

MARAYLLA INÁCIO DE MORAES

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

M827h

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: MARAYLLA INÁCIO DE MORAES

ORIENTADORA: CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

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



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

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



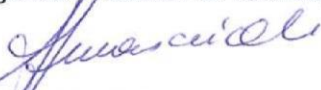
Prof.^a Dr.^a ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO

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



Prof.^a Dr.^a LOURDES CAMPANER DOS SANTOS

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



Prof.^a Dr.^a ANITA JOCELYNE MARSAIOLI

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas



Prof. Dr. ALVARO TAKEO OMORI

Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC - UFABC - Santo André

Araraquara, 17 de maio de 2019

DADOS CURRICULARES

Identificação

Nome: Maraylla Inácio de Moraes

Nome em citações bibliográficas: MORAES, M.I.

Formação Acadêmica

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

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

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

Estágios e Bolsas auxílio

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

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

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

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

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

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Livros e Capítulos

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

Depósito da sequência de aminoácidos

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

Artigo para publicação

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

Apresentação de Trabalhos em Congressos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Participação em bancas de trabalho de conclusão de curso

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

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

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

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

Participação em Eventos

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

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

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

Workshop "Inovações em análise de Enantiômeros", 2016.

34º Congresso Brasileiro de Química, 2014.

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

11º Simpósio Brasileiro de Química, 2013.

I Congresso Regional dos Estudantes de Química, 2013.

Organização de eventos

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

Coorientação concluída

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

Estágio no Exterior

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

*Para Caio
com muito amor*

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À CAPES-PDSE pela bolsa de estágio no exterior.

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

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

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

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

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

(Johann Goethe)

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE ESQUEMAS

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

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Algumas métricas comuns de química verde e suas descrições.....	25
Tabela 2. Atividade de NHase de alguns micro-organismos.....	33
Tabela 3. NHases enantiosseletivas catalisam a transformação da nitrila (R_1R_2CHCN) para a correspondente amida.....	35
Tabela 4. Conversão de dinitrilas por <i>Rhodococcus</i> sp. AJ270.....	43
Tabela 5. Primers desenhados para a amplificação e sequenciamento dos genes que codificam NHase. Em vermelho, estão representadas as caudas que ficarão livres para se ligar ao vetor na segunda PCR. Os códons grifados representam start e stop.....	47
Tabela 6. Sequência de aminoácidos do gene ativador de NHase de alguns micro-organismos.....	52
Tabela 7. Curva analítica do Ensaio de Bradford.....	54
Tabela 8. Proteínas totais presentes no extrato enzimático pós diálise.....	55
Tabela 9. Dados para a construção da curva analítica para determinação da atividade.....	55
Tabela 10. Especificidade dos substratos utilizando <i>R.erythropolis</i> ATCC 4277.....	57
Tabela 11. Conversão de 5a em 5b catalisada por NHase.....	66
Tabela 12. Resultado das reações enzimáticas com NHase 001, 009 e 017.....	67
Tabela 13. Reagentes e quantidades utilizadas nas reações de PCR para amplificação do DNA genômico.....	78
Tabela 14. Reagentes e quantidades utilizadas nas reações de PCR.....	79

LISTA DE FLUXOGRAMAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Amp – Ampicilina

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

ATCC- Coleção de Cultura Tipo Americana (*American Type Culture Collection*)

BSA – Soro albumina bovina (*Bovine serum albumine*)

Can- Cloranfenicol

CCD – Cromatografia em camada delgada

CCT- Coleção de Culturas Tropicais

CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa

Clonagem RF- Clonagem livre de enzimas de restrição

DMSO – Dimetilsulfoxido

DpnI- *Diplococcus pneumoniae* G41

ee – excesso enantiomérico

GC-FID – Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chama (*gas chromatography with flame ionization detector*)

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (*gas chromatography with mass spectrometer*)

GDH - glicose desidrogenase

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High pressure liquid chromatography*)

HHDH - halohidrina desalogenase

IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida

IV – Infravermelho

J – constante de acoplamento

LB – Luria Broth

m/z – razão massa carga

MTBE- Éter metil terc-butílico

NHase- Nitrila hidratase

NHase-Co -Nitrila hidratase dependente de cobalto

NHase-Fe- Nitrila hidratase dependente de ferro

PCR- Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonila (*phenylmethylsulfonyl fluoride*)

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

RMN de ^1H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

rpm – rotações por minuto

SOC - *Super Optimal Broth*

t.a. - temperatura ambiente

TBE- Tampão Tris/borato/EDTA

TMS - Tetrametilsilano

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

SUMÁRIO

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

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biocatálise e Química Verde

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

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

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

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



Figura 1. Os 12 primeiros princípios da química verde

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

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

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

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

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

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

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

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

Uma das principais causas de geração de resíduos, particularmente na fabricação de produtos de química fina e farmacêutica, é o uso de proporções estequiométricas entre reagentes e o uso de solventes em síntese orgânica. Exemplos pertinentes são as reduções com metais (Na, Mg, Zn, Fe) e hidretos de metal (LiAlH_4 , NaBH_4); e oxidações com permanganato, dióxido de manganês e reagentes de cromo (VI); e ácidos de Lewis (AlCl_3 , ZnCl_2 , BF_3), empregados como reagentes nas reações ou em etapas posteriores do processo. Além disso, devido à complexidade molecular da maioria dos produtos farmacêuticos, sua

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

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

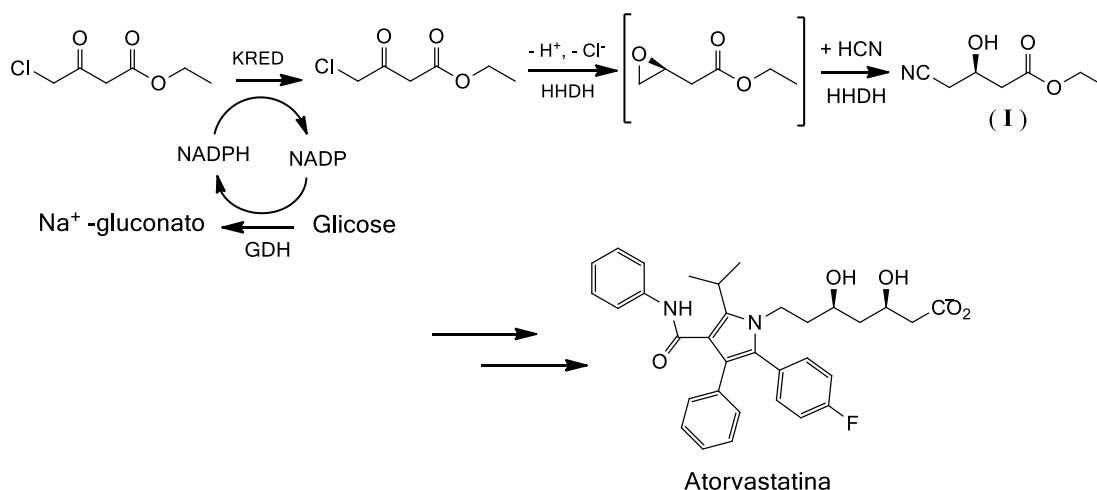
A química verde já existe há décadas e vem fazendo uma diferença real no mundo. Empresas e organizações bem conhecidas que a adotaram incluem Nike, BASF, Pfizer, Agência de Proteção Ambiental Americana, Bayer, Codexis, Johnson & Johnson e outras. O mercado global de química verde está previsto para crescer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

1.2. Aplicações da biocatálise na indústria farmacêutica

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

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

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



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

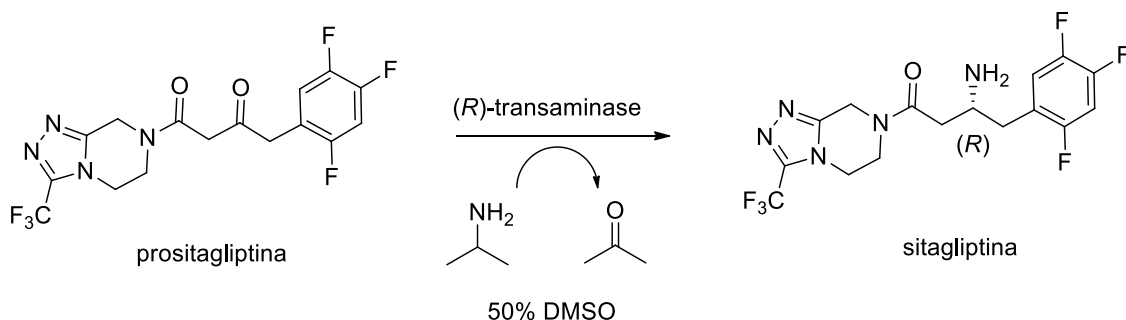
Na primeira etapa, 4-cloroacetoacetato de etila sofre uma redução enantiosseletiva catalisada por cetorredutase (KRED). A regeneração do cofator é realizada com glicose como doador de hidrogênio e NADP dependente de glicose desidrogenase (GDH) com catalisador. No segundo passo, uma halohidrina desalogenase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

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

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

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

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



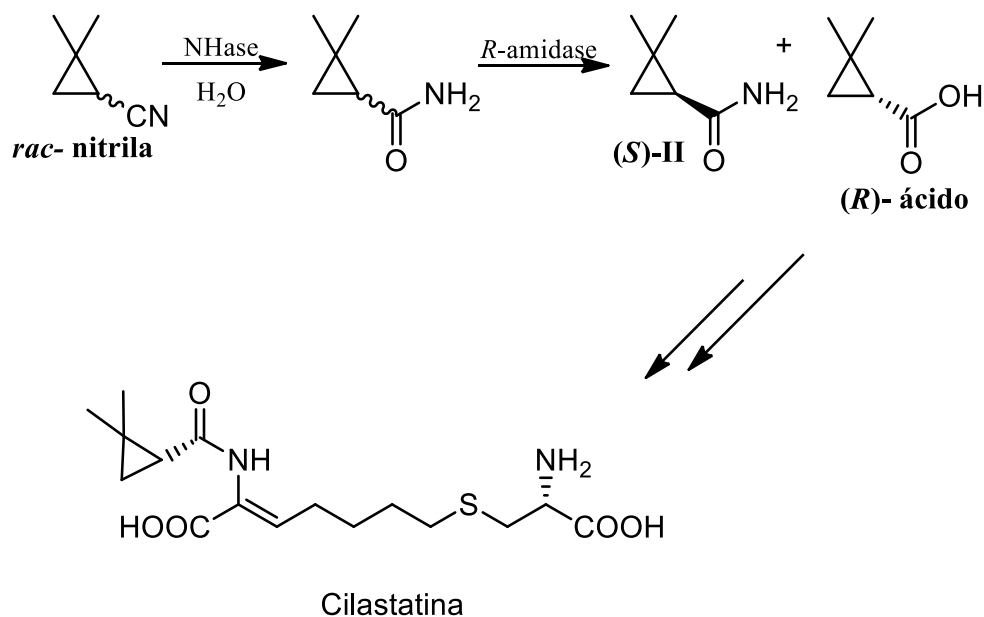
Fonte: Adaptado de Bornscheuer e colaboradores (BORNSCHEUER *et al.*, 2012)

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

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

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

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



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

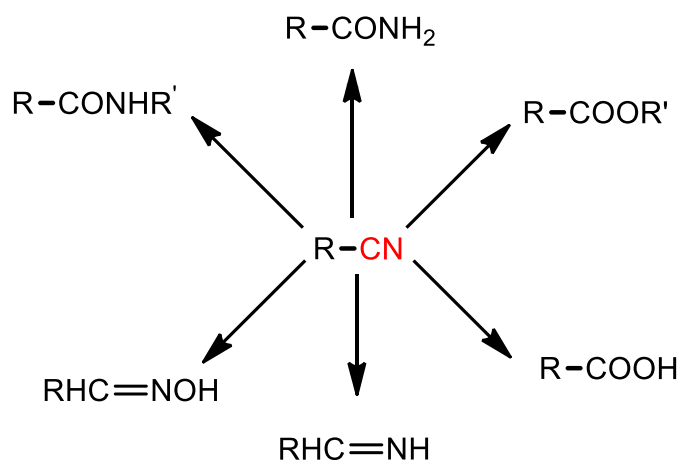
A rota biocatalítica melhorou drasticamente a eficiência do processo em comparação com a rota química, eliminando seis etapas. O bioprocesso evitou o uso de auxiliares quirais e redução no uso de solventes orgânicos. A reação foi realizada sob condições brandas, reduzindo a energia consumida no processo.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

1.3. Nitrila Hidratase (NHase)

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

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

Esquema 4. Versatilidade das nitrilas na obtenção de outros compostos



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

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

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

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

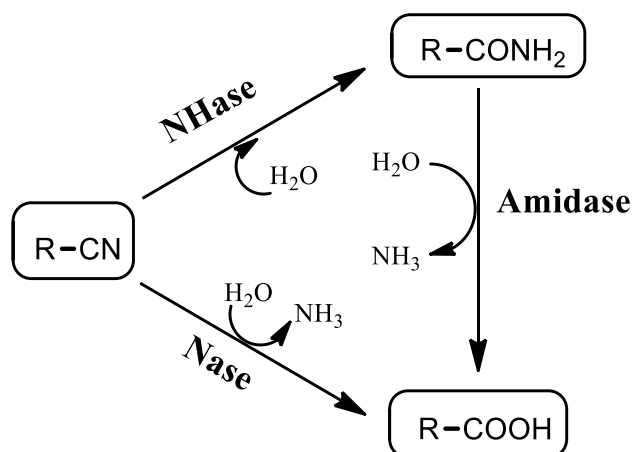


Figura 2. Duas rotas da natureza para a conversão de nitrilas em ácido carboxílico

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

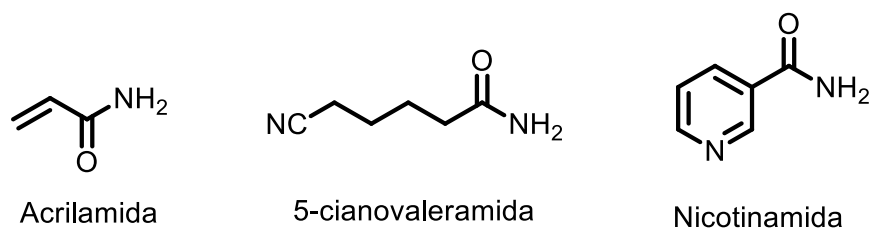


Figura 3. NHase na síntese de amidas produzidas industrialmente

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

Tabela 2. Atividade de NHase de alguns micro-organismos

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

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

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

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

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

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

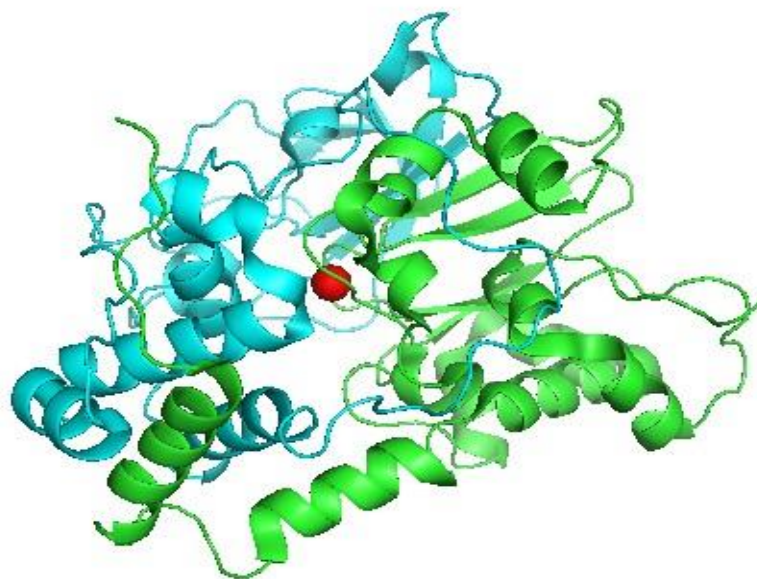


Figura 4. Representação tridimensional de uma NHase de *Rhodococcus erythropolis* AJ270. Em verde e azul estão representadas as subunidades α e β , respectivamente. A esfera vermelha representa o cofator Fe^{3+} .

