

ÉVERTON ALVES TORDATO

CASCATAS MULTIENZIMÁTICAS APLICADAS NA SÍNTESE
ESTEREOSELETIVA DE β -HIDROXIAMIDAS

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

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

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTOR: EVERTON ALVES TORDATO

ORIENTADORA: CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

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



Prof^a. Dr^a. CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. RAFAEL MAFRA DE PAULA DIAS

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. PAULO JOSÉ SAMENHO MORAN

Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 28 de novembro de 2018

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Éverton Alves Tordato

Nome em citações bibliográficas: TORDATO, É. A.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

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

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

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

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos submetidos para publicação

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

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

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

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

Apresentações de trabalho e/ou palestra

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

Estágios e Bolsas Auxílio

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

Participação em eventos

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

Organização de eventos

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

Minicursos ministrados

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

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

À CAPES pela manutenção do Portal de Periódicos.

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

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

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

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

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

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

À Dr^a Bianca pela análise no LC-MS.

EPÍGRAFE

“Pior que não terminar uma viagem é nunca partir”

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

Amyr Klink - Mar sem Fim, fevereiro de 2000

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

Key words: cascade reactions, β -hydroxyamide, stereoselectivity

LISTA DE FIGURAS

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ESQUEMAS

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

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

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

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

DMSO – Dimetilsulfóxido

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

ee - excesso enantiomérico

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

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

GDH - *Glucose Dehydrogenase* (Glicose desidrogenase)

IPA – *Isopropyl alcohol* (Álcool isopropílico)

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

IV - Infravermelho

J - Constante de acoplamento

KRED - *Ketoreductases* (Cetorredutases)

m/z - razão massa carga

NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NB - *Nutrient Broth* (Meio Nutriente)

NHases - Nitrila Hidratases

PLP - Piridoxal-5-fosfato

PMP - Piridoxamina-5-fosfato

ppm - partes por milhão

q.s.p. - quantidade suficiente para

RMN de ^1H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

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

rpm – rotação por minuto

t.a. - temperatura ambiente

TMS - Tetrametilsilano

ω -TA - ω -transaminase

Sumário

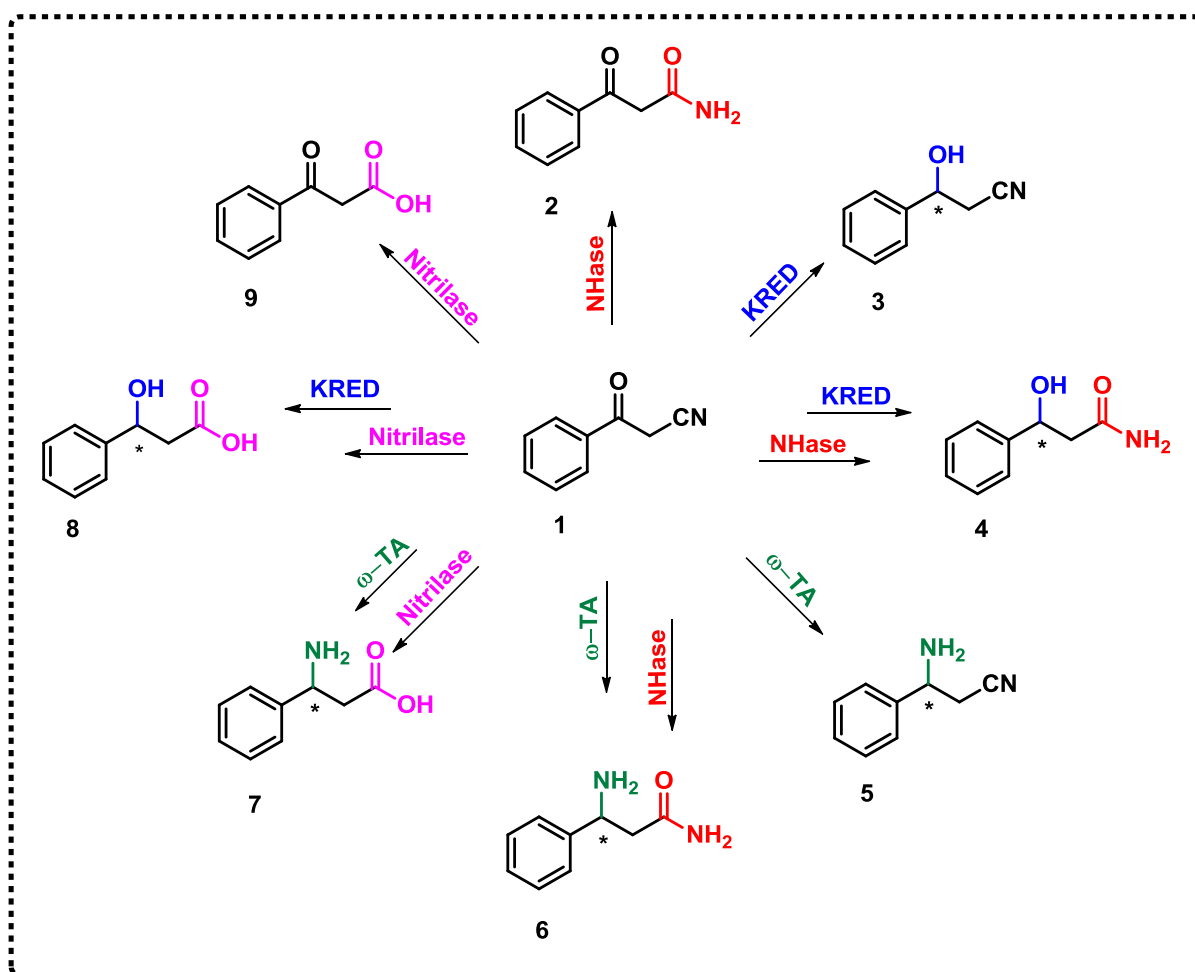
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Nitrila Hidratase (NHase)	23
1.2. ω -Transaminases (ω -TA).....	26
1.3. Cetorredutase (KRED)	28
2. OBJETIVOS	31
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	32
3.1. Considerações Gerais.....	32
3.1.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^1H e ^{13}C)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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

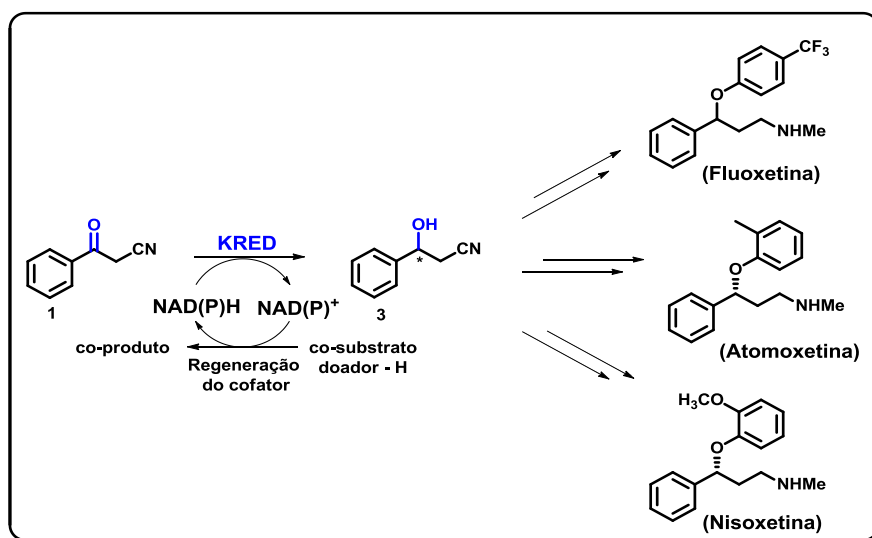


Fonte: Autor, 2018

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

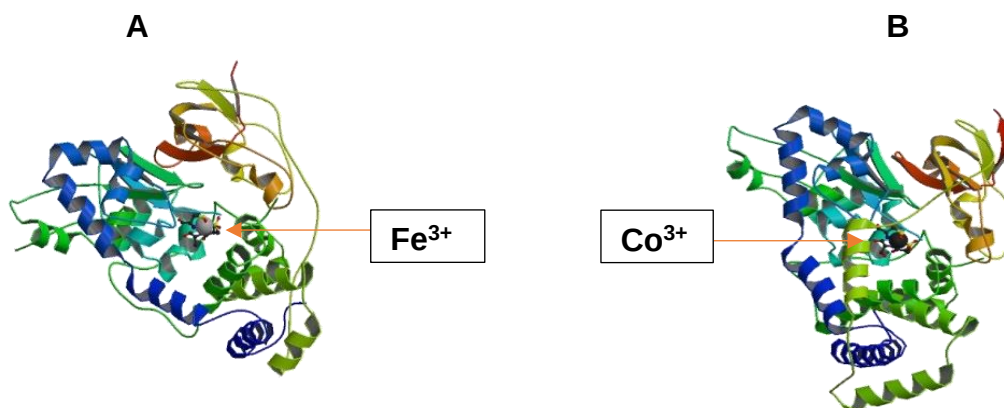
Sabendo que os blocos construtores ácido 3-amino-3-fenilpropanóico^{49;50} (**7**) e ácido 3-hidroxi-3-fenilpropanóico⁵¹ (**8**) já foram obtidos via reações em cascata multienzimáticas utilizando as enzimas ω -TA/nitrilase e KRED/ ω -TA, respectivamente, partindo do substrato **1**, torna-se de grande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

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

1.1. Nitrila Hidratase (NHase)

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

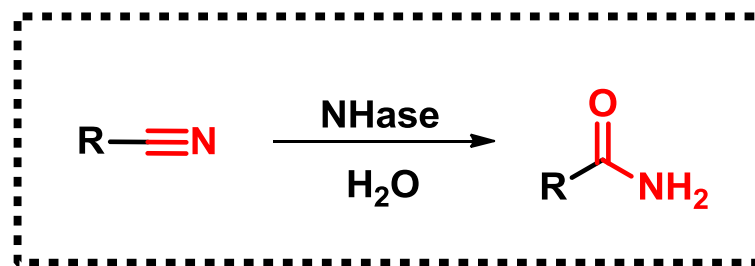
Figura 1: Representação estrutural de NHases dependentes de ferro (A) e cobalto (B)



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

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

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

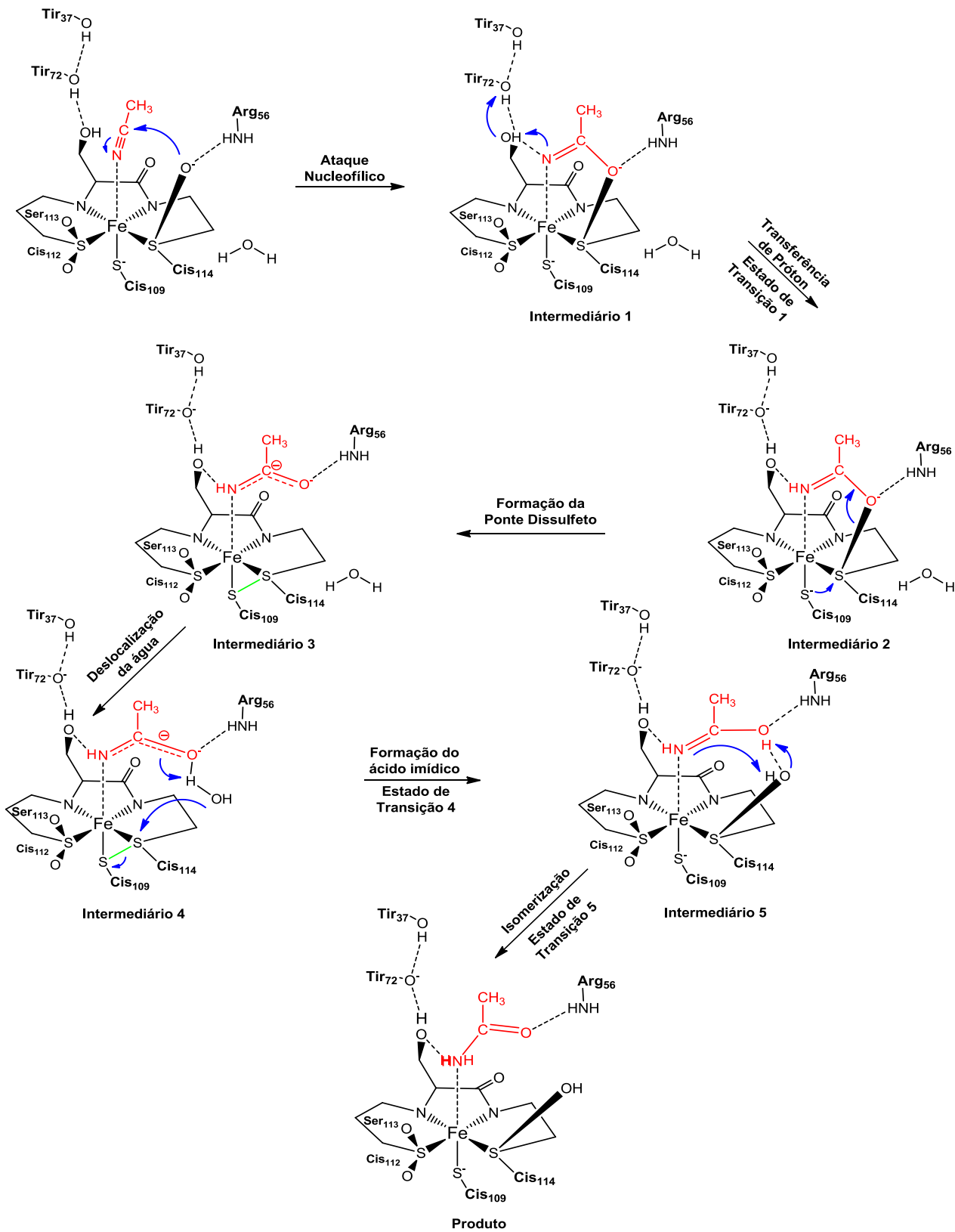


Fonte: (MASCHARAK, P. K.; 2013)⁵²

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

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

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



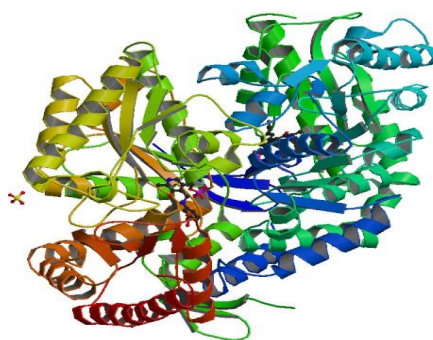
Fonte: Adaptado de (KAYANUMA et al, 2016)⁵⁴

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

1.2. ω -Transaminases (ω -TA)

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

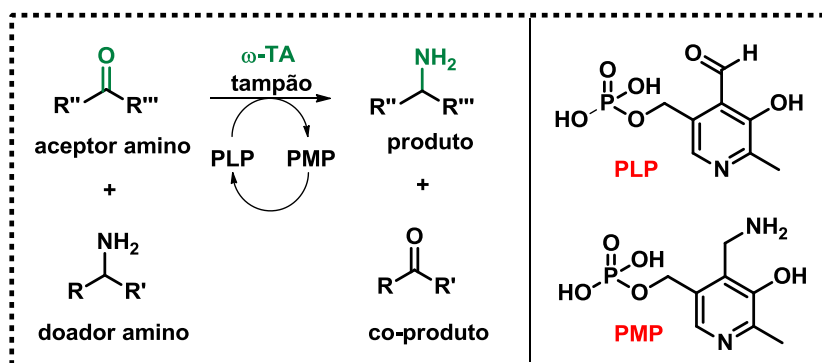
Figura 2: Representação estrutural de uma ω –transaminase



Fonte: Protein Data Bank (estrutura 4BA5)

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

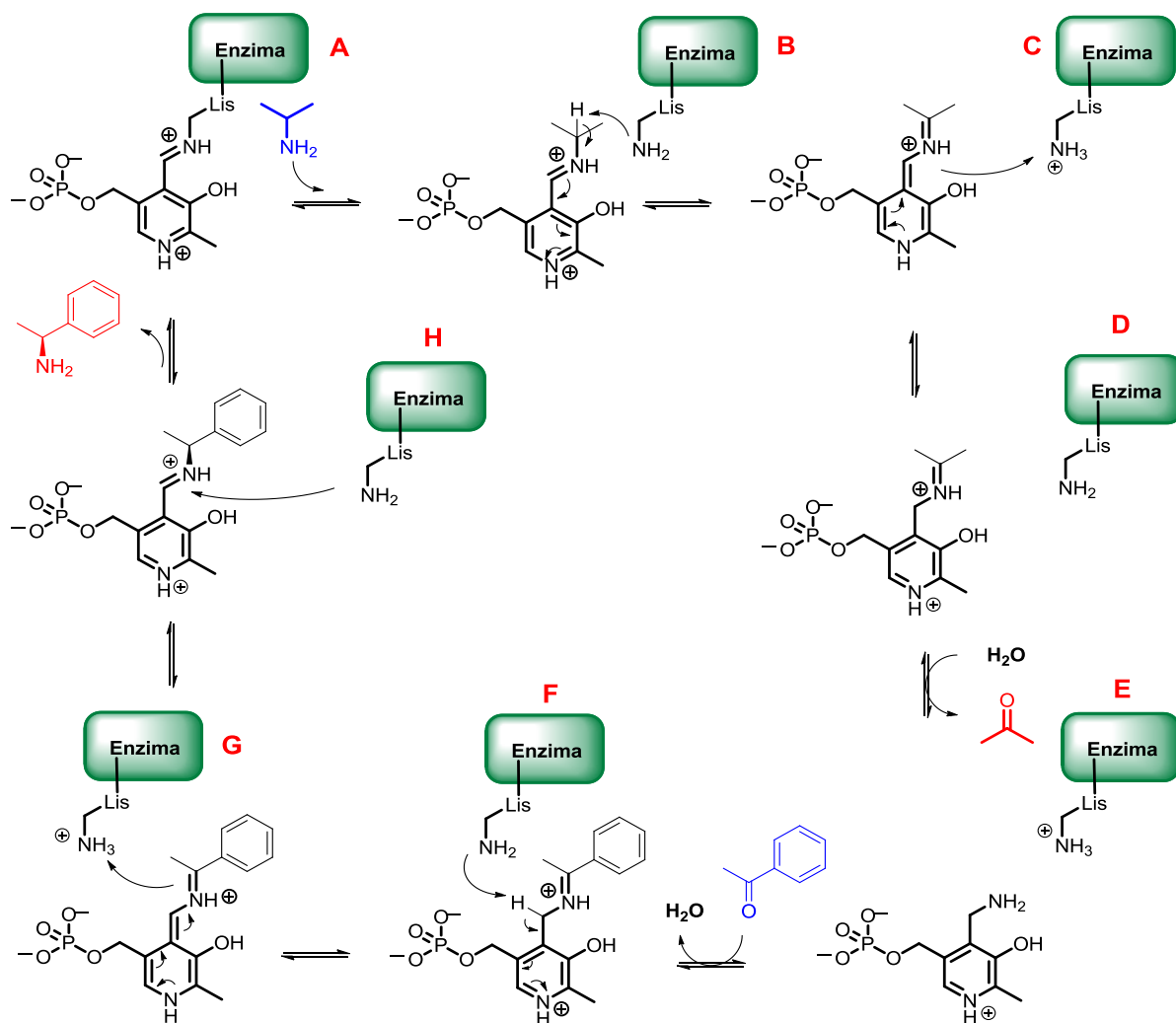
Esquema 5: Reação geral para obtenção de aminas primárias a partir de carbonilas de cetonas ou aldeídos



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

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

Esquema 6: Proposta mecanística para a aminação reductiva da carbonila

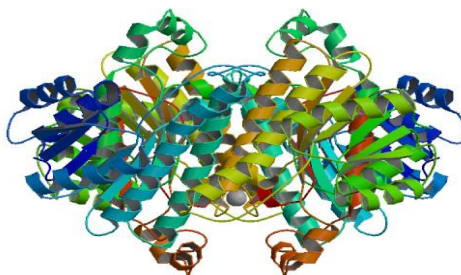


Fonte: Adaptado de (BERGLUND, P.; HUMBLE, M. S.; BRANNEBY, C.; 2012)⁵⁸

1.3. Cetorreductase (KRED)

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

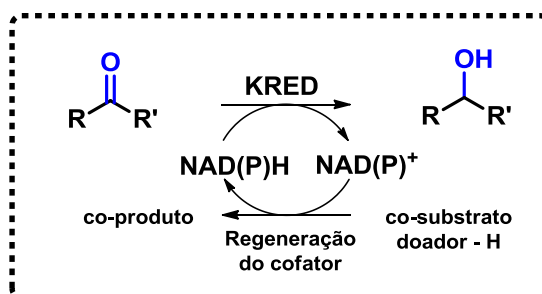
Figura 3: Representação estrutural de uma cetorredutase



Fonte: Protein Data Bank (estrutura 4RF4)

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

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

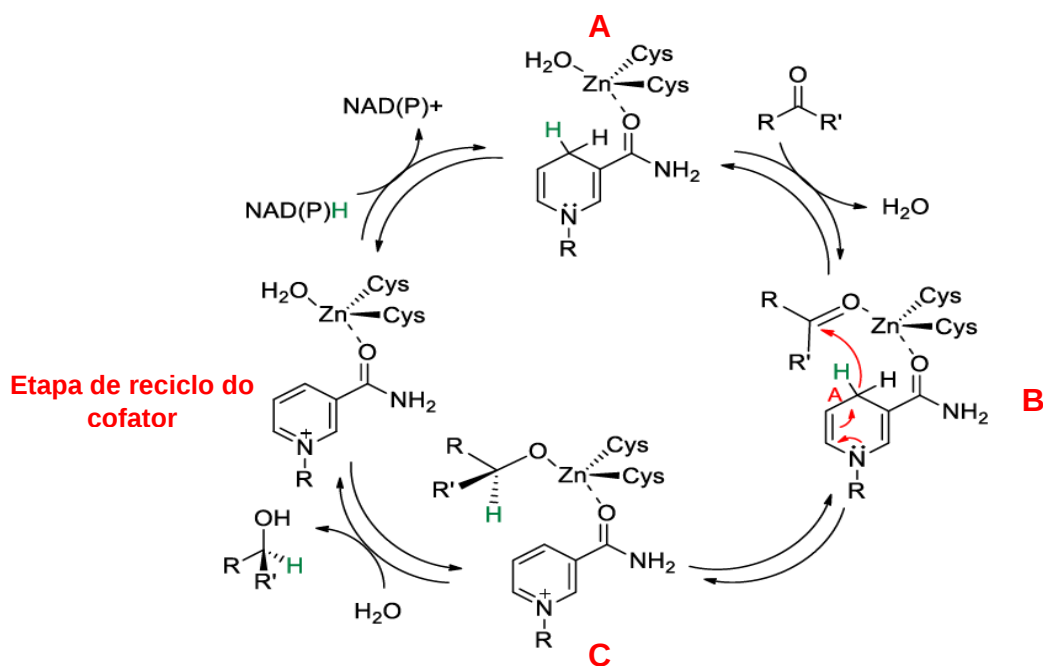


Fonte: Adaptado de (BROUSSY; CHELOHA; BERKOWITZ, 2009)⁵⁹

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

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

Esquema 8: Proposta mecanística para a redução carbonila

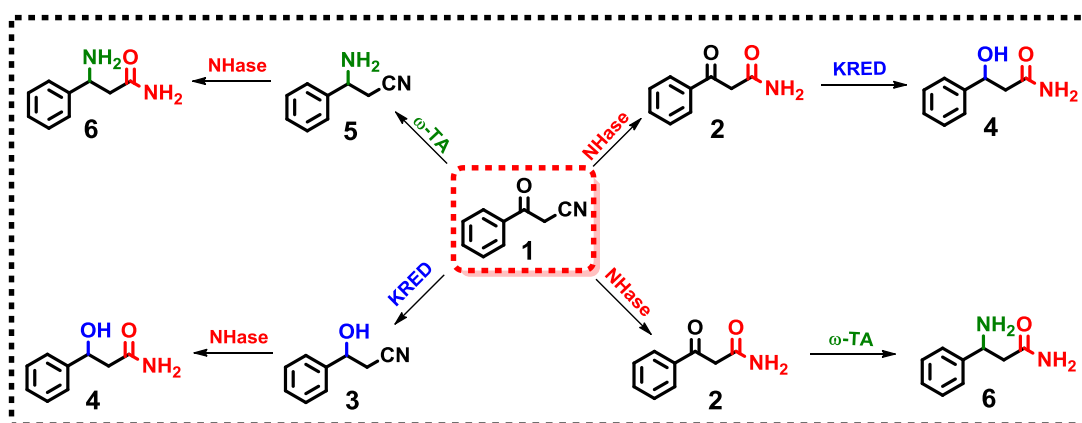


Fonte: Adaptado de (HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E.; HOLTSMANN, D.; 2011)⁶⁰

2. OBJETIVOS

- Avaliar o potencial catalítico das enzimas NHase, ω -TA e KRED frente aos substratos de interesse deste projeto para futuramente explorar um escopo maior de substratos;
- Obter de forma enantiosseletiva os compostos 3-hidroxi-3-fenilpropanamida (**4**) e 3-amino-3-fenilpropanamida (**6**) utilizando reações em cascata multienzimáticas utilizando as enzimas KRED/NHase e ω -TA/NHase, respectivamente (Esquema 9), a partir de reações de redução/hidratação do substrato benzoiacetonitrila (**1**).

Esquema 9: Possibilidades de reações em cascata multienzimáticas visando a obtenção dos blocos construtores **4** e **6**



Fonte: Autor, 2018

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Considerações Gerais

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

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram registrados no espectrômetro Bruker Fourier 300 (B_0 7,05 T) na frequência de 300,19 MHz para o núcleo de hidrogênio e 75,5 MHz para o núcleo de carbono. As análises de RMN foram realizadas no Instituto de Química de Araraquara (IQAr/UNESP).

Os sinais de deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como padrão interno tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$) e padrão externo CDCl_3 ($\delta = 7,26$) e os sinais de deslocamentos químicos de carbono foram registrados em ppm, utilizando como referência externa CDCl_3 ($\delta = 77,0$). Para os deslocamentos químicos de hidrogênio de $\text{CD}_3\text{OD}-d^4$ foram registrados em 3,30 e 4,78 ppm e para carbono 49,0 ppm. Para os deslocamentos químicos de hidrogênio de $\text{DMSO}-d^6$ foi registrado em 2,49 ppm e para carbono 39,7 ppm.

As constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz) e os sinais foram caracterizados como: duplete (d), duplo duplete (dd), duplo duplete duplo (ddd), tripleto (t), multiplete (m), simpleto (s), simpleto largo (sl). As interpretações dos espectros de RMN de ^{13}C foram realizadas com auxílio da técnica DEPT135° (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*), sendo CH_3/CH = sinal positivo (+), CH_2 = sinal negativo (-) e C_0 = carbono quaternário (intensidade nula).

3.1.2. Métodos Cromatográficos

As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) para monitoramento das reações foram realizadas utilizando-se de cromatoplasas de sílica gel 60 Macherey Nagel com indicador fluorescente UV_{254} (20 x 20 cm) sobre suporte de alumínio. A revelação dos compostos nas cromatoplasas foi feita com auxílio do espectrofotômetro Solab com irradiação no ultravioleta com comprimento de onda (λ) de 254 e 364 nm e pulverização com *p*-anisaldeído e subsequente aquecimento a 300 °C com soprador térmico.

As placas cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas com sílica gel Kiesegel DF Riedel-deHaën com 0,75 mm de espessura sobre placa de vidro (20 x 20 cm).

Na purificação do composto 3-amino-3-fenilacrilonitrila por DSC (cromatografia *flash* em sílica seca) utilizou-se sílica gel 230-400 mesh da marca Macherey Nagel com gradiente de eluição em heptano/acetato de etila.

As análises por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Detector de Ionização de Chama (GC-FID) foram realizadas no Milagre Lab, utilizando-se o cromatógrafo gasoso Shimadzu – Modelo GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC – 20i e acoplado a um detector de ionização de chama. Para as análises de rotina utilizou-se coluna capilar de sílica fundida Restek RTX®-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano) coluna **A**. O cromatógrafo operou com fluxo constante de gás H₂ de 1,17 – 1,22 mL/min, com temperatura no injetor de 260 °C e no detector de 280 °C. As programações de temperatura utilizada estão descritas na Tabela 1. O volume de injeção das amostras foi de 1 µL na concentração de 0,5 – 1,0 mg/mL no modo *Split* (100:1)

As análises por GC-FID com coluna quiral para determinação dos excessos enantioméricos (*ee*) dos compostos foram realizadas utilizando-se a coluna Hydrodex® β-3P (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (coluna **B**) e Lipodex® E (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (coluna **C**) ambas da marca Macherey Nagel. O volume das injeções para ambas as colunas quirais foram de 1 µL na concentração de 0,5 – 1,0 mg/mL no modo *split* (100:1). As programações de temperatura utilizadas são descritas na Tabela 1. Os valores de conversão e excesso enantiomérico (*ee*) foram calculados pelas análises em CG-DIC baseando-se nas áreas dos compostos, segundo as equações abaixo:

$$\text{conv.(\%)} = (A_{\text{produto}} / A_{\text{substrato}} + A_{\text{produto}}) \times 100\%$$

$$\text{ee(\%)} = (A_{\text{maior}} - A_{\text{menor}}) / (A_{\text{maior}} + A_{\text{menor}}) \times 100\%$$

As análises por GC-MS foram realizadas no Laboratório Multiusuário I de Análises Químicas do Instituto de Química de Araraquara (IQAr/UNESP), utilizando-se um cromatógrafo gasoso Agilent - Modelo 7890B acoplado a um espectrômetro de massas – Modelo 5977A cuja fonte de ionização por elétrons opera com energia de ionização de 70 eV. O espectrômetro de massas operou na faixa de *m/z* 45-500. Para o GC-MS foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% fenil-metilsiloxano). O cromatógrafo operou com fluxo constante de gás

He de 1 mL/min, temperatura no injetor de 260 °C e de interface de 280 °C. As injeções das amostras foram de 1 µL na concentração de 0,5 – 1,0 mg/mL. A programação da temperatura para as análises é a mesma utilizada nas análises de rotina com a coluna Restek RTX®-5, isto é, os três métodos descritos para a coluna A.

