitrila.



Fonte: O autor.

Conforme pode ser observado no cromatograma da Figura 4, a partir das primeiras 24 h o material de partida começa a sofrer degradação nas condições que serão realizadas as reações de biocatálise, resultando na formação de produtos de degradação com tempos de retenção de 2,8; 4,0 e 4,8 minutos.

4.2. Biocatalisadores

A etapa seguinte envolveu a seleção dos biocatalisadores. Os biocatalisadores utilizados durante o projeto corresponderam aos micro-organismos da Coleção de Culturas Milagre Research Group e enzimas obtidas comercialmente. A Coleção de Culturas Milagre Research Group conta com 70 micro-organismos e, dentre estes foram empregados 7 micro-organismos previamente selecionados quanto à sua atividade enzimática conversora de nitrilas, pela aluna Letícia Mara Lima Angelini. Os micro-organismos aqui empregados foram codificados como MLH 08, MLH 09, MLH 10, MLH 12, MLH 15 e MLH 18 e serão submetidos à identificação à medida que fornecerem resultados positivos nas reações para os quais estão sendo avaliados.

A preservação das culturas microbianas foi realizada de forma a visar sua disponibilidade e viabilidade a curto e a médio prazo. Na preservação a curto prazo os micro-

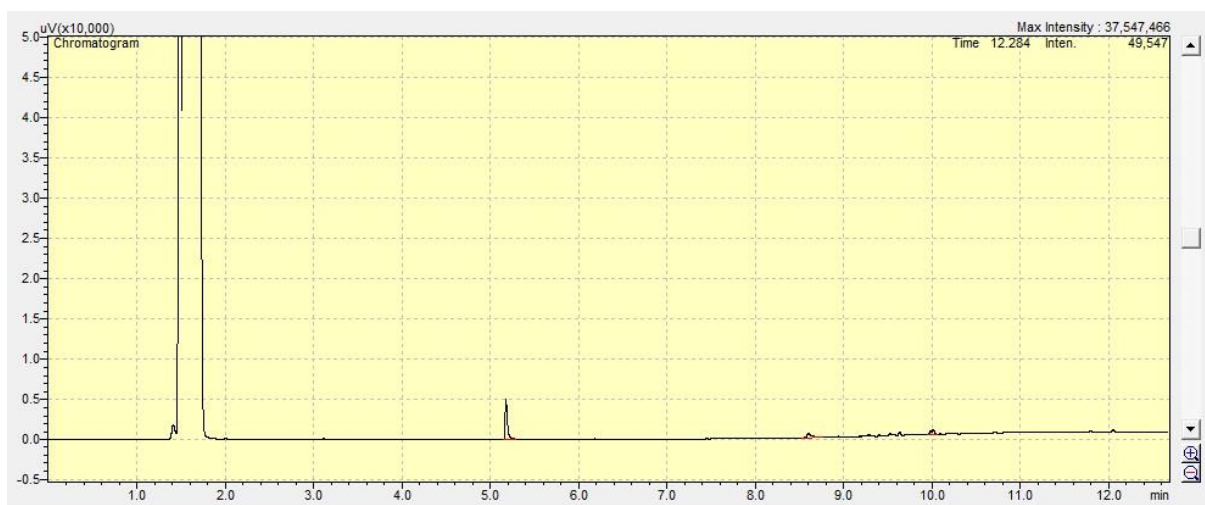
organismos foram repicados em forma de estrias em tubos de ensaio com meio de cultura sólido adequado (em ágar inclinado). Após o crescimento microbiano em B.O.D (28 °C) os tubos foram mantidos à 4°C até o uso. Essa técnica é bastante simples e permite que o metabolismo dos micro-organismos seja reduzido, mas que ainda estejam viáveis em até seis meses armazenados em geladeira (4°C).

Na preservação a médio prazo, os micro-organismos foram repicados em tubos tipo eppendorf contendo o meio de cultura sólido, pela técnica de estriamento superficial, utilizando a alça de inoculação, e mantidos em B.O.D. por 24h a 28°C. Após o crescimento microbiano foi adicionada solução aquosa de glicerol 20%, seguido do armazenamento do microtubos em congelador (-20°C). O glicerol é um agente crioprotetor que impede a formação de cristais de gelo dentro das células microbianas, evitando que as suas paredes celulares sejam rompidas. Em ambos os casos os micro-organismos foram avaliados e mostraram-se viáveis e sem contaminações microbianas.