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

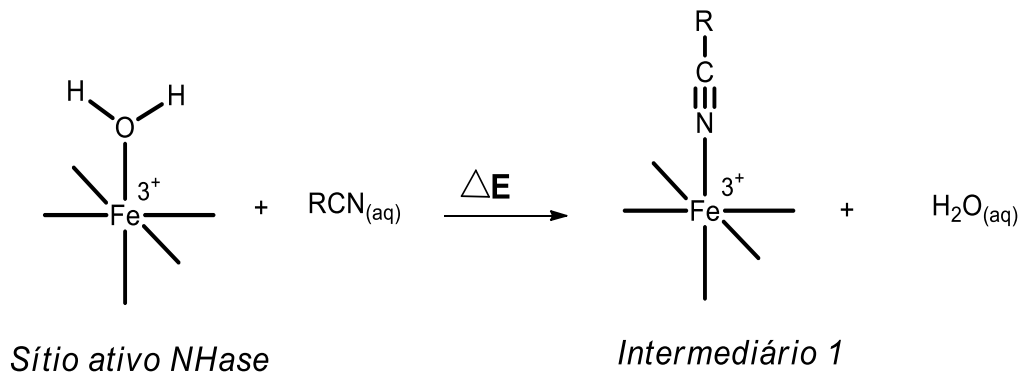
iii) o hidróxido ligado ao metal ativa uma molécula de água livre, que por sua vez atua como um nucleófilo (mecanismo de segunda esfera externa) (HUANG *et al.*, 1997).

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

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

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

i)



ii)

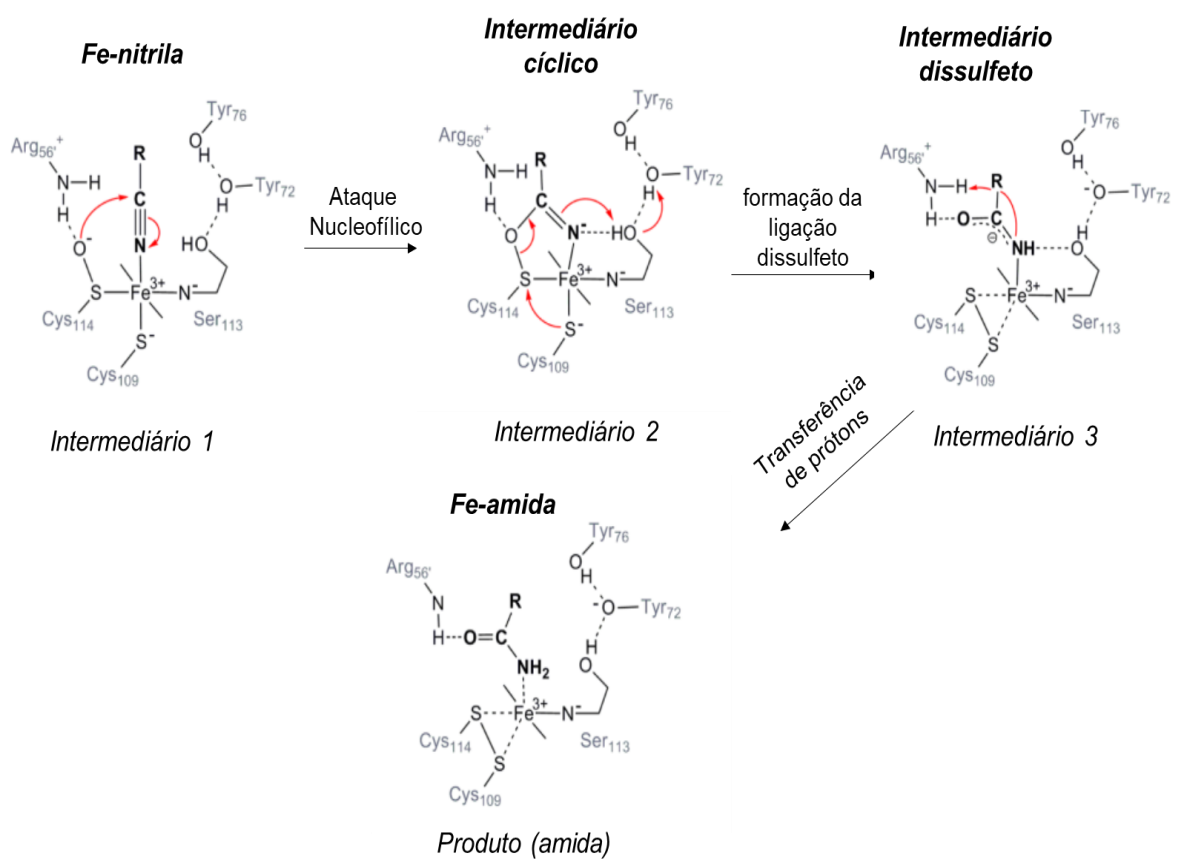


Figura 5. Mecanismo proposto para reação de hidratação de nitrila catalisada por NHase

Fonte: Adaptado de Hopmann (HOPMANN, 2014)

As principais etapas desses mecanismos são:

i) O metal inicialmente se coordena com uma molécula de água ($\text{Fe-H}_2\text{O}$) e uma barreira de entalpia de 13,8 Kcal/mol é suficiente para deslocar a molécula de água pela de nitrila da esfera de coordenação do Fe^{3+} (intermediário 1).

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

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

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

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

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

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

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

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

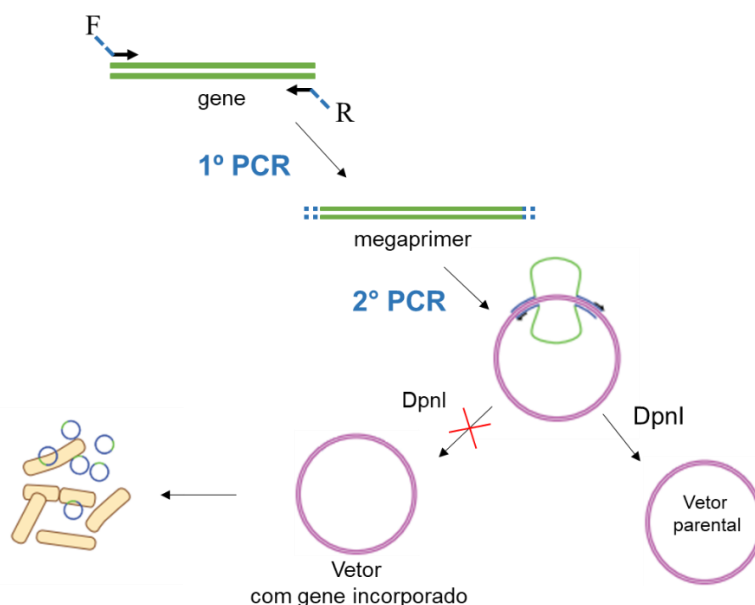


Figura 6. Representação esquemática de clonagem RF. Primers híbridos são desenhados para se ligarem ao gene (verde) e ao plasmídeo (rosa). A primeira PCR leva ao megaprimer que possui em suas extremidades sequências que se flanqueiam ao plasmídeo. Na segunda PCR, o produto da primeira é usado para amplificação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

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

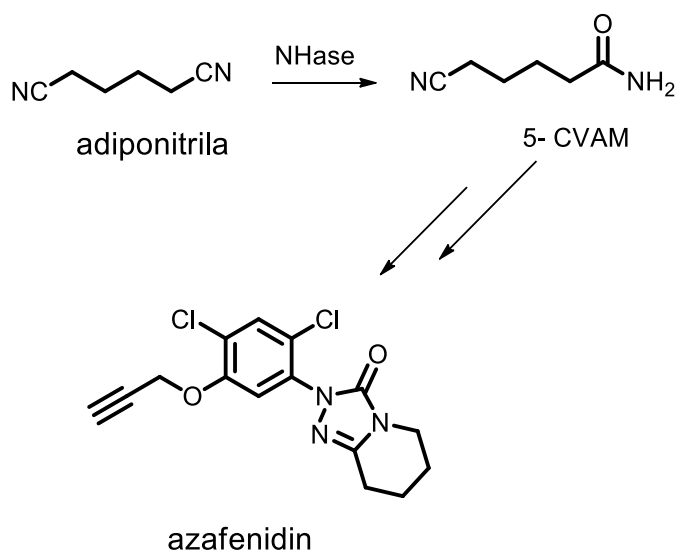
O método de clonagem RF apresenta vantagens, que o torna uma alternativa atraente em relação a outros procedimentos de clonagem. Este método permite uma inserção precisa e perfeita do inserto de DNA sem quaisquer sequências adicionais desnecessárias. Além disso, a reação é altamente eficiente e adequada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

1.5. Biotransformação regioseletiva de dinitrila

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

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

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

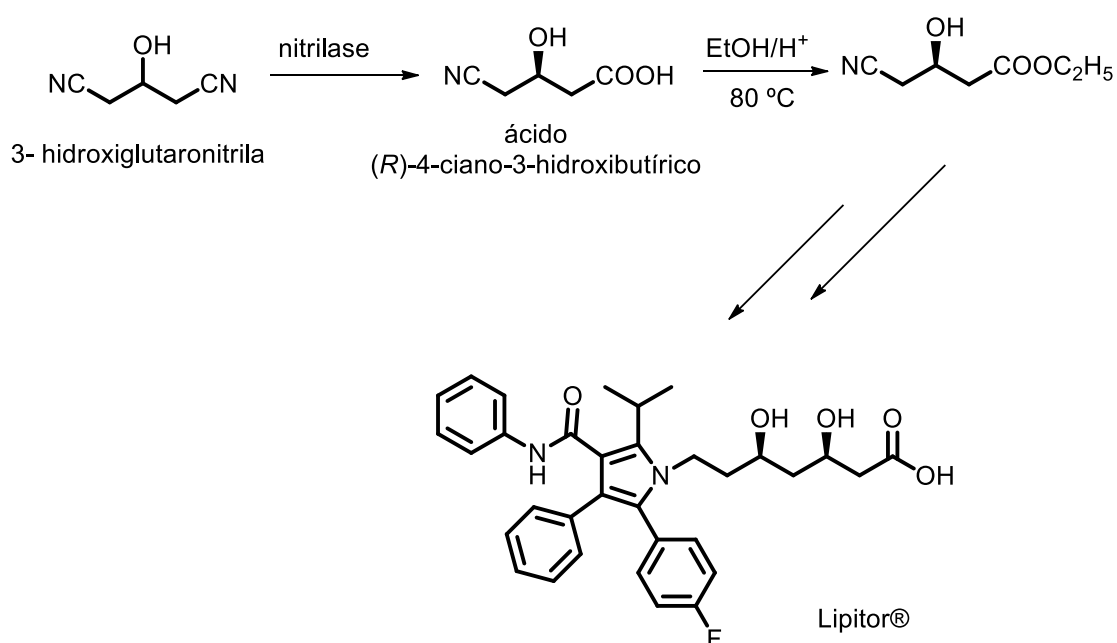


Fonte: Adaptado de Shapiro e colaboradores (SHAPIRO *et al.*, 2001)

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

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

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



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

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

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

Substrato	Tempo (h)	Produto e rendimento
	24	80%
	24	 $R^1 = \text{CN}$ $R^2 = \text{COOH}$ 65% $R^1 = \text{COOH}$ $R^2 = \text{CN}$ 16%
	24	 $R^1 = \text{CN}$ $R^2 = \text{COOH}$ 11% $R^1 = \text{CN}$ $R^2 = \text{CONH}_2$ 65%
	30	67%
	30	69%
	14	99%
	14	86%

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

2. OBJETIVOS

Investigar a especificidade de substratos e a seletividade da enzima nitrila hidratase na conversão de nitrilas em amida, empregando alguns princípios da Química Verde.

Metas:

1- Clonar e expressar NHase dos micro-organismos *Klebsiella oxytoca* e *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 e avaliar a especificidade da enzima recombinante em relação a diferentes substratos.

2- Realizar reação enzimática com nitrila hidratase (NHase) comerciais para a obtenção de 4-(cianometil)benzenoacetanamida, intermediário chave na síntese de compostos de interesse industrial. E aplicação como material de partida em reações de Grignard e transamidação.