Tabela 1: Programação da temperatura para a coluna A, B e C.

Coluna	Programação da temperatura			Tempo total da programação (min)	Composto	Tempo de retenção (min)	
	Taxa de Aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)				
A	-	80	2	13,67	1	6,5	
					2	4,4	
	30	280	5		Intermediário de rac-5	7,2	
					rac-4	7,7	
				rac-6	7,6		
A	-	100	0	30,10	1 rac-5	12,3	
	3	148	2			11,7	
	2	156	0				
	40	280	5				
A	-	100	3	25,50	1 rac-3	16,6	
	2	130	0			16,8	
	60	280	5				
B	Isoterma 180 °C por 45 minutos			45,00	6	34,0 35,4	
C	-	155	5	30,50	(S)-3 (R)-3	18,5	
	1	165	0			19,2	
	30	180	15				
C	-	170	2	32,00	(R)-4	28,6	
	2	180	25		(S)-4	29,3	
C	-	155	5	25,50	5	11,7	
	1	165	0			12,5	
	30	180	10				

3.1.3. Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrômetro Bruker modelo Vertex 70 com transformada de Fourier, absorvendo na região 400 a 4000 cm^{-1} por meio de reflexão total atenuada em cristal diamante (ATR).

3.1.4. Ponto de Fusão

As medidas de ponto de fusão foram realizadas em um equipamento MQAPF-302 Microquímica equipamentos Ltda.

3.1.5. Enzimas, Plasmídeos e Microrganismos

O kit comercial de NHase foi adquirido junto a empresa Prozomix®. As enzimas ω -TA comerciais foram adquiridas junto a empresa Sigma-Aldrich® e são pertencentes aos seguintes microrganismos: *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* e *Neosartorya fischeri*. Cinco plasmídeos contendo genes sintéticos de linhagens selvagens de ω -TA também foram utilizados e foram fornecidos pelo Prof. Dr. Uwe Bornscheuer do Departamento de Biotecnologia e Catalise Enzimática do Instituto de Bioquímica da Universidade de Greifswald – Alemanha. A manutenção dos plasmídeos foi realizada pela MSc. Iris dos Santos Teixeira, deste grupo de pesquisa. Os plasmídeos que codificam ω -TA (*R*)-seletivas são provenientes dos microrganismos *A. terreus* e *Mycobacterium vanbaalenii* e os que codificam ω -TA (*S*)-seletivas são provenientes dos microrganismos *Chromobacterium violaceum*, *Ruegeria pomeroyi* e *Vibrio fluvialis* JS17. Os microrganismos utilizados contendo KRED são: *Bacillus cereus*, *Lysinibacillus boronitolerans* e MLH 15 e são provenientes da coleção de microrganismos do Milagre Research Group. Além destes, também foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* do tipo II adquirida junto a empresa Sigma-Aldrich®. As enzimas isoladas de KRED são provenientes de horse liver, *S. cerevisiae* e recombinante e também foram adquiridas junto a empresa Sigma-Aldrich®.

3.1.6. Reagentes e Solventes

Os solventes, reagentes e o substrato benzoilacetonitrila foram adquiridos junto a empresa Sigma-Aldrich®(Merck)

3.1.7. Meio de Cultura

O meio de cultivo utilizado foi o Nutrient Broth (NB) adquirido junto à empresa Acumedia.

3.1.8. Solução Tampão

Utilizou-se solução tampão fosfato (PBS) pH 7; 100 mM; 39 mL NaH_2PO_4 (0,2M) e 61 mL Na_2HPO_4 (0,2M); q.s.p. 100 mL; com adição de 5 g de D-glicose

3.1.9. Esterilização

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave da marca Phoenix Lufferco a 121 °C e 1,0 Kgf/cm² por 15 minutos e para o descarte dos microrganismos por 45 minutos.

3.1.10. Manipulação dos microrganismos

O repique dos microrganismos, as transferências de células e retirada de alíquotas para monitoramento de reações foi realizado no fluxo vertical previamente esterilizado com EtOH 70% e luz UV por 15 minutos.

3.1.11. Experimentos com microrganismos

Os experimentos com microrganismos foram realizados em incubadora refrigerada com agitação orbital da marca Tecnal, a 115 rpm e 28 °C.

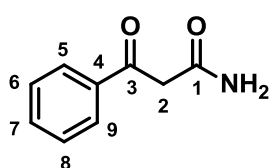
3.1.12. Outros

A síntese do composto 3-amino-3-fenilacrilonitrila foi realizada sob atmosfera de N_2 , vidraria pré-seca em estufa por 12 horas e, posteriormente, em soprador térmico e armazenada no dessecador para resfriamento. A peneira molecular 4 Å foi ativada na mufla a 400 °C por 4 horas, sendo posteriormente armazenada no dessecador.

3.2. Metodologias para as Sínteses e Dados Espectroscópicos dos Compostos

3.2.1. Síntese do composto 3-oxo-3-fenilpropanamida (**2**)⁶¹

Em um balão de fundo redondo de 25,0 mL, adicionou-se **1** (145 mg; 1 mmol) e CH₂Cl₂ anidro (4,0 mL; 5,32 g; 63 mmol). Após completa solubilização do substrato **1**, gotejou-se H₂SO₄ 98% (1,7 mL; 3,128 g; 32 mmol) sob agitação magnética suave em temperatura ambiente. Em seguida, a solução reacional foi mantida sob agitação magnética vigorosa em temperatura ambiente por 6 horas. Logo após, foi neutralizada com NaOH 10 M a 0 °C e extraída com AcOEt (3 x 10 mL) (30 mL; 27,06 g; 307 mmol). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl_(aq)). Adicionou-se à fase orgânica MgSO₄ anidro e procedeu-se à filtração por gravidade, utilizando papel de filtro pregueado. O produto bruto foi purificado por CCDP (eluente: heptano/AcOEt 3:7). Nessas condições, o R_f encontrado foi: **1** = 0,78 e **2** = 0,26. Após purificação, obteve-se um rendimento de 40 %. O produto apresentou-se como um sólido amorfo de cor bege claro. A faixa de fusão foi igual 109-111 °C.

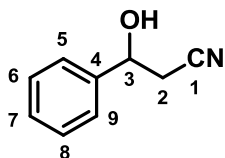


3-oxo-3-fenilpropanamida (**2**). **FM**: C₉H₉NO₂. **MM**: 163 g·mol⁻¹; sólido bege claro; GC-FID: t_R = 4.4 min (Restek®); **EM** (IE, 70 eV) *m/z* (abundância relativa %): 120 (35), 105 (100) e 77 (65) **IV** – (ν max) (cm⁻¹) 3419, 3187, 1675, 1632; **RMN de ¹H** – (300,19 MHz, CDCl₃) δ 3,99 (s, 2H, H2), 5,71 (sl, 1NH), 7,17 (sl, 1NH), 7,38 – 7,56 (m, 3H, H6, H7e H8), 7,96 -8,05 (m, 2H, H4 e H9); (enol, CDCl₃): 5,57 (s, 1H, H2), 14,24 (s, 1H, OH); **RMN de ¹³C** – (75,5 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 45,0 (CH₂, C2), 128,6; 128,9 (CH, C5, C6, C7 e C8), 134,2 (CH, C9), 136,1 (C_O, C4), 168,1 (C_O, C1), 195,7 (C_O, C3)

3.2.2. Síntese do composto *rac*-3-hidroxi-3-fenilpropanonitrila (*rac*-**3**)^{14;64}

Em um balão de 25 mL, adicionou-se **1** (73 mg; 0,5 mmol) e EtOH grau HPLC (5 mL; 3,945 g; 86 mmol) a 0 °C. Após completa solubilização de **1**, adicionou-se em uma única porção NaBH₄ (62,4 mg; 1,65 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética vagarosa com retorno gradual a temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi monitorada por CCD, utilizando como fase móvel CH₂Cl₂/n-hexano/AcOEt (4:1:1). Nessas condições, o R_f encontrado foi: **1** = 0,78 e *rac*-**3** = 0,60. O solvente da reação foi evaporado no rotaevaporador sob pressão reduzida e o resíduo contido no balão suspenso com 5,0 mL de H₂O destilada pH 5-6. A fase

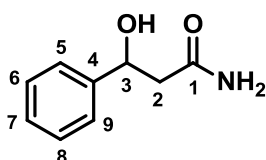
aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 15 mL) (45 mL = 40,59 g; 461 mmol). As fases orgânicas foram combinadas e secas sob MgSO₄ anidro, filtradas por gravidade com papel de filtro pregueado e evaporadas em rotaevaporador, fornecendo um óleo viscoso de cor amarela. Obteve-se conversão >99% e rendimento de 84%.



rac-3-hidroxi-3-fenilpropanonitrila (***rac*-3**). **FM**: C₉H₉NO; **MM**: 147 g·mol⁻¹; óleo viscoso amarelo; GC-FID: t_R = 16.8 min (Restek®); t_R(*R*) = 19.2 min e t_R(*S*) = 18.5 min (Lipodex E.); [α]_D²¹ = -27,7 **EM** (IE, 70 eV) *m/z* (abundância relativa %) **EM - *m/z*** (%): 147 (8), 129 (8), 107 (100), 105 (26) 79 (86), 77 (72), 51 (27); **IV** – (ν max (cm⁻¹); 3421, 2254, 3066, 3033, 2984, 2935, 206, 1636; **RMN de ¹H** – (300,19 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2,47 (d, J = 3,3 Hz, 1H, OH), 2,77 (d, J = 6,2 Hz, 2H, H₂), (m, J = 3,3 e 6,2 Hz, 1H, H₃), 7,31 – 7,39 (m, 5H, H₅, H₆, H₇, H₈ e H-9); **RMN de ¹³C** – (75,5 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 27,9 (CH₂, C₂), 70,2 (CH, C₃), 117,2 (CN, C₁), 125,5 (CH, C₅ e C₉), 128,9 (CH, C₆ e C₈), 129,0 (CH, C₇), 140,9 (C₀, C₄)

3.2.3. Síntese do composto *rac*-3-hidroxi-3-fenilpropanamida (***rac*-4**)⁸

Em um balão de 5 mL, adicionou-se ***rac*-3** (85 mg; 0,578 mmol) e DMSO (580 μL; 638 mg; 8 mmol). Após completa solubilização de ***rac*-3**, adicionou-se H₂O₂ 35% (190 μL; 275 mg; 8 mmol) e K₂CO₃ (23,8 mg; 0,172 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 6 horas. Logo após, adicionou-se 1,0 mL de H₂O destilada e procedeu-se a extração com AcOEt (3 x 2,0 mL) (6 mL; 5,412 g; 61 mmol). Obteve-se conversão >99% e rendimento bruto acima do teórico, devido à um óleo amarelo extraído junto com produto. O produto bruto foi purificado por CCDP utilizando como fase móvel AcOEt 100%. O R_f de ***rac*-4** foi de 0,23. Após purificação, o rendimento foi de 14% e o produto se apresentou como um sólido branco com faixa de fusão de 120-121 °C.



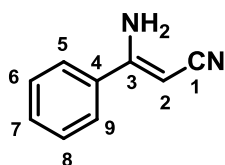
rac-3-hidroxi-3-fenilpropanamida (***rac*-4**). **FM**: C₉H₁₁NO₂; **MM**: 165 g·mol⁻¹; sólido branco; GC-FID: t_R = 7.7 min (Restek®); t_R(*R*) = 28.6 min e t_R(*S*) = 29.2 min (Lipodex E.); [α]_D²¹ = -49,7 **EM** (IE, 70 eV) *m/z* (abundância relativa %): 51 (42), 59 (95), 63 (7), 77 (100), 91 (10), 105 (61), 120 (20), 131 (29), 146 (69), 165 (31); **IV** – (ν max (cm⁻¹); 3378, 3301, 3176, 3057, 3032, 2919, 2852, 1620; **RMN de ¹H** – (300,19 MHz, CD₃OD-d⁴) δ (ppm): 1,29 (s, 1H, OH), 2,47 – 2,69 (ddd, J = 4,8, 8,7 e 14,4 Hz, 2H H₂), 5,00 (dd, J = 4,8 e 8,7 Hz, 1H, H₃), 7,21 – 7,43 (m, 5H, H₅, H₆, H₇,

H8 e H9); **RMN de ^{13}C** – (75,5 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d^4$) δ (ppm): 44,6 (CH_2 , C2), 70,5 (CH, C3), 125,4 (CH, C5 e C9), 127,1 (CH, C6 e C8), 127,9 (CH, C7), 143,9 (C_0 , C4), 175,0 (C_0 , C1)

3.2.4. Síntese do composto *rac*-3-amino-3-fenilpropanonitrila (*rac*-5)

Primeira etapa:⁶⁷ Formação do intermediário 3-amino-3-fenilacrilonitrila

Em um balão de fundo redondo de duas bocas de 25,0 mL, adicionou-se **1** (145 mg; 1 mmol) e NH_4OAc (786 mg; 10 mmol). Adicionou-se ao balão, o solvente composto por 1 mL de CH_3COOH glacial (1,05 g; 17 mmol) em 5 mL de benzeno (4,38 g; 56 mmol) e 4 esferas de peneira molecular previamente ativada. Essa mistura reacional foi agitada sob refluxo e atmosfera de N_2 por 4,5 horas. A reação foi monitorada por GC-FID. (O monitoramento por CCD também é viável uma vez que o revelador químico *p*-anisaldeído revela com grande intensidade o produto e não revela o material de partida). Ao término da reação, deixou-se a mistura reacional retornar a temperatura ambiente naturalmente. Em seguida, evaporou-se o solvente e o resíduo foi suspenso em 15 mL H_2O destilada pH 8. Extraiu-se a fase aquosa com AcOEt (3 x 15 mL) (45 mL; 40,6 g; 461 mmol). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução saturada de NaCl . Após isso, as fases orgânicas foram secas sob MgSO_4 anidro, filtradas por gravidade com papel de filtro pregueado e o solvente evaporado em rotaevaporador, fornecendo 135 mg de um sólido alaranjado. Obteve-se conversão >99% e rendimento de 94%.

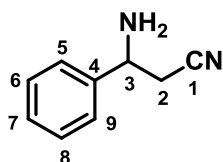


3-amino-3-fenilacrilonitrila. **FM:** $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2$; **MM:** $144 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; sólido alaranjado; GC-FID: $t_R = 7.2 \text{ min}$ (Restek®); **EM** (IE, 70 eV) m/z (abundância relativa %): 144 (100), 129 (22), 117 (98), 104 (40), 89 (21), 77 (44), 51 (47) **IV** – (V max) (cm^{-1}): 3444, 3353, 3240, 2182; **RMN de ^1H** – (300,19 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 4,25 (s, 1H, H2), 4,74 – 5,20 (sl, 2 NH), 7,37 – 7,54 (m, 5H, H5, H6, H7, H8 e H9); **RMN de ^{13}C** – (75,5 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 63,9 (CH_2 , C2), 119,6 (CN, C1), 126,1 (CH, C5 e C9), 129,1 (CH, C7), 131,1 (CH, C6 e C8), 135,5 (C_0 , C4), 161,6 (C_0 , C3)

Segunda etapa:⁶⁸

Em um balão de 10 mL, adicionou-se o substrato 3-amino-3-fenilacrilonitrila (166mg; 1,15 mmol), EtOH HPLC (3 mL; 2,367 g; 51 mmol), NaBH_3CN (81,6; 1,3 mmol) e 3 μL do indicador verde de bromocresol 0,5% em EtOH grau HPLC. O balão

foi hermeticamente fechado com septo e, com auxílio de uma seringa de vidro, gotejou-se HCl 37% em EtOH grau HPLC (1:1) até a obtenção de cor amarela permanente. **(Atenção: nesta etapa há liberação de HCN, sendo necessário utilizar borbulhador com solução NaOH 10 M para capturar este gás extremamente tóxico. Além disso, a reação deve ser realizada na capela de exaustão e com uso de sensor de HCN).** A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética em temperatura ambiente por 3 horas. A reação foi monitorada por CCD, utilizando eluente: heptano/AcOEt 1:1. Nessas condições o R_f encontrado foi: 3-amino-3-fenilacrilonitrila = 0,48 e **rac-5** = 0,31. Para confirmar o término da reação, a placa de CCD foi revelada com solução de *p*-anisaldeído, pois revela somente o substrato e pôde ser observado que não havia resquício algum de substrato. Evaporou-se o solvente da reação no rotaevaporador sob pressão reduzida e a massa bruta contida no balão foi suspendida com 20 mL de H₂O destilada pH 11. Adicionou-se solução saturada de NaCl à fase aquosa e a mesma foi extraída com AcOEt (3 x 20 mL) (60 mL; 54,12 g; 614 mmol). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução saturada de NaCl. Posteriormente, foram secas sob MgSO₄ anidro, filtradas por gravidade com papel de filtro pregueado e o solvente evaporado em rotaevaporador, fornecendo 149 mg de um óleo viscoso amarronzado. Obteve-se conversão >99% e rendimento de 89%. Não foi necessária uma etapa de purificação.

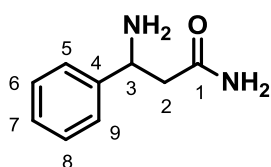


rac-3-amino-3-fenilpropanonitrila (rac-5). **FM:** C₉H₁₀N₂; **MM:** 146 g·mol⁻¹; óleo viscoso marrom; GC-FID: t_R = 11.7 min (Restek®); $t_{R\text{-enantiômeros}}$ = 11.7 e 12.5 min (Lipodex E.); **EM** (IE, 70 eV) m/z (abundância relativa %): 145 (3), 129 (9), 106 (100), 104 (31), 79 (62) 77 (45) 51 (17) **IV** – (ν max (cm⁻¹); 3365, 3301, 3187, 2211; **RMN de ¹H** – (300,19 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1,79-1,83 (sl, 2H, 2 NH), 2,59 – 2,76 (t, J = 6 Hz, 2H, H2), 4,31-4,38 (dd, J = 5,7 e 6 Hz 1H, H3), 7,28 – 7,42 (m, 5H, H5, H6, H7, H8 e H-9); **RMN de ¹³C** – (75,5 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 28,5 (CH₂, C2), 52,7 (CH, C3), 117,9 (CN, C1), 125,9 (CH, C5 e C9), 128,3 (CH, C7), 128,9 (CH, C6 e C8), 142,1 (C₀, C4)

3.2.5. Síntese do composto **rac-3-amino-3-fenilpropanamida (rac-6)**⁶¹

Em um balão de fundo redondo de 10,0 mL, adicionou-se **rac-5** (48 mg; 0,328 mmol) e CH₂Cl₂ anidro (~ 1,3 mL; 1,729 g; 20 mmol). Após completa solubilização de **rac-5**, gotejou-se H₂SO₄ 98% (558 μL; 1,027 g; 10 mmol) sob agitação magnética

suave em temperatura ambiente. O balão se encontrava hermeticamente vedado com septo. Em seguida, a solução reacional foi mantida sob agitação magnética vigorosa em temperatura ambiente por 4 horas. A reação foi monitorada por GC-FID. Adicionou-se NaOH 10 M a 0 °C até pH 12. Extraíu-se a fase aquosa com AcOEt (3 x 10,0 mL) (30 mL; 27,06 g; 307 mmol). O pH foi corrigido a cada extração. As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). Adicionou-se à fase orgânica MgSO₄ anidro e procedeu-se à filtração por gravidade, utilizando papel de filtro pregueado. O solvente foi evaporado em rotaevaporador. Obteve-se um sólido branco com filme amarelado adsorvido. A faixa de fusão de 114-116 °C. A conversão foi de 99% e o rendimento bruto de 51%. O produto não foi purificado.



rac-3-amino-3-fenilpropanamida (**rac-6**). **FM**: C₉H₁₂N₂O; **MM**: 164 g·mol⁻¹; sólido branco; GC-FID: t_R = 7.6 min (Restek®); t_R-enantiômeros = 34.0 e 35.4 min (Hydrodex β-3P); **EM** (IE, 70 eV) *m/z* (abundância relativa %): 51 (15), 59 (17), 79 (36), 106 (100), 119 (61), 146 (7), 163 (1), 164 (1); **IV** – (ν max) (cm⁻¹): 3382, 3281, 3062, 3028, 2923, 2852, 1650, 1642; **RMN de ¹H** – (300,19 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 2,28 - 2,42 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, 2NH [amina]), 2,48 – 3,48 (m, 2H), 4,13-4,18 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H, H3), 6,77 (sl, 1H, 1NH [amida]), 7,13 - 7,64 (m, 7H, H5, H6, H7, H8 e H9); **RMN de ¹³C** – (75,5 MHz, DMSO-d₆) δ(ppm): 45,7 (CH₂, C2), 53,0 (CH, C3), 126,7 (CH, C5 e C9), 126,9 (CH, C7), 128,5 (CH, C6 e C8), 146,9 (C_O, C4), 173,2 (C_O, C1)

3.3. Reações com enzimas isoladas, extratos enzimáticos e células íntegras

3.3.1. Procedimento geral para triagem das NHases

Em um tubo do tipo Eppendorf de 2,0 mL, adicionou-se tampão fosfato de sódio (1,0 mL; 200 mM) contendo solução de elementos traços de Fe³⁺ e Co³⁺ na proporção 1000:1; tampão/solução traços) e 5 μL de enzima. A solução de elementos traços consiste na adição de CoCl₂ · 6H₂O ou FeCl₂ · 6H₂O em água destilada (2 mg/500 mL). O tubo de Eppendorf foi colocado em banho de gelo sob luz natural por 1,5 horas. Em seguida, foi levado ao termomixer a 25 °C e 1000 rpm onde permaneceu por 2 minutos para atingir a temperatura programada. Logo após, adicionou-se o substrato

1 ou **rac-3** ou **rac-5** (1 mg; 6,90; 6,80 e 6,85 mM, respectivamente) solubilizado em DMSO (100 μ L; 110 mg; 1,4 mmol). O tubo de Eppendorf foi incubado nas condições reacionais acima por 24 horas. Após o término, a solução aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 0,5 mL) (1,5 mL; 1,353 g; 15 mmol). As fases orgânicas foram combinadas, secas sob MgSO_4 anidro e filtradas com algodão. Evaporou-se o solvente e suspendeu-se o produto contido no tubo com AcOEt ou EtOH grau HPLC. Analisou-se via GC-FID.

3.3.2. Procedimento geral para triagem de ω -TA (extratos enzimáticos)

Em um tubo do tipo Eppendorf de 2,0 mL, adicionou-se o substrato **1** ou **2** (4.4 mg; 20 mM), DMSO (15 μ L; 16,5 mg; 0,2 mmol), 1 mM PLP (15 μ L de uma solução estoque 0,1 M) e isopropilamina (39 μ L; 28 mg; 0,48 mmol). Em seguida, adicionou-se o extrato enzimático (preparado em tampão pH 7,5; 100 mM) q.s.p. 1,5 mL (~ 1,4 mL). Aferiu-se o pH e o mesmo estava em 12, sendo corrigido para 7 com HCl 4 M. Esta solução reacional foi incubada a 30 °C, 850 rpm por 24 horas. Após o término, a solução reacional foi alcalinizada (pH 12) com solução de NaOH 4 M e extraída com AcOEt (2 x 1,5 mL) (3,0 mL; 2,706 g; 31 mmol). As fases orgânicas foram combinadas, secas sob MgSO_4 anidro e filtradas com algodão. A reação foi analisada por GC-FID.

3.3.3. Procedimento geral para triagem de ω -TA (enzimas)

Em um tubo do tipo Eppendorf de 2,0 mL, adicionou-se substrato **1** ou **2** (1,5 mg; 17 mM), DMSO (6 μ L; 6,6 mg; 0,084 mmol), 0,5 mmol de PLP (7,5 μ L de uma solução estoque 0,1M) e 150 mM de isopropilamina (0,112 mL de uma solução estoque 0,2M). Adicionou-se tampão fosfato de sódio pH 7,0 100 mM q.s.p 0,6 mL. O pH do meio foi corrigido para 7 com adição de HCl 4M. Em seguida adicionou-se 2 mg da enzima ω -TA. O tubo foi deixado sob agitação em termomixer a 30 °C e 850 rpm por 24 horas.

Após as 24 horas, a reação foi centrifugada (12.000 rpm/4 min) e a fase aquosa alcalinizada até pH 12 com solução de NaOH 10M e extraída com AcOEt (4 x 0,6 mL). (2,4 mL; 2,16 mg; 24 mmol). As fases orgânicas foram combinadas, secas sob MgSO_4 anidro, evaporadas em rotaevaporador sob pressão reduzida e o produto bruto suspenso em AcOEt grau HPLC e analisado via GC-FID.

3.3.4. Procedimento geral para triagem das KRED (microrganismos)

Ao tubo de ensaio com ágar inclinado contendo os microrganismos *Lysinibacillus boronitolerans*, *Bacillus cereus* ou MLH 15 previamente crescidos em BOD por 24 horas a 28-29 °C, adicionou-se 5 mL de água estéril em cada tubo de ensaio (7 tubos). Formou-se uma suspensão microbiana e esta foi adicionada em um erlenmeyer de 500 mL contendo 70 mL de meio NB. Após 24 horas, dividiu-se em duas partes o volume total contido neste erlenmeyer (~105 mL) e estes foram adicionados em dois erlenmeyers de 2000 mL contendo 400 mL de meio NB que foram levados para o agitador orbital a 28-29 °C a 115 rpm onde os microrganismos cresceram por 3 dias. Em seguida, os mesmos foram centrifugados, o sobrenadante descartado e a biomassa suspendida com solução tampão fosfato de sódio pH 7; 200 mM, contendo 5 gramas de glicose/100 mL de tampão. Adicionou-se o substrato de acordo com a quantidade de biomassa obtida, seguindo uma proporção de 50 mL de tampão, 0,260 mmol de substrato e 5,0 gramas de biomassa úmida. O substrato foi solubilizado em DMSO (0,5 mmol/2 mL) e adicionado na solução tampão contendo o microrganismo. Todas essas etapas foram realizadas em atmosfera estéril, inclusive para retirada das alíquotas. A solução reacional foi novamente levada ao agitador orbital a 28-29 °C e 115 rpm por 72 horas. Ao término da reação, a solução reacional foi centrifugada a 3200 rpm por 15 minutos. Adicionou-se NaCl_(s) ao sobrenadante e o mesmo foi extraído com AcOEt (3 porções de seu volume). As fases orgânicas foram combinadas e secas sob MgSO₄ anidro. Filtrou-se a fase orgânica por gravidade utilizando papel de filtro pregueado e evaporou-se o solvente no rotaevaporador sob pressão reduzida. A reação foi analisada por GC-FID.

3.3.5. Procedimento geral para triagem das KRED (enzimas)

Inicialmente, o cofator NADH (0,5 mg; 0,75 mM) ou NADPH (0,5 mg; 0,67 mM) foi adicionado em uma solução tampão de fosfato de sódio (1,0 mL; 100 mM; pH 7) contendo Mg²⁺ (1,0 mM). Todas as soluções preparadas foram utilizadas no máximo em 2 dias. A adição do cofator NADH ou NADPH foi realizada somente no momento da reação. Em um tubo de Eppendorf de 2,0 mL, o substrato **1** ou **2** (1,0 mg; 6,9 e 6,1 mM, respectivamente) foi adicionado seguido de álcool isopropílico (IPA; 50 µL; 39,3 mg; 0,65 mmol) e após completa solubilização do substrato, adicionou-se 500 µL de tampão. Este tubo foi deixado em termomixer (25 °C; 1000 rpm) por 2 minutos. Em um segundo tubo de Eppendorf, a enzima KRED foi adicionada (1 µL) seguido de 500

μL de solução tampão. Este tubo foi mantido no termomixer (25 °C; 1000 rpm) por 2 minutos. Em seguida, o conteúdo do tubo contendo a enzima foi adicionado sobre o substrato. O tubo de Eppendorf foi incubado na condição reacional descrita acima e após 24 horas foi centrifugado (12.000 rpm / 4 minutos) e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 500 μL) (1,5 mL; 1,353 g; 15 mmol). As fases orgânicas foram combinadas, secas sob MgSO_4 anidro, filtradas com algodão e o solvente evaporado. O produto bruto extraído foi suspenso com AcOEt ou EtOH HPLC (para amidas) e a reação foi analisada em GC-FID.

3.3.6. Procedimento geral para as reações em cascata

Em um tubo de Eppendorf de 2,0 mL, 1 adicionou-se o substrato **1** (1,0 mg; 6,9 mM) e IPA (50 μL ; 39,3 mg; 0,65 mmol). Após a completa solubilização, foi adicionado tampão fosfato de sódio (500 μL) contendo todos os reagentes descritos anteriormente no tópico 3.3.5. mais solução traço de cobalto na mesma concentração e proporção previamente descrita no tópico 3.3.1. Este tubo foi mantido no termomixer (25 °C; 1000 rpm) por 2 minutos. Em um segundo tubo Eppendorf de 2,0 mL, a enzima KRED recombinante (1 μL) foi adicionada seguido do tampão (400 μL). Este tubo foi mantido no termomixer (25 °C; 1000 rpm) por 2 minutos. Em seguida, o tubo contendo a enzima foi adicionado sobre o substrato e mantido no termomixer nas mesmas condições acima por 8 horas. NHase E0257 (5,0 μL) foi adicionada em um terceiro tubo de Eppendorf contendo tampão (100 μL). Esta solução foi adicionada no tubo da reação e mantida no termomixer (25 °C; 1000 rpm) por 2 horas. A seguir a solução reacional foi centrifugada (12.000 rpm / 4 minutos), e a fase aquosa saturada com $\text{NaCl}_{(s)}$. Extraiu-se a fase aquosa com AcOEt (3 x 500 μL) (1,5 mL; 1,353 g; 15 mmol). As fases orgânicas foram combinadas, secas sob MgSO_4 anidro, filtradas com algodão e o solvente foi evaporado. O produto bruto extraído foi suspenso EtOH HPLC e a reação foi analisada em GC-FID.