Assim como foi necessário realizar um controle sobre a estabilidade físico-química do substrato, foi necessário realizar um controle microbiano para cada um dos micro-organismos utilizados neste estudo, com o objetivo de verificar a formação de possíveis produtos provenientes do metabolismo microbiano e não das reações de biocatálise.

Nestes experimentos de controle microbiano, cada micro-organismo foi inoculado em meio complexo (Nutrient broth) e mantidos sob agitação orbital, a 28°C por 24h. Após este período o meio de cultivo foi centrifugado e a biomassa obtida ressuspensa em tampão citrato-fosfato pH 5,5, sem a adição do substrato dinitrila. Após 7 dias cada meio aquoso foi extraído com acetato de etila e analisado por GC-FID. Para nenhum dos micro-organismos avaliados foi detectada a presença dos produtos esperados nas reações de catálise enzimática (amidas e ácidos carboxílicos correspondentes à dinitrila). Em alguns casos foram observados alguns picos de baixa intensidade que correspondem a substâncias produzidas e excretadas pelas células microbianas, conforme exemplificado na Figura 5.

Figura 5: Cromatograma relativo ao controle microbiano do micro-organismo MLH-08.



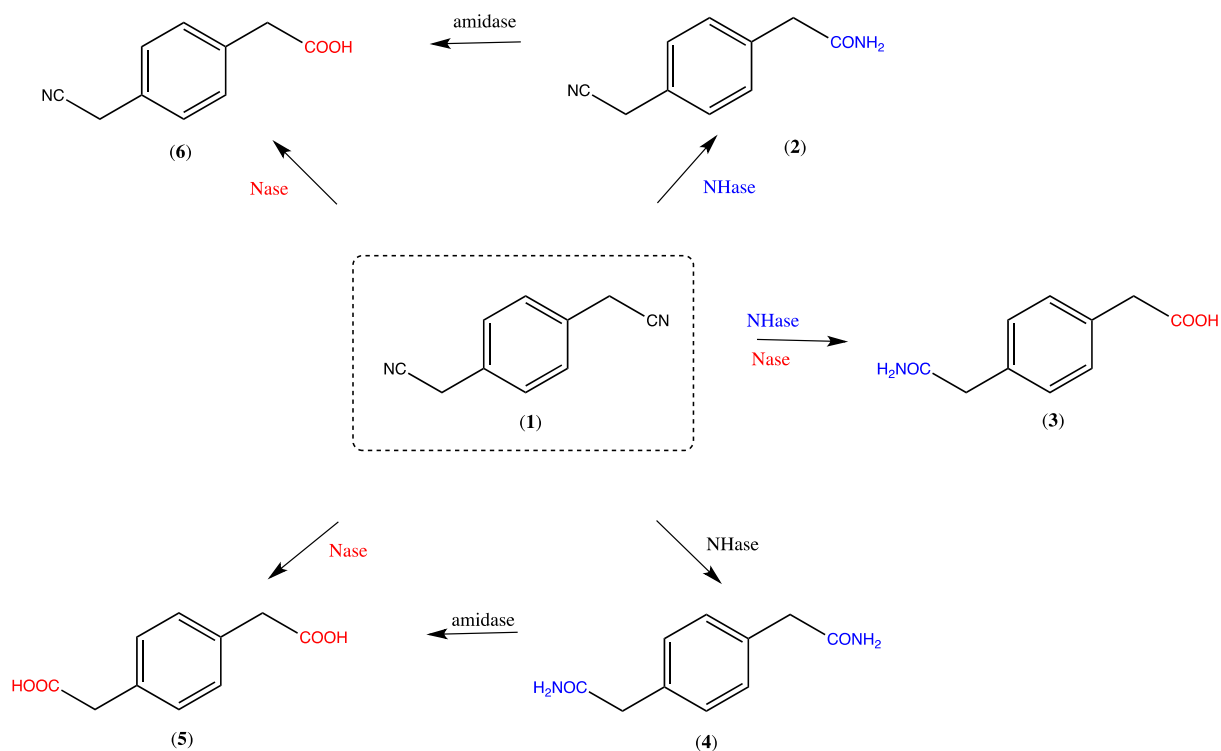
Fonte: O autor.