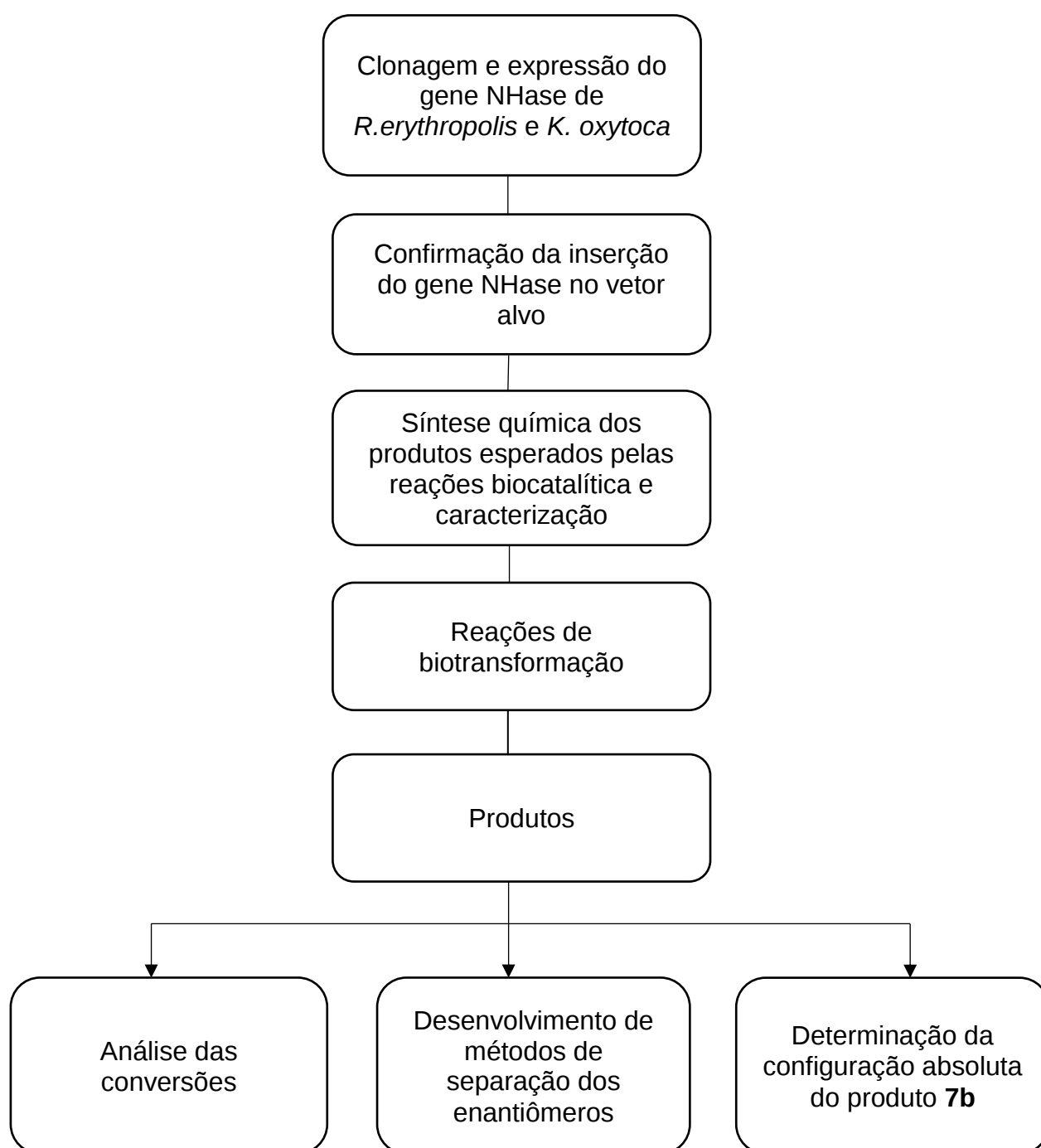
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

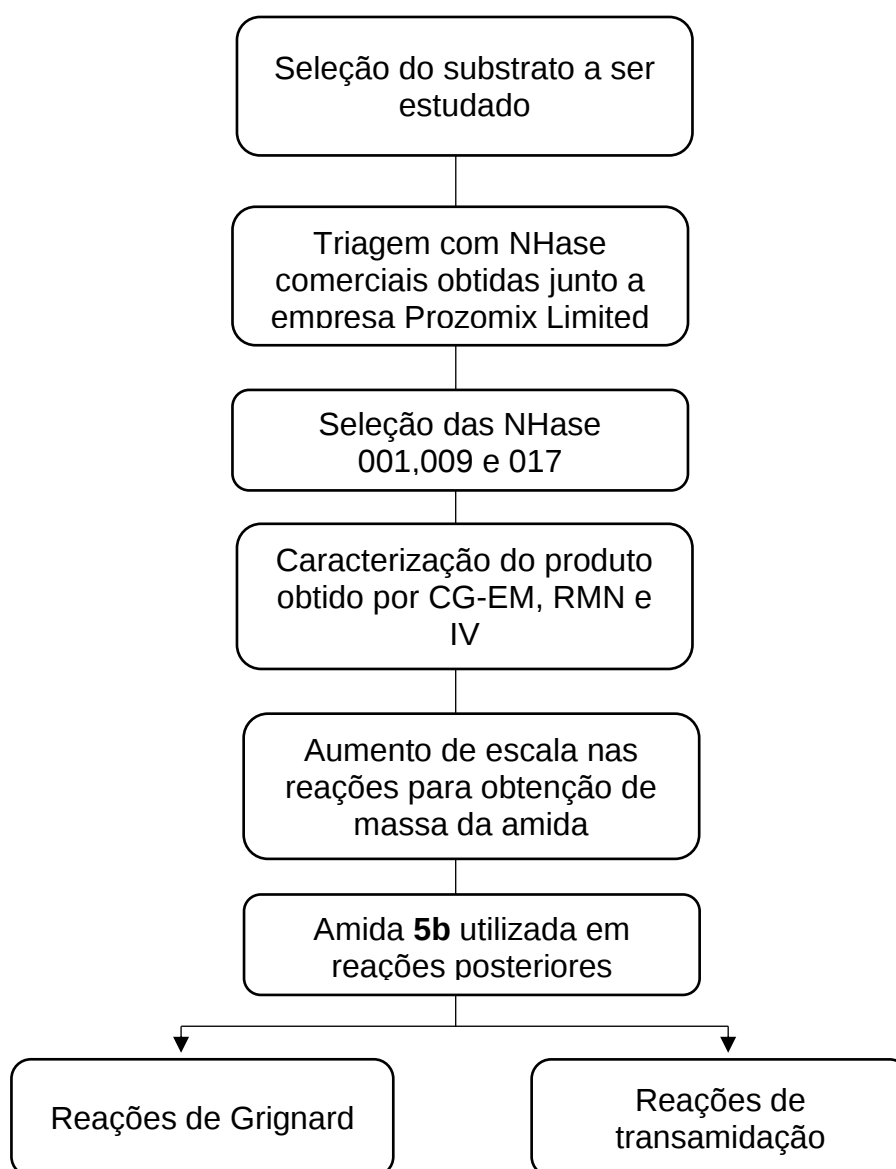
Os fluxogramas 1 e 2 sumarizam a linha de raciocínio adotada para desenvolvimento deste trabalho.

3.1. Planejamento de trabalho

O desenvolvimento deste trabalho encontra-se descrita e resumida nos fluxogramas 1 e 2 abaixo:

Fluxograma 1: Etapas para o desenvolvimento do trabalho



Fluxograma 2: Planejamento para o desenvolvimento do trabalho

3.2. Construção do plasmídeo recombinante de *R. erythropolis* ATCC 4277

Os genes que codificam NHase de *R. erythropolis* ATCC 4277 foram inseridos no vetor de expressão pACYCDuet-1 (4008 pb). Este vetor foi desenvolvido para a co-expressão de dois genes alvo e contém dois promotores T7lac separados e duas regiões de múltiplos locais de clonagem (MCS). Para a construção do plasmídeo recombinante pACYCDuet-NH-RE, o gene de *R. erythropolis* ATCC 4277 foi amplificado por PCR usando primers específicos (Tabela 5).

Tabela 5. Primers desenhados para a amplificação e sequenciamento dos genes que codificam NHase. Em vermelho, estão representadas as caudas que ficaram livres para se ligar ao vetor na segunda PCR. Os códons grifados representam start e stop.

Primer	Sequências
NHa-F	5'-AGATATACCATGGGCAGCAGCATGTCAGTAACGATCGACCACAC-3'
NHa-R	5'-TACGATTACTTTCTGTTCTGACTTAAGCCCTGGAATGCTGGAAGATCAG-3'
ativador-F	5'-TAAGAAGGAATATACATATGGCAGATCTCATGTCGACACACGACTTCC-3'
ativador-R	5'-CTCAGCGGTGGCAGCACAAATCAACGGTCTGGTTCG-3'
Koxyt NHase-F	5' - GGATAACAATTTACACAGGAAACATGAGCCATAAACACGACCACG - 3
Koxyt NHase-R	5' - GAAAATCTTCTCTCATCCGCCCGACGCTCTCATGTTGTT AACC - 3
DuetUp2	5'-TTGTACACGGCCGCATAATC-3'
T7 terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
pACYCDuetUp1	5'-GGATCTCGACGTTCTCCCT-3'
DuetDown1	5'-GATTATGCGGCCGTGTACAA-3'

O gene ativador foi amplificado usando os primers ativador-F e ativador-R (NH-AT1) e os primers NHa-F/NHa-R foram usados para amplificar o fragmento de DNA que codifica as subunidades α e β (NH-AB1), cada um contendo uma sequência de codificação do gene e uma extensão que se sobrepõe aos locais de inserção no vetor (Figura 7). Após a purificação, os produtos de PCR foram nomeados de megaprimers e utilizados na amplificação linear do vetor.

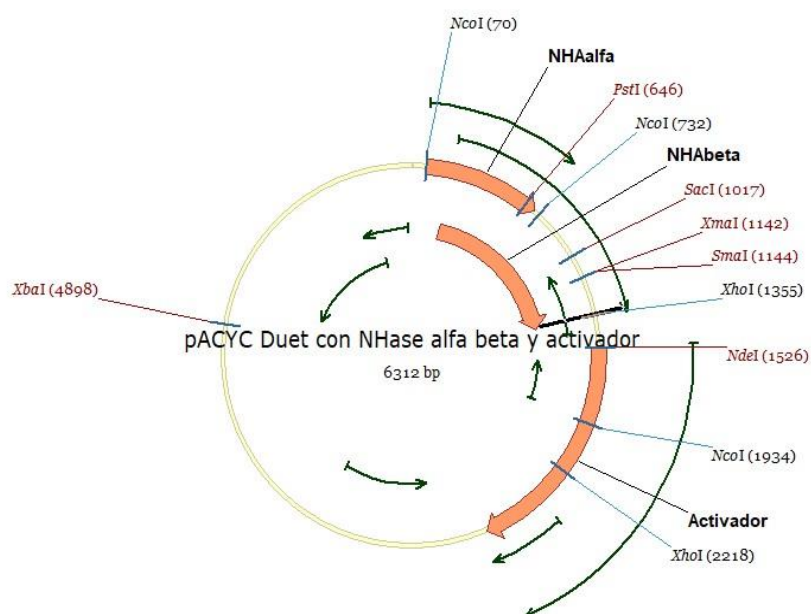


Figura 7. Esquema do vetor recombinante pACYCDuet-1-NHase

Na primeira etapa, o gene ativador (1200 bp) foi incorporado ao vetor pACYCDuet-1 e cada uma das cadeias de DNA hibrida com o vetor de destino. Em seguida, o vetor parental foi digerido por *DpnI* e a mistura foi, finalmente,

transformada em células competentes de *E. coli* JM109. Os clones positivos foram confirmados por PCR e o plasmídeo recombinante (pACYCDuet-NH-AT) foi purificado e utilizado na etapa seguinte. Na segunda reação de amplificação linear, o gene das subunidades (1286 bp) foi clonado em pACYCDuet-NH-AT e as colônias positivas foram rastreadas por PCR para a presença do gene de interesse. Clones positivos foram confirmados por sequenciamento e o plasmídeo recombinante denominado pACYCDuet-NH-RE (Figura 8).

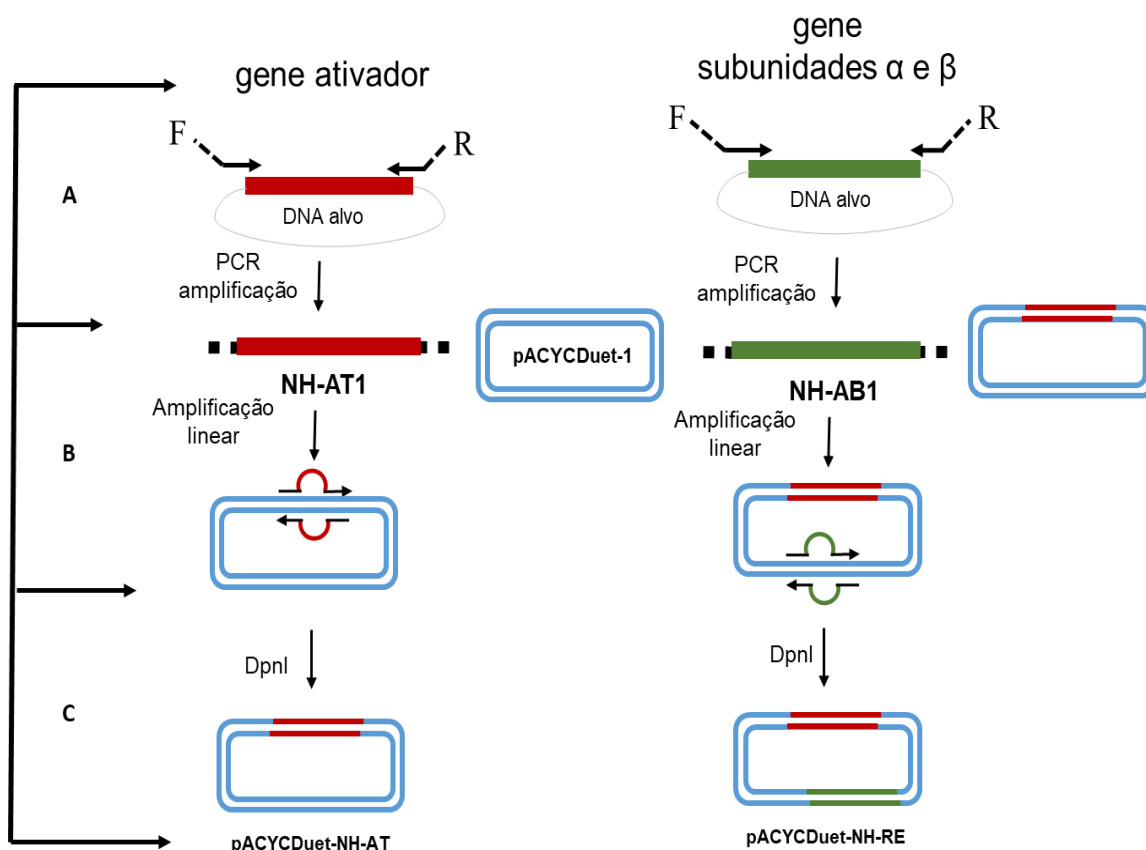


Figura 8. Construção do plasmídeo recombinante por clonagem RF. (A) A primeira PCR amplifica os genes (ativador, subunidades α e β) que codificam a proteína de interesse. (B) Na segunda PCR, o produto da primeira PCR foi usado como megaprimer para amplificação linear do vetor escolhido. (C) O plasmídeo parental foi digerido com DpnI antes da transformação.

O método de clonagem livre de restrição foi efetivo na clonagem do gene NHase de *R. erythropolis* ATCC 4277, independente dos sítios de restrição, e a co-expressão dos genes (subunidades α e β e gene ativador) produziu uma NHase ativa. As evidências deste estudo apontam para as vantagens da abordagem da clonagem RF, o que a torna uma alternativa atraente comparada

a outros procedimentos de clonagem, uma vez que permite uma inserção precisa e perfeita da inserção de DNA, sem sequências adicionais desnecessárias. Além disso, a reação é altamente eficiente e adequada para clonagem de alta produtividade.

3.3. Construção do plasmídeo recombinante de *K. oxytoca*

Para a NHase de *K. oxytoca* foram clonados conjuntamente quatro genes, os dois componentes da enzima (subunidades α e β), um ativador e transportador de cobalto. O vetor recombinante foi desenvolvido através da amplificação do gene NHase de *K. oxytoca* usando os primers Koxyt NHase- F e Koxyt NHase- R (Tabela 5), seguido de uma segunda PCR para incorporação do gene ao vetor pkk223-3 (4586 bp). A amplificação dos genes que codificam NHases de *K. oxytoca* apresentam 2664 bp (Figura 9B). O vetor obtido é mostrado na figura 9A.