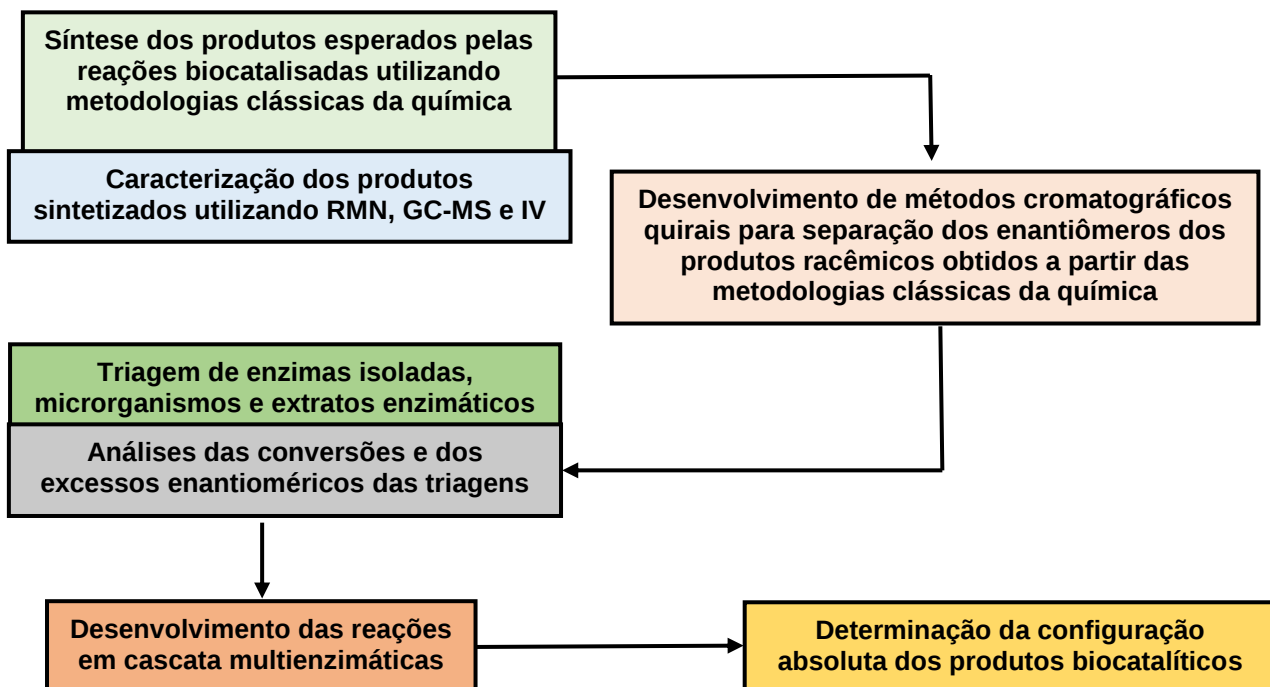
Para a reação em cascata simultânea, utilizou-se as mesmas condições da reação em cascata sequencial, entretanto, utilizou-se a NHase 016 e todas as enzimas foram adicionadas simultaneamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estratégia de trabalho

A estratégia de trabalho para o desenvolvimento deste projeto, encontra-se descrita e resumida no fluxograma 1 abaixo:

Fluxograma 1: Etapas para o desenvolvimento do projeto



Os blocos construtores racêmicos foram sintetizados previamente pelos métodos sintéticos convencionais para serem utilizados como padrões nos processos biocatalíticos. Uma vez sintetizados, foram caracterizados e métodos cromatográficos quirais foram desenvolvidos para a separação dos enantiômeros dos padrões racêmicos com a finalidade de auxiliar nas análises e determinação dos ee dos processos biocatalíticos estereosseletivos.

4.2. Síntese, caracterização e desenvolvimento dos métodos cromatográficos dos padrões dos produtos de interesse

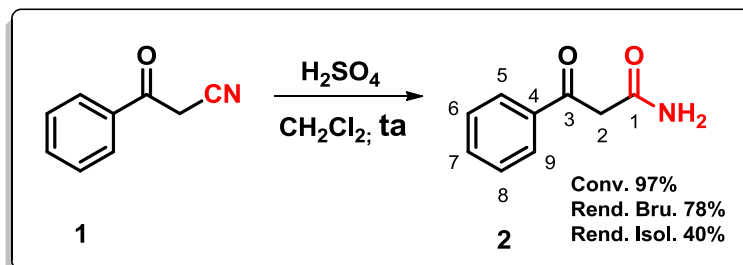
A primeira etapa desta discussão tratará da síntese, caracterização e desenvolvimento dos métodos cromatográficos dos padrões dos produtos esperados pelos processos biocatalíticos.

4.2.1. Síntese do composto 2

O composto **2** foi sintetizado via hidrólise ácida da nitrila catalisada por ácido sulfúrico (Esquema 10). A reação foi realizada baseando-se na metodologia de Gonzáles-Vera e colaboradores.⁶¹ A reação foi monitorada por CCD e GC-FID. Os resultados obtidos entre as sínteses realizadas não foram reprodutíveis. Em algumas sínteses a reação se completou em 6 horas. Porém, algumas vezes o tempo de reação foi de 24 horas e provavelmente atingia seu equilíbrio devido a conversão não ultrapassar 97%. Em outras vezes uma pequena quantidade de ácido carboxílico foi observada através das análises no GC-FID ou então ao ser revelada com o revelador químico verde de bromocresol. A formação do ácido carboxílico é um processo cineticamente favorecido.^{16,33,62}

O melhor resultado obtido foi com conversão de 97% e rendimento de 40% após purificação por CCDP. O uso de ácidos e bases fortes para hidratação de nitrilas é problemático devido às condições drásticas e rendimentos moderados.⁶³ Além disso, durante a etapa de neutralização, há grande formação de sal e contaminação do produto.⁶³ A reação catalisada por ácido requer controle da temperatura e proporção de reagentes com a finalidade de evitar a formação de polímeros promovida pela característica exotérmica da hidratação.⁶³ A síntese de amidas frequentemente apresenta degradação, racemização e difícil purificação devido a possibilidade de formação de ácido carboxílico.³³ Consequentemente, apresenta significativo impacto ambiental.¹⁶

Esquema 10: Reação geral para hidrólise ácida da nitrila de **1** em **2**



Fonte: Autor, 2018

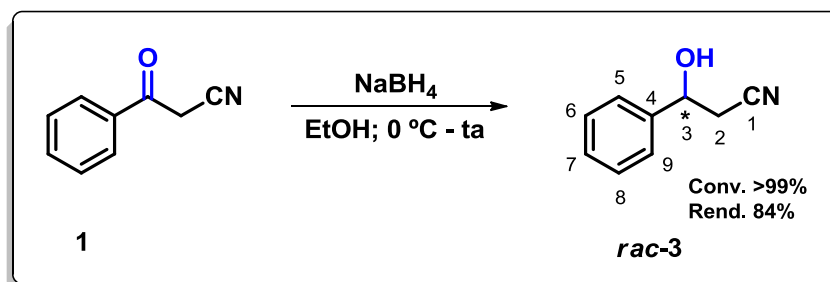
O composto **2** foi caracterizado por RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135, CG/EM e IV e comparados com a literatura.³² No espectro de RMN de ^1H (Apêndice-Espectro A), observa-se um simpleto em 3,98 ppm referentes aos 2H, C-2. Em 5,70 e em 7,12 ppm, observa-se dois simpletos largos referentes aos hidrogênios ligados ao átomo de nitrogênio. Os deslocamentos são diferentes devido a deslocalização eletrônica por ressonância que ocorre entre o par de elétrons não ligantes do nitrogênio com o grupo carbonila, conferindo uma estrutura plana à molécula, deixando os hidrogênios em ambientes magneticamente diferentes. Entre 7,37-7,67 ppm há um multiplete integrando para três hidrogênios referentes ao anel aromático H6, H7 e H8 e em 7,96-8,03 ppm há um segundo multiplete integrando para dois hidrogênios H5 e H9. Como há a possibilidade de ocorrer tautomerismo ceto-enólico, observa-se outros dois sinais quando a molécula está em sua forma enólica. Um simpleto em 5,56 ppm referente a 1H, C-2 e um simpleto em 14,2 ppm característico do hidrogênio da hidroxila -OH em na forma enólica.

O espectro de massas (Apêndice-Espectro C) não apresentou o sinal do íon molecular, apenas os fragmentos característicos com m/z (%) 120 (35), 105 (100) e 77 (65). No espectro no IV (Apêndice-Espectro D) observa-se a presença de duas bandas de absorção: uma referente a amida primária em 3419 cm^{-1} e a outra em 3187 cm^{-1} referente a deformação axial O-H, devido a possibilidade de ocorrer equilíbrio ceto-enólico. Além dessas duas bandas, observa-se outras duas em 1675 cm^{-1} e 1632 cm^{-1} , características do estiramento da ligação C=O.

4.2.2. Síntese do composto *rac*-3

O composto *rac*-3 foi obtido via redução da carbonila do substrato **1** utilizando borohidreto de sódio (NaBH_4) (Esquema 11). Esta síntese foi baseada na metodologia descrita por Kamila e colaboradores¹⁴ e Coady e colaboradores.⁶⁴ A reação foi monitorada por CCD e após 30 minutos de reação, todo material de partida havia sido consumido. Junto com o produto foi recuperado um sólido branco que pôde ser separado com papel de filtro pregueado. O rendimento desta reação foi de 84%.

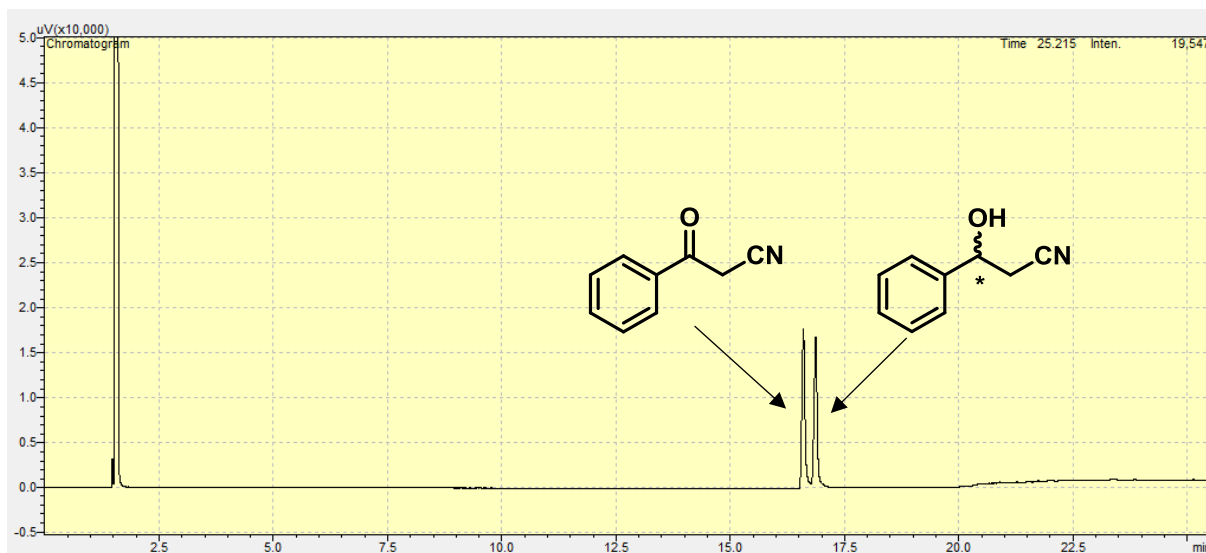
Esquema 11: Reação geral para redução da carbonila de **1** em *rac*-**3**



Fonte: Autor, 2018

Desenvolveu-se um método cromatográfico na coluna aquiral para as análises de rotina para a separação do composto **1** e *rac*-**3** (Figura 4). O tempo de retenção de **1** e *rac*-**3** passou a ter uma diferença de 0,2 minutos.

Figura 4: Cromatograma mostrando a separação dos compostos **1** e *rac*-**3** utilizando a coluna Restek® (Coluna A)



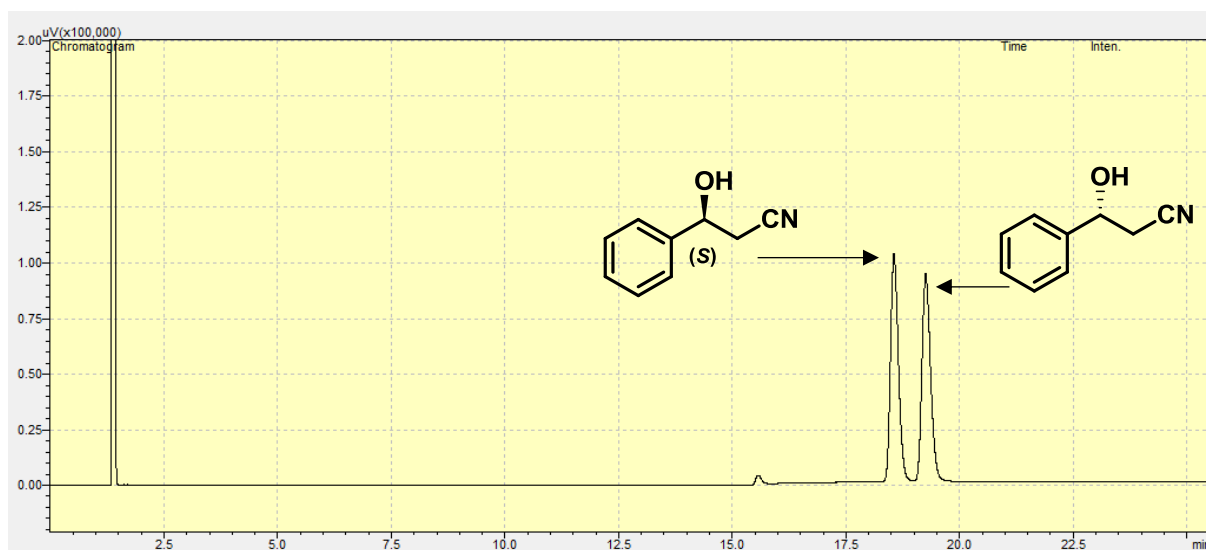
A estrutura do composto *rac*-**3** foi confirmada pelas análises dos espectros no RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135, CG-EM e IV e comparados com a literatura.⁶⁴ No espectro de RMN de ^1H (Apêndice-Espectro E), observa-se um duplete em 2,40-2,53 ppm referente ao hidrogênio da hidroxila se acoplando com o hidrogênio de C-3 com $J=3,3$ Hz. Em 2,79- 2,82 ppm, observa-se um duplete, integrando para dois

hidrogênios que são referentes aos hidrogênios diastereotópicos ligados ao H2 com $J=6,2$ Hz. Em 4,96-5,12 ppm observa-se um multipeto, acoplando com $1H-OH$ e H2, integrando para um hidrogênio ligado ao carbono assimétrico H3, com $J=3,3$ e 6,2 Hz. Por fim, em 7,28-7,41 ppm observa-se os multipeto referente aos hidrogênios do anel aromático, integrando para 5H.

O espectro de massas (Apêndice-Espectro G) apresentou o sinal do íon molecular com m/z (%)147 (7) e, além desse, os fragmentos característicos com m/z (%) 129 (8), 107 (100), 105 (26), 79 (86) 77 (72) e 51 (27). No espectro no IV (Apêndice-Espectro H) observa-se a presença de uma banda de absorção característica de álcool em 3421 cm^{-1} relativa ao estiramento da ligação O-H com ligações de hidrogênio. Além dessa, observa-se a banda da nitrila em 2254 cm^{-1} , características do estiramento da ligação CN.

Uma vez caracterizado, desenvolveu-se um método cromatográfico na coluna quiral do GC-FID para a separação dos enantiômeros do composto racêmico (Figura 5). As atribuições dos enantiômeros em cada pico do cromatograma foram realizadas a partir dos ee e das análises de $[\alpha]_D^{21}$ das reações biocatalisadas e comparadas com a literatura.⁶⁵

Figura 5: Cromatograma mostrando os sinais referentes aos enantiômeros do composto **rac-3** utilizando a coluna quiral Lipodex E® (Coluna C)

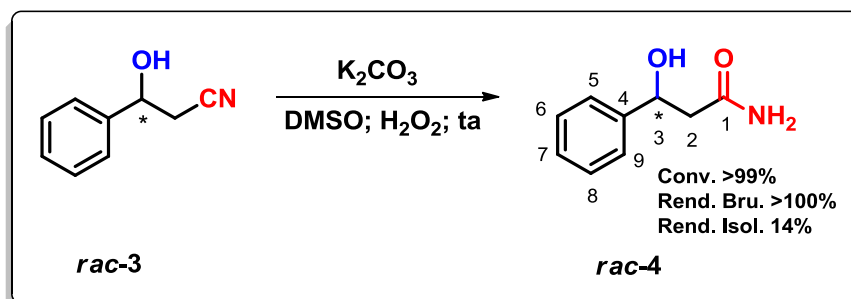


4.2.3. Síntese do composto *rac-4*

O composto *rac-4* foi sintetizado baseando-se na metodologia descrita por Khamal e colaboradores⁸ (Esquema 12). Não foi utilizado H_2SO_4 para a hidratação da nitrila do composto *rac-3* para a obtenção de *rac-4*, visto que o ácido sulfúrico não é um catalisador quimiosseletivo e poderia reagir com os dois grupos funcionais do substrato, levando a formação do produto insaturado a partir da reação de desidratação de álcoois.^{14,64}

A reação foi monitorada por GC-FID e após 6 horas reacionais verificou-se que todo material de partida havia sido consumido. Como observado por Wessjohann e colaboradores²⁶, também visualizamos apenas um spot na placa de CCD e um pico intenso no GC-FID, entretanto, o produto bruto se apresentou como um sólido branco impregnado com um óleo viscoso amarelo. Provavelmente, uma pequena quantidade do DMSO utilizado como solvente na reação possa ter sido recuperado juntamente com o produto.

Esquema 12: Reação geral para a hidratação da nitrila de *rac-3* em *rac-4*



Fonte: Autor, 2018

Dessa forma, o rendimento do produto bruto excedeu ao teórico e, então, foi realizada purificação por CCDP. O rendimento foi de apenas 14%. Um inconveniente dessa reação é que, na etapa de extração, uma massa considerável do produto é perdida, devido à grande afinidade pela fase aquosa.²⁶ O composto *rac-4* foi caracterizado por RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135, GC/MS e IV e comparado com a literatura.²⁸

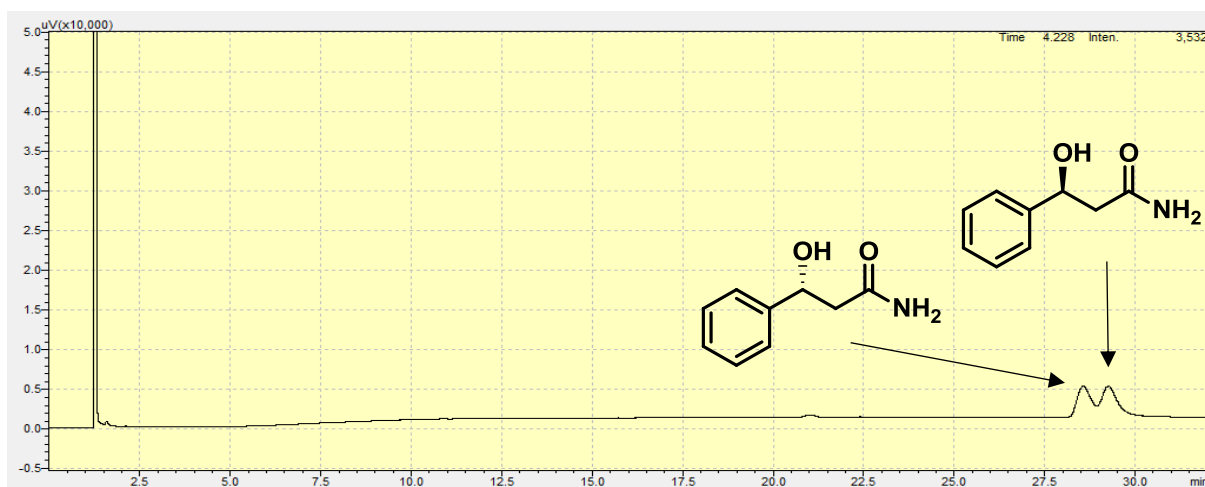
No espectro de RMN de ^1H (Apêndice-Espectro I), observa-se um simpleto em 1,29 ppm referente ao H da hidroxila. Em 2,47-2,69 ppm observa-se um duplo duplete duplo referente aos dois hidrogênios diastereotópicos ligados ao H2. Observa-se que

há um simpleto muito intenso em 4,88 ppm. É o deslocamento esperado para os dois hidrogênios ligados ao átomo de nitrogênio da amida, entretanto, é o mesmo deslocamento da água em metanol. Dessa forma, não foi possível integrar esses hidrogênios. Em 5,00 ppm há um duplo duplete integrando para 1 hidrogênio H-3. Por fim, em 7,21-7,43 ppm há um multiplete integrando para os 5 hidrogênios do anel aromático.

O espectro de massas (Apêndice-Espectro K) apresentou o sinal do íon molecular com m/z (%) 165 (31) e, além deste, os fragmentos característicos com m/z (%) 146 (69), 131 (29), 120 (20), 105 (61), 91 (10), 77 (100), 59 (95) e 51 (42). No espectro no IV (Apêndice-Espectro L) observa-se a presença de duas bandas de absorção característica de amida primária. As absorções são em 3378 e em 3301 cm^{-1} relativas as deformações axiais assimétrica e simétrica de N-H, respectivamente. Além dessa, observa-se a banda da hidroxila em 3176 cm^{-1} fazendo ligação de hidrogênio intramolecular. Isso fica evidente devido a banda ser larga, pouco intensa e não há a banda aguda de hidroxila livre, isto é, que não faz ligação de hidrogênio. Essa absorção é relativa a deformação axial de O-H. Por fim, observa-se uma absorção em 1620 cm^{-1} , característica da deformação axial da carbonila C=O.

Após a caracterização do composto **rac-4**, desenvolveu-se um método cromatográfico na coluna quiral do CG-DIC para a separação dos enantiômeros do composto racêmico (Figura 6). A determinação dos sinais para cada enantiômero no cromatograma pôde ser realizada a partir do ee do produto obtido nas reações em cascata multienzimáticas e comparados com a literatura.¹³ Além disso, o enantiômero **(S)-4** era esperado, uma vez que a estereosseletividade da reação é determinada pela enzima KRED e as enzimas NHases não haviam apresentado seletividade.

Figura 6: Cromatograma mostrando os picos referentes aos enantiômeros do composto **rac-4** utilizando a coluna quiral Lipodex E® (Coluna C)

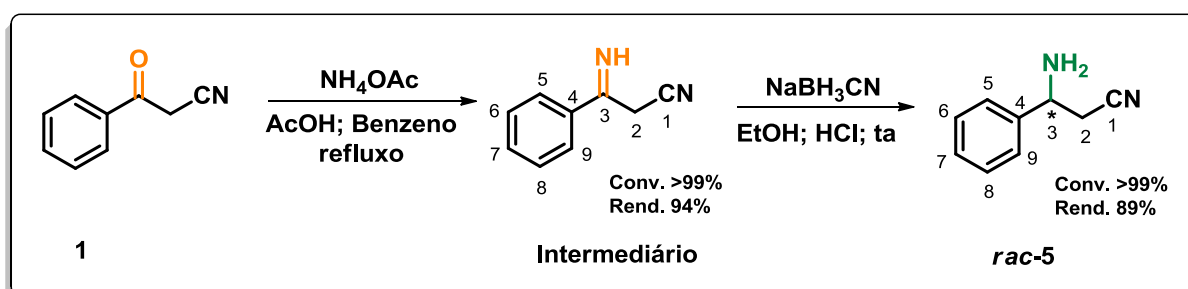


4.2.4. Síntese do composto **rac-5**

Inicialmente, utilizou-se a metodologia proposta por Miriyala e colaboradores⁶⁶ para a síntese *one-pot* de **rac-5**. Os autores utilizaram o substrato 3-oxo-3-fenilpropano. Porém, para o substrato **1** obteve-se conversão de apenas 6% para o produto 3-amino-3-fenilacrilonitrila após 6 horas, provavelmente devido as diferenças de reatividade entres os substratos. Então, uma nova metodologia foi utilizada para realizar a aminação redutiva da carbonila do substrato **1** em duas etapas (Esquema 13). Na 1ª etapa ocorre a formação da imina e na 2ª etapa sua redução.

Então, para a obtenção do intermediário 3-amino-3-fenilacrilonitrila, utilizou-se umas das metodologias propostas por Zhao e colaboradores⁶⁷ que utilizaram o substrato benzoilacetato de etila e na 2ª etapa a reação procede com a metodologia descrita por Chhiba e colaboradores⁶⁸, utilizando o substrato 3-amino-3-fenilacrilonitrila.

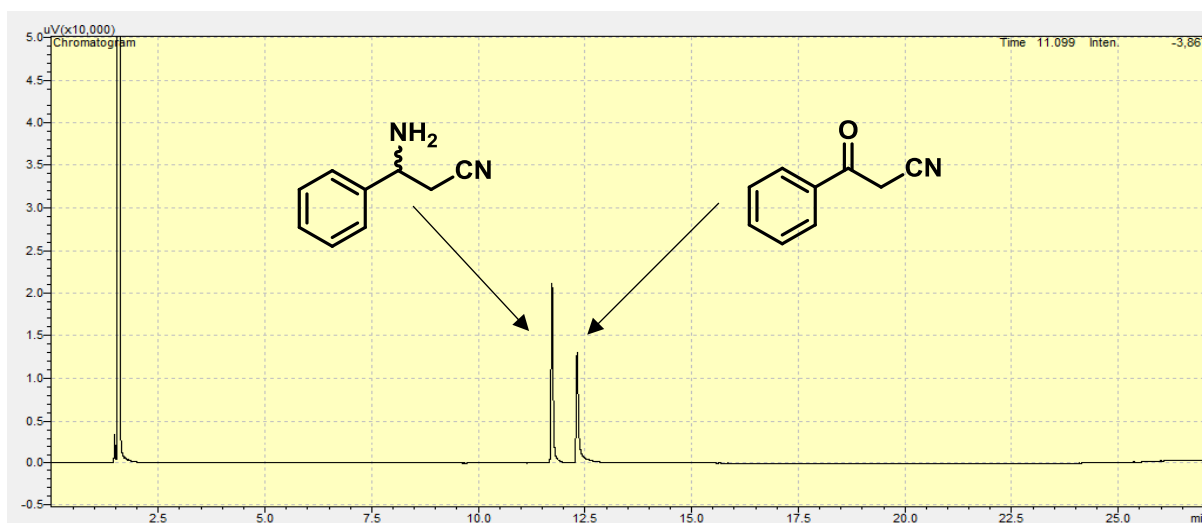
Esquema 13: Reação geral para a aminação redutiva da carbonila de **1** em **rac-5**



Na 1^o etapa da síntese, a reação foi monitorada por GC-FID e, após 4,5 horas de reação, todo material de partida havia sido consumido, gerando o composto 3-amino-3-fenilacrilonitrila com 94% de rendimento. Procedeu-se para a 2^a etapa da reação, reduzindo a ligação dupla para a obtenção da amina primária. Nesta etapa, a reação foi monitorada por CCD, utilizando *p*-anisaldeído como revelador químico, pois o substrato 3-amino-3-fenilacrilonitrila é revelado com grande intensidade e o produto **rac-5** não é revelado. Após 3 horas de reação, verificou-se que todo material de partida havia sido consumido. O rendimento foi de 89%.

Para este composto também foi necessário o desenvolvimento um método cromatográfico na coluna aquiral para as análises de rotina para a separação do composto **1** e **rac-5** (Figura 7). O tempo de retenção de **1** e **rac-5** passou a ter uma diferença de 0,6 minutos.

Figura 7: Perfil cromatográfico da separação dos compostos **1** e **rac-5** utilizando a coluna Restek® (Coluna A)



A estrutura molecular do intermediário foi confirmada pelas análises dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135, CG-EM e IV e comparados com a literatura.⁶⁸ No espectro de RMN de ^1H (Apêndice-Espectro M) observa-se um simpleto em 4,25 ppm referente a 1H, H2. De 4,70 a 5,20 ppm, observa-se um simpleto largo, integrando para dois hidrogênios que são referentes aos hidrogênios

ligados ao átomo de nitrogênio. E em 7,37- 7,54 ppm, observa-se um multiplete, integrando para os 5 hidrogênios aromáticos.