4.3. Reações biocatalíticas

4.3.1. Produtos esperados, enzimas envolvidas e indutores enzimáticos

Uma vez avaliadas a estabilidade físico-química do substrato e a formação ou não de produtos do metabolismo microbiano dos biocatalisadores, deu-se início às reações de biocatálise propriamente ditas. Os possíveis produtos (**2** a **6**) esperados nas reações de biocatálise estão ilustrados no Esquema 12. A formação dos compostos **2** e **4** envolvem a participação de nitrilas hidratases (NHase), enzimas que convertem nitrilas em amidas. Os compostos **5** e **6** podem ser obtidos tanto pela ação de nitrilases (Nases), enzimas que convertem uma nitrila diretamente em ácido carboxílico, ou pela ação de amidases que são capazes de converter amidas em ácidos carboxílicos. Já para a obtenção do composto **3** seria necessária a ação de uma nitrilase e uma nitrila hidratase. Os compostos **2**, **3** e **6** correspondem a moléculas assimétricas (dessimetrizadas a partir do material de partida), enquanto os compostos **4** e **5**, a simetria observada no material de partida seria mantida, porém com grupos funcionais distintos.

Esquema 12: Possíveis produtos esperados nas reações de biocatálise a partir de **1** (1,4-fenilenodiacetonitrila).



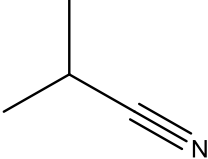
Fonte: O autor.

As enzimas podem ser classificadas como indutivas ou constitutivas. As enzimas constitutivas são aquelas produzidas constantemente pelo micro-organismos, em geral estão associadas ao metabolismo primário. Já as enzimas indutivas são aquelas em que a expressão de sua biossíntese depende da presença de um indutor no meio, e este normalmente é análogo ou derivado do seu substrato. (EMBRAPA, 2016).

É sabido que as enzimas nitrila hidratases são, em sua maioria, indutivas enquanto as nitrilases e amidases são constitutivas (GONG, 2012). Neste trabalho utilizou-se a isobutironitrila como indutor enzimático de nitrila hidratases, suas informações físico-químicas encontram-se na Tabela 2. Esta escolha baseou-se em investigações anteriores desenvolvidas dentro do Milagre Research Group.

Tabela 2: Informações físico-químicas da isobutironitrila.

Fórmula molecular	C ₄ H ₇ N
--------------------------	---------------------------------

Estrutura molecular	
Massa molar	69,11 g/mol
Densidade	0,77 g/cm ³
Estado físico	Líquido incolor

Fonte: O autor.

4.3.2. Reações catalisadas por micro-organismos

Para iniciar os experimentos envolvendo as reações de biocatálise, primeiramente os micro-organismos foram incubados em meio complexo (NB) sob agitação orbital, por 24h a 28°C e 160 rpm, para que fosse produzida a biomassa celular necessária aos experimentos. Após as 24h de crescimento microbiano foi adicionado agente indutor ao meio reacional, que permaneceu sob agitação orbital por 24h a 28°C e 160 rpm.

Os experimentos foram realizados com as células em repouso, ou seja, após a obtenção da biomassa e indução enzimática, houve a centrifugação da biomassa e a mesma foi ressuspensa em solução tampão citrato-fosfato pH 5,5, seguida da adição do substrato 1,4-fenilenodiacetonitrila (80mg). Aliquotas foram retiradas em intervalos de tempo de 72h, 96h e 120h e analisadas por GC-FID. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Biotransformação da 1,4-fenilenodiacetonitrila por células microbianas.

Micro-organismo	Tempo de reação	Produtos de biotransformação
MLH 08	72h	-
	96h	+
	120h	+
MLH 09	72h	-
	96h	-
	120h	-
MLH 10	72h	-
	96h	-

	120h	-
MLH 12	72h	-
	96h	-
	120h	-
MLH 15	72h	-
	96h	-
	120h	-
MLH 18	72h	-
	96h	-
	120h	-