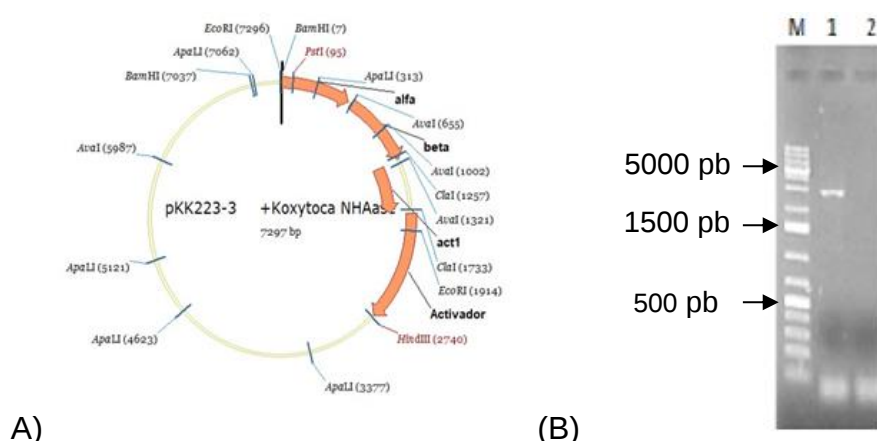


Figura 9. (A) Esquema do vetor recombinante pkk223-3-NHase. (B) Eletroforese em gel de agarose das amplificações de NHase (entrada 1). A entrada 2 é controle negativo. M: marcador de massa molecular, pb: pares de base.

As colônias brancas (controle positivo) foram selecionadas (Figura 10) e após crescimento por 24 h a 37 °C em 5 mL de meio LB contendo ampicilina, o DNA plasmidial destas células foi extraído utilizando-se o kit PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification (Invitrogen). Duas colônias foram enviadas para sequenciamento do DNA e nomeadas pNHaseKO3 e pNHaseKO4.

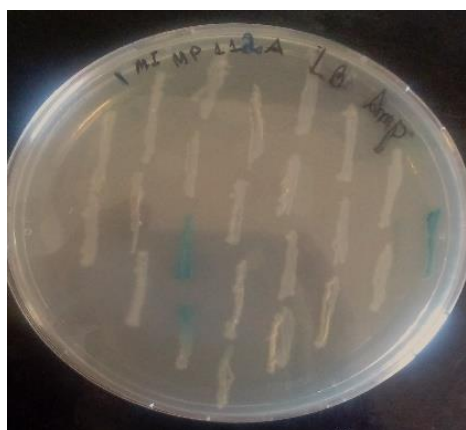


Figura 10. Triagem branco-azul de *E. coli* JM109 para a presença do gene NHase
Fonte: o autor

3.4. Análise da sequência de nucleotídeos

A análise da sequência de nucleotídeos de pACYCDuet-NH-RE confirmou a presença do fragmento de DNA do gene NHase, composto de subunidades α e β , bem como um gene ativador. O sequenciamento foi realizado usando os primers pACYCDuetUP1 e DuetDOWN1 para identificar o gene das subunidades α e β , enquanto os primers DuetUP2 e T7terminator foram usados para confirmar a inserção do gene ativador.

A sequência de proteínas da subunidade α de *R. erythropolis* ATCC 4277 foi alinhada com outras sequências de subunidade α . O resultado mostrou que a subunidade α de *R. erythropolis* ATCC 4277 contém um padrão característico de ligação de ferro (CSLCSC), que difere do padrão de ligação de cobalto (CTLCSC) (Figura 11).

	:: :::: ::*: *:***** .**:* ***** *:.* .**:*: **.* :* *
NHase_Rhodococcus_erythropolis_ATCC_4277	IVAVEDTPTLKNVI/CSLCSC/AWPILGLPPTWYKSFYRARVVREPRKVLSEMG-
Rhodococcus_sp._NN5a	IVAVEDTPTLKNVI/CSLCSC/AWPILGLPPTWYKSFYRARVVREPRKVLSEMG-
Microbacterium_sp._AJ115	IVAVEDTPTLKNVI/CSLCSC/AWPILGLPPTWYKSFYRARVVREPRKVLSEMG-
Gordonia_polyisoprenivorans	IVALEDTPSLKNVI/CSLCSC/AWPILGLPPTWYKSFYRARVVREPRKVLSEMG-
Bacillus_sp._NN1	IVAVEDTPTLKNVI/CSLCSC/AWPILGLPPTWYKSFYRARVVREPRKVLSEMG-
Curtobacterium_sp._LCF50	IVAVEDTPTLKNVI/CSLCSC/AWPILGLPPTWYKSFYRARVVREPRKVLSEMG-
Rahnella_sp._SS1-7	IVAVEDTPTLKNVI/CSLCSC/AWPILGLPPTWYKSFYRARVVREPRKVLSEMG-
Paenibacillus_sp._NN32	IVAVEDTPTLKNVI/CSLCSC/AWPILGLPPTWYKSFYRARVVREPRKVLSEMG-
Pseudonocardia_thermophila	MMWVENTIDEVHHVV/CTLCSC/FWPVLGLPPNWFKEPQYRSRVVREPRQLLKEEF
Sphingobium_sp._bal	IVALDDASAVKHVV/CTLCSC/AWPILGLPPTWYKSFYRARICREPRKVLSEMG-
Pseudomonas_putida	IVALENTPTLQNV/CTLCSC/AWPVLGLPPDWYKSFYRARVVREPRKVLSEMG-

Figura 11. Sequências conservadas de aminoácidos da subunidade α de NHase de vários micro-organismos. Os padrões de ligação de cobalto (CTLCSC) ou ferro (CSLCSC) estão destacados. Idêntico (*), fortemente similar (:) e pouco semelhante (.).

Uma análise filogenética foi realizada para comparar a evolução molecular da subunidade α desta espécie com outras reportadas no banco de dados do Genbank. Os resultados mostraram que as sequências conservadas de aminoácidos da subunidade α de *R. erythropolis* compartilharam homologia com a subunidade α de NHase do tipo Fe de *Bacillus* sp. NN1 (100%), *Paenibacillus* sp. NN32 (100%), *Rhodococcus* sp. NN5a (99%), *Microbacterium* sp. AJ115 (98%) e *Gordonia polyisoprenivorans* (83%) (Figura 12).

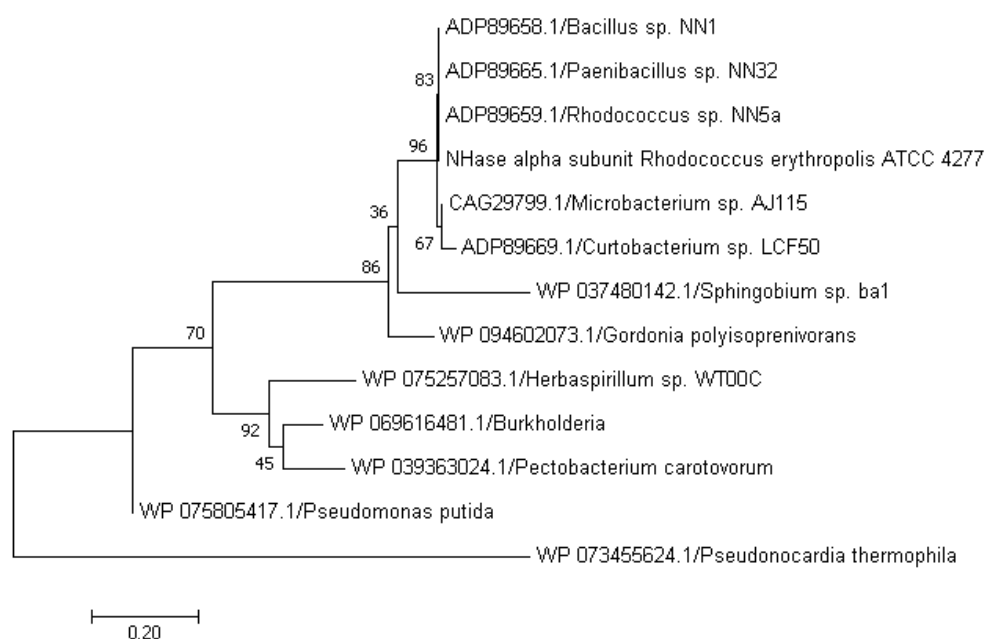


Figura 12. Análise filogenética da subunidade α de NHase de *R. erythropolis* comparada com outras reportadas na literatura

O sequenciamento do gene NHase de *R. erythropolis* ATCC 4277 expressa em *E.coli* mostrou que as subunidades α e β do gene contêm 624 e 639 bases, e 221 e 220 aminoácidos, respectivamente. A sequência de aminoácidos da subunidade β de *R. erythropolis* ATCC 4277 exibiu 97% de homologia com a sequência de aminoácidos de *Bacillus* sp. SW2-21, 93% de identidade com *Microbacterium* sp. SW2-8 e 88% de identidade com *Rhodococcus opacus*.

A importância da subunidade β para a atividade catalítica é sugerida pelo fato de que todas as NHases conhecidas possuem subunidade β ou subunidades homólogas que estão envolvidas com o complexo do sítio ativo. Uma rede de ligações de hidrogênio altamente conservada liga as duas subunidades, inclusive ligações entre os resíduos de cisteína pós-traducional da

subunidade α e dois resíduos de arginina da subunidade β que, quando mutados, reduz drasticamente a atividade ou a suprime completamente (NELP *et al.*, 2014).

A sequência de aminoácidos para o gene ativador (400 aa) de *R. erythropolis* ATCC 4277 foi alinhada com outras sequências de gene ativador de NHase. Nossa sequência mostrou homologia significativa com ativadores de *Microbacterium* sp. AJ115 (98%), *Rhodococcus* sp. AJ270 (98%) e *Rhodococcus* sp. N-771 (75%). A presença do gene ativador de NHase foi relatada para melhorar a solubilidade e a atividade enzimática de NHase em *Rhodococcus* sp. N771 e N774, *Rhodococcus erythropolis* AJ270 e *Pseudoxanthomonas* sp. AAP-7 (SONG *et al.*, 2008; ZHANG *et al.* 2017). No entanto, o gene ativador não foi necessário para expressão ativa das NHases recombinantes de *Bacillus* sp. BR449 e *Comamonas testosteroni* Ni1 (KIM; ORIEL, 2000; PEI *et al.*, 2014).

O gene ativador de *R. erythropolis* ATCC 4277 contém resíduos de cisteína conservado (CXCC), presente nas posições 72-75, crucial na ligação e transporte de metais e na regulação de reações redox (LU *et al.*, 2003). Esta alta homologia na sequência de aminoácidos do gene ativador com outros ativadores NHase indica sua contribuição para a expressão funcional da NHase em *E. coli* (Tabela 6).

Tabela 6. Sequência de aminoácidos do gene ativador de NHase de alguns micro-organismos

Micro-organismo	Região CXCC
<i>Pseudomonas putida</i> F1	69LIEMSNGCICCTLRADLLEQISALARQ95
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> B23	69LIEMSNGCICCT LRADLLEQISDLARQ95
<i>Rhodococcus</i> sp. N771	66LVEMTNGCICCTLR-DLLSEISALARS91
<i>Rhodococcus erythropolis</i> AJ270	66LVEMTNGCICCTLRDLDLSEISALAAA91
<i>Rhodococcus erythropolis</i> A4	66LVEMTNGCICCTLRDLDLSEISALAAD91
<i>Rhodococcus globerulus</i> A-4	66LVEMTNGCICCTLRDLDLSEISALAAD91
<i>Microbacterium</i> sp. AJ115	66LVEMTNGCICCTLRDLDLSEISALAAA91

Fonte: adaptada de Pei e colaboradores (PEI *et al.*, 2014)

No sequenciamento dos clones de *K. oxytoca* (pNHseKO3 e pNHseKO4) não foi identificado a inserção do gene NHase.

3.5. Expressão de NHase recombinante em *E. coli*

O gene NHase de *R. erythropolis* ATCC 4277 foram clonados e inseridos no vetor de expressão pACYCDuet-1. O plasmídeo recombinante foi transformado em *E. coli* BL21 (DE3) e a temperatura de indução foi reduzida para 20 °C para evitar a agregação da NHase recombinante. A expressão das proteínas correspondentes em *E. coli* foi confirmada por SDS-PAGE, variando o tempo de indução (24 h e 48 h). As proteínas da subunidade α e β (~ 23 kDa) e o gene ativador (~ 45 kDa) foram expressos em gel SDS-PAGE (Figura 13). A análise SDS-PAGE mostrou o tamanho esperado para a subunidade α e β , porém com baixo nível de expressão. Como as subunidades α e β têm tamanho semelhante, não foi possível avaliar o nível de expressão das subunidades individuais em SDS-PAGE, como já foi reportado por Song e colaboradores (SONG *et al.*, 2008).

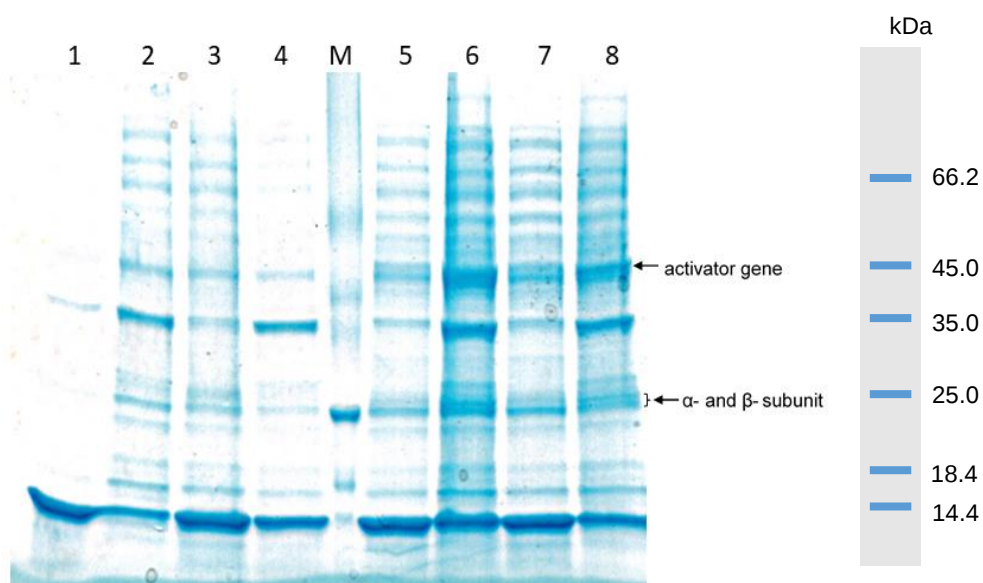


Figura 13. Análise por SDS-PAGE da expressão de NHase recombinante. M: marcador de proteína. As entradas indicam: 1 e 2 (pACYCDuet1-solúvel/ insolúvel-24h), 3 e 4 (pACYCDuet1-solúvel/insolúvel-48h, 5 e 6 (pACYCDuet-NH-RE-solúvel/insolúvel-24h), 7 e 8 (pACYCDuet-NH-RE solúvel/insolúvel-48h)

3.6. Determinação das proteínas totais - Ensaio de Bradford

Foi realizada a quantificação da quantidade de proteínas totais presentes no extrato enzimático de pACYCDuet-NH-RE, de modo a ter uma estimativa da quantidade de enzima empregada nas reações de biocatálise

usando esses extratos. O ensaio consiste de um teste colorimétrico que se baseia na mudança de absorvância do corante Azul Brilhante de Coomassie G-250 quando ligado às proteínas. É uma metodologia simples, rápida e de baixo custo, capaz de dosar a quantidade de proteínas totais presentes em solução. Para construção da curva analítica foram usadas as concentrações de 0,125, 0,25, 0,5 e 1 mg mL⁻¹. Todos os pontos foram feitos em triplicata. Na Tabela 7 se encontram as médias de Absorvância em 595 nm obtidas.