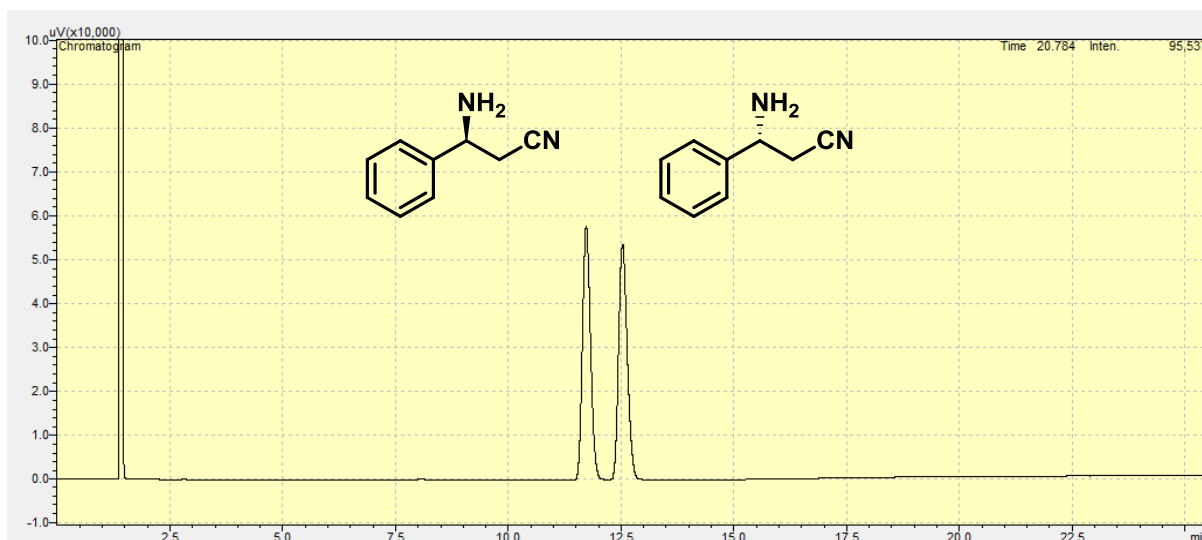
O espectro de massas (Apêndice-Espectro O) apresentou o sinal do íon molecular com m/z (%) 144 (100) e, além desse, os fragmentos característicos com m/z (%) 129 (22), 117 (98), 104 (40), 89 (21), 77 (44) 51 (47). No espectro no IV (Apêndice-Espectro P) observa-se a presença de duas bandas de absorção referentes ao estiramento da ligação NH_2 em 3444 e 3353 cm^{-1} . Além dessas bandas, há uma harmônica em 3240 cm^{-1} relacionada ao dobramento da ligação N-H em 1626 cm^{-1} . E em 2182 cm^{-1} observa-se o estiramento da ligação CN da nitrila.

E as mesmas técnicas foram utilizadas para a elucidação estrutural do composto **rac-5** e comparada com a literatura.⁶⁸ No espectro de RMN de ^1H (Apêndice-Espectro Q) observa-se um simpleto largo em 1,79-1,83 ppm integrando para 2 hidrogênios ligados ao átomo de nitrogênio. Em 2,59-2,77 ppm observa-se um multiplete, integrando os dois prótons diastereotópicos H-2. Em 4,30-4,39 ppm observa-se um duplo dubleto, integrando 1H ligado ao carbono assimétrico H-3. Por fim, em 7,28-7,43 ppm há um multiplete integrando para cinco hidrogênios do anel aromático.

O espectro de massas (Apêndice-Espectro S) não apresentou o sinal do íon molecular apenas os fragmentos característicos com m/z (%) 145 (3), 129 (9), 106 (100), 104 (31), 79 (62) 77 (45) e 51(17). No espectro no IV (Apêndice-Espectro T) observa-se a presença de duas bandas de absorção referentes ao estiramento da ligação NH_2 em 3365 e 3301 cm^{-1} . Além dessas bandas, há uma harmônica em 3187 cm^{-1} relacionada ao dobramento da ligação N-H em 1593 cm^{-1} . E em 2211 cm^{-1} observa-se o estiramento da ligação CN da nitrila.

Uma vez caracterizado, desenvolveu-se um método cromatográfico na coluna quiral do GC-FID para a separação dos enantiômeros do composto racêmico (Figura 8). As atribuições dos enantiômeros deste composto do cromatograma não puderam ser realizadas, pois não obtivemos resultados com as enzimas ω -TA. Portanto, as estruturas no cromatograma abaixo foram colocadas de forma aleatória.

Figura 8: Perfil cromatográfico para a separação dos enantiômeros do composto **rac-5** utilizando a coluna Lipodex E® (Coluna C)

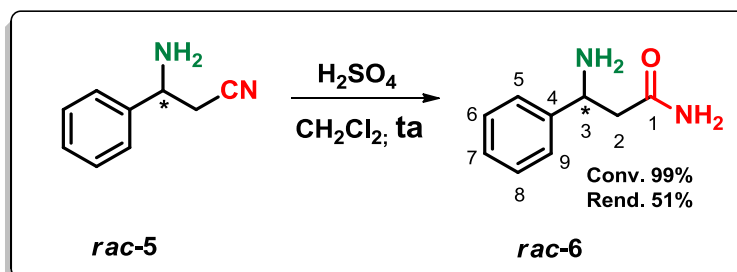


4.2.5. Síntese do composto **rac-6**

Novamente, utilizou-se a metodologia de Gonzáles-Vera e colaboradores⁵⁵ para a hidrólise ácida da nitrila (Esquema 14). A reação foi monitorada por GC-FID e, após 4 horas de reação, a conversão de **rac-5** em **rac-6** era de aproximadamente 99%. O rendimento bruto foi de 51%. O mesmo inconveniente observado durante a extração do composto **rac-4** ocorreu com o composto **rac-6**.

Esse composto também possui grande afinidade pela fase aquosa e, após a realização de duas extrações múltiplas consecutivas, o rendimento foi de 51%.

Esquema 14: Reação geral para a hidratação da nitrila de **rac-5** em **rac-6**



Fonte: Autor, 2018

Vale ressaltar que a cada extração, o pH tende a tornar-se menos alcalino, ficando em torno de 8-9. Sendo assim, é preciso verificar e corrigir o pH para 12, pois é o pH normalmente utilizado para a extração de amins primárias. Após extração, uma amostra foi analisada no GC-FID e a pureza era de 99,2%. O composto **rac-6** foi caracterizado por RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135, GC-MS e IV e comparado com a literatura.⁶⁸

No espectro de RMN de ^1H (Apêndice-Espectro U), observa-se um duplete em 2,28 - 2,42 ppm com constante de acoplamento de 6,9 Hz integrando para os dois hidrogênios diastereotópicos. Em torno de 2,5 - 3,5 ppm observa um simpleto muito intenso e um outro sinal largo ao lado. Devido ao DMSO ser um solvente bastante higroscópico, provavelmente uma quantidade de água foi absorvida pelo DMSO e acabou alargando e/ou sobrepondo outros sinais do composto **rac-6**. Em 4,13-4,18 ppm observa-se um tripleto com constante de acoplamento de 6,9 Hz referente ao hidrogênio ligado ao centro estereogênico H-3. Em 6,77 ppm, observa-se que há um pico largo, integrando para um hidrogênio. Este hidrogênio refere-se à ligação do átomo de hidrogênio com o nitrogênio da amina primária. Por fim, em 7,13 - 7,64 ppm há um multiplete integrando para 7 hidrogênios. Teoricamente, esperava-se encontrar uma integração para 5 hidrogênios. Talvez, a pequena quantidade de impureza (>1%) da amostra ou do solvente tenha contribuído para o valor desta integral.

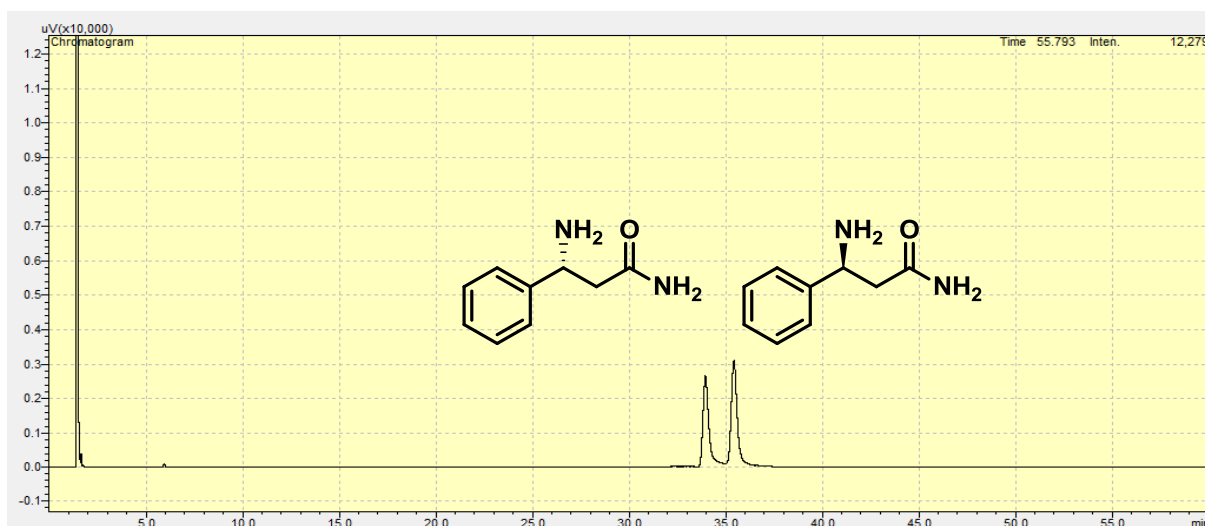
Porém, é possível afirmar que o composto **rac-6** foi formado pelo fato de que o produto obtido durante a triagem com as NHases, utilizando o substrato **rac-5**, possui exatamente o mesmo tempo de retenção do produto da catálise ácida utilizando ácido sulfúrico. Além disso, a enzima utilizada está em sua forma isolada e comumente se apresenta como um reagente de elevada quimiosseletividade.

O espectro de massas (Apêndice-Espectro X) apresentou o pico do íon molecular com m/z (%) 164 (1) e, além desse, os fragmentos característicos com m/z (%) 146 (7), 131 (2), 119 (61), 106 (100), 79 (37), 59 (17), 51 (15). No espectro no IV (Apêndice-Espectro W) observa-se em 3337 cm^{-1} a presença de uma banda aguda referente a deformação axial de N-H associada a ligação de hidrogênio e em 3197 cm^{-1} uma banda larga e pouca intensa característica da deformação axial de N-H. Além dessas, há duas bandas em 3028 e 3003 cm^{-1} típicas de da deformação axial de N-H de amina primária. Em 1650 e 1616 cm^{-1} , observa-se duas bandas de absorção, sendo

a primeira banda referente a deformação axial de C=O e a segunda de deformação angular de N-H.

Para o composto **rac-6** o método cromatográfico quiral para separação dos enantiômeros foi desenvolvido na coluna Hydrodex® β -3P (Figura 9). As estruturas moleculares dos enantiômeros do composto **rac-6** estão de forma aleatória no cromatograma, pois este composto não pôde ser obtido em sua forma enantiomericamente pura para que uma análise no polarímetro pudesse ser realizada e comparada com a literatura.

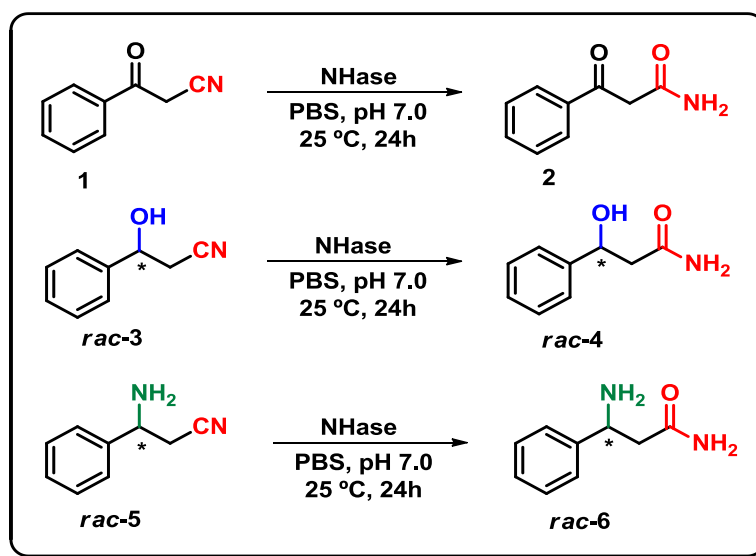
Figura 9: Cromatograma mostrando os picos referentes aos enantiômeros do composto **rac-6** utilizando a coluna quiral Hydrodex® β -3P (Coluna B)



4.3. Triagem das enzimas NHases

Foram realizadas triagens com 13 NHases disponíveis comercialmente (Prozomix®) frente aos substratos **1**, *rac-3* e *rac-5*. Utilizou-se a metodologia descrita por Amaral.⁶⁹ A reação geral da triagem encontra-se no Esquema 15.

Esquema 15: Reação geral de hidratação da nitrila catalisada por NHase



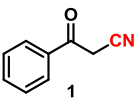
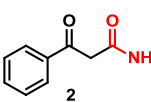
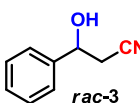
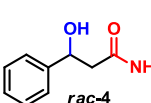
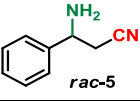
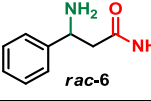
Condições da reação: substrato **1**, *rac-3* ou *rac-5* (1 mg; 7 μ M), DMSO (100 μ L), tampão fosfato de sódio (PBS) (1,0 mL), enzima (5 μ L). Para mais detalhes, veja a seção de matérias e métodos.

^a As conversões foram determinadas pela análise no GC-FID.

Analisando a Tabela 2 abaixo contendo o resultado das triagens com NHases, verifica-se que 6 enzimas (NHase 003, NHase 011, NHase 014, NHase 016, NHase E0257 e NHase E0259) catalisaram a hidratação da nitrila do composto **1** no composto **2** com conversões >99% (Entrada 1). Para o substrato *rac-3*, 9 enzimas (NHase 003, NHase 004, NHase 008, NHase 011, NHase 014, NHase 016, NHase 018, NHase E0257 e NHase E0259) catalisaram a conversão na amida correspondente *rac-4* (Entrada 2). Vale a pena ressaltar quimiosseletividade da reação em que há um grupo nitrila na presença do grupo hidroxila que pode ser eliminado sob catálise ácida ou básica levando a formação do produto insaturado 3-fenilprop-2-enamida. Interessante notar o aumento do potencial catalítico das enzimas com o substrato *rac-3*. Por exemplo, a atividade da NHase 016 frente aos substratos **1** e *rac-3* foi de 44 e 97%, respectivamente. Algumas enzimas como o NHase 004, 008 e 018 cujas conversões foram aproximadamente 90% com o substrato **1**, atingiram conversões >99% com

rac-3. Talvez, a possibilidade do grupo hidroxila fazer uma nova ligação de hidrogênio, possa estabilizar o complexo enzima-substrato durante o estado de transição.

Tabela 2: Resultados das triagens das NHases com os substratos **1**, **rac-3** e **rac-5**

Entrada	Substrato	Produto	Conversão (%) ^a												
			NHases												
			003	004	008	010	011	012	014	015	016	018	E0256	E0257	E0259
1			>99	94	90	7,5	>99	6,0	>99	>99	44	93	0	>99	>99
2			>99	>99	>99	0	>99	0	>99	>99	97	>99	0	>99	>99
3			0	0	90	0	67	0	38	20	0	>99	0	93	86
Cofator			Co ³⁺	Co ³⁺	Co ³⁺	Co ³⁺	Co ³⁺	Fe ³⁺	Co ³⁺	Co ³⁺	Co ³⁺	Co ³⁺	Fe ³⁺	Co ³⁺	Co ³⁺

Em relação ao substrato **rac-5**, somente a NHase 018 converteu >99% em **rac-6**. Interessante notar que as NHases 003 e 004, que apresentaram elevadas conversões com os substratos **1** e **rac-3**, não mostraram atividade alguma frente ao substrato **rac-5**. As atividades das NHases 011, 014 e 015 reduziram consideravelmente frente a este substrato. Contudo, são resultados muito promissores e atrativos, visto que uma importante conversão de grupos funcionais está sendo realizada em condições muito brandas de reação e que dificilmente é obtida pelos métodos sintéticos convencionais que requerem condições drásticas.

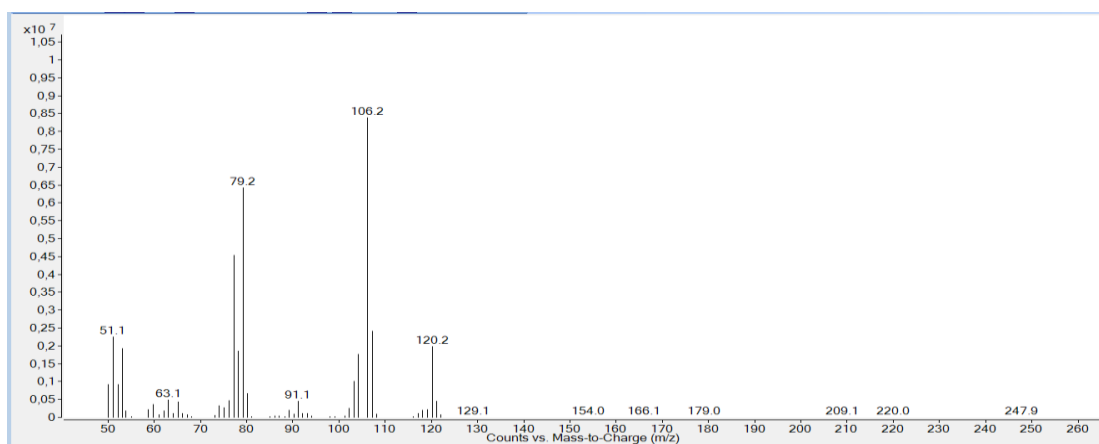
Nenhuma estereosseletividade foi observada com essas NHases que são comumente inespecíficas com substratos quirais.⁷⁰ Propõe-se que o NHase possua um bolsão espaçoso capaz de aceitar uma ampla gama de substratos, mas com nenhuma ou baixa enantiosseletividade.⁷¹ Entretanto, essa característica se torna interessante quando combinada com uma segunda enzima enantiosseletiva em um processo em cascata, pois, se ambas enzimas apresentarem seletividade, ocorreria uma reação enantioespecífica com conversão teórica máxima de 50%.

4.4. Triagem dos extratos enzimáticos e enzimas comerciais de ω -TA

Antes de iniciar a triagem com os extratos enzimáticos de ω -TA e com as enzimas isoladas, realizou-se um experimento controle com os possíveis doadores

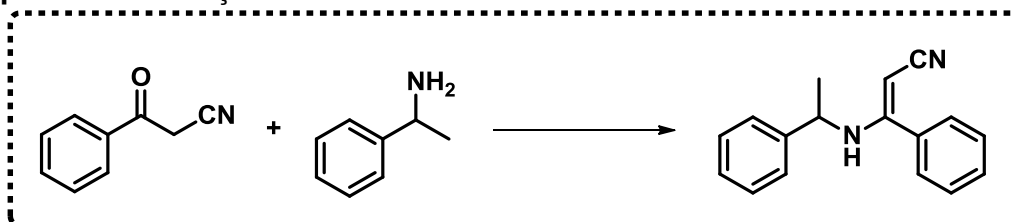
amino (isopropilamina e feniletilamina), com a finalidade de verificar se os mesmos não reagiriam com o substrato **1**. Após análise pelo GC-MS (Figura 10), pôde-se concluir que ocorreu reação entre o substrato **1** e a feniletilamina onde foi possível observar alguns sinais característicos da enamina formada, como o pico molecular de razão m/z 248. Além disso, outros picos que não foram identificados apareceram no cromatograma da feniletilamina.

Figura 10: Espectro de massas da enamina formada



A reação que provavelmente ocorreu entre o substrato **1** e a feniletilamina é representada no Esquema 16 abaixo.

Esquema 16: Reação entre o substrato **1** e a feniletilamina



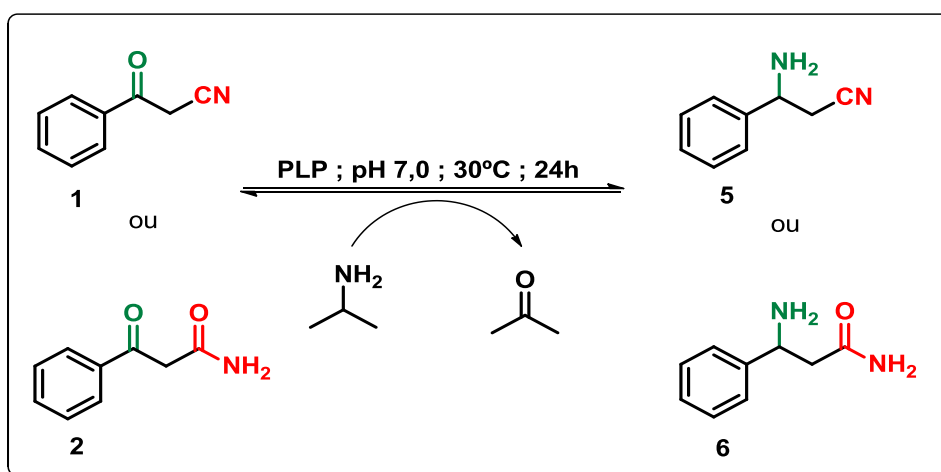
Fonte: Autor, 2018

Em relação ao teste com a isopropilamina, somente um pico foi visualizado correspondente ao substrato **1**. Dessa forma, a isopropilamina passou a ser utilizada como doador amino nas reações de aminação redutiva da carbonila, pois a mesma não reagiu com o substrato.

As triagens foram realizadas com 5 extratos enzimáticos de ω -TA e 4 enzimas isoladas comerciais para a aminação redutiva da carbonila dos substratos **1** e **2**

(Esquema 17). As enzimas ω -TA dos extratos enzimáticos utilizados são provenientes dos microrganismos *Aspergillus terreus*, *Mycobacterium vanbaalenii* que são (R) - seletivas e *Chromobacterium violaceum*, *Vibrio fluvialis* e *Ruegeria pomeroyi* que são (S)-seletivas. As enzimas isoladas são provenientes de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Neosartorya fischeri* e *Penicillium chrysogenum*. Utilizou-se a metodologia descrita por Teixeira.⁶⁶

Esquema 17: Reação geral para a aminação redutiva da carbonila de **1** e **2** catalisada por ω -TA



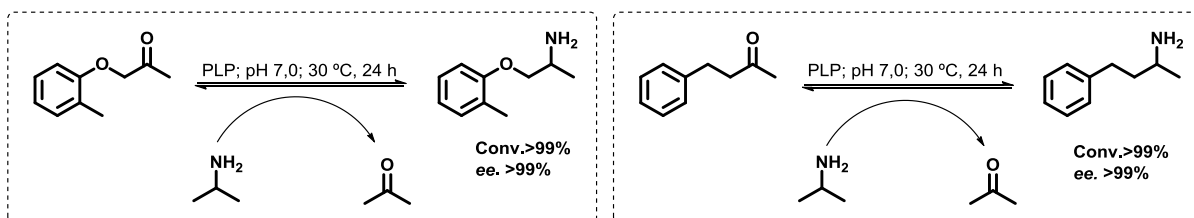
Condição reacional (extrato enzimático): substrato **1** ou **2** (4,5 mg; 20 mM), DMSO (15 μ L), PLP (15 μ L), isopropilamina (39 μ L) e extrato enzimático (q.s.p. 1,5 mL). Condição reacional (enzima isolada): substrato **1** ou **2** (1,5 mg; 17 mM), DMSO (6 μ L), PLP (2,5 μ L), isopropilamina (75 μ L) enzima (2,0 mg), tampão (400 μ L). Para mais detalhes ver materiais e métodos

O equilíbrio desfavorável é um dos maiores desafios para realizar sínteses assimétricas, entretanto, algumas estratégias vêm sendo desenvolvidas para favorecer a formação dos produtos no equilíbrio.⁴⁹ Dentre essas estratégias, há a que utiliza um excesso de doador amino, por ser um método simples e eficiente. Porém, o aumento da concentração do doador amino pode afetar a atividade da enzima devido a inibição do substrato. Além da simplicidade e custo ao utilizar a isopropilamina como doador amino, a mesma é oxidada a acetona e, sendo um composto volátil, pode ser removida facilmente da reação, contribuindo para o favorecimento da formação do produto no equilíbrio.⁴⁹

Outro detalhe a ser considerado é que o pKa da isopropilamina é de 10,6 e o pH da reação torna-se bastante alcalino (12) quando adicionada no meio reacional

que é um pH não muito comum para as enzimas. Não foi observada nenhuma conversão dos substratos avaliados. Contudo, Teixeira⁷² obteve altas conversões e excelentes ee com a mesma metodologia utilizada e os mesmos extratos enzimáticos, utilizando o substrato 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona que se enquadra no postulado de Shinn estruturalmente. Além desse resultado, obteve conversão e ee >99% com o substrato 4-fenil-2-butanona utilizando a enzima isolada de *A. fumigatus* (Esquema 18).

Esquema 18: Aminoação redutiva do substrato 1-(2-metilfenoxi)-2-propanona catalisada pelos extratos enzimáticos. Aminoação redutiva da carbonila do substrato 4-fenil-2-butanona catalisada por *A. fumigatus*.



Portanto, aparentemente o principal parâmetro que está influenciando na catálise da reação é a estrutura molecular dos substratos. O que provavelmente pode ter acontecido é que nem o substrato **1** nem o **2** estão de acordo com o postulado proposto por Shin que diz que o sítio catalítico de uma ω -TA é constituído de dois bolsões, um maior e outro menor, como representado na Figura 11. Bons substratos para a enzima são aqueles que possuem duas regiões de tamanhos distintos ao redor da carbonila, de modo que possam interagir efetivamente no sítio catalítico, sendo que o substituinte menor, vital no reconhecimento do substrato, não deve ser maior do que um grupo etila.⁵⁵

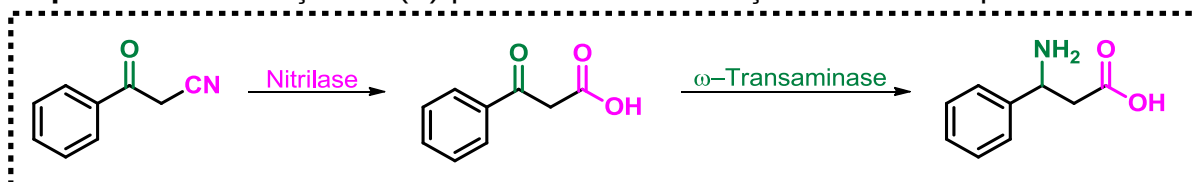
Figura 11: Bolsões do sítio catalítico da enzima ω -Ta



Fonte: (MALIK, M. S.; PARK, E. S.; SHIN, J. S, 2012)⁵⁵

Em contrapartida, Zhang e colaboradores⁵⁰ obtiveram o composto (S)- β -fenilalanina a partir de **1**, utilizando as enzimas nitrilase e ω -TA em um processo de reações em cascata (Esquema 19). Provavelmente, o ácido carboxílico mimetiza de forma eficiente um aminoácido e isso não ocorre quando há nitrila ou amida.

Esquema 19: Obtenção da (S)- β -fenilalanina via reação em cascata partindo de **1**

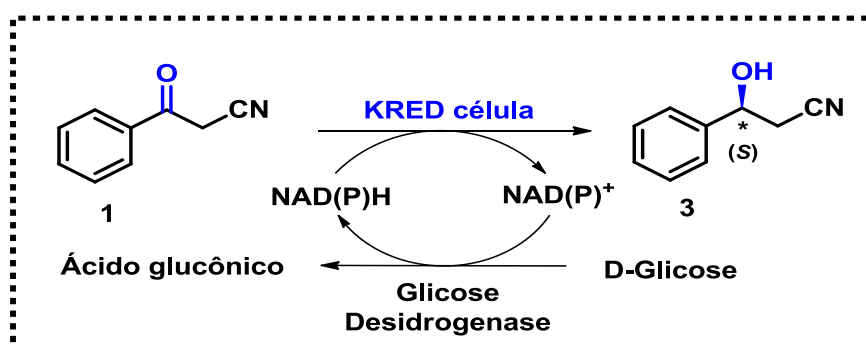


Fonte: Autor, 2018

4.5. Triagem de microrganismos contendo KRED

Para a redução da carbonila do substrato **1** e formação do álcool secundário correspondente **3** utilizou-se 4 microrganismos, sendo: *Saccharomyces cerevisiae* tipo II comercialmente disponível pela Sigma-Aldrich® (célula liofilizada), *Bacillus cereus*, MLH 15 e *Lysinibacillus boronitolerans*, sendo esses três últimos microrganismos na forma de biomassa úmida e pertencentes a coleção do Milagre Research Group. Para a redução assimétrica da carbonila do composto **1** e formação do produto **3** (Esquema 20) utilizou-se a metodologia descrita por Milagre⁷³ para os quatro microrganismos.

Esquema 20: Reação geral para a redução assimétrica da carbonila de **1** para formação de (S)-**3**



Condição reacional: para *S. cerevisiae*: substrato **1** (12 mg; 4 mM), DMSO (330 μ L), D-glicose (1 g), tampão fosfato de sódio (PBS) (20 mL), forma liofilizada de *S. cerevisiae* (800 mg). Para os demais microrganismos: substrato **1** (38 mg; 5,2 μ M), DMSO (1,0 mL), glicose (2,5 g), tampão fosfato de sódio (PBS) (50 mL), célula íntegra (5 g). O tempo de reação foi de 72 horas. Para mais detalhes, veja materiais e métodos.

^a Configuração absoluta foi determinada pela análise de $[\alpha]_D^{21}$ e comparada com a literatura

A redução estereosseletiva de cetonas pró-quirais no álcool correspondente catalisadas por KRED é uma ferramenta bem estabelecida na síntese orgânica.⁷³ A redução biocatalítica de β -cetonitrilas tem sido explorada tanto com enzimas quanto com células íntegras. Esta última abordagem apresenta a vantagem de que o cofator NAD(P)H é regenerado naturalmente pela célula.^{1;10;75}

Os microrganismos *B. cereus* e MLH15 praticamente forneceram os mesmos valores de conversão e ee. (Tabela 3, Figuras 12 e 13). Na reação com *B. cereus* a conversão foi de 26% e ee de 92% do enantiômero **(S)-3**. Com o microrganismo MLH 15 a conversão foi de 23% e novamente 92% do enantiômero **(S)-3**. O pH tornou-se mais ácido a medida que a reação se processava com os microrganismos que apresentaram atividade catalítica e converteram **1** em **(S)-3**. Com a levedura *S. cerevisiae* o pH ficou em 5 e com os microrganismos *B. cereus* e MLH 15 em 6. O pH da reação com *L. boronitolerans* manteve-se em 7 durante as 72 horas de reação e o mesmo não apresentou atividade catalítica.