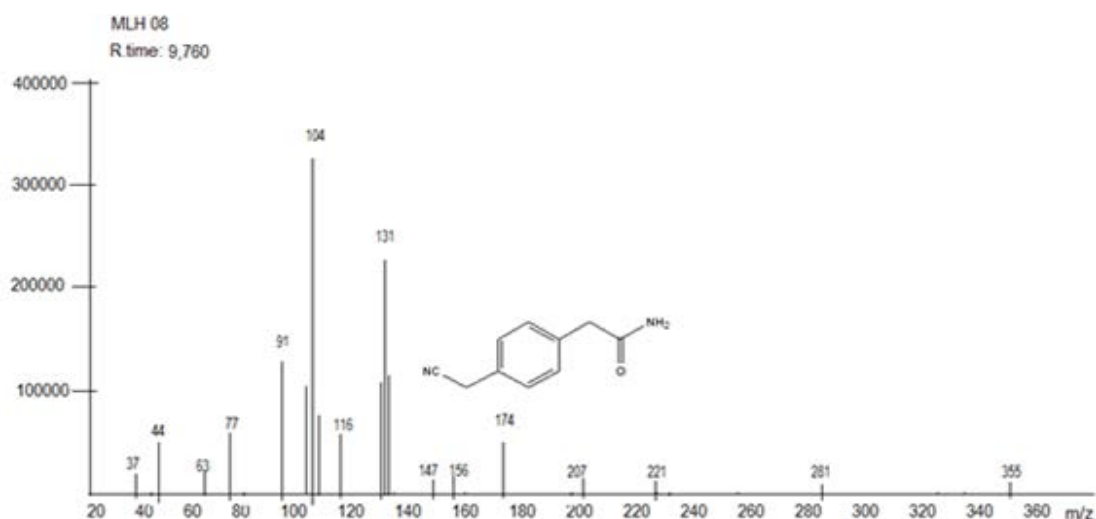
* tempo de incubação dos micro-organismos: 24h

* tempo de indução enzimática: 24h

Fonte: O autor.

Após a análise de todos os cromatogramas gerados pelo GC-FID, comparando-os com os experimentos controle de substrato e controle microbiano, verificou-se que o único micro-organismo que produziu algum possível produto de interesse, com tempo de retenção de 9,64 minutos, foi o MLH-08. Esta amostra foi submetida a análise por GC-MS (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) a fim de identificar este produto. A Figura 6 apresenta o espectro de massas deste produto com tempo de retenção de 9,64 minutos.

Figura 6: Espectro de massas (ionização por impacto de elétrons, 70 eV) do composto com tempo de retenção de 9,70 minutos produzido na reação como micro-organismo MLH-08.



Fonte: O autor.

O sinal de m/z 174 corresponde ao íon molecular (M^{++}) da amida correspondente à 1,4-fenilenodiacetonitrila. Os sinais m/z 207, 221, 281 e 355 são espécies de silício relativas ao sangramento da coluna. Este resultado sugere a ação de uma nitrila hidratase e formação de **2**, um dos produtos de interesse e resultante da dessimetrização do material de partida. Entretanto, a conversão de **1** em **2** foi de apenas 10% em 96 h de reação. O aumento do tempo reacional não resultou em aumento na produção de **2**.

Com os micro-organismos MLH-12 e MLH-15 observou-se que não houve a formação de produto algum – nem de degradação e nem dos produtos de interesse. Já os micro-organismos MLH-09, MLH-10 e MLH-18 houveram apenas a formação de produtos de degradação da dinitrila.

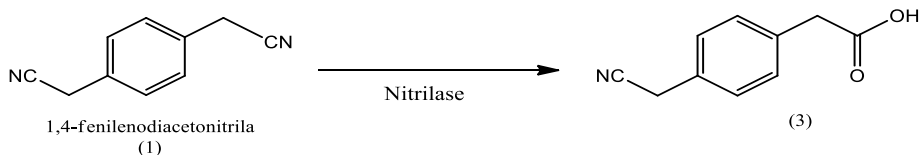
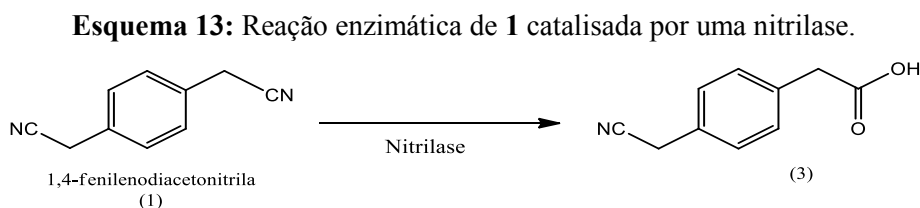
4.3.3. Reações catalisadas por enzimas comerciais

Em seguida iniciaram-se os estudos envolvendo a utilização das enzimas disponíveis comercialmente: nitrilases (Nases) e nitrila hidratases (NHases).