Tabela 7. Curva analítica do Ensaio de Bradford

Concentração (mg/mL)	Abs 595nm
0,062	0,069
0,125	0,078
0,25	0,088
0,5	0,101
1	0,132

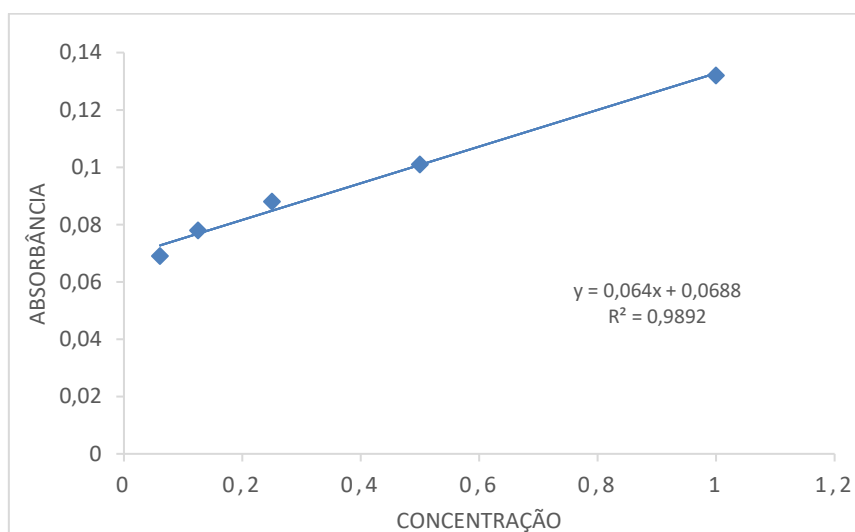


Figura 14. Curva Analítica - Ensaio de Bradford

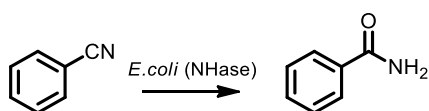
Após a construção da curva analítica foi realizada a medida da absorvância do extrato enzimático de pACYCDuet-NH-RE após a diálise (medida realizada em duplicata). Na Tabela 8 se encontram as médias das absorvâncias obtidas, bem como o valor de concentração encontrado quando as absorvâncias foram “interpoladas” na equação de reta da curva da Figura 14.

Tabela 8. Proteínas totais presentes no extrato enzimático pós diálise

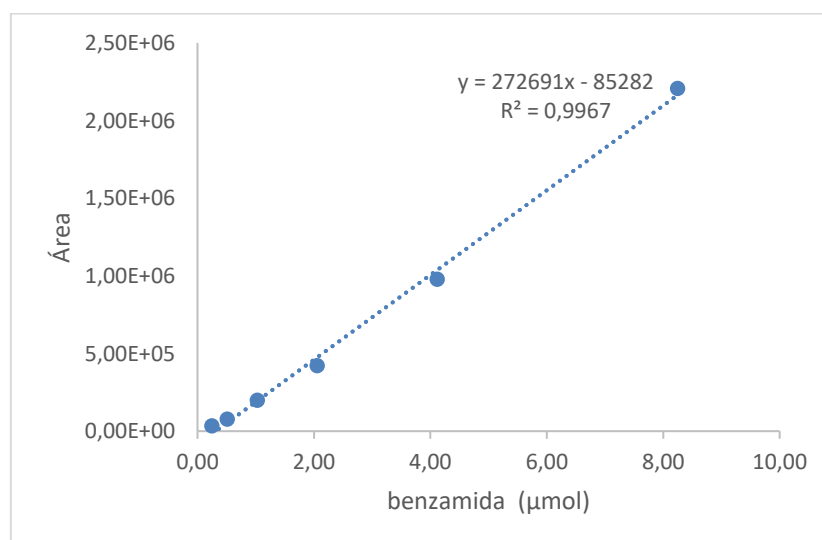
Extrato	Abs 595nm	Concentração (mg/mL)
pACYCDuet-NH-RE	0,082	0,206

3.7. Medida da atividade enzimática

A atividade enzimática foi verificada frente a formação da benzamida através da curva analítica apresentada na Tabela 9 e Figura 15.

Tabela 9. Dados para a construção da curva analítica para determinação da atividade da NHase

Benzamida (μmol)	Área (uV)
0,25	33271,4
0,51	75784,1
1,03	198694,1
2,06	420694,9
4,12	977553,9
8,25	2205359,3

**Figura 15.** Curva Analítica – Determinação da atividade enzimática

Como a curva analítica apresentou coeficiente de correlação (R^2) de 0,99, a equação da reta apresentou um bom ajuste e pode ser utilizada para os cálculos de atividade. A atividade enzimática foi definida como a quantidade de benzamida formada, a partir da benzonitrila, por minuto, por miligrama de células. A atividade específica das células totais de pACYCDuet-NH-RE foi de 6 U/mg de proteínas.

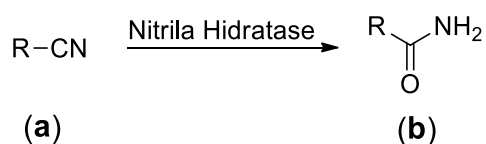
3.8. Especificidade do Substrato

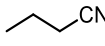
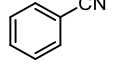
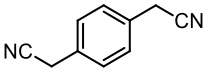
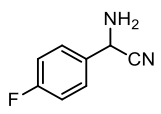
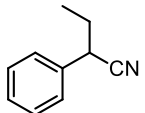
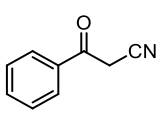
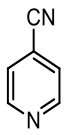
Inicialmente os compostos 2b, 3b, 6b e 7b foram sintetizados via hidrólise ácida das nitrilas catalisadas por ácido sulfúrico e caracterizados por RMN de ^1H , ^{13}C e CG-EM. Esses compostos foram usados como padrões no monitoramento dos processos biocatalíticos.

As células inteiras de *E. coli* recombinante foram usadas em reações de biotransformação para avaliar a especificidade dos substratos e os resultados são apresentados na Tabela 10. A NHase pode ser classificado em dois grandes grupos com base no componente de íon metálico: tipo Fe e tipo Co. De acordo com a literatura, esses dois tipos diferentes de NHases exibem diferentes propriedades enzimáticas, particularmente a especificidade do substrato (ENDO *et al.*, 2001; RZEZNICKA *et al.*, 2010)

NHases tipo Co geralmente convertem compostos aromáticos e alifáticos, enquanto NHases do tipo Fe catalisam preferencialmente a hidratação de compostos alifáticos (RZEZNICKA *et al.*, 2010). No entanto, foi relatado que várias NHases do tipo Fe apresentam ampla especificidade de substrato, tais como NHases de *Rhodococcus equi* TG328-2, *Pseudomonas putida* F1 e *R. erythropolis* A4 (BRADY *et al.*, 2004; PEI *et al.*, 2014; RZEZNICKA *et al.*, 2010)

A NHase tipo Fe de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 não segue essas tendências, pois altas conversões foram obtidas para uma ampla gama de nitrilas alifáticas e aromáticas, sem preferência pelas alifáticas ou aromáticas.

Tabela 10. Especificidade dos substratos utilizando *R.erythropolis* ATCC 4277

Entrada	Nitrilas	Estrutura	Conversão ^a (%)	ee (%)
1	acrilonitrilia (1a)		0	
2	butironitrila (2a)		>99	
3	isobutironitrila (3a)		>99	
4	benzonitrila (4a)		>99	
5	1,4-fenilenodiacetonitrila (5a)		21	
6	2-amino-2-(4'-fluorofenil)acetonitrila (6a)		88	7 ^b
7	2-fenilbutironitrila (7a)		11	60 ^c (S-seletiva)
8	benzoilacetonitrila (8a)		1	
9	4-cianopiridina (9a)		0	

Condições experimentais: 0,2 mmol das nitrilas, 1,5 g de células (*E. coli* recombinante), 50 mL de tampão fosfato (0,1 M), 28 °C por 24 horas.

a- conversão determinada por GC-FID

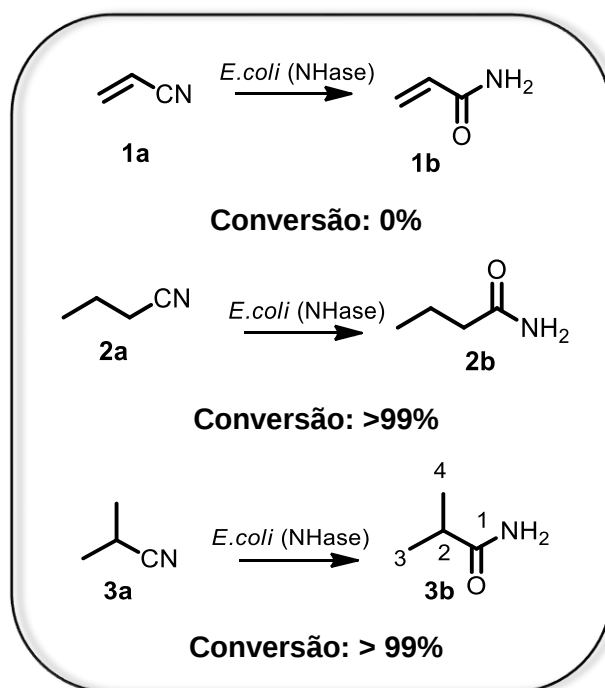
b- determinada por GC-FID

c- determinada por HPLC

➤ Hidratação das nitrilas alifáticas

A nitrila hidratase de *R. erythropolis* foi eficiente na hidratação de nitrilas alifáticas, como butironitrila (**2a**) e isobutironitrila (**3a**), com conversões acima de 99% na formação de butiramida (**2b**) e isobutiramida (**3b**), respectivamente. Por outro lado, nenhuma atividade foi encontrada para a acrilonitrila (**1a**) (Esquema 7) que concorda com Endo e colaboradores (2001) que relata que a NHase do tipo Co é mais estável e eficiente para a produção de acrilamida (**1b**) do que a tipo Fe (ENDO *et al.*, 2001)

Esquema 7. Hidratação enzimática das nitrilas alifáticas



Condições experimentais: 0,2 mmol das nitrilas, 1,5 g de células (*E. coli* recombinante) 50 mL de tampão fosfato (0,1 M), 28 °C.

O composto **2b** foi caracterizado por CG-EM e comparado com a literatura (ABEBE; MACCOLL; BOWEN, 1997). No espectro de massas (Apêndice-Espectro E1) foi possível identificar o pico do íon molecular de razão m/z de 87 e os fragmentos característicos com m/z (%) 72 (22), 60 (4), 59 (100).

O composto **3b** foi caracterizado por RMN de ^1H , ^{13}C e CG-EM e comparado com a literatura (ABEBE; MACCOLL; BOWEN, 1997; BOLYOG-NAGY *et al.*, 2014). No espectro de RMN de ^1H (Apêndice-Espectro E3) observa-se um simpleto largo em 5,42 ppm referente a dois átomos de hidrogênio do

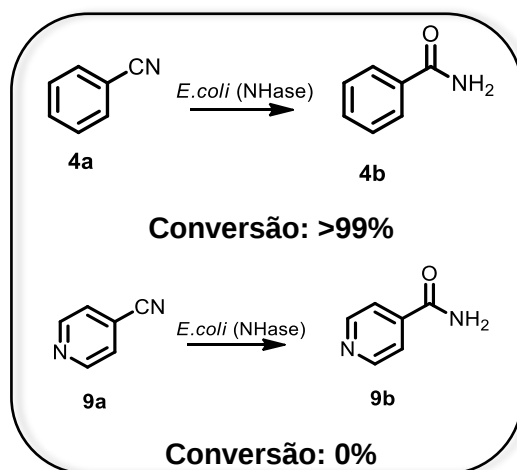
átomo de nitrogênio. Em 2,45-2,41 ppm, observa-se um hepteto, integrando para um hidrogênio H-2. E em 1,18 ppm, observa-se um duplete, integrando para 6 hidrogênios H-3 e H-4. No espectro de massas (Apêndice-Espectro E2) foi possível identificar o pico do íon molecular de razão m/z 87 e os fragmentos característicos com m/z (%) 72(60), 60 (3), 59 (44), 44 (100).

➤ Hidratação das nitrilas aromáticas

Os compostos aromáticos foram hidratados com reatividade bastante distintas, variando de excelente para **4a** e **6a**, moderada para **5a**, baixa para **7a** e **8a** e sem atividade para **9a**.

A conversão de benzonitrila (**4a**) em benzamida (**4b**) foi acima de 99%, enquanto não houve conversão de 4-cianopiridina (**9a**) (Esquema 8), sugerindo que a substituição de um átomo de carbono por um de nitrogênio no anel aromático pode ser responsável pela completa inativação desta enzima. O composto **4b** foi caracterizado por CG-EM e comparado com a literatura (SHARIF; WU, 2015). No espectro de massas (Apêndice-Espectro E5) foi possível identificar o pico do íon molecular de razão m/z de 121 e os fragmentos característicos com m/z (%) 105 (100), 77 (72), 51 (20), 50 (9), 44 (10).

Esquema 8. Hidratação enzimática das nitrilas **4a** e **9a**

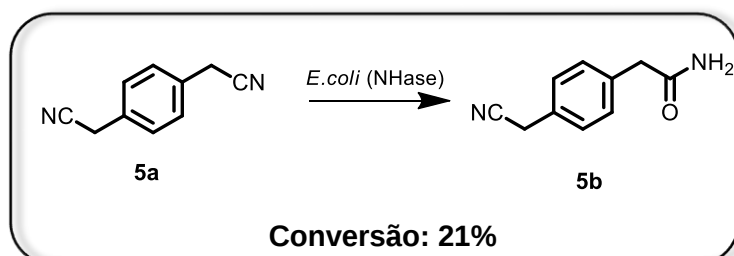


Condições experimentais: 0,2 mmol das nitrilas, 1,5 g de célula (*E. coli* recombinante) 50 mL de tampão fosfato (0,1 M), 28 °C.

Quando um grupo espaçador CH₂ foi introduzido, a conversão de 1,4-fenilenotrietonitrila (**5a**) caiu para 21%, mas com alta regiosseletividade, produzindo apenas a correspondente monoamida, 4-

(cianometil)benzenoacetamida (**5b**) da dinitrila em 24h (Esquema 9). Brady e colaboradores (2004) relataram que a NHase de *Rhodococcus* ATCC BAA-870 também foi regioselectiva na formação da monoamida (**5b**) a partir do composto (**5a**) (BRADY *et al.*, 2004).