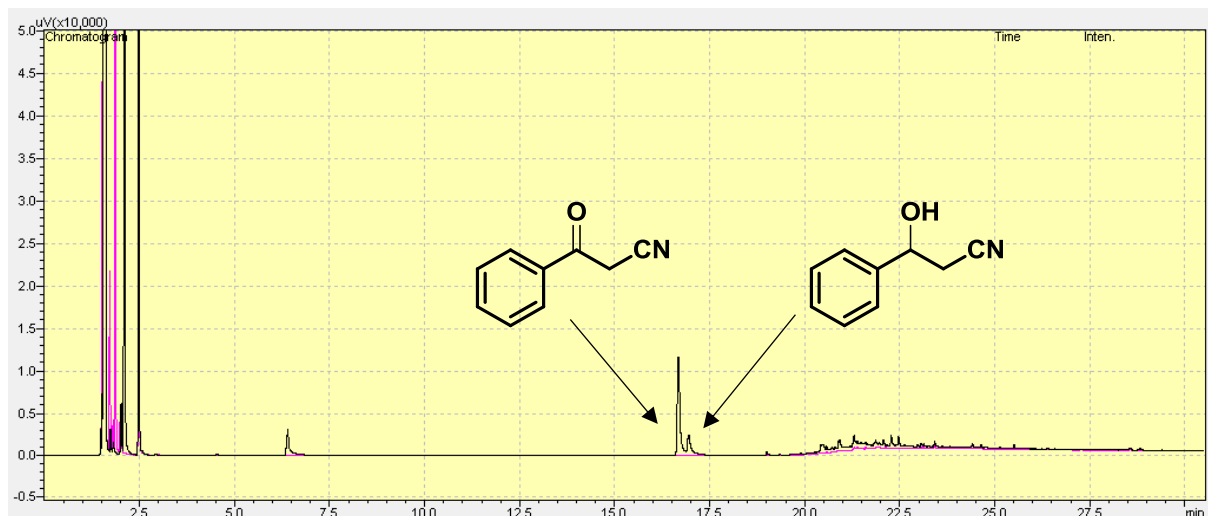
Tabela 3: Conversões e ee do substrato **1** em **(S)-3** catalisada pelos microrganismos contendo KRED

Entrada	Microrganismo	Conversão (%) ^a	ee (%) ^b
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5	87 (S)-3
2	<i>Bacillus cereus</i>	26	92 (S)-3
3	MLH 15	23	92 (S)-3
4	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	0	0

^a Conversões foram determinadas pela análise GC-FID

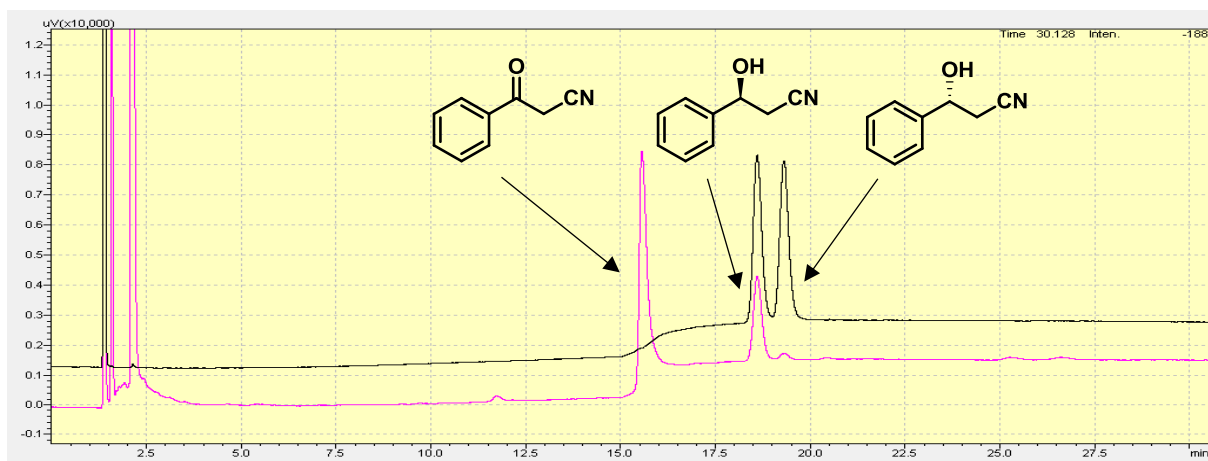
^b O excesso enantiomérico foi determinado por análise GC-FID quiral

Figura 12: Conversão de **1** em **(S)**-**3** utilizando *B. cereus* ou MLH 15



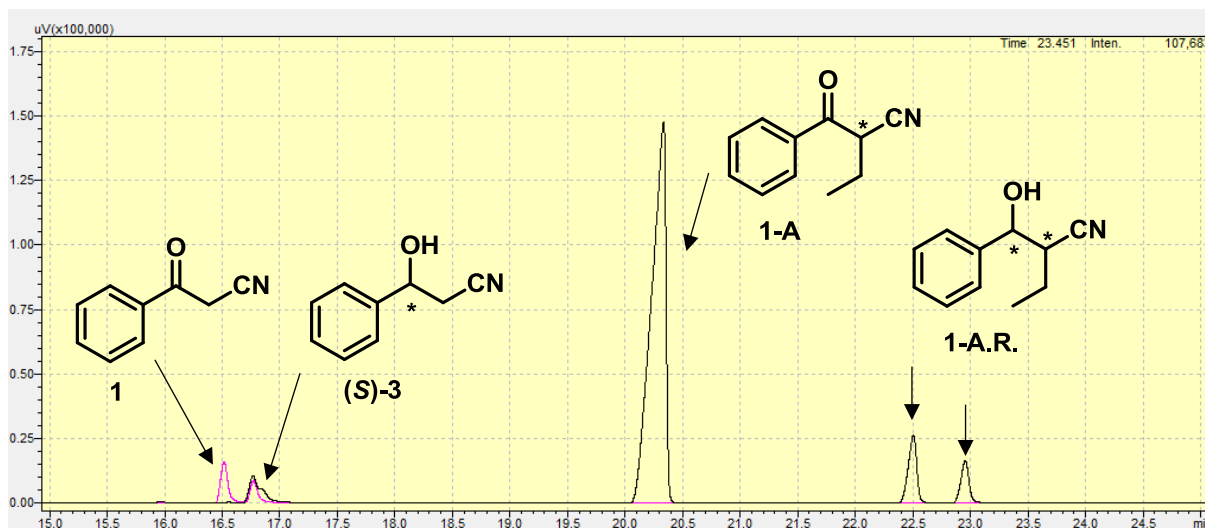
Um experimento foi realizado com *B. cereus* utilizando o substrato **2**, entretanto, nenhuma conversão foi observada. A alteração da nitrila pela amida primária fez com que nenhuma atividade catalítica fosse demonstrada na condição reacional utilizada.

Figura 13: Determinação do ee dos microrganismos *B. cereus* e MLH 15



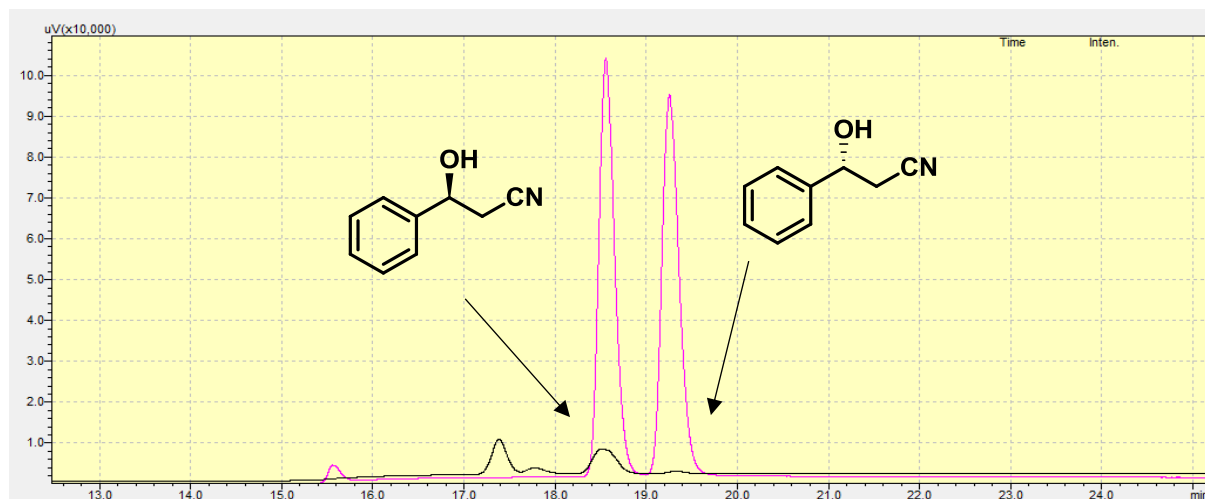
Em relação à *S. cerevisiae*, a conversão de **1** em **(S)**-**3** foi de 5% e o ee foi de 87% (Tabela 3, Figuras 14 e 15). O microrganismo *S. cerevisiae* catalisou majoritariamente a reação de alquilação do substrato **1**, levando a formação de uma ligação C-C em duas etapas. (maiores detalhes a partir da página 49)

Figura 14: Cromatograma da reação da *S.cerevisiae* com substrato **1** após 72 horas.

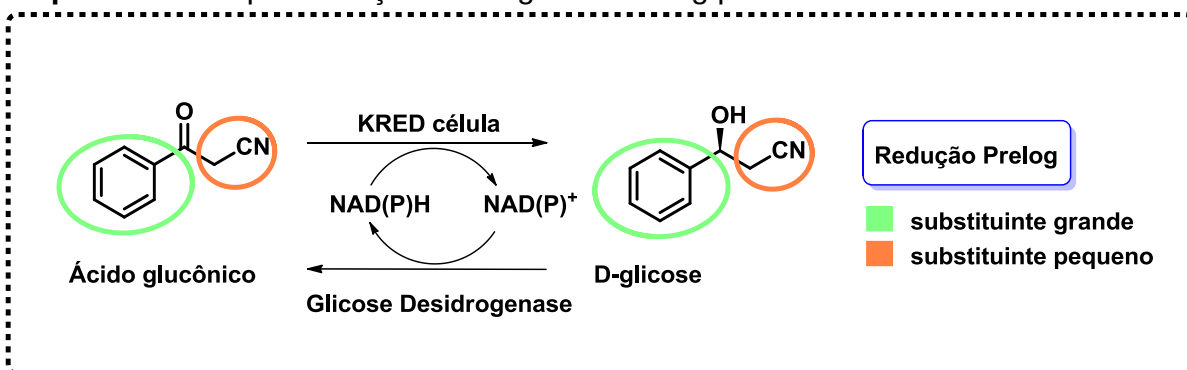


Após realizar a análise de $[\alpha]_D^{21}$, confirmou-se que todos os microrganismos catalisaram a formação do enantiômero **(S)-3**, estando de acordo com a literatura.⁷⁵

Figura 15: Determinação do excesso enantiomérico da *S. cerevisiae*

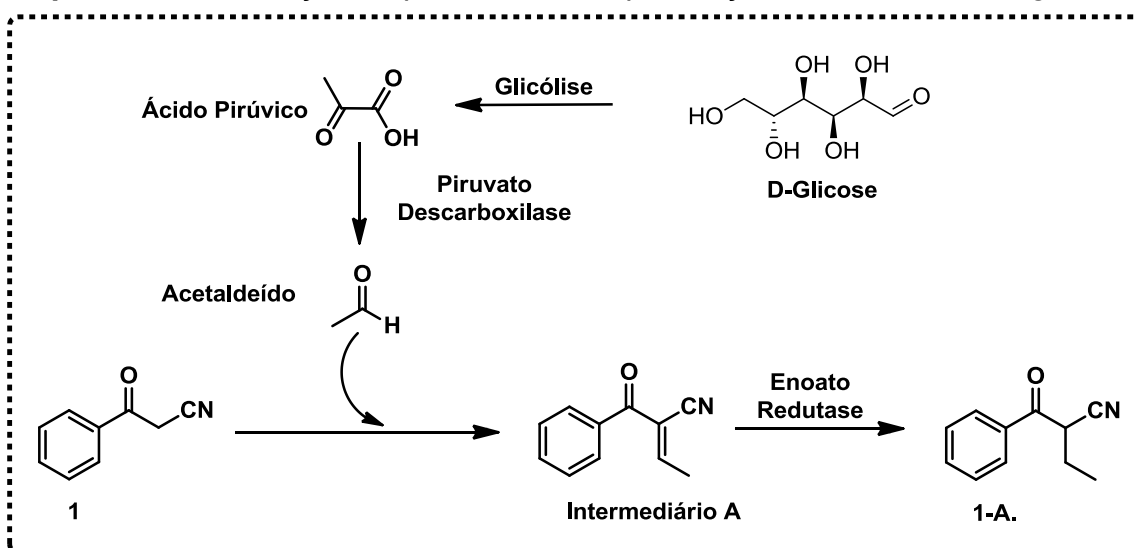


A Regra de Prelog explica a seletividade de acordo com o ataque do hidreto, podendo ser na face re ou si. No Esquema 21 abaixo, está representada a face si do substrato **1**. O ataque do hidreto acontece pelo lado menos volumoso ao redor da carbonila, neste caso, o ataque ocorreu pelo lado do ligante $-\text{CH}_2\text{CN}$, levando a formação do produto (S), ou produto Prelog.

Esquema 21: Representação da Regra de Prelog para estereosseletividade

Fonte: Adaptado de (MATSUDA; YAMANAKA; NAKAMURA; 2009)⁷⁵

Como dito anteriormente, o microrganismo *S. cerevisiae* catalisou majoritariamente a formação do produto 2-benzoilbutanonitrila (**1-A**) em um processo em duas etapas, conforme representado no Esquema 22. A glicose, ao ser metabolizada na via glicolítica do microrganismo, é transformada em ácido pirúvico e posteriormente em acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase. Na sequência, o acetaldeído reage com o substrato **1** formando o produto 2-benzoilbut-2-enenitrila (**Intermediário A**), a partir de uma condensação aldólica não enzimática catalisada por ácido. Em seguida, a ligação dupla C=C do intermediário recém-formado sofre redução catalisada pela enzima enoato-redutase, levando a formação do composto racêmico **1-A**.^{65;76}

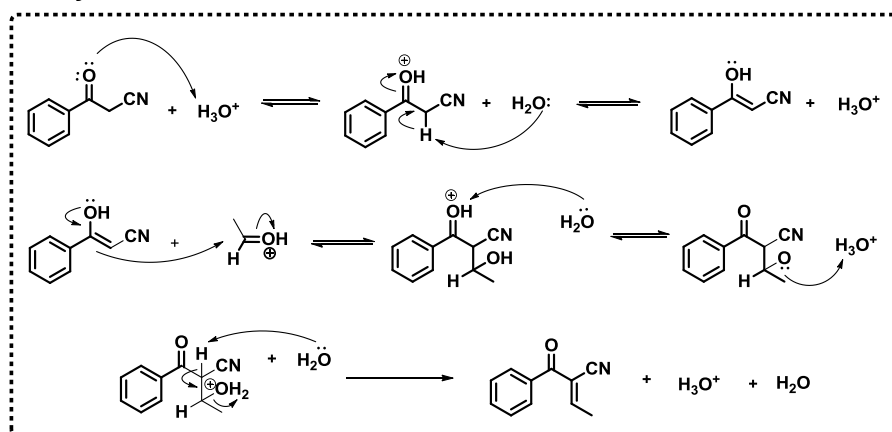
Esquema 22: Formação do produto **1-A** na presença de *S. cerevisiae* e glicose

Fonte: Adaptado de (SERRA, et al, 2016)⁷³

O mecanismo proposto para a condensação aldólica ácida na primeira etapa da reação de alquilação encontra-se representado abaixo no Esquema 23 e a redução da ligação dupla C=C catalisada pela enzima enoato-redutase no Esquema 24.

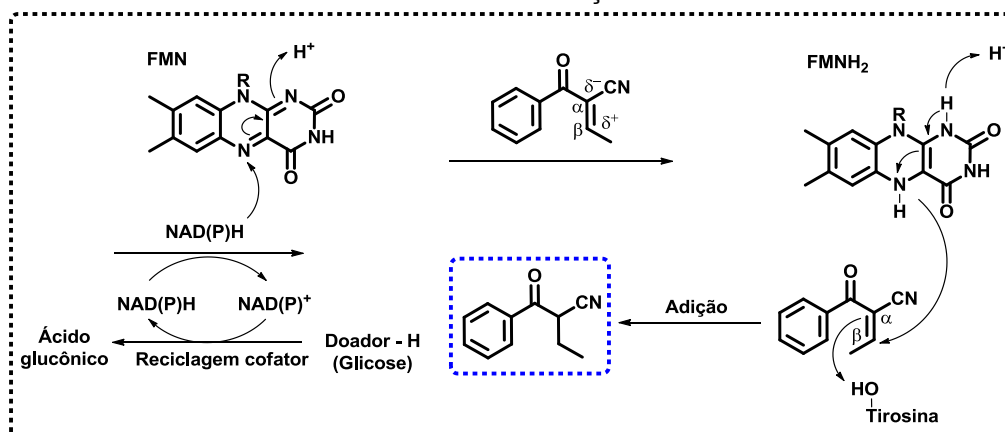
Na literatura é descrito que a levedura *S. cerevisiae* catalisa somente a formação do produto alquilado **1-A**.^{1-2;8-9;65;73;78-80} Rimoldi e colaboradores⁹, relataram a atividade de diversas leveduras frente ao substrato 3-oxo-3-(tiofen-2-il)-propanonitrila levando a formação do produto 2-(tiofeno-2-carbonil)-butanonitrila. A levedura *S. cerevisiae* Zeus forneceu somente o produto alquilado correspondente. Entretanto, Dehli e Gotor⁸¹ observaram que o fungo *Curvularia lunata* catalisa a formação do produto 2-(hidroxifenilmetil)butanonitrila (**1-A.R.**) (Figura 14), utilizando **1** como substrato. Após otimização de alguns parâmetros da reação, conseguiram obter o composto **1-A.R.** como único produto da reação com ee (*R,R*) 98% e d.r. *anti* (98:2)

Esquema 23: Proposta mecanística para a primeira etapa da formação do produto **1-A** via condensação aldólica ácida.



Fonte: Autor, 2018

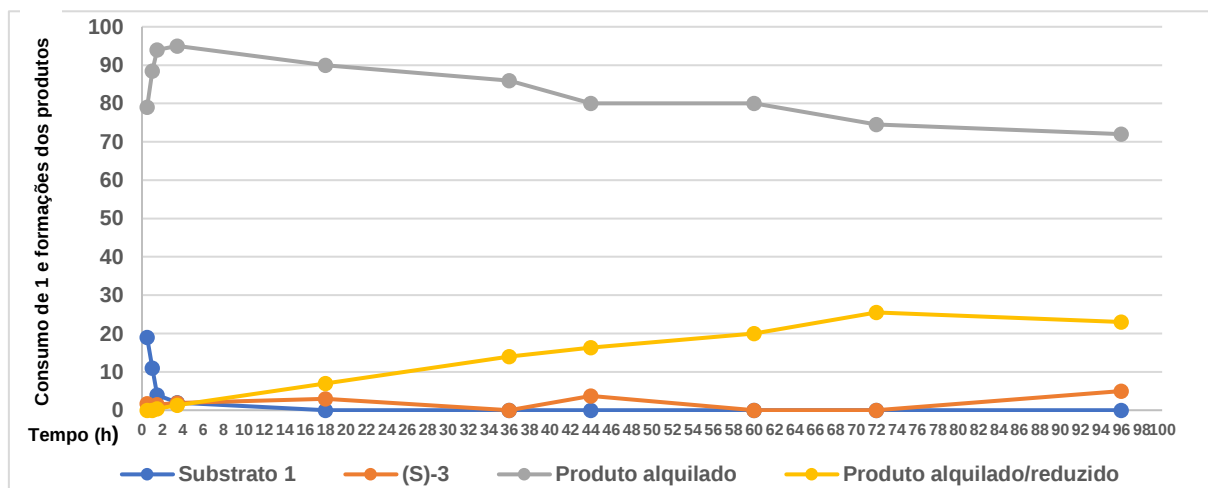
Esquema 24: Ciclo catalítico da enzima enoato redutase para redução da ligação dupla C=C do **Intermediário A** levando a formação de **1-A**



Fonte: Adaptado de (HALL, et al, 2006)⁷⁷

Contudo, também observamos a formação do produto proveniente da reação de alquilação/redução do substrato **1**, catalisada pelas enzimas KRED/Enoato-Redutase, ou seja, o composto **1-A.R.**, que foi o segundo composto formado em maior quantidade. Durante o monitoramento das reações com *S. cerevisiae*, foi possível verificar que a concentração de **1-A.** diminui e a de **1-A.R.** aumenta (Figura 16). Nas primeiras reações com *S. cerevisiae* o monitoramento foi realizado em intervalos longos (18, 36, 44, 60 e 72 horas), sendo mantida até 96 horas com intuito de verificar se ocorreria um aumento na formação do produto **1-A.R.** Entretanto, a conversão de **1** em **1-A.R.** atingiu 25% em 72 horas e permaneceu praticamente inalterada até 96 horas (23%). No produto bruto extraído havia uma mistura dos compostos **1-A** (72%) **1-A.R.** (23%) e **(S)-3** (5%). Não foi possível isolar esses compostos utilizando CCDP para obtê-los de forma pura e caracterizá-los. Então, sabendo que na literatura⁷³ já havia sido descrita uma fase móvel para a separação dos compostos **1** e **1-A.** e baseando-se na alíquota de 18 horas, onde a formação de **1-A.** é em torno de 90%, decidimos investigar os instantes iniciais da reação na tentativa de obter pelo menos um dos compostos puros. Sendo assim, três reações foram realizadas e interrompidas a cada 30 minutos. No produto bruto obtido na reação de 30 minutos haviam os compostos **1** (19,2%), **1-A** (79%) e **(S)-3** (1,7%). Na reação de 60 minutos, a composição era novamente de **1** (11%), **1-A** (88,5%) e **(S)-3** (0,5%) e, após 90 minutos, o produto bruto obtido era composto de **1** (4%), **1-A** (94%), **1-A.R.** (0,4%) e **(S)-3** (1,5%).

Figura 16: Consumo de **1** e formação dos produtos **1-A.**, **1-A.R.**, **(S)-3** de 0,5 a 96 horas de reação



Fonte: Autor, 2018

Em seguida, realizou-se a purificação, de forma separada, dos produtos brutos das reações de 30 e 60 minutos e uma amostra foi preparada e analisada de cada purificação. O perfil de ambas foi bastante semelhante, apresentando pureza de 97%. Junto com o composto havia uma impureza que aparentemente é derivada do metabolismo do microrganismo por estar em algumas alíquotas retiradas para monitoramento da reação e na reação controle.

A caracterização deste composto foi realizada com pureza de 97%, utilizando RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135, GC-MS, LC-MS e IV e comparada com a literatura.⁸² No espectro de RMN de ^1H (Apêndice-Espectro Y), observa-se um tripleto em 1,14-1,20 ppm referente ao H-11 do CH_3 se acoplando com o H-10 do CH_2 com $J=7,4$ Hz. Em 2,02- 2,17 ppm, observa-se um multipeto, integrando para os dois hidrogênios diastereotópicos referentes ao H-10. Em 4,27-4,37 ppm observa-se um duplo dubleto, referente ao H-2 do centro assimétrico acoplando com H-8 com $J=7,9$ e 4,0 Hz. Por fim, em 7,53-8,0 ppm observa-se um multipeto integrando para os cinco hidrogênios do anel aromático. No espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice-Espectro Z) observou os seguintes deslocamentos, em ppm: 11,7 (CH_3 - C-11), 23,7 (CH_2 - C-10), 41,6 (CH - C-2), 117,3 (CN - C-1), 128,8 (C6 e C8 - Ar), 129,2 (C5 e C9 - Ar), 134,2 (C7- Ar), 135,6 (C4 - C_0) e 190,9 (C=O - C_0).

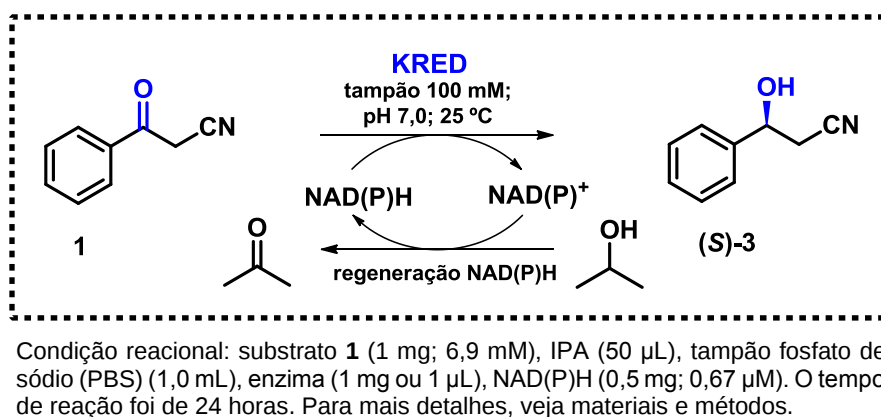
O espectro de massas (Apêndice-Espectro AB) apresentou o sinal do íon molecular com m/z (%)173 (0,19) e, além desse, os fragmentos característicos com m/z (%) 171 (0,71), 145 (0,71), 105 (100), 77 (43) e 51 (13). No espectro no IV (Apêndice-Espectro AC) observa-se a presença algumas bandas de absorção em 2976, 2837 e 2870 cm^{-1} relativa ao estiramento da ligação CH. Além dessa, observa-se a banda da nitrila em 2240 cm^{-1} , características do estiramento da ligação CN e a carbonila da cetona em 1689 cm^{-1} .

Após a caracterização de **1-A**, foi realizada uma reação com NaBH_4 e constatou-se que os outros dois sinais aproximadamente em 22,5 e 23,0 minutos na Figura 13, correspondiam aos diastereoisômeros do produto **1-A.R**. Os diastereoisômeros não foram isolados.

4.6. Triagem com as enzimas KRED isoladas

Três enzimas KRED isoladas foram avaliadas em relação ao potencial catalítico de redução assimétrica da carbonila do substrato **1** (Esquema 25). Diferentes volumes de álcool isopropílico (IPA) foram utilizados para auxiliar na reciclagem do cofator NAD(P)H e como cossolvente para a solubilização do substrato.

Esquema 25: Reação Geral para redução assimétrica da carbonila de **1** para (**S**)-**3** utilizando a enzima KRED



. Os volumes de IPA utilizados foram 50 e 200 μ L, correspondendo a 5 e 20%, respectivamente, do volume do tampão da reação. O volume de 5% foi utilizado por Rodríguez e colaboradores⁸³ e o de 20% foi baseado no guia de protocolos da Codexis®.⁸⁴ Não foi observada nenhuma conversão do substrato **1** no produto **3** com as enzimas KRED de *S. cerevisiae* e de horse liver. Entretanto, a enzima KRED recombinante catalisou a redução assimétrica de **1** em (**S**)-**3** com conversão e ee >99% utilizando 5% de IPA (Tabela 4)

Quando foi utilizado 20% de IPA, a conversão foi de cerca de 90%. Presumivelmente, foi um volume elevado de IPA e resultou na desnaturação da enzima. Nas duas condições reacionais utilizadas e para as três enzimas foi possível observar após 40 minutos de reação a formação de um precipitado branco em suspensão no meio reacional.

Um experimento foi realizado com a KRED recombinante frente ao substrato **2**. Assim como ocorreu com o microrganismo *B. cereus*, nenhuma conversão foi observada após a substituição da nitrila pela amida primária.

Tabela 4: Conversões e ee de **1** para **(S)-3** catalisada pelas enzimas KRED

Entrada	Enzima	Conversão (%) ^a	ee (%) ^b
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	0
2	Horse Liver	0	0
3	Recombinante	>99	>99 (S)-3

^a Conversões foram determinadas pelo GC-FID.

^b O excesso enantiomérico foi determinado por análise GC-FID quiral.

Rodríguez e colaboradores⁸³ obtiveram conversão de 70% de **1** em **(R)-3** com a KRED de *Lactobacillus brevis* após 48 horas, utilizando 5% IPA. Bisogno e colaboradores⁸⁵ utilizaram o octan-2-ol racêmico como co-solvente e para auxiliar na regeneração do cofator para obter o produto **(S)-3** de **1** e o octan-2-ol opticamente puro via resolução cinética. A conversão foi de 78% e ee >99% após 24 horas. Ankati e colaboradores¹⁰ também obtiveram **(S)-3** com ee >99% e rendimento 83% utilizando o sistema glicose/GDH após 48 horas.

A enzima KRED de *S. cerevisiae* e horse liver são dependentes do cofator NADH e a KRED recombinante de NADPH. Esses cofatores são necessários apenas em quantidades catalíticas quando sua regeneração é acoplada à oxidação de IPA em acetona, servindo como redutor do cofator no ciclo catalítico. Isso torna o processo mais econômico, já que uma segunda enzima, como a glicose desidrogenase (GDH) não é necessária para regenerar o cofator. Portanto, a grande vantagem do IPA sobre o sistema glicose/GDH para a reciclagem de cofator é o custo. Além disso, não é necessário o controle de pH, pois não é gerado o ácido glucônico como ocorre na oxidação da glicose catalisada pela GDH. Como algumas KRED necessitam de Mg²⁺ para manter a atividade catalítica^{83;85} como, por exemplo, as oriundas dos microrganismos *Lactobacillus brevis*, *Rhodococcus ruber* e *Thermoanaerobacter sp.*, decidimos adicionar íons Mg²⁺ no meio reacional, uma vez que a empresa Sigma-Aldrich® não pôde fornecer a origem da enzima KRED recombinante.