4.3.3.1 Reações catalisadas por nitrilase (Nase)

As enzimas nitrilases são utilizadas para converter diretamente nitrilas em ácidos carboxílicos, como apresentado no Esquema 4 (página 16). Estas enzimas dependem de alguns fatores que possam influenciar em sua atividade, como temperatura, pH, tipo de solventes, fontes de carbono e/ou nitrogênio e íons metálicos. (GONG, 2012).

Para realizar a reação com a enzima nitrilase comercial, representada no Esquema 13, utilizou-se uma solução tampão pH 7,2 e temperatura de 25°C, seguida da adição da dinitrila e da enzima, em microtubos tipo Eppendorf. Após incubação em Termomixer a 1000 rpm pelos períodos de 2h, 4h, 8h e 12h, realizou-se a extração do produto e a posterior análise em GC-FID.



Fonte: O autor.

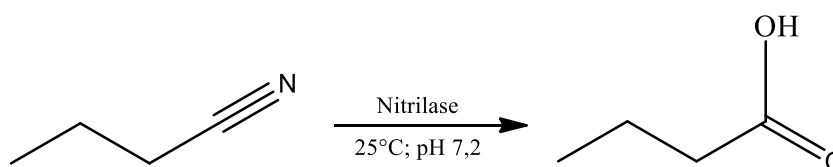
Os resultados desta análise mostraram que não houve a conversão da dinitrila no ácido carboxílico correspondente, como o esperado. Além disso, não houve a formação de nenhum outro produto.

Estes resultados negativos poderiam indicar duas possibilidades: (1) a enzima comercial estava inativa ou (2) esta enzima não apresenta especificidade para o substrato avaliado.

Assim realizou-se um teste para verificar se a nitrilase estava ativa perante a outro substrato. A nitrilase foi adicionada em um meio reacional com uma solução tampão fosfato pH 7,2 100mM, temperatura de 25°C, e butironitrila como substrato (Esquema 14).

Após trinta minutos de reação, em Termomixer, a solução aquosa foi extraída com acetato de etila e monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD). A cromatoplaça foi revelada comverde de bromocresol – um revelador seletivo para ácidos carboxílicos. Nesta cromatoplaça observou-se uma mancha com Rf de 0,62 e ficou amarela após revelada. Este resultado indica a presença de ácidos carboxílicos e permite concluir que a enzima estava ativa.

Esquema 14: Conversão da butironitrila em ácido carboxílico.



Fonte: O autor.

Assim, o resultado negativo obtido quando o substrato 1,4-fenilenodiacetonitrila foi utilizado nos leva a concluir que provavelmente a enzima não reconheceu este substrato e, portanto, não foi capaz de catalisar a reação. Uma segunda hipótese baseia-se na não ocorrência da catálise enzimática para o substrato 1,4-fenilenodiacetonitrila nas condições reacionais (pH e/ou temperatura) utilizadas no trabalho.

4.3.3.2 Reações catalisadas por nitrila hidratase (NHase)

As enzimas nitrilas hidratases são utilizadas para converter nitrilas em amidas, como apresentado no Esquema 6, página 17.

Neste estudo foram avaliadas 22 nitrila hidratases obtidas junto a empresa Prozomix. A Tabela 4 abaixo apresenta uma relação das enzimas utilizadas e algumas de suas características.

Tabela 4: Relação de nitrilas hidratases.

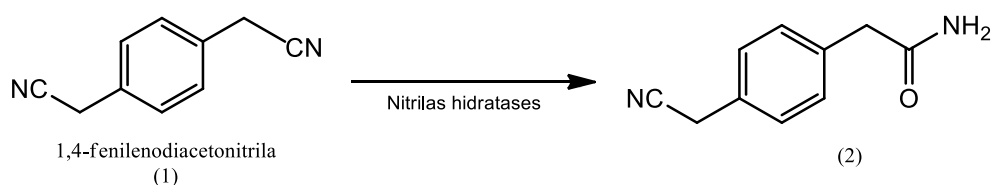
Enzimas	Cofator	Forma
NHase 001	Fe	Livre
NHase 002	Co	Livre
NHase 003	Co	Livre
NHase 004	Co	Livre
NHase 007	Co	Livre
NHase 008	Co	Livre
NHase 009	Fe	Livre
NHase 010	Co	Livre
NHase 011	Co	Livre
NHase 012	Fe	Livre
NHase 013	Co	Livre
NHase 014	Co	Livre
NHase 015	Co	Livre
NHase 016	Co	Livre
NHase 017	Co	Livre
NHase 018	Co	Livre
NHase E0256	Fe	Livre
NHase E0257	Co	Livre
NHase E0258	Co	Livre
NHase E0259	Co	Livre
NHclea 002	Co	Imobilizada
NHclea 003	Co	Imobilizada

Fonte: Prozomix – Recombinant enzymes and proteins.