Esquema 9. Hidratação enzimática da nitrila **5a**

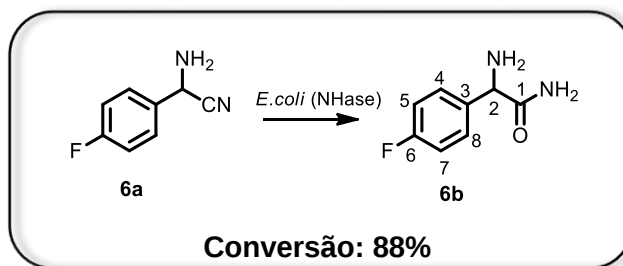


Condições experimentais: 0,2 mmol das nitrilas, 1,5 g de célula (*E.coli* recombinante) 50 mL de tampão fosfato (0,1 M), 28 °C.

O composto **5a** apresentou-se como um sólido branco cristalino e foi analisado por CG-EM, IV e RMN e comparado com a literatura (SINGH *et al.*, 2017). Por análise em CG-EM (Apêndice-Espectro E6) foi possível identificar o pico do íon molecular de razão m/z 174 correspondente ao composto de interesse. O espectro de absorção na região do IV forneceu evidências da presença de vários grupos funcionais na estrutura do composto como: estiramento de amida primária ($-NH_2$) com duas bandas em 3373 e 3198 cm^{-1} , estiramento $-CN$ em 2248 cm^{-1} , estiramento de anel para-substituído em 1921 cm^{-1} e estiramento $-CO$ em 1649 cm^{-1} (Apêndice-Espectro E9). No espectro de RMN de 1H (Apêndice-Espectro E7) observa-se um simpleto largo em 5,43 ppm referente a 2H do átomo de nitrogênio. Em 3,75 e 3,59 ppm, observa-se simpletos, integrando para dois hidrogênios referentes aos hidrogênios do carbono metileno. E em 7,34- 7,30 ppm, observa-se um quadrupeto, integrando para os 4 hidrogênios aromáticos.

As células de *R. erythropolis* ATCC 4277 foram capazes de hidratar 2-amino-2- (4'-fluorofenil) acetonitrila (**6a**) produzindo a 2-amino-2- (4'-fluorofenil) acetamida (**6b**) com uma conversão de 88% (Esquema 10) e excesso enantiomérico de 7% (Figura 16).

Esquema 10. Hidratação enzimática da nitrila **6a**



Condições experimentais: 0,2 mmol das nitrilas, 1,5 g de célula (*E.coli* recombinante)
50 mL de tampão fosfato (0,1 M), 28 °C.



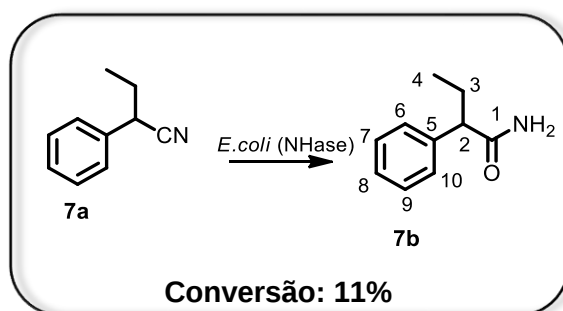
Figura 16. Cromatograma de separação dos enantiômeros de **6b** por GC-FID
(Coluna quiral Hydrodex- 1 °C/min-170 °C, 170 °C (5 min), 180 °C (20 min))

O composto **6b** foi caracterizado por RMN de ^1H , ^{13}C e CG-EM. No espectro de RMN de ^1H (Apêndice-Espectro E11) observa-se um simpleto em 1,29 ppm referente a hidrogênios ligados a nitrogênio da posição 2. Em 4,61 ppm, observa-se um simpleto referente a dois hidrogênios da amida (posição 1) e em 4,51 ppm um simpleto, integrando para um hidrogênio (H-2). Em 7,47-7,35 ppm, observa-se um duplo duplete, integrando para dois hidrogênios (H-4 e H8). E em 7,10- 7,09 ppm, observa-se um tripleto, integrando para dois hidrogênios (H-5 e H-7). No espectro de massas (Apêndice-Espectro E10) foi possível identificar fragmentos característicos com m/z (%) 95 (10), 97(40), 124 (100). A configuração absoluta da amida **6b** não foi determinada, uma vez que o excesso enantiomérico foi muito baixo.

O composto (*S*)-(+)-2-fenilbutiramida (**7b**) foi obtido como produto da transformação de 2-fenilbutironitrila (**7a**), com uma baixa conversão de 11% (Esquema 11), no entanto, com um excesso enantiomérico moderado de 60%

em 24h (Figura 17). Wang e colaboradores (2000) determinaram que a NHase de *Rhodococcus* sp. A AJ270 foi estereoespecífica na hidratação do substrato **7a** e obteve o enantiômero oposto, (*R*)-(-)- **7b**, em 35% ee, após 70h (WANG *et al.*, 2000). Em contraste, Prepechalová e colaboradores (2001) determinaram que a nitrila hidratase de *R. equi* A4 não era estereosseletiva na hidratação de **7a** para a amida correspondente (PREPECHALOVÁ *et al.*, 2001) A hidratação de **7a** por *Rhodococcus* sp. (SP 361) foi observado por Beard e colaboradores (1993) com 20% de excesso enantiomérico de (*R*)-(-)- **7b** em 25h (BEARD *et al.*, 1993) (Beard *et al.*, 1993).

Esquema 11. Hidratação enzimática da nitrila **7a**



Condições experimentais: 0,2 mmol das nitrilas, 1,5 g de célula (*E.coli* recombinante)
50 mL de tampão fosfato (0,1 M), 28 °C.

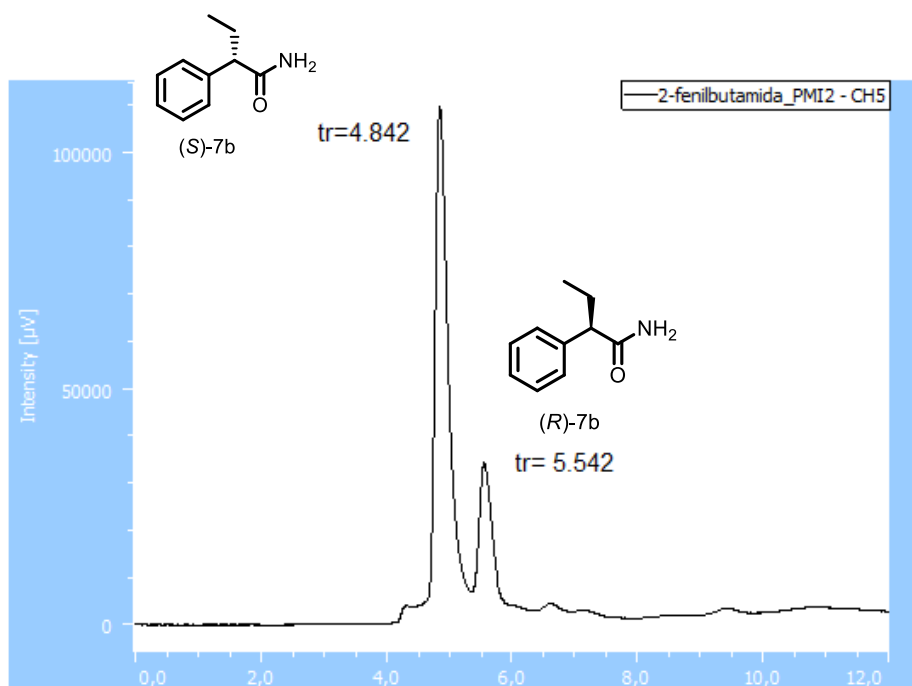
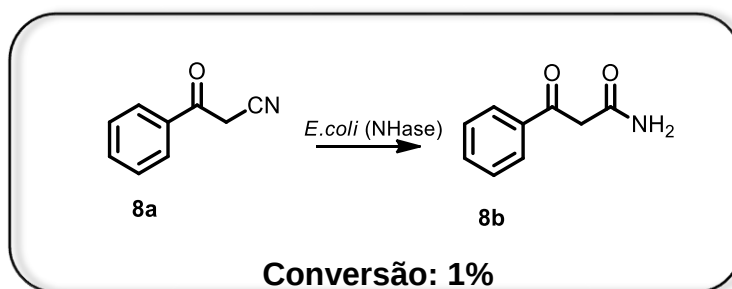


Figura 17. Cromatograma de separação dos enantiômeros de **7b** por HPLC
(coluna Chiralcel OD-H, iPrOH/Hex = 9:1, fluxo = 0,8 mL / min, 216nm λ):
tr = 4,842 min (+) **7b**; tR = 5,542 min (-)-**7b**.

O composto **7b** foi caracterizado por RMN de ^1H , ^{13}C e CG-EM e comparado com a literatura (WANG *et al.*, 2000). No espectro de RMN de ^1H (Apêndice-Espectro E16) observa-se um simpleto em 5,33 ppm referente a dois hidrogênio ligados a nitrogênio. Em 3,30 ppm, observa-se um tripleto, integrando para um hidrogênio H-2. Em 2,20 e 1,80 ppm, observa-se sinais de hidrogênios diastereotópicos, integrando para um hidrogênio cada um (H-3) e em 0,90 ppm um tripleto, integrando para três hidrogênio H-4. Em 7,35- 7,28 ppm, observa-se um multipeto, integrando para os hidrogênios do anel aromático. No espectro de massas (Apêndice-Espectro E15) foi possível identificar o pico do íon molecular de razão m/z de 163 e os fragmentos característicos com m/z (%) 77 (11), 91 (100), 119 (14). A configuração absoluta da amida **7b** foi determinada por comparação da rotação específica ($[\alpha]_D^{28} + 8,5$ (c 0.1, CHCl_3)), com dados da literatura ($[\alpha]_D^{25} -23,2$ (CHCl_3) (*R*)-(-)-2-fenilbutiramida) (WANG *et al.*, 2000).

A conversão de benzoilacetonitrila (**8a**) em 3-oxo-3-fenilpropanamida (**8b**) foi apenas de 1% (Esquema 12). O composto **8b** foi caracterizado por CG-FID, RMN de ^1H e ^{13}C anteriormente no grupo (TORDATO, 2018). Logo a amida foi identificada por comparação de tempo de retenção no CG-FID ($t_r=4,4$ min- coluna Restek Rtx®-5).

Esquema 12. Hidratação enzimática da nitrila **8a**



Condições experimentais: 0,2 mmol das nitrilas, 1,5 g de célula (*E.coli* recombinante) 50 mL de tampão fosfato (0,1 M), 28 °C.

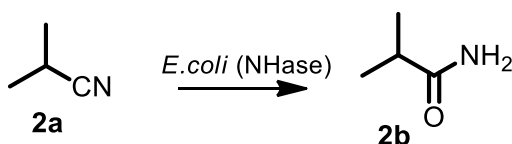
Anteriormente, supunha-se que as NHases fossem relativamente não estereoespecíficas (PREPECHALOVÁ *et al.*, 2001); entretanto, recentemente, alguns NHases enantiosseletivas de *Rhodococcus equi* A4 (PREPECHALOVÁ *et al.*, 2001), *Agrobacterium tumefaciens* d3 (BAUER; KNACKMUSS; STOLZ, 1998), *Pseudomonas putida* NRRL-18668 (FALLON; STIEGLITZ; TURNER, 1997) *Rhodococcus* sp. AJ270 (BLAKEY *et al.*, 1995) e *Klebsiella oxytoca*

(EWERT; LUTZ-WAHL; FISCHER, 2008) foram relatados. A NHase de *R. erythropolis* ATCC 4277 exibiu excesso enantiomérico baixo e moderado para os substratos **6a** e **7a**, respectivamente. Isso certamente não é satisfatório ainda, mas é um bom ponto de partida para a engenharia de proteínas. A sequência de aminoácidos da NHase de *R. erythropolis* ATCC 4277 apresentou alta homologia com a de *R. erythropolis* AJ270. Comparando estas sequências de aminoácidos, foi possível identificar a modificação de apenas 4 e 7 aminoácidos nas subunidades α e β , respectivamente. Os resultados apontam para a probabilidade de que as alterações na sequência de aminoácidos possam ser responsáveis pelas diferenças nas especificidades do substrato e enantiopreferência destas NHase (DURAN *et al.*, 1993).

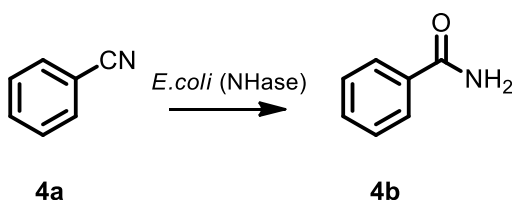
3.9 Reações com extratos enzimáticos

O extrato enzimático contendo NHase expressas em *E. coli* e proveniente do micro-organismo *R. erythropolis* ATCC 4277 foi submetido a reações de biotransformação frente aos substratos **2a**, **4a**, **5a**, **7a** (Esquema 13).

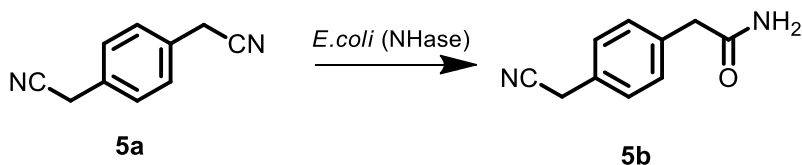
Esquema 13. Reações com os extratos enzimáticos



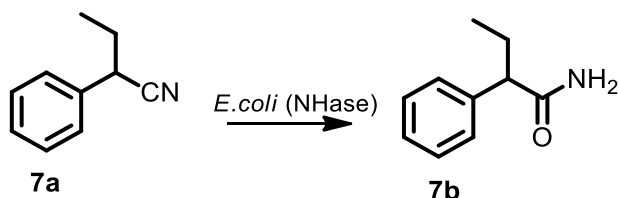
Conversão: 0%



Conversão: 0%



Conversão: 0%



Conversão: 0%

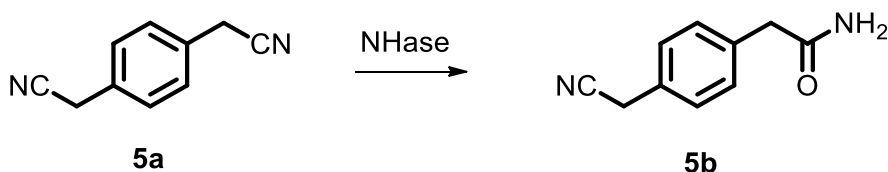
Condições experimentais: 0,2 mmol das nitrilas, 5 mL do extrato enzimático, 28 ° por 24 h.

Não foi observada reação de hidratação, frente aos substratos avaliados, com o extrato contendo a NHase. Esses resultados podem ser explicados pela limitada estabilidade de algumas enzimas fora da célula. Isso aplica-se particularmente a enzimas, nitrila hidratases, que tendem a se dissociar, com perda concomitante de atividade, fora da célula. Portanto, as NHases são usadas como biocatalisadores na forma de células inteiras, a fim de protegê-las da dissociação (SHELDON; BRADY, 2018).