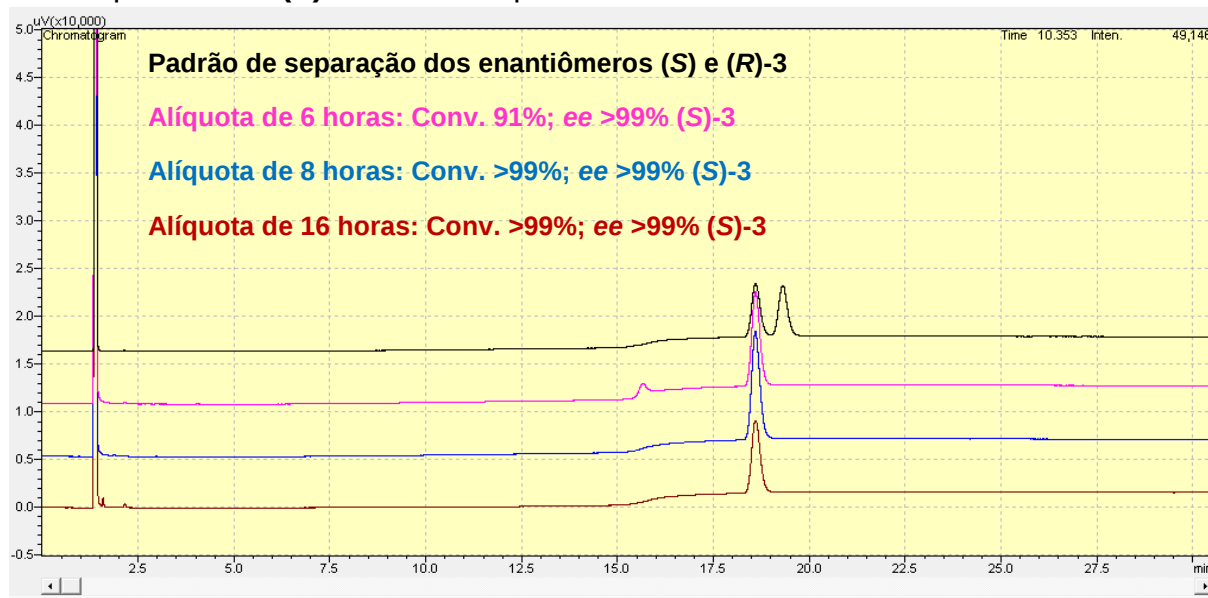
4.7. Desenvolvimento das reações em cascata simultânea e sequencial para obtenção do bloco construtor (S)-4

Após o término das triagens com as enzimas, extratos enzimáticos e microrganismos, iniciou-se o desenvolvimento das reações em cascata. Em relação à escolha das enzimas para a síntese do bloco construtor **(S)-4**, tínhamos somente uma opção na escolha da KRED, entretanto, diversas NHases poderiam ser utilizadas no desenvolvimento das reações em cascata. A NHase escolhida foi a E0257 devido a maior disponibilidade em nosso laboratório.

Nossa primeira tentativa de obtenção do enantiômero puro **(S)-4** a partir de **1** foi utilizando a abordagem de reação em cascata simultânea, uma vez que não houve incompatibilidade de tampão, valores de pH e temperatura de reação entre as enzimas KRED recombinante e NHase E0257. A formação do composto **2** foi observada na primeira hora de reação com conversão de 92% e, após duas horas, toda massa do substrato **1** havia sido convertida em **2**. Como esperado, mesmo após 24 horas, o composto **2** foi o único produto detectado para esta condição de reação, devido a enzima KRED recombinante não ser ativa em relação a este substrato. Sabendo que a enzima KRED recombinante converteu o substrato **1** em **(S)-3** e o NHase E0257 é uma enzima não seletiva e reagiu com os substratos **1** e **(S)-3**, decidimos avaliar a abordagem de reação em cascata sequencial.

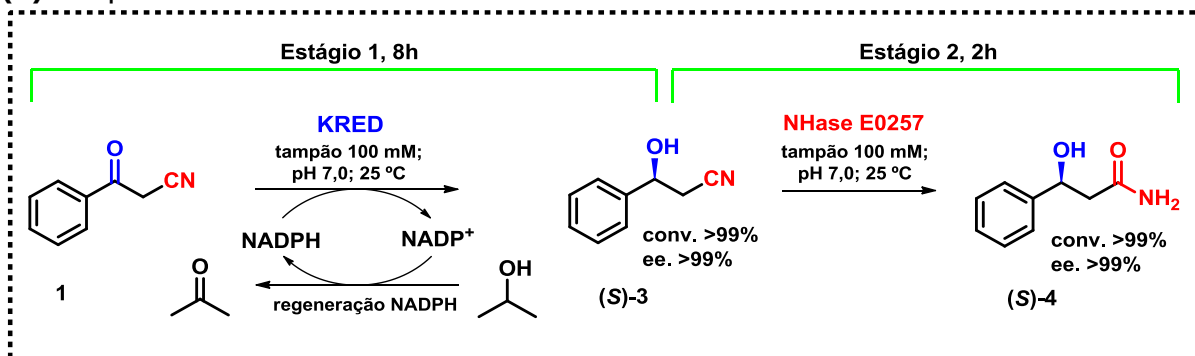
Até esse momento, tínhamos os resultados das triagens das enzimas com tempo de reação de 24 horas, portanto, foi necessário determinar o tempo de reação da enzima KRED recombinante frente ao substrato **1** e da NHase E0257 frente aos substratos **1** e **(S)-3**. Então, 3 experimentos foram realizados com a KRED recombinante a fim de verificar o tempo necessário para a conversão do substrato **1** no produto **(S)-3**. Os experimentos realizados foram de 6, 8 e 16 horas e observou-se que em 6 horas aproximadamente 90% do substrato **1** havia sido convertido em **(S)-3** e após 8 horas a conversão era de >99%. O ee foi determinado por GC-FID e manteve-se >99% para os três ensaios, como mostra a Figura 17. A configuração absoluta foi determinada no polarímetro e comparada com a literatura.⁶⁵

Figura 17: Determinação dos excessos enantioméricos para a redução assimétrica do composto **1** em **(S)**-**3** catalisada pela enzima KRED recombinante



Posteriormente, 6 experimentos foram realizados de hora em hora com a NHase E0257 frente ao substrato **1** e **(S)**-**3**. As conversões de ambos substratos apresentaram perfil muito idêntico e após 1 hora de reação, as conversões foram de 92% e em duas horas as conversões estavam >99%. Então, o composto **(S)**-**4** pôde ser obtido após 10 horas reacionais, sendo 8 horas no primeiro estágio para a redução assimétrica enantiosseletiva da carbonila de **1** em **(S)**-**3** e mais duas horas no segundo estágio para a hidratação da nitrila de **(S)**-**3** em **(S)**-**4** como mostra o Esquema 26 abaixo. A porcentagem do ee foi determinada por GC-FID quiral e manteve-se >99% em ambos os estágios. Novamente, a configuração absoluta foi determinada pela medida da rotação óptica no polarímetro e comparada com a literatura.¹³

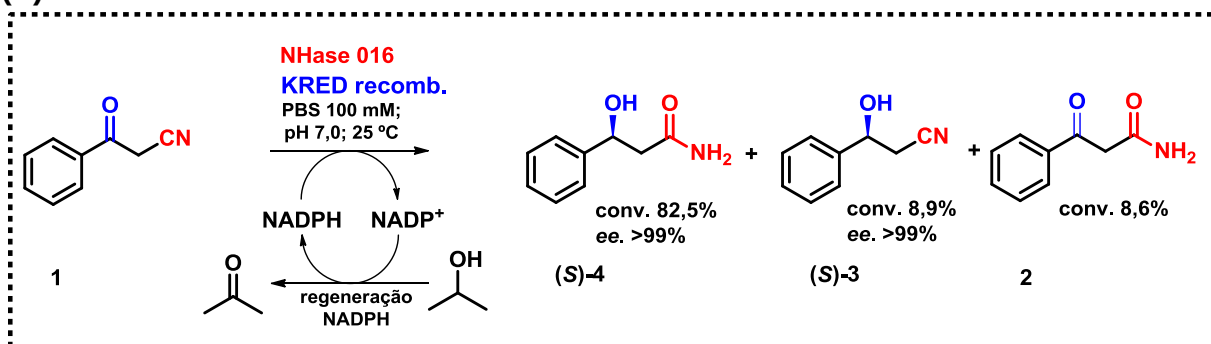
Esquema 26: Reação em cascata sequencial para a obtenção do bloco construtor (S)-4 a partir de 1



Fonte: Autor, 2018

Para que a reação em cascata multienzimáticas simultânea pudesse funcionar com a enzima KRED recombinante, seria ideal que houvesse uma enzima NHase com pouca atividade frente ao substrato **1** e alta atividade catalítica frente ao substrato **3**. Caso contrário, o composto **2** seria formado mais rapidamente e não seria mais possível a obtenção de (S)-4, uma vez que a enzima KRED recombinante não mostrou atividade frente a esse substrato. Sendo assim, a enzima NHase 016 se enquadra na condição inicialmente proposta, pois a conversão de **1** em **2** e *rac*-**3** em *rac*-**4** foi de 44 e 97%, respectivamente, após 24 horas. Portanto, baixa atividade no composto **1** e alta atividade no composto *rac*-**3**. Dessa forma, decidimos testar uma reação em cascata simultânea com esta enzima (Esquema 27). Então, um experimento foi realizado e após 24 horas observamos a conversão do substrato **1** nos compostos **2** (8,6%), (S)-**3** (8,9%) e (S)-**4** (82,5%). Portanto, uma segunda metodologia foi desenvolvida para a obtenção do bloco construtor (S)-4. O ee manteve-se em >99%.

Esquema 27: Reação em cascata simultânea para a obtenção do bloco construtor (S)-4 de 1



Fonte: Autor, 2018

As demais NHases mostraram alta atividade, isto é, acima de 90% para ambos os substratos e, provavelmente, não poderiam ser utilizadas em reação em cascata multienzimáticas simultânea, já que o composto **2** poderia ser formado rapidamente e, portanto, inibiria a atividade da enzima KRED recombinante.

A reação em cascata simultânea, ela é vista como sendo mais “elegante” pelo fato de que todos os reagentes e (bio)catalisadores são adicionados simultaneamente no início da reação, porém é necessário a otimização de alguns parâmetros do processo para que o composto **(S)-4** seja formado exclusivamente. Entretanto, adicionando todos os (bio)catalisadores ou não no início da reação, ambas apresentam as mesmas vantagens, que são: eliminação de etapas de extração e purificação, redução do uso de solventes, de energia, de espaço e tempo. Embora a reação em cascata multienzimáticas simultânea seja mais “elegante”, a reação em cascata multienzimáticas sequencial também é bastante interessante e, em nosso caso, foi a mais eficiente.

Futuramente, pretende-se ampliar o escopo de substratos para estas metodologias de reações em cascatas multienzimáticas, como por exemplo, realizar substituições no anel aromático adicionando grupos doadores e retiradores de elétrons em diferentes posições, substituir o anel aromático por heterociclos assim como adicionar substituintes na posição alfa dos substratos. Portanto, a partir desses resultados, há a possibilidade de realizar um estudo muito amplo e rico de natureza química que certamente contribuirá com a literatura científica e, possivelmente, com potencial aplicação industrial.

5. CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

- 11 ZHU, D.; ANKATI, H.; MUKHERJEE, C.; YANG, Y.; BIEHL, E. R.; HUA, L.; Asymmetric reduction of β -keto nitriles with a recombinant carbonyl reductase and enzymatic transformation to optically pure β -hydroxy carboxylic acids. **Organic Letters**, v. 9, n. 13, p. 2561-2563, maio. 2007.
- 12 MIRMASHHORI, B.; AZIZI, N.; SAIDI, M. R.; A simple, economical, and highly efficient synthesis of β -hydroxy nitriles from epoxide under solvent free conditions. **Journal of molecular catalysis A: Chemical**, v. 247, n. 1-2, p. 159-161, mar. 2006.
- 13 QUIRÓS, M.; REBOLLEDO, F.; LIZ, R.; GOTOR, V.; Enantioselective reduction of β -keto amides by the fungus *Mortierella isabelina*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 18, p. 3035-3038, set. 1997.
- 14 KAMILA, S.; ZHU, D.; BIEHL, E. R.; HUA, L.; Unexpected stereorecognition in nitrilase-catalyzed hydrolysis of β -hydroxy nitriles. **Organic Letters**, v. 8, n. 20, p. 4429-4431, set. 2006.
- 15 GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; CROCHET, P.; CADIerno, V.; Ruthenium-catalyzed synthesis of β -hydroxy amides from β - keto nitriles in water. **Organic Letters**, v. 18, n. 23, p. 6164-6167, nov. 2016.
- 16 GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; GONZÁLEZ-LISTE, P. J.; BERGE, J.; CROCHET, P.; CADIerno, V.; Chlorophosphines as auxiliary ligands in ruthenium-catalyzed nitrile hydration reactions: applications to the preparation of β -keto amides. **Catalysis Science & Technology**, v. 6, n.12, p. 4398-4409, fev. 2016.
- 17 SATHE, P. A.; KARPE, A. S.; PARAB, A. A.; PARED, B. S.; VADAGAONKAR, K. S.; CHASKAR, A. C.; Tandem synthesis of aromatic amides from styrenes in water. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 29, p. 2820-2823, jul. 2018.
- 18 SHARLEY, D. D. S.; WILLIAMS, J. M. J.; A selective hydration of nitriles catalyzed by a $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ -based system in water. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 43, p. 4090-4093, out. 2017.
- 19 KUMAR, D.; MASITAS, C. A.; NGUYEN, T. N.; GRAPPERHAUS, C. A.; Bioinspired catalytic nitrile hydration by dithiolato, sulfinato/thiolato, and sulfenato/sulfinato ruthenium complexes. **Chemical Communications**, v. 49, n. 3, p. 294-296, nov. 2012.
- 20 ROY, S.; ROY, S.; GRIBBLE, G. W.; Metal-catalyzed amidation. **Tetrahedron**, v. 68, n. 48, p. 9867-9923, dez. 2012.
- 21 HAMMOND, R. J.; POSTON, B. W.; GHIVIRIGA, I.; FESKE, B. D.; Biocatalytic synthesis toward both antipodes of 3-hydroxy-3-phenylpropanonitrile aprecursor to fluoxetine, atomoxetine and nisoxetine. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 7, p. 1217-1219, fev. 2007.

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

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

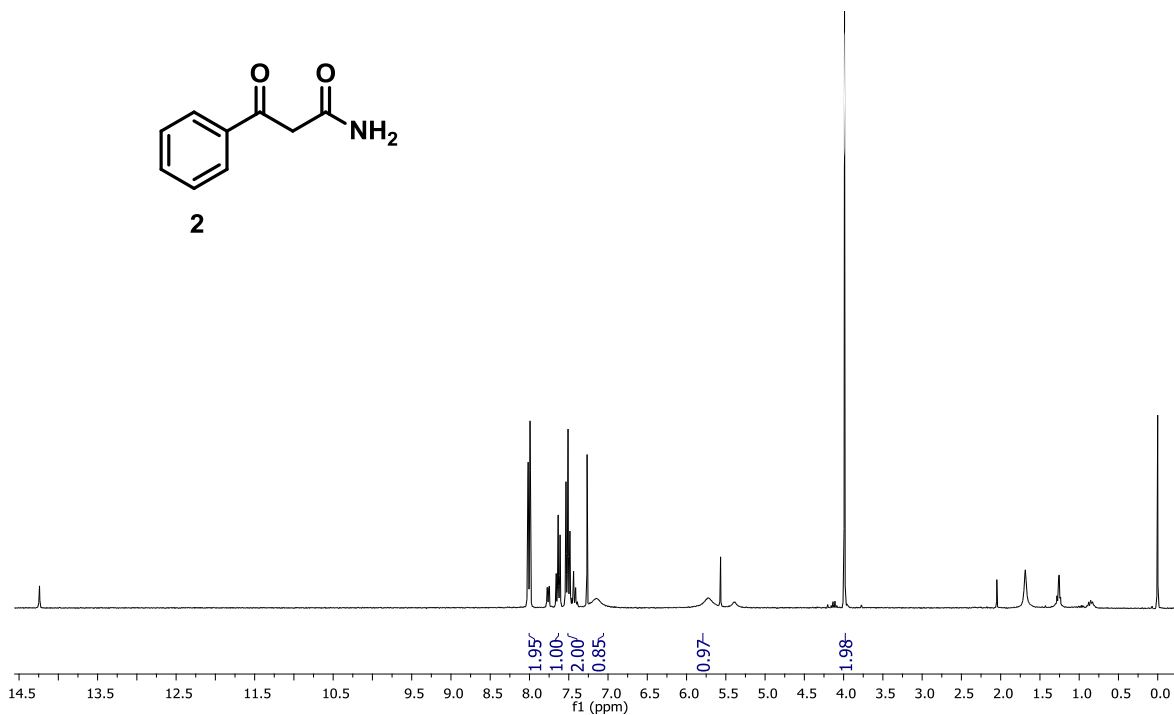
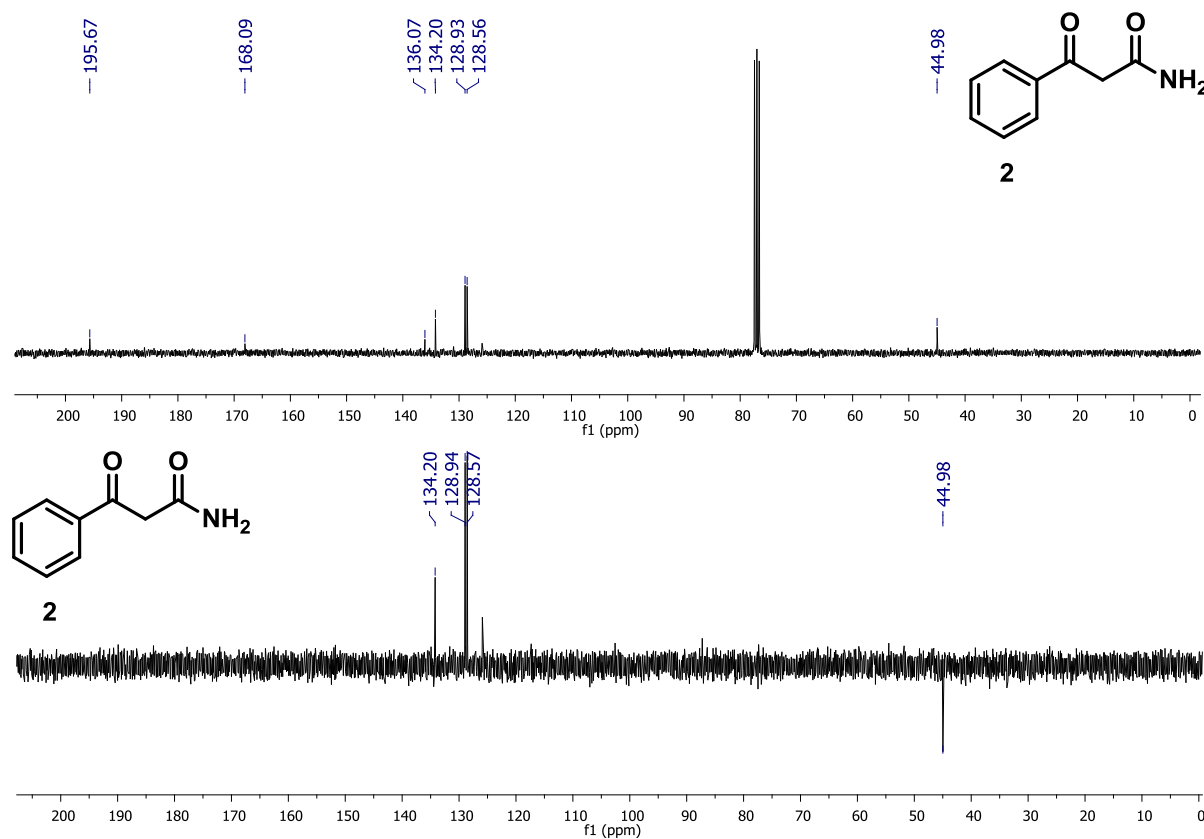
- 45 https://baranlab.org/wp-content/uploads/2018/02/Cascade_reactions_Reisberg2018.pdf Acesso: 01/12/2018.
- 46 SPERL, J. M.; SIEBER, V.; Multienzyme cascade reactions – status and recent advances. **ASC Catalysis**, v. 8, n. 3, p. 2385-2396, jan. 2018.
- 47 SCHMIDT, S.; CASTIGLIONE, K.; KOURIST, R.;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

- 56 FUCHS, M.; FARNBERGER, J. E.; KROUTIL, W. The industrial age of biocatalytic transamination. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 32, p. 6965–6982, 2015.
- 57 KOSZELEWSKI, D. et al. ω -Transaminases for the synthesis of non-racemic α -chiral primary amines. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 324–332, 2010.
- 58 BERGLUND, P.; HUMBLE, M. S.; BRANNEBY, C.; C-X bond formation: transaminases as chiral catalysts: engineering, and applications. **Comprehensive chirality**, v. 7, p. 390-400, 20012.
- 59 BROUSSY, S.; CHELOHA, R. W.; BERKOWITZ, D. B.; Enantioselective, ketoreductase-based entry into pharmaceutical building blocks: ethanol as tunable nicotinamide reductant. **Organic Letters**, v. 11, n. 2, p. 305-308, 2009.
- 60 HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E.; HOLTMANN, D. Enzymatic reductions for the chemist. **Green Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 2285–2314, jul.2011.
- 61 GONZÁLEZ-VERA, J. A.; GARCÍA-LÓPEZ, M. T.; HERRANZ, R.; Molecular diversity via amino acid derived α -amino nitriles: synthesis of spirocyclic 2,6-dioxopiperazine derivatives. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 9, p. 3660-3666, mar.2005.
- 62 WILGUS, C. P.; DOWNING, S.; MOLITOR, E.; BAINS, S.; PAGNI, R. M.; KABALKA, G. W.; The acid-catalyzed and uncatalyzed hydrolysis of nitriles on unactivated alumina. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 20, p. 3469-3472, maio.1995.
- 63 KUKUSHKIN, V. Y.; POMBEIRO, A. J. L.; Metal-mediated and metal catalyzed hydrolysis of nitriles. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, n. 1, p. 1-21, jan.2005.
- 64 COADY, T.M.; COFFEY, L. V.; O'REILLY, C.; LENNON, C. M.; Substrate evaluation of *Rhodococcus erythropolis* SET1, a nitrile hydrolyzing bacterium, demonstrating dual activity strongly dependent on nitrile sub-structure. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 5, p. 1108-1116, jan.2015.
- 65 CONTENTE, M. L.; SERRA, I.; MOLINARI, F.; GANDOLFI, R.; PINTO, A.; ROMANO, D.; Preparation of enantiomerically enriched aromatic β -hydroxynitriles and halohydrins by ketone reduction with recombinant ketoreductase KRED1-Pglu. **Tetrahedron**, v. 72, n 27-28, p. 3974-3979, jul.2016.
- 66 MIRIYALA, B.; BHATTACHARYYA, S.; WILLIAMSON, J. S. Chemoselective reductive alkylation of ammonia with carbonyl compounds: synthesis of

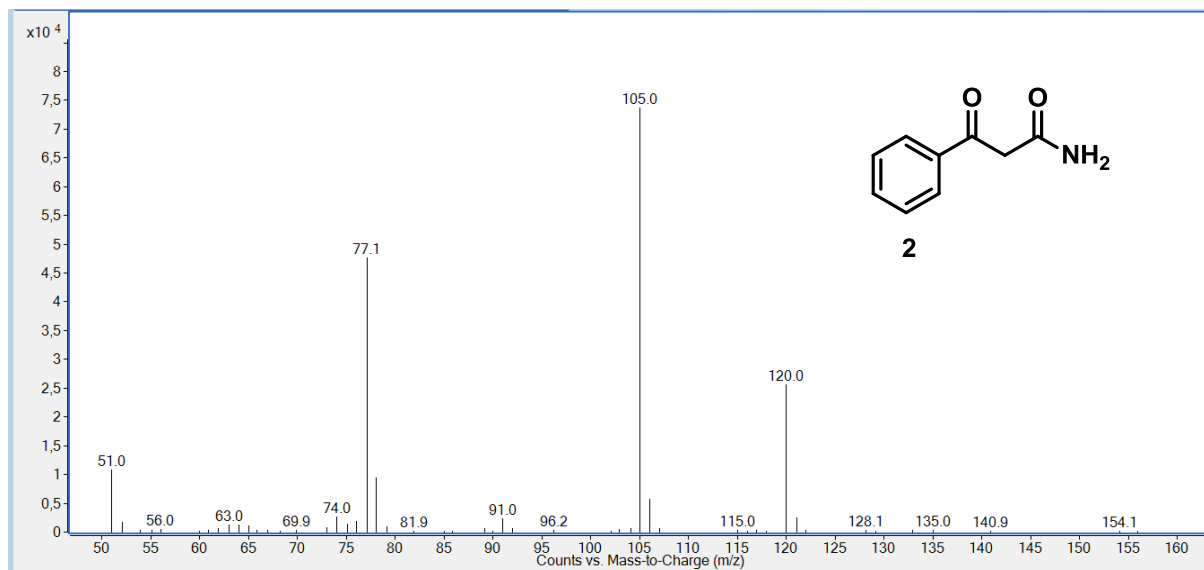
- primary and symmetrical secondary amines. **Tetrahedron**, v. 60, n. 7, p. 1463–1471, 2004.
- 67 ZHAO, Y.; ZHAO, J.; ZHOU, Y.; LEI, Z.; LI, L.; ZHANG, H.; Efficient synthesis of β -amino- α,β -unsaturated carbonyl compounds, **New Journal of Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 769-772, abr. 2005.
- 68 CHHIBA,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

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

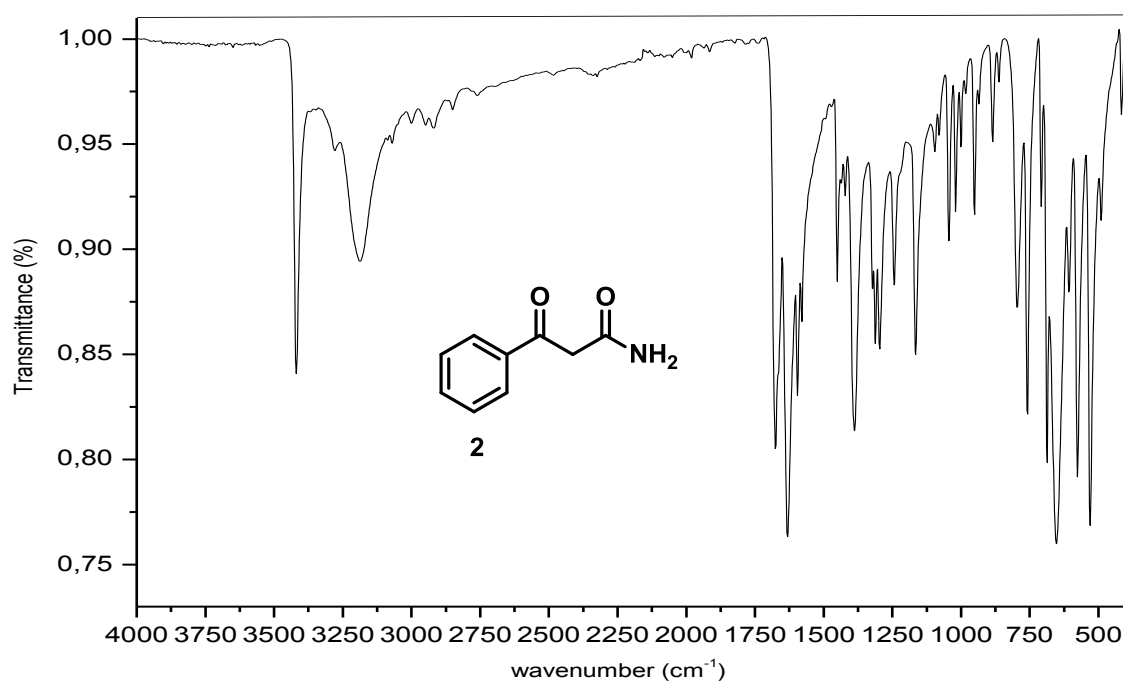
7. ANEXO

Espectro A: RMN de ^1H do composto **2** (300,19 MHz, CDCl_3)Espectro B: RMN de ^{13}C e DEPT 135 do composto **2** (300,19 MHz, CDCl_3)

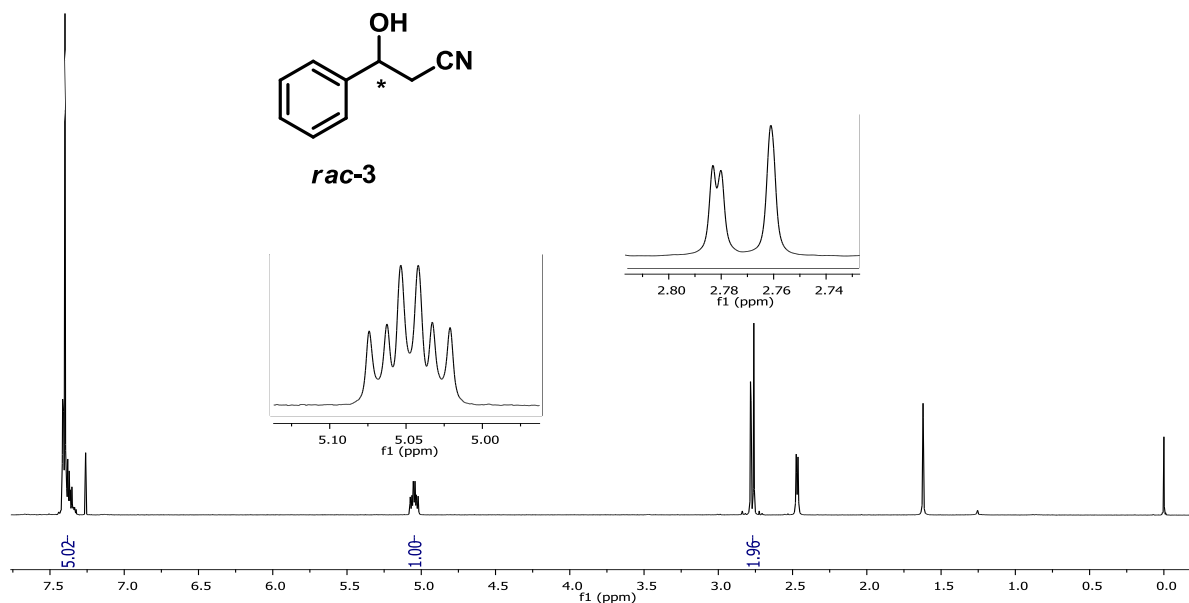
Espectro C: Espectrometria de massas por impacto de elétrons (70 eV) do composto **2**