Nas reações de biocatálise empregando as NHases utilizou-se uma solução tampão pH 7, enriquecida pela solução traço de Cobalto e Ferro, temperatura de 25°C, seguida da adição da dinitrila **1** e da enzima, em microtubos tipo Eppendorf. Após incubação em Termomixer a

1000 rpm pelo período de 8h, realizou-se a extração do produto e a posterior análise em CG-FID.

Esquema 15: Reação enzimática esperada.



Fonte: O autor.

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos com as 22 enzimas nitrilas hidratases avaliadas.

Tabela 5: Resultados da reação de conversão de **1** em **2** catalisada por nitrilas hidratases (NHases).

Enzimas	Cofator	Conversão de 1 em 2 (%)
NHase 001	Fe	100
NHase 002	Co	100
NHase 003	Co	-
NHase 004	Co	-
NHase 007	Co	100
NHase 008	Co	100
NHase 009	Fe	100
NHase 010	Co	0
NHase 011	Co	-
NHase 012	Fe	0
NHase 013	Co	-
NHase 014	Co	-
NHase 015	Co	-
NHase 016	Co	100
NHase 017	Fe	-
NHase 018	Co	-
NHase E0256	Co	69
NHase E0257	Co	86

NHase E0258	Co	-
NHase E0259	Co	42
NHclea 002	Co	0
NHclea 003	Co	91

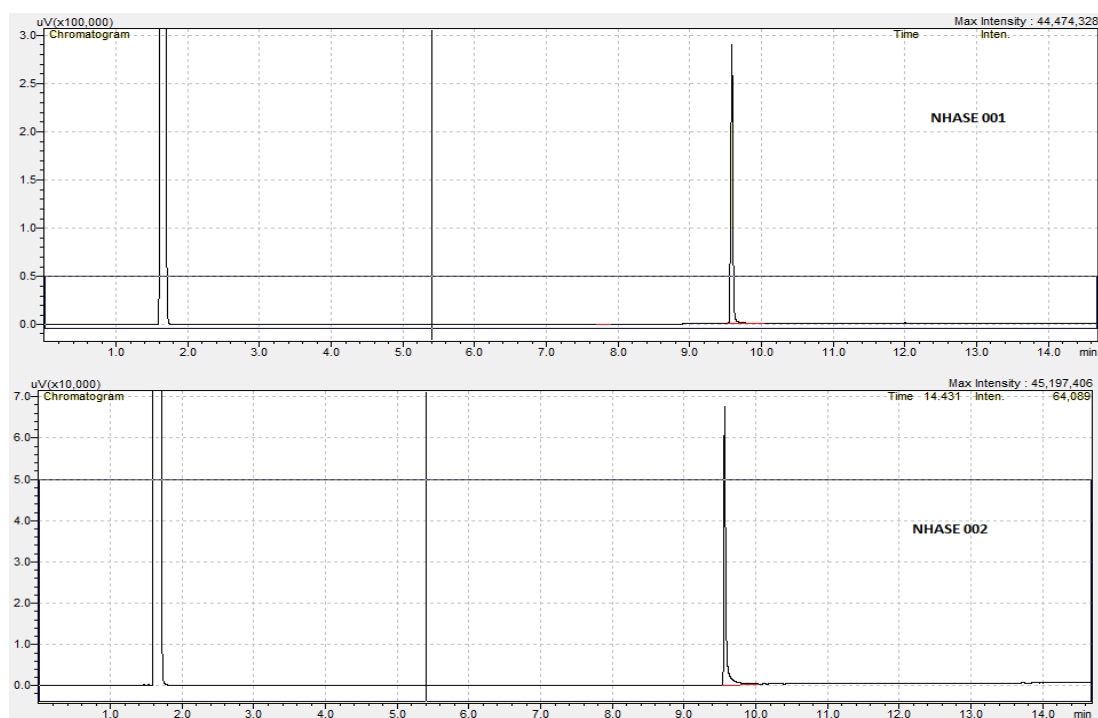
* tempo de reação: 8 horas

* o traço (-) correspondente a não formação de produto e nem do material de partida