3.10. Reações de catálise enzimática para formação do 4-(cianometil)benzenoacetanamida

Inicialmente foram avaliadas nove NHase (NHase 003, NHase 004, NHase 011, NHase 013, NHase 014, NHase 015, NHase 017, NHase 018 e NHclea 002) obtidas junto a empresa Prozomix. A escolha foi baseada em ensaios enzimáticos realizados anteriormente no grupo de uma coleção de 22 NHases. As reações foram realizadas para avaliar a formação do 4-(cianometil)benzenoacetanamida (**5b**) a partir do 1,4 fenilenodiacetonitrila (**5a**). (Esquema 14).

Esquema 14. Conversão do substrato **5a** para a respectiva amida **5b** por NHase



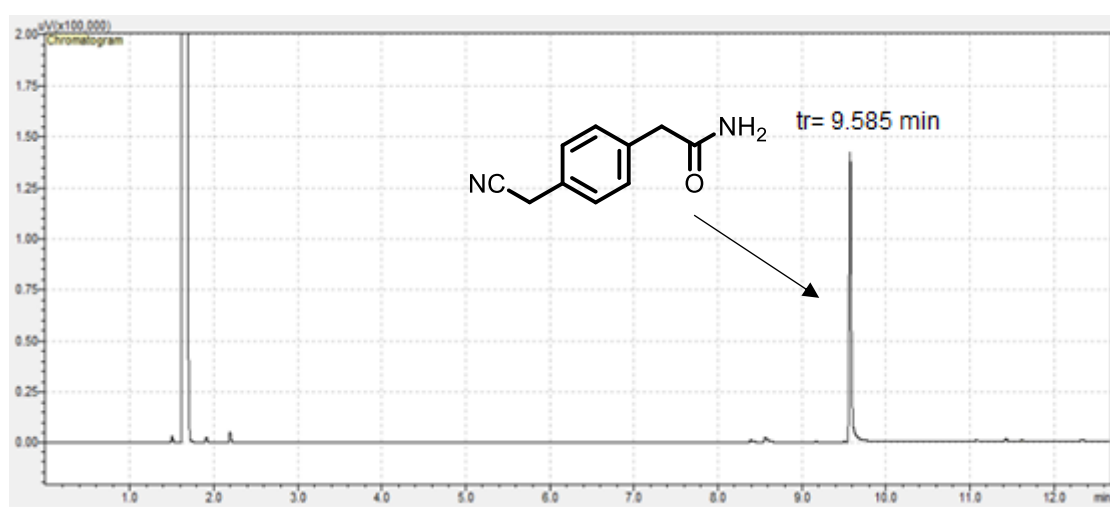
A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos com as nove NHase avaliadas.

Tabela 11. Conversão de **5a** em **5b** catalisada por NHase

Enzimas ^a	Conversão de 5a em 5b (%)
NHase 003	> 99
NHase 004	-
NHase 011	-
NHase 013	> 99
NHase 014	-
NHase 015	-
NHase 017	> 99
NHase 018	-
NHclea 002	26

^aNHases tipo Co

As reações enzimáticas com as NHase 003, 013 e 017 apresentaram altas conversões na formação da amida de interesse e o ensaio com a enzima imobilizada apresentou uma conversão de 26%. É bastante difícil conduzir a hidratação regioseletiva de dinitrilas por métodos químicos, assim a enzima nitrila hidratase foi capaz de agir de forma eficaz e regioseletiva em relação ao substrato **5a** (Figura 18). Nas reações com NHase 004, 011, 014, 015 e 018 não foi possível identificar a formação da amida e do material de partida, sugerindo que as extrações não foram efetivas.

**Figura 18** Cromatograma da reação de **5a** com NHase 017

Reações em maior escala foram realizadas com as enzimas NHase 001, 009 e 017, a fim de se obter massa suficiente do 4-(cianometil)benzenoacetanamida. O critério de escolha das enzimas foi baseado na quantidade de solução enzimática disponível e altas conversões apresentadas nos testes enzimáticos. A escolha das enzimas NHase 001 e NHase 009 foi baseada em ensaios realizados anteriormente no grupo de pesquisa. As reações apresentaram altas conversões e rendimentos (Tabela 12).

Tabela 12. Resultado das reações enzimáticas com NHase 001, 009 e 017

Reação	Enzima	Cofator	Conversão	Rendimento
1 ^a	009	Fe	> 99%	91,5%
2 ^a	009	Fe	> 99%	81,0%
3 ^a	009	Fe	> 99%	90,0%
4 ^a	009	Fe	> 99%	91,8%
5 ^a	009	Fe	> 99%	96,6%
6 ^a	009	Fe	> 99%	94,8%
7 ^a	001	Fe	> 99%	89,2%
8 ^a	001	Fe	> 99%	90,0%
9 ^a	001	Fe	> 99%	67,0%
10 ^a	017	Co	> 99%	81,7%
11 ^a	017	Co	> 99%	72,0%

As reações enzimáticas com NHase apresentaram altas conversões e bons rendimentos na síntese do 4-(cianometil)benzenoacetanamida que foi utilizado como intermediário em reações de Grignard e reações de transaminação.

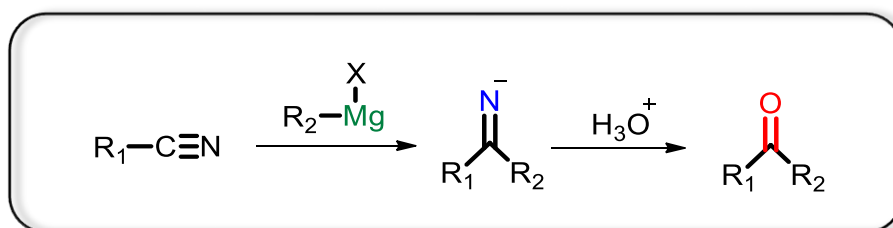
3.11. Reações com o composto 4-(cianometil)benzenoacetanamida (5b)

- **Reações de Grignard**

As cetonas em geral, especialmente as arilcetonas, são amplamente utilizadas nas indústrias agroquímica, de fragrâncias, corantes e farmacêutica. Mais importante, elas estão entre os intermediários mais versáteis disponíveis na caixa de ferramentas da síntese orgânica. Um dos métodos mais diretos para

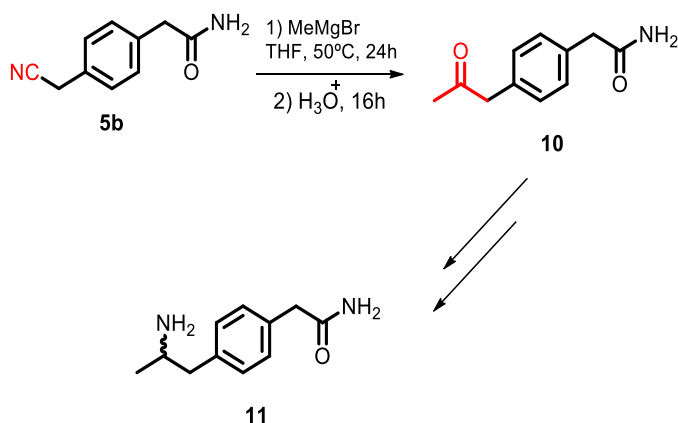
preparar esses compostos consiste na adição nucleofílica do correspondente reagente de Grignard a nitrila e subsequente hidrólise (Esquema 15) (MATEOS; RINCÓN; VILLANUEVA, 2013; RIVA *et al.*, 2010).

Esquema 15. Preparação geral de cetonas via adição nucleofílica de reagentes de Grignard a nitrila



Usamos o composto **5b** e brometo de metilmagnésio como reagentes para a preparação da imina (50°C por 24 h) e posterior hidrólise para a síntese do 4-(2-propanona)benzenoacetanamida (**10**) (Esquema 16; Figura 19). O composto **10** é um intermediário importante para a síntese do composto **11**, um bloco construtor usado na obtenção de um potente fármaco agonista de receptor β -3.

Esquema 16. Síntese do intermediário **10**



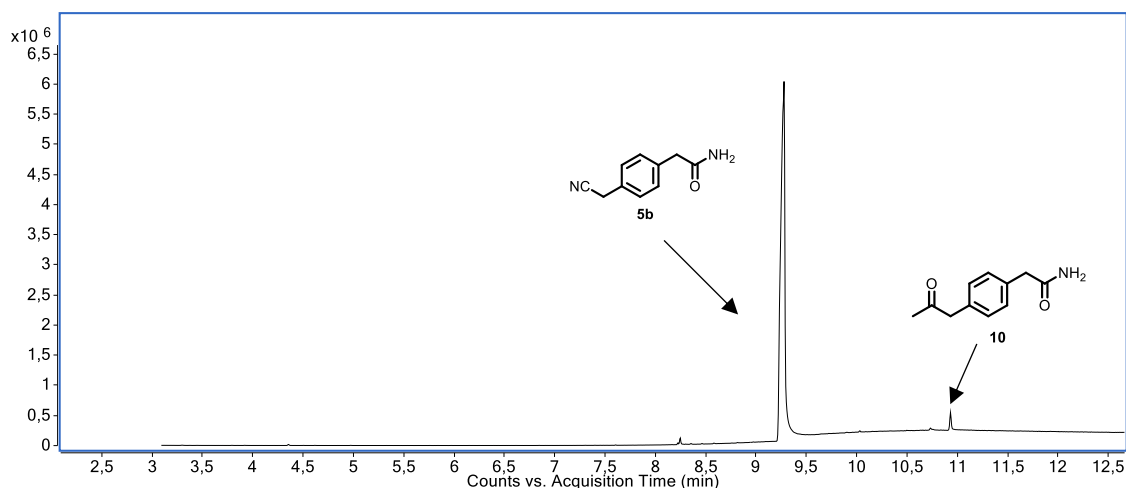


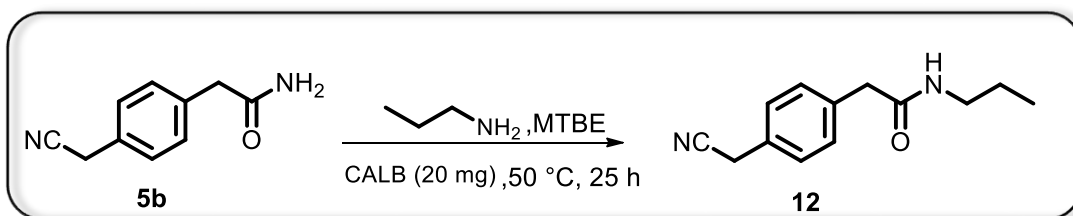
Figura 19. Cromatograma da reação de Grignard por CG-EM

No espectro de massas (Apêndice-Espectro E18) foi possível identificar fragmentações características do composto **10** com o pico do íon molecular de razão m/z de 191 e os fragmentos característicos com m/z (%) 176 (5) 147 (30), 134 (20) com conversão de 5%. Foram realizados outros testes a fim de otimização da reação, mas com o rendimento foi muito baixo os estudos foram interrompidos.

- **Reações de transamidação**

Depois de explorar a reação de Grignard do composto **5b** sem êxito, realizou-se a reação de transamidação para avaliar a eficiência com que a CAL-B catalisa esta reação (Esquema 17).

Esquema 17. Reação de transamidação do composto **5b**



Após 25 h de reação o cromatograma da reação com e sem CAL-B foram os mesmos, logo a enzima não eficiente em catalisar a reação de transamidação com esse substrato nas condições avaliadas (Figura 20).

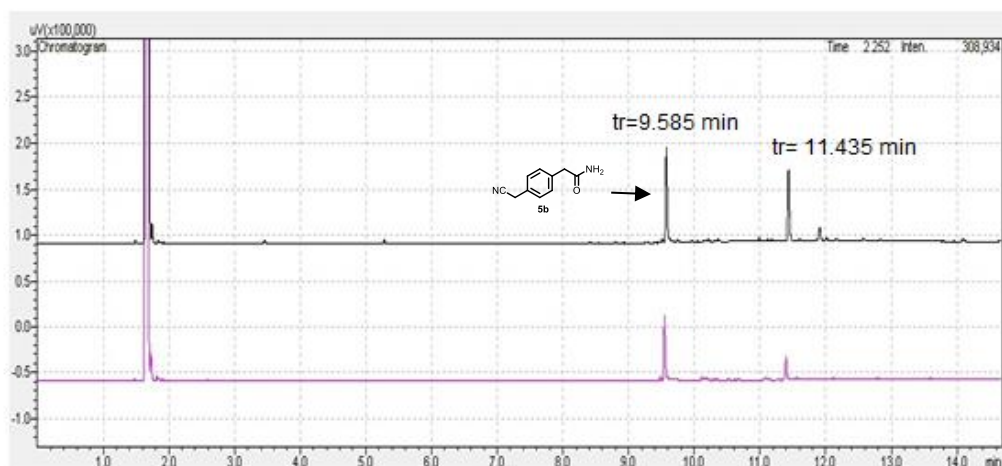


Figura 20. Cromatograma da reação de transamidação analisada por CG-FID. Em preto reação com a CALB em rosa sem a CALB

A transamidação tem se mostrado difícil de alcançar sinteticamente e enzimaticamente. Sergeeva e colaboradores (2000) reportaram o uso da CAL-B utilizando diferentes amidas nas reações de transamidação e concluíram que o aumento no tamanho do grupo ligado ao carbono da carbonila resultou em baixas conversões. Além disso, amidas aromáticas e amidas altamente ramificadas apresentaram conversão de 0% (SERGEEVA et al., 2000). Logo, o composto **5b** não foi um substrato para a transamidação. Esse resultado pode estar relacionado a presença de um grupo muito volumoso ligado ao carbono da carbonila.

5. CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Considerações gerais

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

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram registrados nos espectrômetros Bruker Fourier 600 (B_0 14,1 T) operando na frequência de 600,13 MHz para o núcleo de hidrogênio e 150,90 MHz para o núcleo de carbono. Os sinais de deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm utilizando como padrão interno tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$) e padrão externo CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7,24$; $\delta_{\text{C}} = 77,23$) e CD_3OD ($\delta_{\text{H}} = 3,35$ e $4,78$; $\delta_{\text{C}} = 49,3$). As constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz) e os sinais foram caracterizados como: duplete (d), duplo duplete (dd), multiplete (m), quadruplete (q), simpleto (s), simpleto largo (sl), tripleto (t) e sexteto (st). A técnica DEPTQ (*Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer with Retention of Quaternaries*, em inglês), sendo CH_3/CH = sinal positivo (+), CH_2/C_0 (carbono quaternário) = sinal negativo (-), auxiliou a interpretação do espectro de RMN de ^{13}C .

5.1.2 Métodos Cromatográficos

As análises por CG-FID foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo Shimadzu GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i e acoplado a um detector de ionização em chamas. O cromatógrafo operou a um fluxo constante de gás H_2 de 1 mL min^{-1} , temperatura do injetor igual a 260°C , temperatura do detector igual a 300°C . Utilizou-se coluna capilar de sílica fundida Restek Rtx®-5 ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$, 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano). As injeções das amostras foram de $1 \text{ }\mu\text{L}$ na concentração de $0,5 - 1 \text{ mg mL}^{-1}$ no modo *splitless*. A programação utilizada foi 80°C por 3 minutos, $80 - 280^\circ\text{C}$ com rampa de aquecimento à $30^\circ\text{C min}^{-1}$, e mantidas a 280°C por 5 minutos.