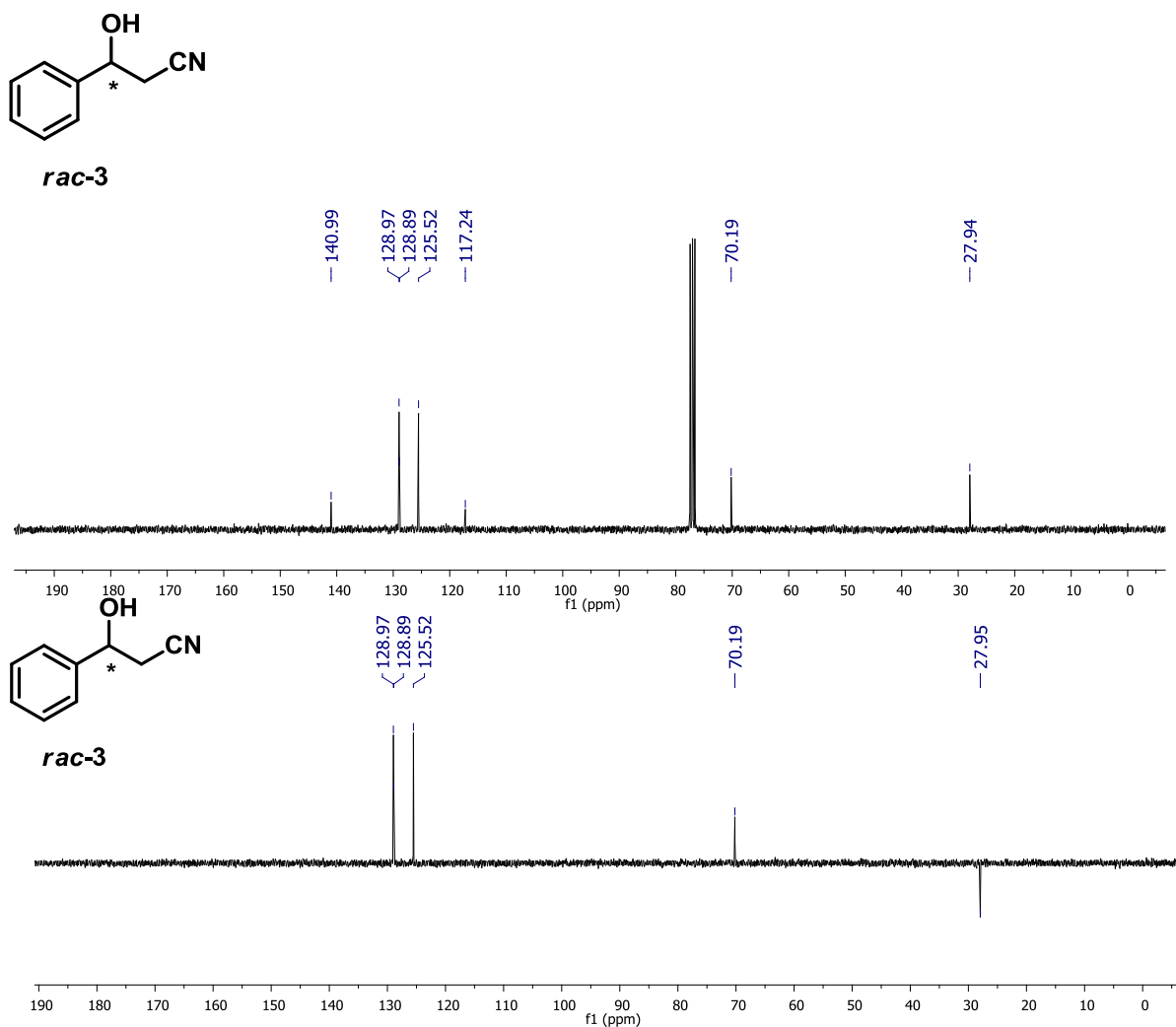
Espectro D: Espectrofotometria na região do infravermelho (ATR) do composto **2**



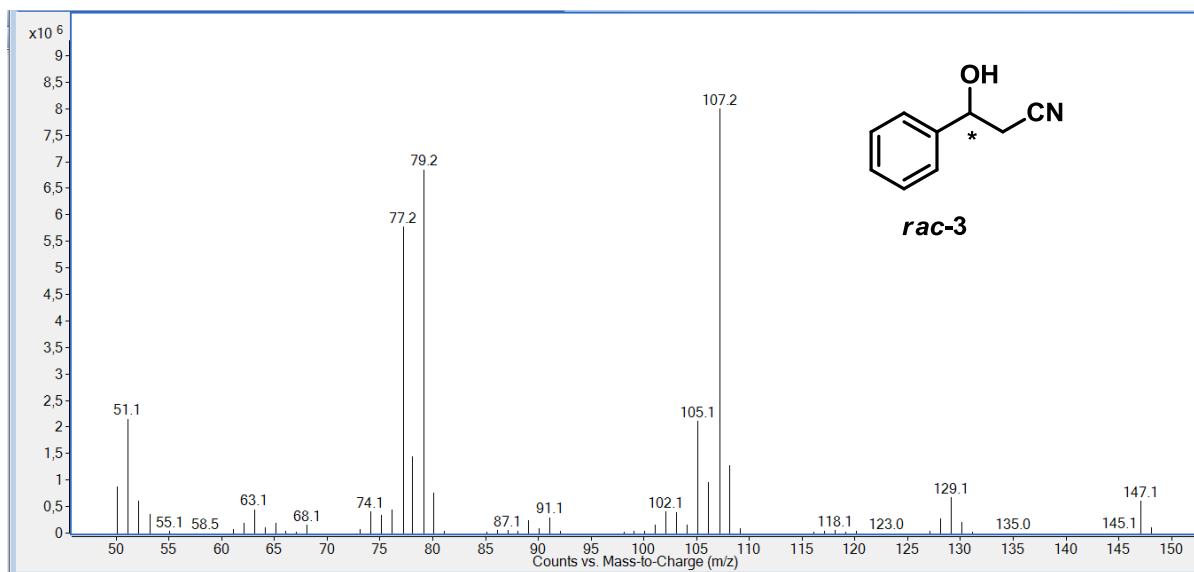
Espectro E: RMN de ^1H do composto *rac*-3 (300,19 MHz, CDCl_3)



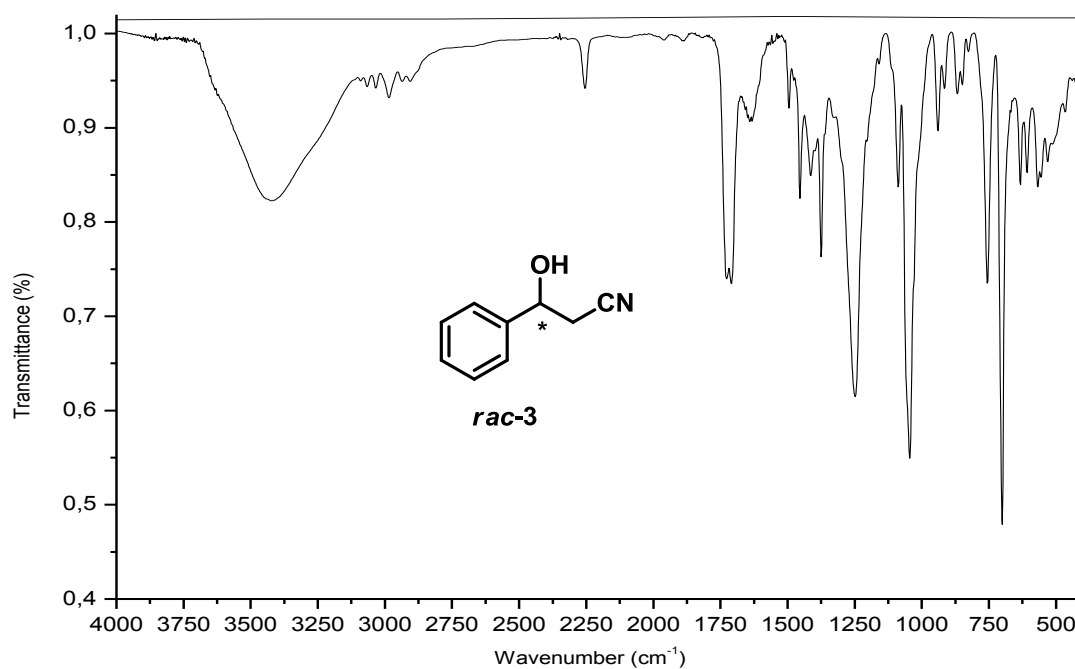
Espectro F: RMN de ^{13}C e DEPT 135 do composto *rac*-3 (300,19 MHz, CDCl_3)



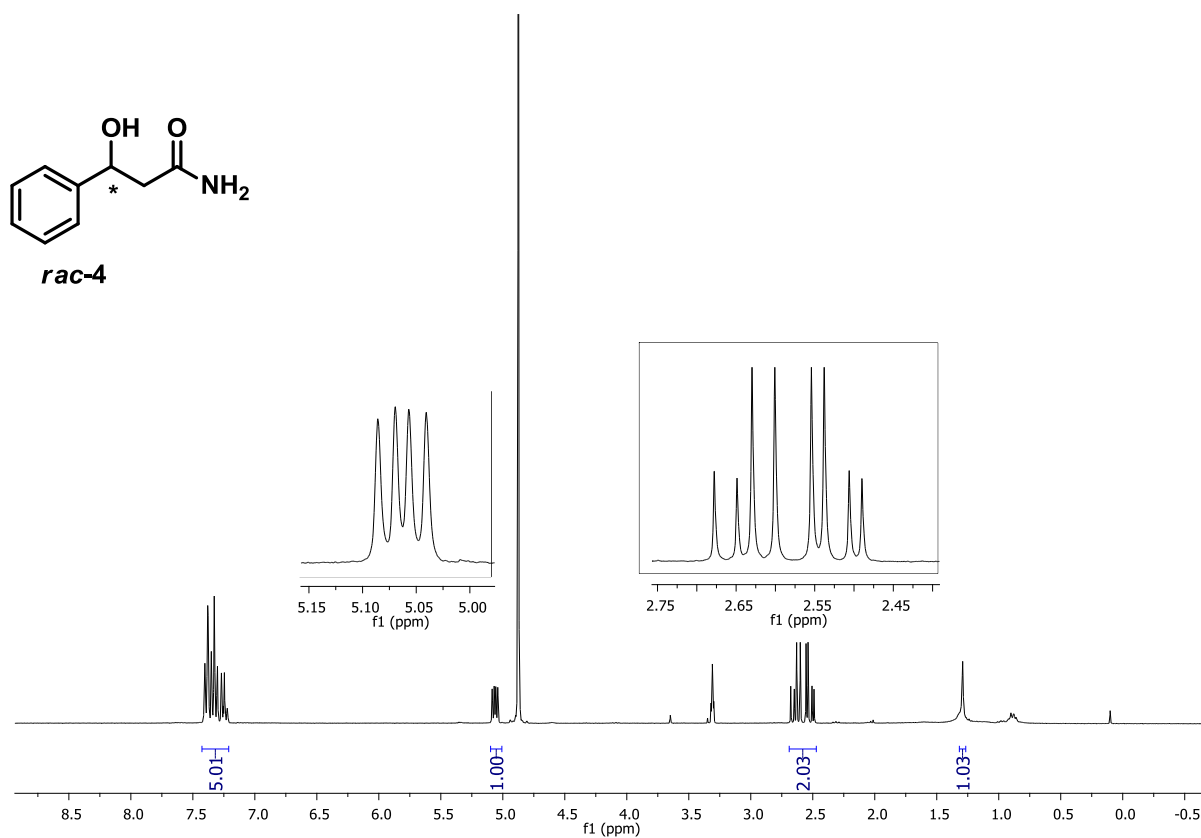
Espectro G: Espectro de massas por impacto de elétrons (70 eV) do composto ***rac*-3**



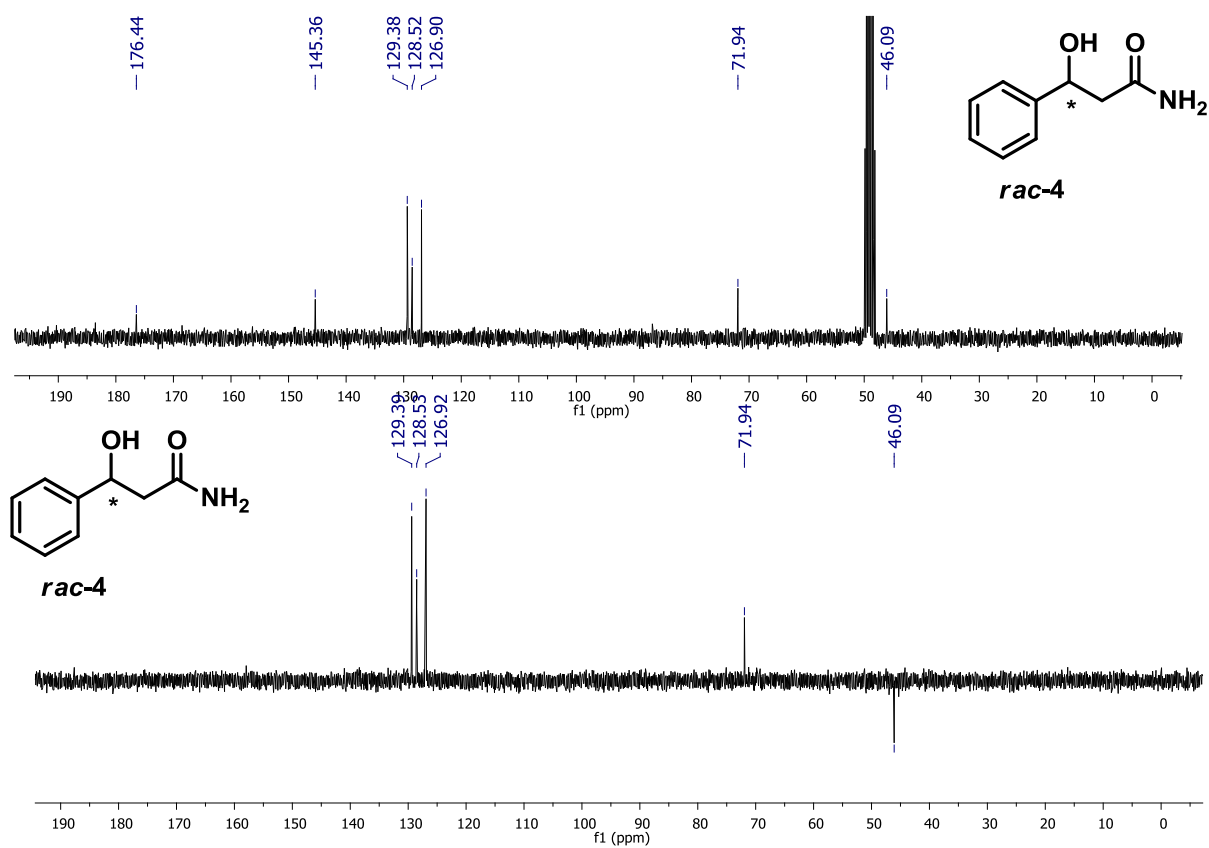
Espectro H: Espectrofotometria na região do infravermelho (ATR) do composto ***rac*-3**



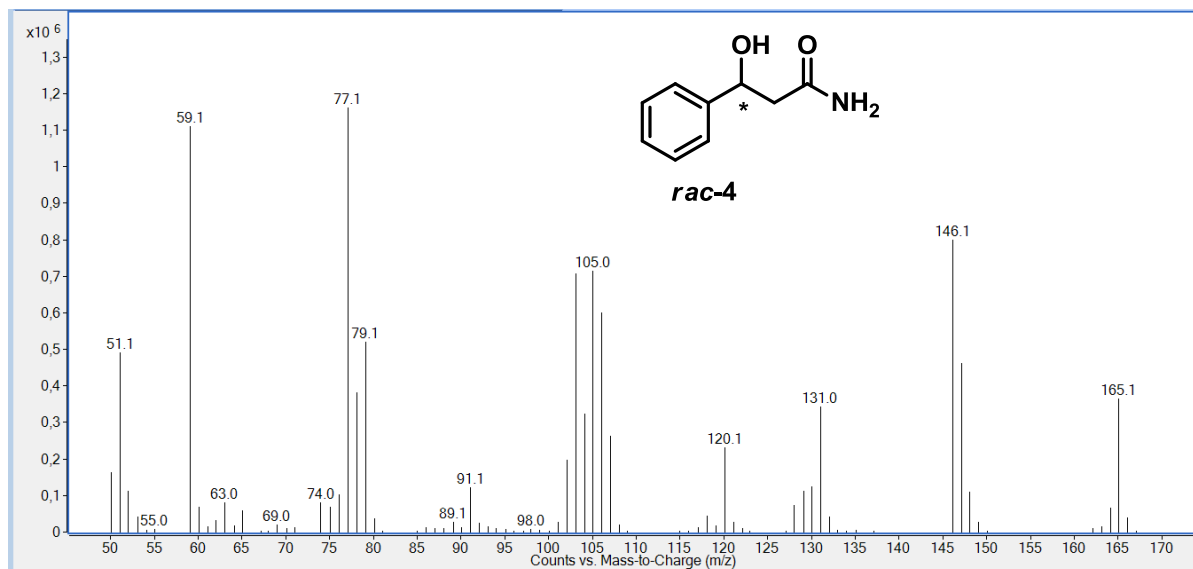
Espectro I: RMN de ^1H do composto **rac-4** (300,19 MHz, CD_3OD)



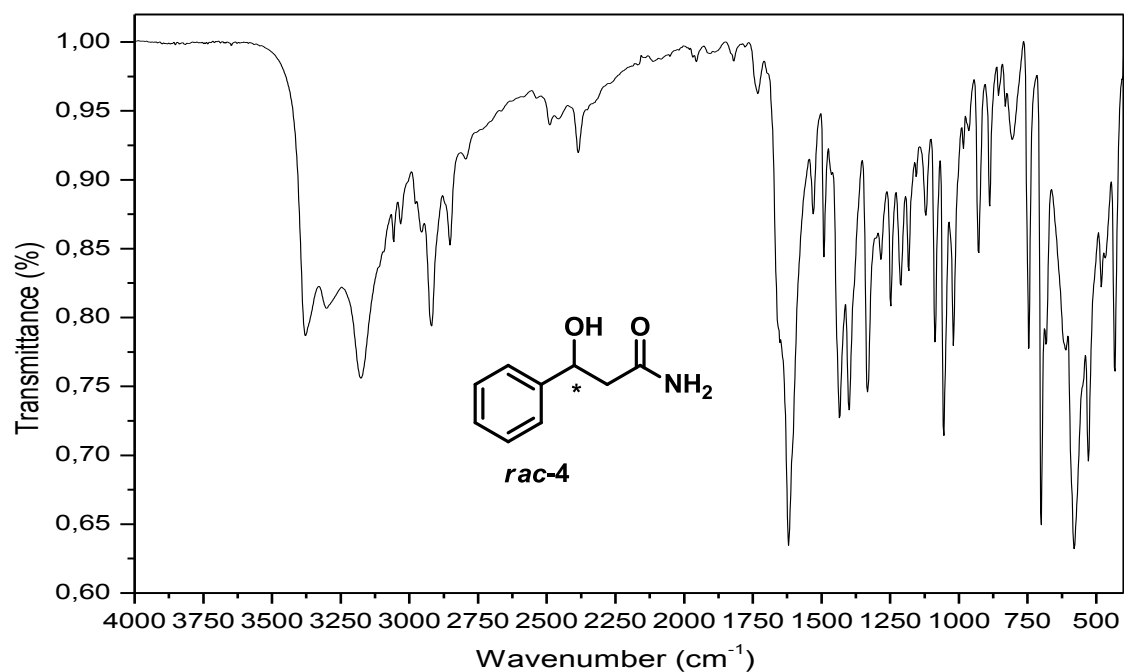
Espectro J: RMN de ^{13}C e DEPT 135 do composto **rac-4** (300,19 MHz, CD_3OD)



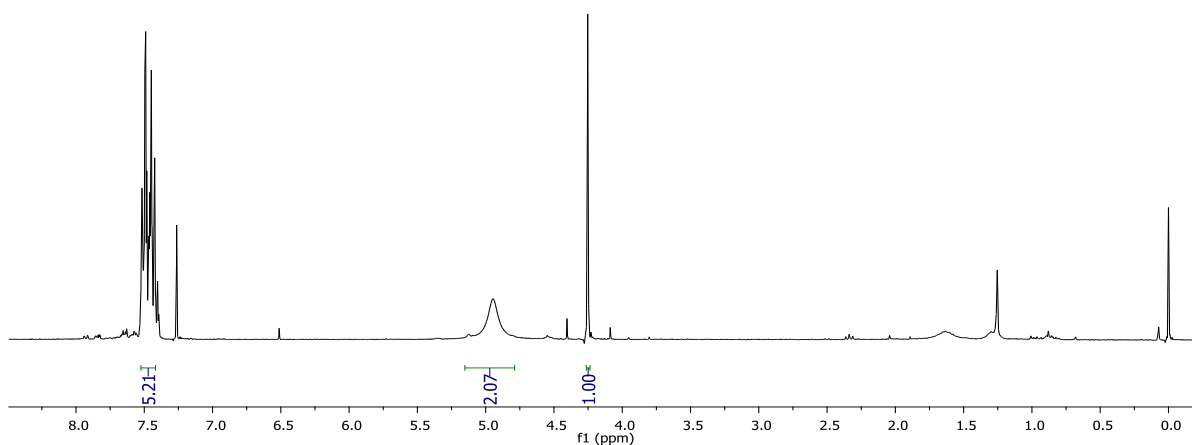
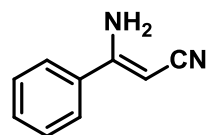
Espectro K: Espectrometria de massas por impacto de elétrons (70 eV) do composto *rac-4*



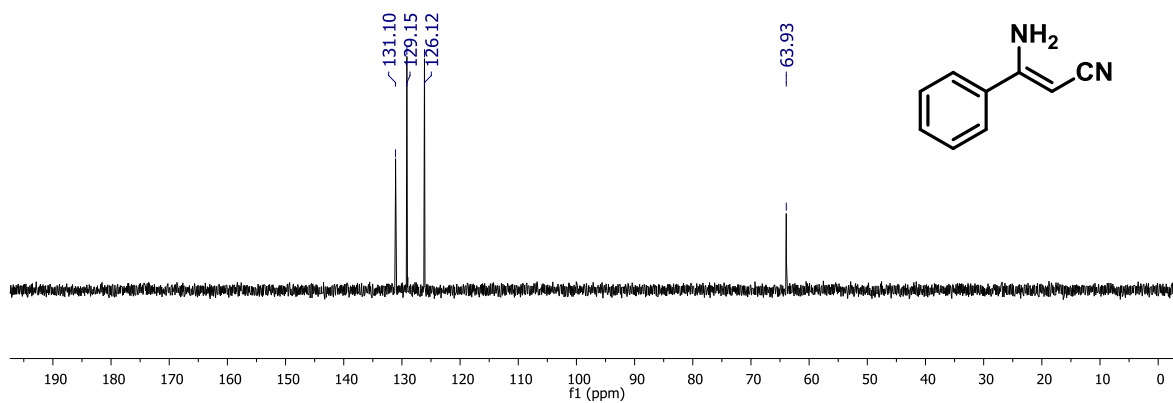
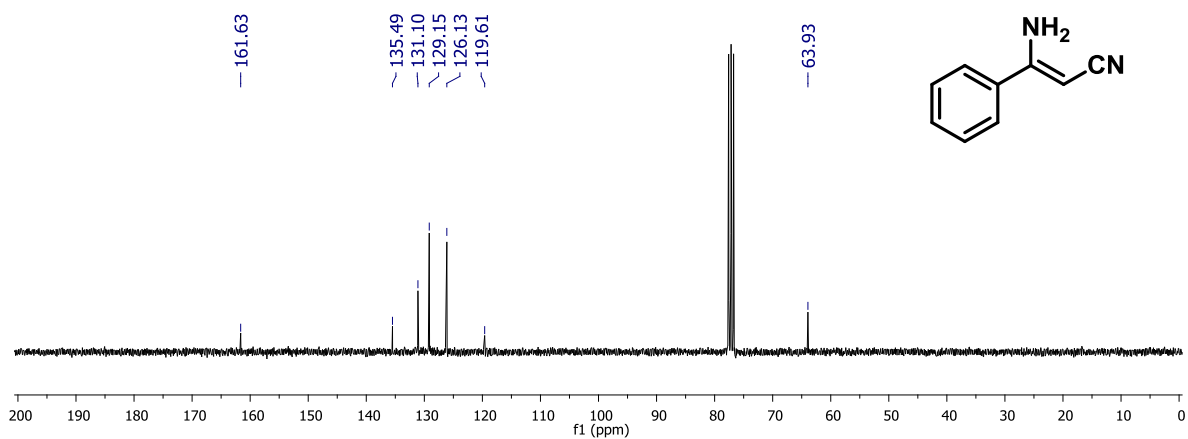
Espectro L: Espectrofotometria na região do infravermelho do composto *rac-4*



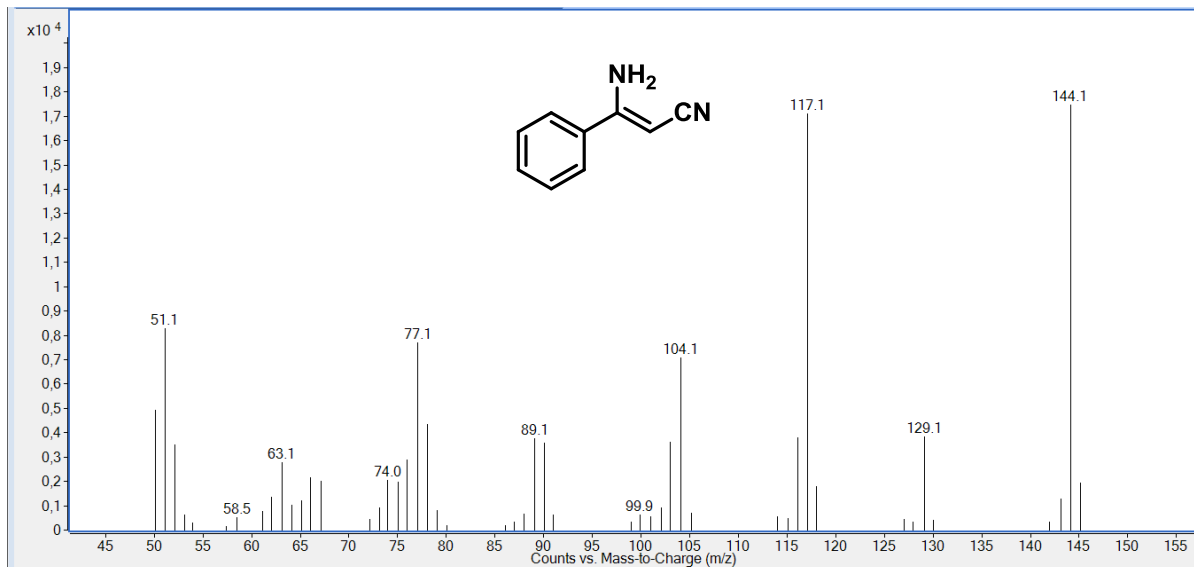
Espectro M: RMN de ^1H do composto 3-amino-3-fenilacrilonitrila (300,19 MHz, CDCl_3)



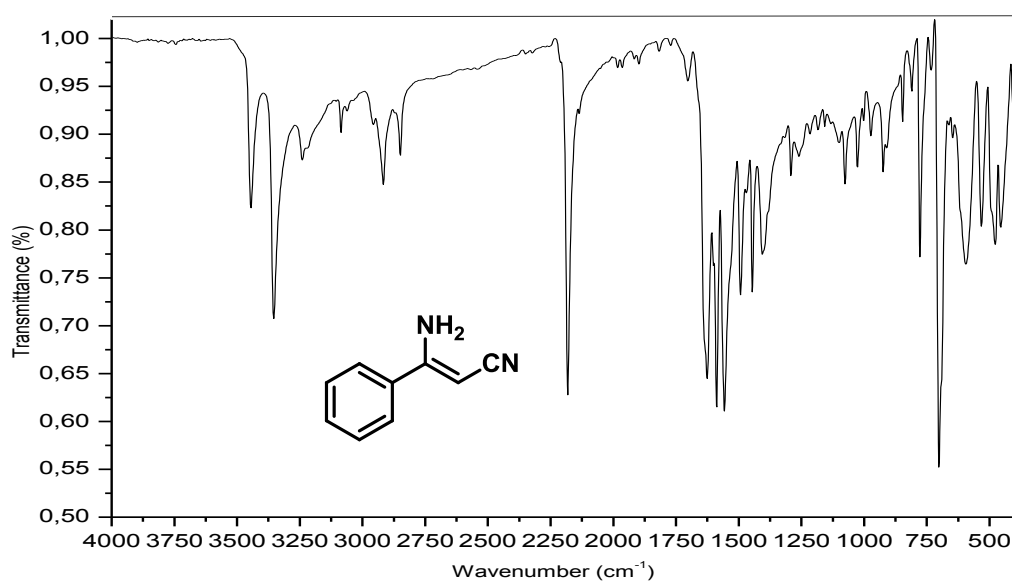
Espectro N: RMN de ^{13}C e DEPT 135 do composto 3-amino-3-fenilacrilonitrila (300,19 MHz, CDCl_3)