Fonte: O autor

Geralmente, as nitrilas hidratases tipo Fe aceitam tanto substratos alifáticos quanto aromáticos com preferência pelos alifáticos, enquanto as NHase do tipo Co, possuem uma preferência pelos compostos aromáticos. (RZEZNICKA et al, 2009). Os nossos resultados indicam que não há uma correlação direta entre o cofator da NHase e a especificidade para a nitrila aromática (**1**). Tanto NHases dependentes de Fe quanto de Co foram capazes de converter 100% de **1** em **2**, como exemplificado pela NHase 001 e NHase 002, respectivamente (Figura 7). Assim como nenhuma conversão foi observada por NHases dependentes de Fe quanto de Co, conforme observado para as NHases 12 e 10, respectivamente.

Figura 7: Cromatogramas da conversão da dinitrila pela nitrila hidratase – NHase 001 (tipo Fe) e NHase 002 (tipo Co).



Fonte: O autor.

Também não foi possível tirar conclusões definitivas sobre a capacidade de conversão do substrato e a forma em que a enzima se encontrava, livre ou imobilizada. A nitrila hidratase imobilizadas NHclea 003 converteu o substrato no produto com uma taxa de 91% enquanto a NHclea 002 não foi capaz de converter **1** em **2**. Entretanto tratam-se de enzimas de fontes diferentes e, portanto, não é possível correlacionar diretamente a forma da enzima com sua capacidade de conversão. Para que isto fosse possível, teríamos que ter a mesma enzima livre e imobilizada.

Das 22 NHases avaliadas, observou-se 6 delas (NHases 001, 002, 007, 008, 009 e 16) foram capazes de converter 100% do material de partida na amida correspondente, enquanto que 09 NHases (003, 004, 11, 14, 15, 17, 18, E0258 e NHclea 003) não converteram a dinitrila (1,4-fenilenodiacetonitrila) em amida e houve recuperação do material de partida. Resultados de conversões intermediárias foram observadas para as NHases E0256, E0257, E0259 e NHclea 003. Esta diferença na capacidade de converter **1** em **2** está relacionada à fonte das enzimas. Como estas enzimas são obtidas de micro-organismos diferentes, é provável que foram produzidas isoformas de NHase com especificidade de substrato diferenciada.

No caso das NHases 003, 004, 011, 013, 014, 015, 017, 018 e E0258 os cromatogramas não indicaram a presença de material de partida ou de qualquer outro produto. Provavelmente ocorreu algum problema durante a etapa de extração.

5. CONCLUSÃO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi baseado na avaliação do potencial de biocatalisadores (células microbianas e enzimas isoladas) na dessimetrização da substância 1,4-fenilenodiacetonitrila (**1**), catalisada por nitrilases (Nases) e/ou nitrila hidratases (NHases), que daria origem a intermediário importantes na síntese de ingredientes farmacêuticos ativos.

Dos micro-organismos pertencentes à Coleção de Culturas Microbianas do Milagre Research Group avaliados, apenas aquele catalogado como MLH-08 foi capaz de converter a 1,4-fenilenodiacetonitrila (**1**) na correspondente amida. Entretanto a taxa de conversão foi de

apenas 10%, o que inviabiliza a utilização deste micro-organismo como um bom biocatalisador para a produção do composto desejado em maior escala.

A enzima comercial nitrilase utilizada neste trabalho não apresentou especificidade para o substrato desejado, apesar de ter se mostrado ativa para a butironitrila.

Em contrapartida, quando foram utilizadas as nitrila hidratases isoladas, foram obtidos resultados expressivos para 06 das enzimas avaliadas, que foram capazes de converter 100% do substrato na amida **2**. Estes resultados indicam um potencial catalítico destas enzimas para a conversão do substrato testado, em maior escala.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELINI, L. M. L.; SILVA, A. R. M.; ROCCO, L. F. C.; MILAGRE, C. D. F. A high-throughput screening assay for distinguishing nitrile hydratases from nitrilases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p.113-116, 2015.

BADLAND, M.; BURNS, M. P.; CARROLL, R. J.; HOWARD, R. M.; LAITY, D.; WYMER, N. J. Application of biocatalysis towards asymmetric reduction and hydrolytic desymmetrisation in the synthesis of a β -3 receptor agonist. **Green Chemistry**, v. 13, p. 2888-2894, 2011.

CHEN, J.; ZHENG, R.-C.; ZHENG, Y.-G.; SHEN, Y.-C. Microbial transformation of nitriles to high-value acids or amides. **Biotechnology in China**, v. 113, p. 33-77, 2009.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5s.gif02wyiv80z4s473v6o7sud.html. Acessado em 05 de julho de 2016.

GLASER, J. A. Biocatalyst greenness. **Clean Techn Environ Policy**, v. 16, p. 991-999, 2014.

GONG, J.; LU, Z.; LI, H.; SHI, J.; ZHOU, Z.; XU, Z. Nitrilases in nitrile biocatalysis: recent progress and forthcoming research. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 142-160, 2012.

KAYANUMA, M.; SHOJI, M.; YOHDA, M.; ODAKA, M.; SHIGETA, Y. Catalytic mechanism of nitrile hydratase subsequent to cyclic intermediate formation: A QM/MM Study. **The journal of Physical Chemistry B**, v. 120, p. 3259-3266, 2016.

LIN, G. Q.; ZHANG, J. C.; CHENG, J. F. Overview of chirality and chiral drugs. **Chiral drugs: chemistry and biological action**. Hoboken: John Wiley & Sons. Chap. 1, p. 3-28, 2011.

Lonza Company: Pharma & Biotech. Disponível em: <http://www.lonza.com/about-lonza/mediacenter/news/2010/lonza-selects-nansha-china-for-its-new-plant-for-vitamin-b3-nicotinates.aspx>. Acessado em 20 de setembro de 2016.

MARTÍNKOVÁ, L.; KREN, V. Biotransformations with nitrilases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, p. 130-137, 2010.

NERI, C.; WILLIAMS, J. M. J. New Routes to Chiral Evans Auxiliaries by Enzymatic Desymmetrisation and Resolution Strategies. **Advanced Synthesis & Catalysis**. v. 345, p. 835-848, 2003.

NERI, C.; WILLIAMS, J. M. J. Preparation of 2-oxazolidinones by enzymatic desymmetrisation. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 13, p. 2197-2199, 2002.

PATEL, R. N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. **Chiral catalysis**, v. 252, p. 659-701, 2008.

PEARSE, B. Coated vesicles. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 5, p. 131-134, 1980.

POLLARD, D. J.; WOODLEY, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. **Trends in Biotechnology**, v. 25, p. 66-73, 2006.

RUCKÁ, L.; VOLKOVA, O.; PAVLÍK, A.; KAPLAN, O.; KRACÍK, M.; NESVERA, J.; MARTÍNKOVÁ, L.; PÁTEK, M. Expression control of nitrile hydratase and amidase genes in *Rhodococcus erythropolis* and substrate specificities of the enzymes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 1179–1190, 2014.

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 characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1417-1425, 2009.

SABATINI, D. D.; ROBERTIS, E. D. P.; BLEICHMAR, H. B. Submicroscopic Study of the Pituitary Action on the Adrenocortex of the Rat. **Journal Endocrine Society**, v. 70, 1962.

Sigma-Aldrich – Especificação do produto 1,4-fenilenodiacetonitrila. Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/P2/P23806/P23806-BULK_____ALDRICH_.pdf. Acessado em 06 de julho de 2015.

TORRELO, G.; HANEFELD, U.; HOLLMANN, F. Biocatalysis. **Catalysis letters**, v.145, p. 309-345, 2014.

WANG, M. X.; LI, C. S.; LI, J. S. Enzymatic desymmetrization of 3-alkyl- and 3-arylglutaronitriles, a simple and convenient approach to optically active 4-amino-3-phenylbutanoic acids. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 12, p. 3367–337, 2002.

WILLIS, M. C. Enantioselective desymmetrisation. **Journal of the Chemistry Society, Perkin Transaction**, v. 1, p. 1765–1784, 1999.

WOODLYEY, J. M. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. **Trends in Biotechnology**, v. 26, p. 321-327, 2008.

WU, L.; VOGT, F. G. A review of recent advances in mass spectrometric methods for gas-phase chiral analysis of pharmaceutical and biological compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 133-147, 2012.

DADOS FINAIS

Araraquara, 11 de janeiro de 2017.

Fernanda Aragão Coyado
(Graduanda)

De acordo,

Cintia Duarte de Freitas Milagre
(Orientadora)

Humberto Márcio Santos Milagre
(Co-orientador)