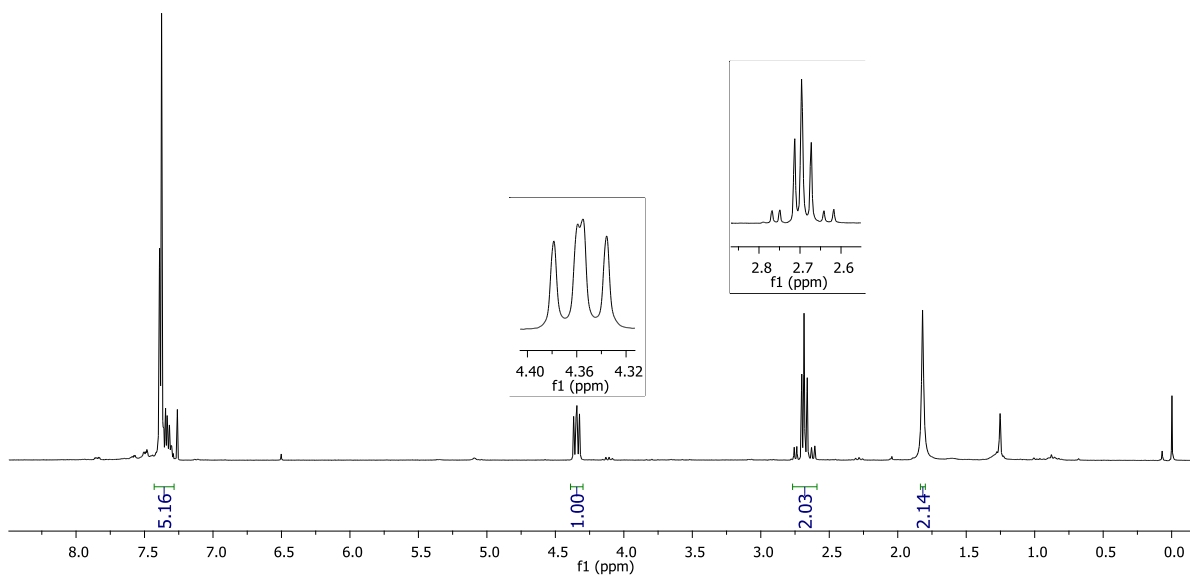
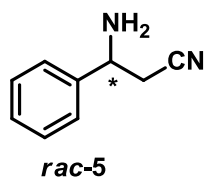
Espectro O: Espectrometria de massas por impacto de elétrons (70 eV) do composto 3-amino-3-fenilacrilonitrila



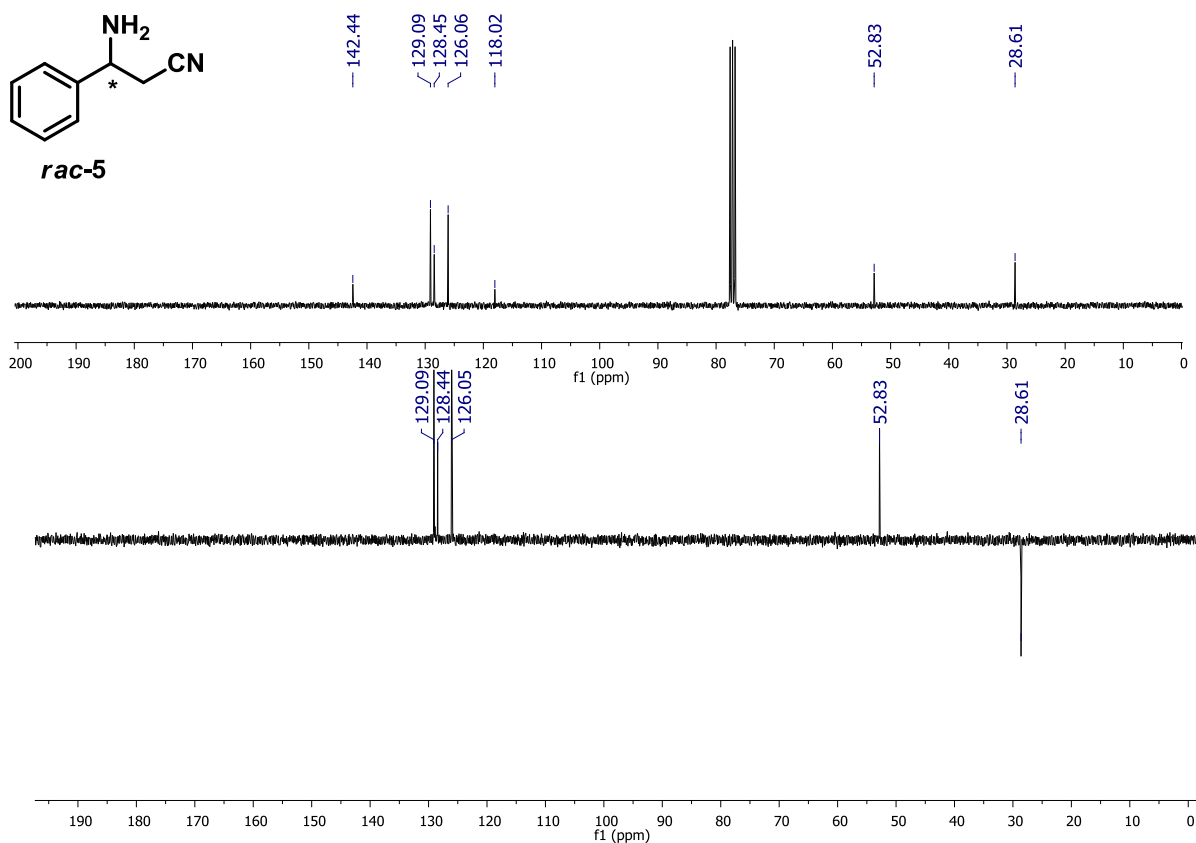
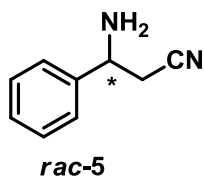
Espectro P: Infravermelho (ATR) do composto 3-amino-3-fenilacrilonitrila



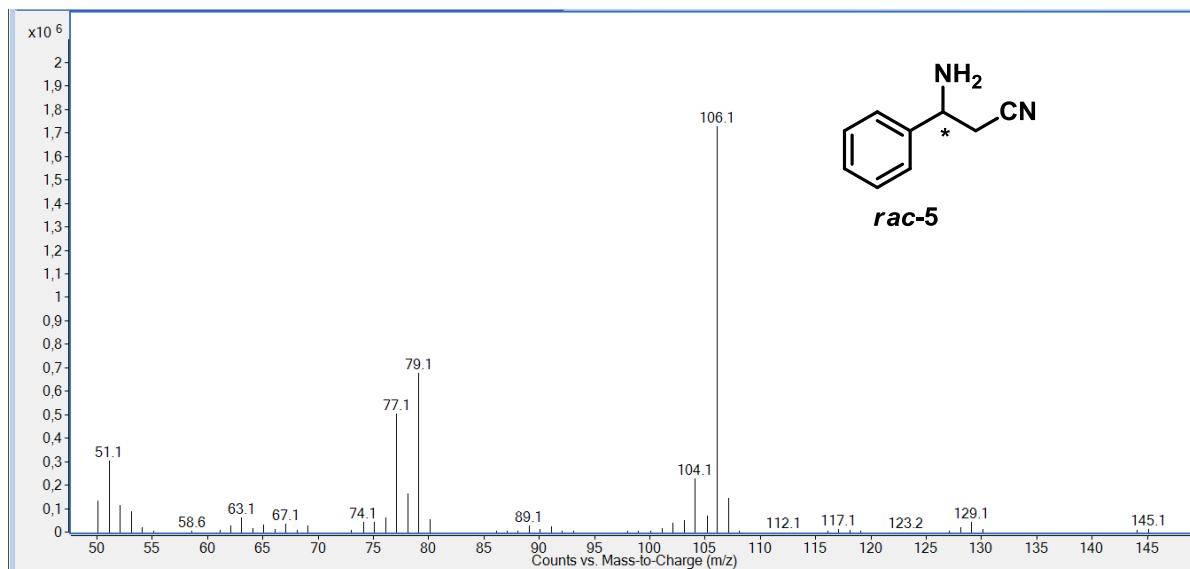
Espectro Q: RMN de ^1H do composto ***rac*-5** (300,19 MHz, CDCl_3)



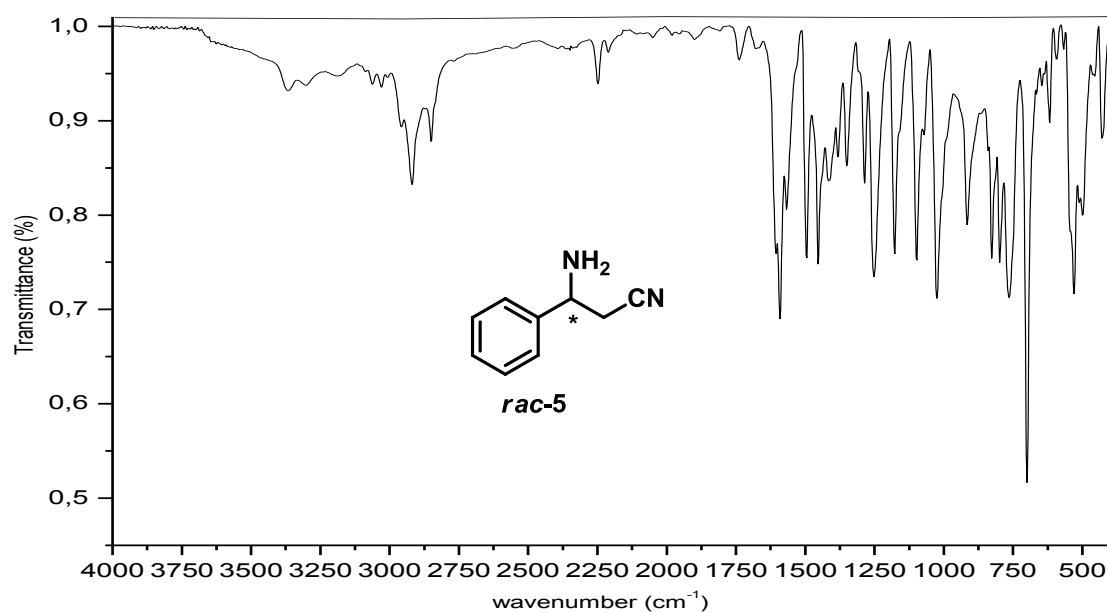
Espectro R: RMN de ^{13}C e DEPT 135 do composto ***rac*-5** (300,19 MHz, CDCl_3)



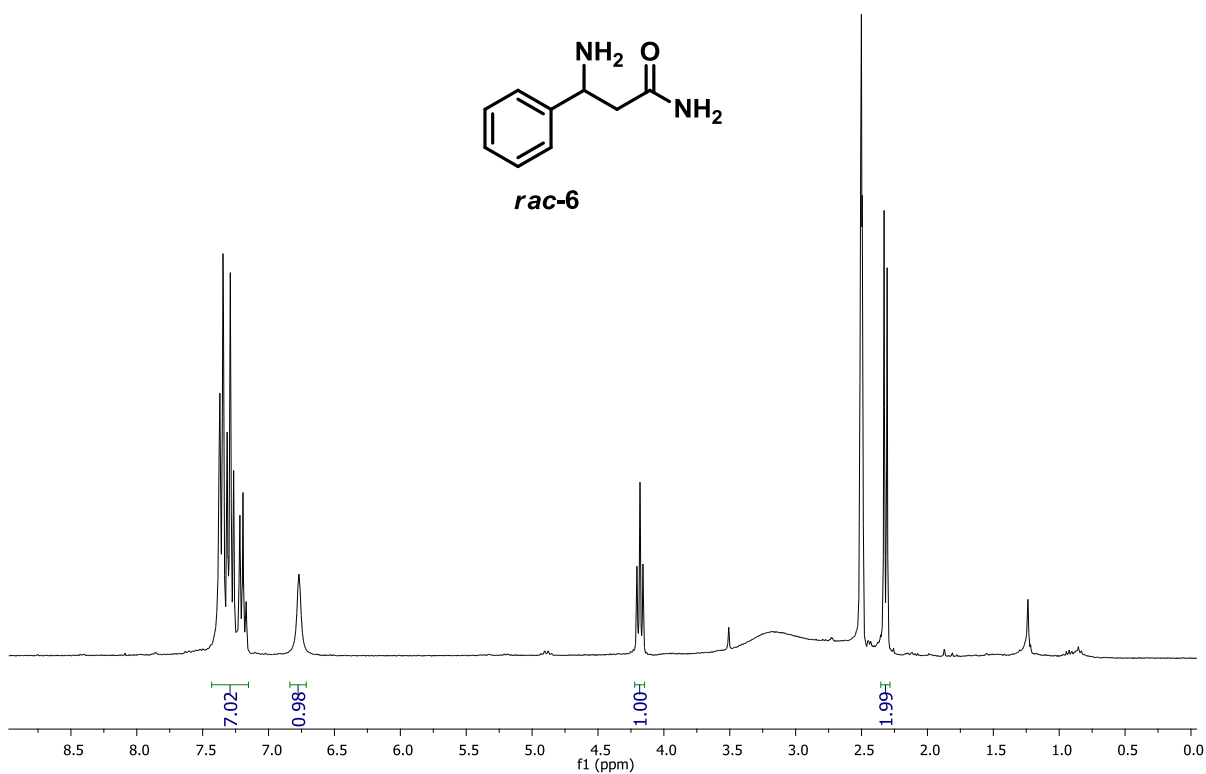
Espectro S: Espectrometria de massas por impacto de elétrons (70 eV) do composto **rac-5**



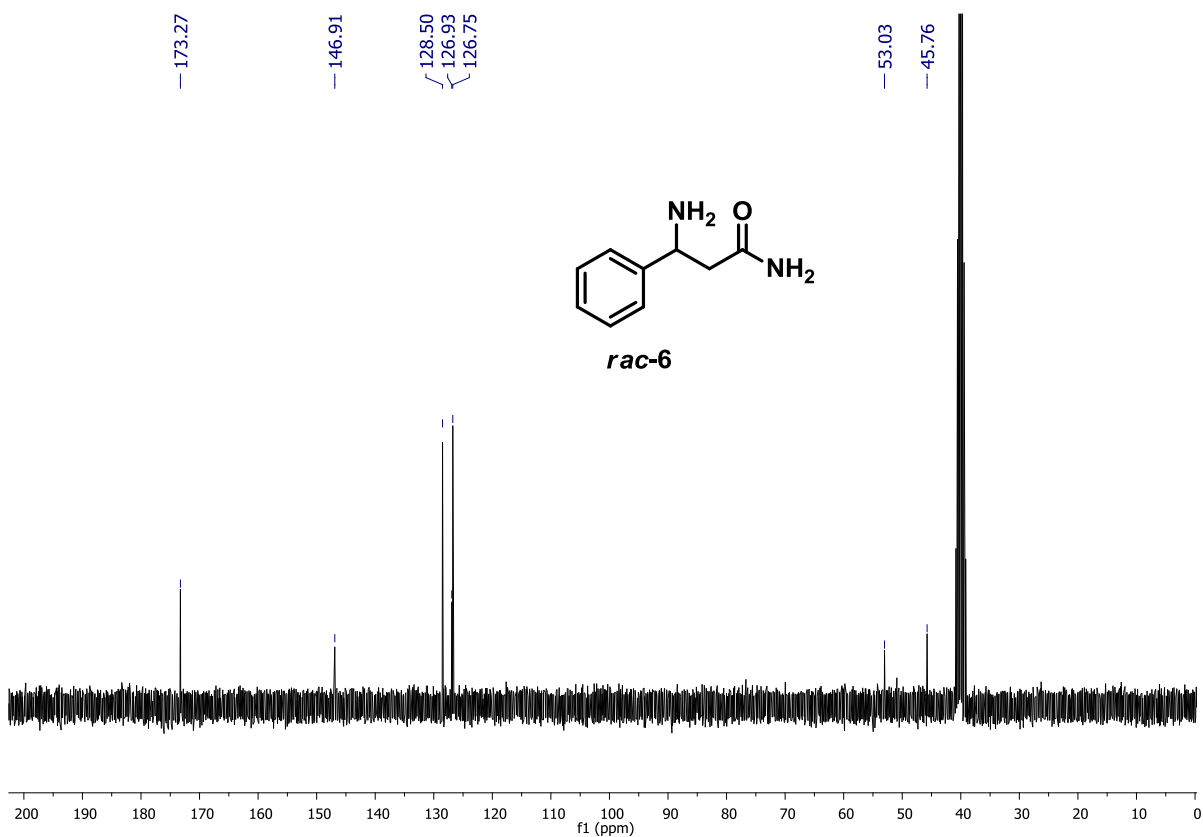
Espectro T: Infravermelho (ATR) do composto **rac-5**



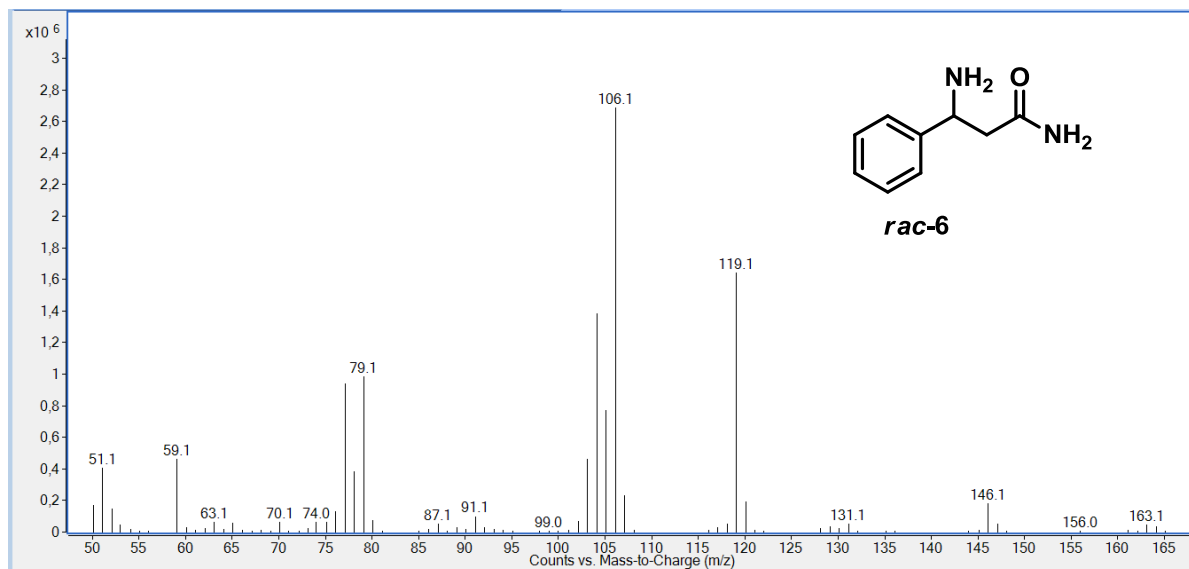
Espectro U: RMN de ^1H do composto **rac-6** (300,19 MHz, CD_3SOCD_3)



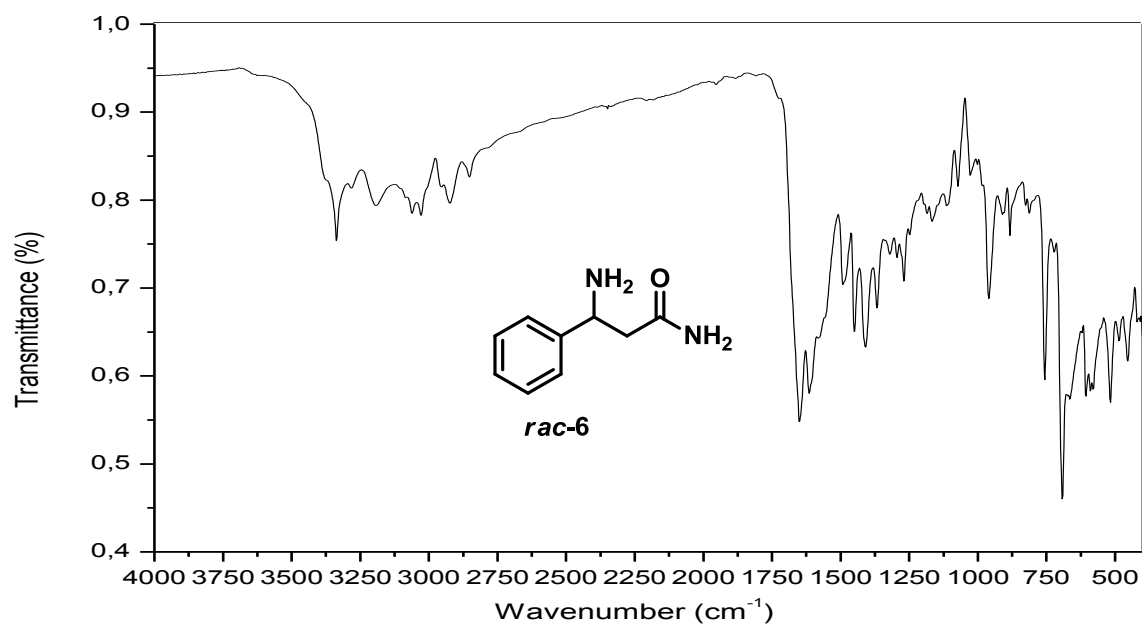
Espectro V: RMN de ^{13}C do composto **rac-6** (300,19 MHz, CD_3SOCD_3)



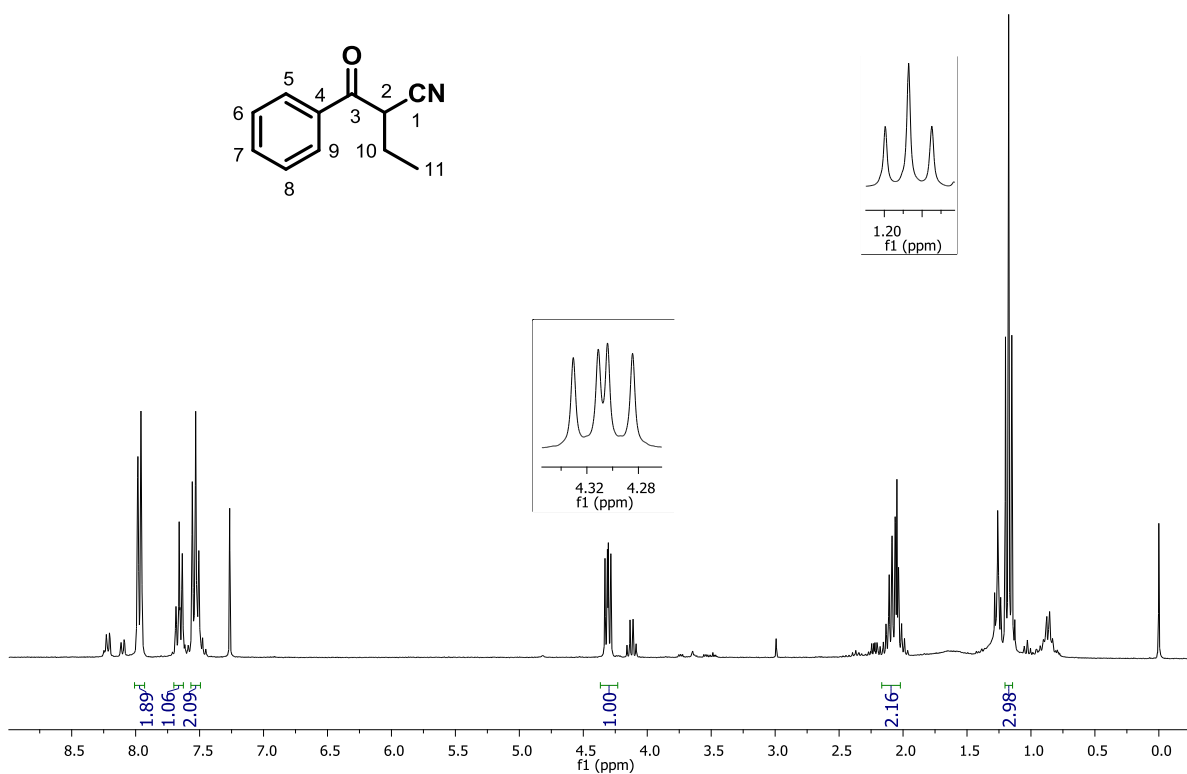
Espectro X: Espectrometria de massas por impacto de elétrons (70 eV) do composto *rac-6*



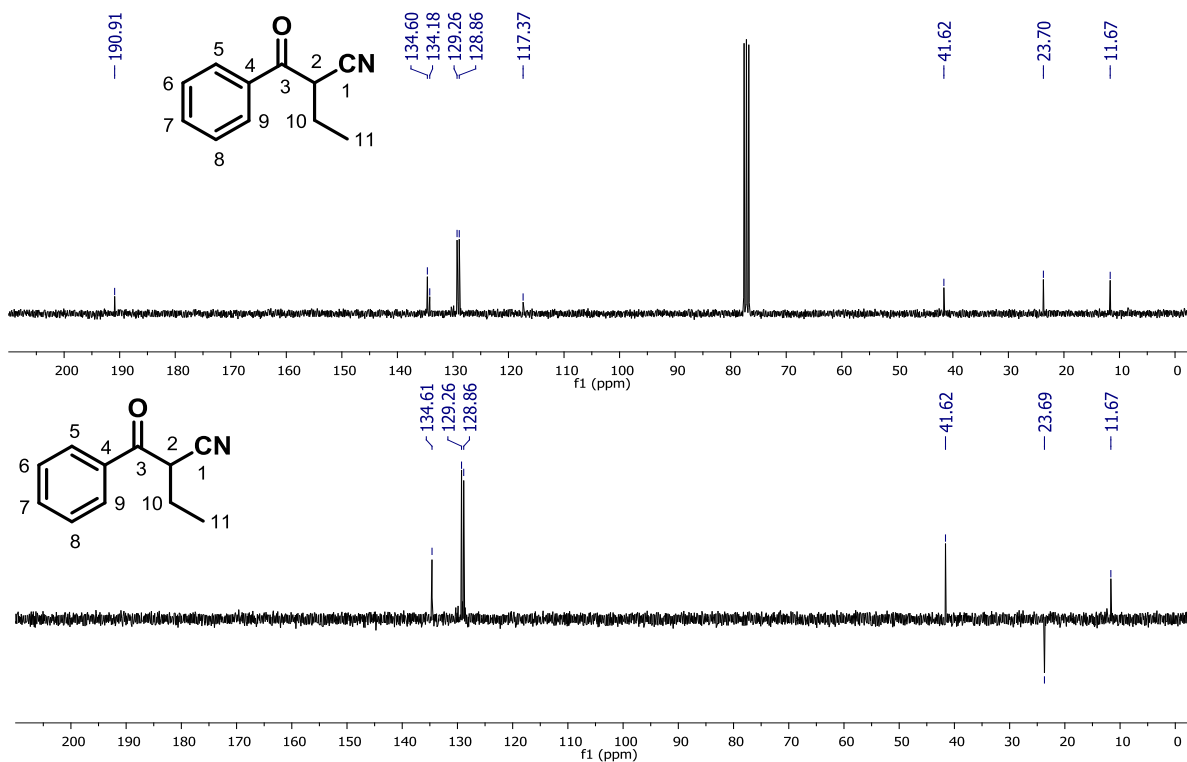
Espectro Z: Espectrofotometria na região do infravermelho (ATR) do composto *rac-6*



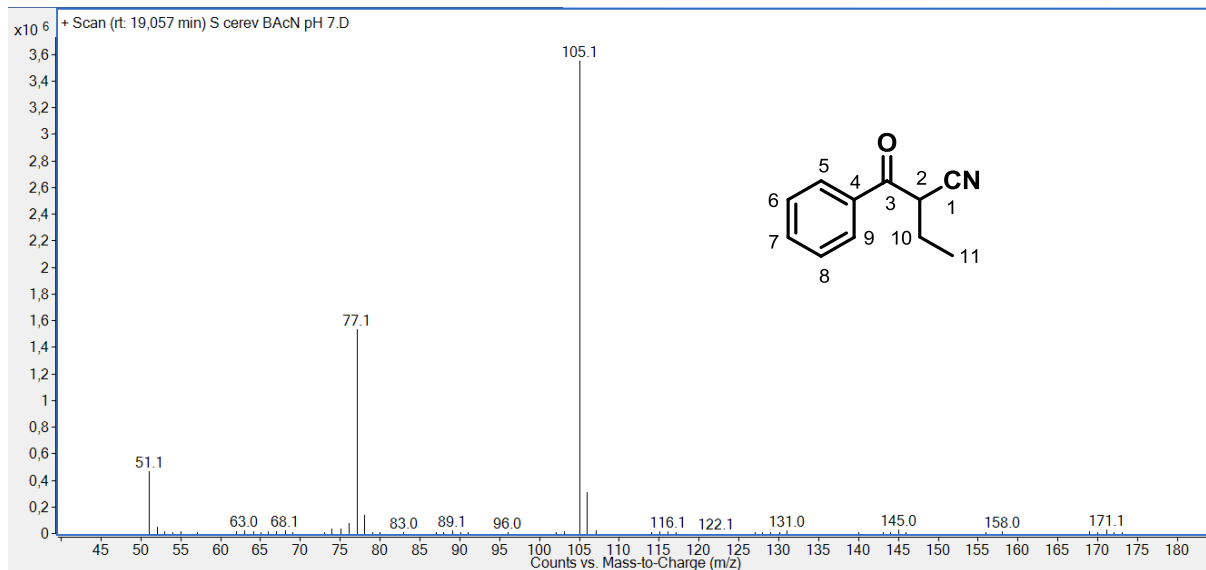
Espectro Y: RMN de ^1H do composto 1-A. (300,19 MHz, CDCl_3)



Espectro Z: RMN de ^{13}C do composto 1-A. (300,19 MHz, CDCl_3)



Espectro AB: Espectrometria de massas por impacto de elétrons (70 eV) do composto **1-A**.



Espectro Z: Espectrofotometria na região do infravermelho (ATR) do composto **1-A**.