O excesso enantiomérico (ee) de 2-amino-2-(4-fluorofenil)acetonitrila foi determinado em CG-FID equipado com uma coluna Hydrodex® β -3P ($25 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$). O cromatógrafo operou a um fluxo constante de gás H_2 de

1 mL min⁻¹, com temperaturas no injetor e detector de 160 °C e 180 °C, respectivamente. O volume das injeções para ambas as colunas foi de 1 µL na concentração de 0,5–1,0 mg mL⁻¹, no modo *split*. O método utilizado para a separação dos enantiômeros foi: 160 °C (1 °C/1 min até 170°C), 170°C - 5 min, 180 °C- 20 min.

As análises por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-MS) foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso GC/MS – Modelo 7890B – Agilent acoplado a um espectrômetro de massas Modelo 5977A cuja fonte de ionização por elétrons opera com energia de ionização a 70 eV. O espectrômetro de massas operou na faixa de *m/z* 45-500. Para GC foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 m, 5% fenil-metilsiloxano). O cromatógrafo operou com fluxo constante de gás He de 1 mL/min, temperatura do injetor igual a 260 °C e a temperatura da interface igual a 280 °C. As injeções das amostras foram de 1 µL na concentração de 0,5–1 mg/mL. A programação de temperatura utilizada foi de 3 minutos a 80 °C, seguida de rampa de aquecimento 80-280 °C a 30 °C/min e mantido em 280 °C por 3 minutos.

Algumas reações foram acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), em cromatoplasas de 20 x 10 cm da Merck com suporte de alumínio com filme de sílica gel 60 F₂₅₄. As placas cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas com sílica gel da Sigma-Aldrich com 0.75 mm de espessura, sobre placas de vidro de 20 x 20 cm. A revelação dos compostos com grupos cromóforos foi realizada utilizando radiação ultravioleta no comprimento de onda λ de 254 nm.

5.1.3 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Vertex 70-Bruker, com transformada de Fourier, operando na região do infravermelho médio (400 a 4000 cm⁻¹), por meio de reflexão total atenuada (cristal de diamante) (ATR).

5.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foram realizadas em um cromatógrafo JASCO® com controlador LC-NET II/ADC, detector de arranjo fotodiodos (DAD) modelo MD-2018 PLUS, bomba PU-2086 plus, injetor automático AS-2055 e detector de dicroísmo circular (DC-2095). As injeções das amostras foram de 20 µL na concentração de 1 mg mL⁻¹. Utilizou-se a coluna Daicel® Chiralcel OD-H, de sílica encapada com celulose ligada a 3,5- dimetilfenilcarbamato (250 x 4,6 mm, 5 µm). O cromatógrafo operou em modo isocrático com fase móvel composta por 90% isopropanol e 10% hexano, em um fluxo de 0,8 mL min⁻¹.

5.1.5 Polarimetria

A polarimetria foi realizada usando um Polarímetro Perkin Elmer Modelo 341 (medições sendo feitas na linha D de sódio) com uma célula de comprimento de 1,0 dm e concentrações g/100 mL. A configuração absoluta de 2-fenilbutiramida (**7b**) foi determinada pela comparação do valor $[\alpha]_D$ da literatura.

5.2 Meios de cultura

Os meios listados a seguir foram utilizados para o cultivo de bactérias. Todos os meios foram autoclavados à temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão, por 15 minutos, após o preparo.

❖ Luria-Bertani (LB)

Composição: 10g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de cloreto de sódio

- LB-ágar – Ágar 15 g para 1 L de meio de cultura líquido LB.
- LB-amp – meio LB ou LB-ágar, acrescido de ampicilina 4 µL por mL de meio.
- LB-cm – meio LB ou LB-ágar, acrescido de cloranfenicol 2 µL por mL de meio.

❖ Luria Broth (L-broth)

Composição: 10g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de cloreto de sódio.

❖ **Super Optimal broth (SOB)**

Composição: 20 g/L de triptona, 5 g/L extrato de levedura e 0,5 g/L cloreto de sódio. O meio SOC contém, em adição ao SOB, 10 mmol de MgCl_2 , 10 mmol de MgSO_4 e 22 mmol de glicose.

5.3 Tampões

Tampão Fosfato de Potássio pH 7,5; 0,1M

Composição: 0,2 M de KH_2PO_4 , 0,2 M de K_2HPO_4 e água destilada

Tampão de lise

Composição: Tampão fosfato pH 7,0; 20 mM, 20 μM de PLP, 2 mM de EDTA, 1 mM de PMSF, 5 % de glicerol.

Tampão de diálise

Composição: 20 μM de PLP e 1000 mL Tampão fosfato pH 7,5; 50 mM

5.4 Micro-organismos

Os micro-organismos *Klebsiella oxytoca* (coleção particular da Profa. Dra Sonia Rodriguez Giordano) e *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 (CCT 1878, obtido da Coleção de Culturas Tropicais, Fundação André Tosello) foram selecionados para estudo, pois apresentam em seus genomas sequências de NHase já conhecidas.

5.5 Extração do DNA genômico

➤ **K. oxytoca**

A extração do DNA de *K. oxytoca* foi realizada através do Kit ZR fungal/Bacterial DNA Miniprep™. Para tanto, partiu-se de 5 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB) contendo colônias de *K. oxytoca* incubada overnight, 37 °C, 150 rpm, e seguiu-se o protocolo do fabricante. Transferiram-se 40 mg de

células úmidas de *K. oxytoca* para ZR BashingBead™ Lysis Tubo seguido da adição de 750 µL de solução de lise. O tubo foi agitado por 2 minutos e depois centrifugado a 10,000 x g por 1 minuto. Após centrifugação 400 µL do sobrenadante foi transferido para o tubo Zymo-Spin™ IV Spin Filte e centrifugado por 7000 x g por 1 min. Adicionou-se 1200 µL de tampão Fungal/Bacterial DNA Binding ao filtrado e transferiu-se 800 µL para Zymo-Spin™ IIC Column e centrifugou-se a 10,000 x g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e o processo foi repetido para os outros 800 µL. Adicionou-se 200 µL de tampão DNA Pre-Wash a Zymo-Spin™ IIC Column e centrifugou-se a 10,000 x g por 1 minuto, logo foram adicionado 500 µL de tampão Fungal/Bacterial DNA Wash a Zymo-Spin™ IIC Column e centrifugou-se a 10,000 x g por 1 minuto. A Zymo-Spin™ IIC Column foi transferida para um eppendorf limpo e foi adicionado 50 µL de tampão DNA Elution.

➤ **R. erythopolis**

O DNA de *R. erythopolis* ATCC 4277 foi extraído previamente por um aluno do grupo da Profa. Dra. Sonia Rodriguez Giordano (Universidad de la República -Montevideú).

5.6 Análise do DNA em gel de agarose

A quantificação da extração de DNA, bem como os fragmentos amplificados, é realizada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, ou mais precisamente por espectrofotometria. Os géis foram preparados pela solubilização de agarose em tampão TBE 0,5x por aquecimento em micro-ondas. Para visualização das bandas de DNA foi adicionado 0,05 µL/mL de GoodView™ (indicador de fluorescência) e, em seguida, adicionou-se a mistura no suporte para solidificação. Todas as corridas foram realizadas no equipamento ENDUROT™ Gel XL (Labnet), com tampão de corrida TE 0,5x, sob corrente de 100 mA, durante 30 minutos do polo negativo para o positivo. A concentração do DNA foi estimada pela comparação da intensidade de fluorescência das bandas, quando expostas a radiação ultravioleta, por comparação com o marcador (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific).

5.7 Amplificação por PCR

A partir da sequência de nucleotídeos que codificam a NHase de interesse (UniProtKB - Q6XMT1, Q6XMT2, B1GY04 para *Rhodococcus* e gi|397655102 para *Klebsiella*) e o vetor no qual ocorrerá a clonagem são desenhados pares de primers forward e reverse, que estão apresentados na Tabela 6, para amplificação pela estratégia de RF cloning. A síntese dos primers foi realizada pela empresa Macrogen (Coréia).

Todas as PCRs foram realizadas em termociclador Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler, e otimizadas a fim de se obter o mínimo de amplificações inespecíficas. Os reagentes, suas quantidades e suas respectivas concentrações que foram utilizados nas amplificações estão representados na Tabela 13.

Tabela 13. Reagentes e quantidades utilizadas nas reações de PCR para amplificação do DNA genômico

<i>R. erythropolis</i>		<i>K.oxytoca</i>	
Reagente	Quantidade (µL)	Reagente	Quantidade (µL)
5X GC Buffer	20 µL	5X HF Buffer	20 µL
Prime F _w (10 pmol/µL)	10 µL	Prime F _w (10 pmol/µL)	10 µL
Prime rev (10 pmol/µL)	10 µL	Prime rev (10 pmol/µL)	10 µL
dNTP's (10mM)	2 µL	dNTP's (10mM)	2 µL
DMSO	2 µL	Phusion DNA polimerase	1 µL
Phusion DNA polimerase	1 µL	DNA <i>k.oxytoca</i>	2 µL
DNA <i>R.erythropolis</i>	2 µL	H ₂ O Milli Q	55 µL
H ₂ O Milli Q	53 µL		
Volume final	100 µL	Volume final	100 µL

As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial a 98 °C por 30 s, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 s, hibridação (*annealing*) a 64 °C por 30 s e extensão dos primers a 72 °C por 3 min e 30 s; com extensão final a 72 °C por 10 min. Ao final da reação a mesma foi interrompida por resfriamento a 4 °C. O ciclo utilizado está apresentado na Figura 21.

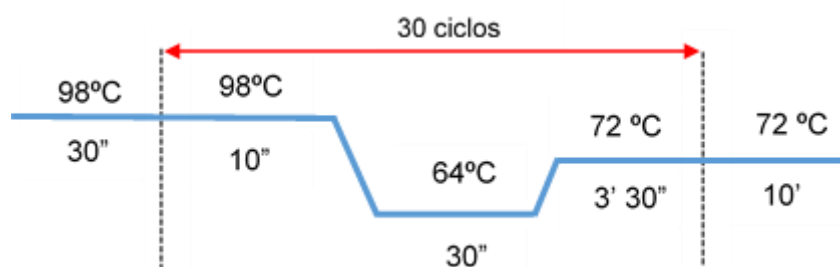


Figura 21. Representação do ciclo de PCR utilizado para a amplificação dos genes de *R. erythropolis* (ativador e subunidades α e β) e o gene NHase de *K. oxytoca*

Os produtos foram purificados em gel de agarosa, e logo com Freeze N' Squeeze DNA gel extraction spin columns (*K.oxytoca*) e kit QIAquick® Gel Extraction (*R. erythropolis*) para posterior quantificação. Assim, os produtos de PCR foram denominados megaprimers.

5.8 Reação de amplificação linear

Os megaprimers foram utilizados em uma reação de amplificação linear com pKK223-3 (genes de *K. oxytoca*) e pACYCDuet-1 (genes de *R. erythropolis*). Os produtos de PCR têm locais de iniciação únicos em ambas as extremidades; representados em vermelho na Tabela 3, que atuam como pares de primers, que são complementares a sequências que flanqueiam o sítio de inserção no vetor. As condições para PCR de cada micro-organismo estão sumarizadas na Tabela 14.

Tabela 14. Reagentes e quantidades utilizadas nas reações de PCR

<i>R. erythropolis</i> (gene ativador)		<i>K.oxytoca</i>	
Reagente	Quantidade (μ L)	Reagente	Quantidade (μ L)
Buffer HF (5x)	20 μ L	5X HF Buffer	20 μ L
dNTP's (10 mM)	2 μ L	dNTP's (10 mM)	2 μ L
pACYCDuet-1 (10 ng/ μ L)	3 μ L	pkk223-3 (40 ng/ μ L)	1 μ L
Phusion DNA polimerase	1 μ L	Phusion DNA polimerase	1 μ L
megaprimer (20 ng/ μ L)	6 μ L	megaprimer (80 ng/ μ L)	2 μ L
H ₂ O Milli Q	68 μ L	H ₂ O Milli Q	74 μ L
Volume final	100 μ L	Volume final	100 μ L

O ciclo utilizado foi o mesmo da Figura 21, porém com temperatura de anelamento a 62°C (*R. erythropolis*) e 58 °C (*K. oxytoca*). As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial a 98 °C por 30 s, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 s, hibridação (*annealing*) a 62 °C e 58 °C por 30 s e extensão dos primers a 72 °C por 3 min e 30 s; com extensão final a 72 °C por 10 min. Ao final da reação a mesma foi interrompida por resfriamento a 4 °C. Foram realizados controles negativos, substituindo o megaprimer por água. Após a amplificação, os produtos foram submetidos à digestão com *DpnI* (enzima que digere vetores metilados, extraídas de cepas de *E. coli* que carregam o gene *DpnI* de *Diplococcus pneumoniae* G41).

As digestões foram realizadas em tubos tipo eppendorfs de 2,0 mL onde para cada 50 µL de produtos de PCR de amplificação linear, adicionou-se 20 µL de Buffer Tango 10x (Thermo Fisher Scientific), 2 µL de *DpnI* 20 U/µL (Thermo Fisher Scientific) e 128 µL de água. A mistura foi incubada a 37 °C por 24 horas e em seguida inativada a 80 °C por 20 minutos. Os produtos digeridos foram submetidos a precipitação com tRNA. Para 100 µL do conteúdo digerido foi acrescido de 100 µL de tRNA, 200 µL de água e 1000 µL de etanol absoluto. A mistura foi deixada overnight a -20 °C. Em seguida, centrifugou-se 12.000 × g e 4 °C durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o plasmídeo foi lavado com 100 µL de etanol 70% e, novamente, centrifugou-se a 12.000 × g e 4 °C durante 30 minutos. O sobrenadante foi removido, o plasmídeo foi seco a 50 °C e ressuspendido em 5 µL de água e transformado em células competentes de *E. coli* JM109.

5.9 Preparo de bactérias eletrocompetentes

E. coli TOP10, preservadas em glicerol a -70°C, foram inoculadas em placas LB-ágar e incubadas a 37 °C durante 24 h. Uma colônia foi transferida para um tubo contendo 5 mL de LB e incubou-se a 37 °C e 150 rpm *overnight*. Do cultivo, 1 mL foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio L-broth, e incubado a 37 °C e 150 rpm até obtenção de uma densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀) de 0,5. Após esta etapa, o erlenmeyer com o cultivo foi levado para banho de gelo durante 15 minutos. Em seguida, todo o conteúdo foi centrifugado a 4000 × g e 4 °C durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e a biomassa lavada com 100 mL de glicerol 10% frio. O conteúdo

foi centrifugado a $5000 \times g$ e 4°C durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e a biomassa lavada com 50 mL de glicerol 10% frio. Novamente, o conteúdo foi centrifugado a $5000 \times g$ e 4°C durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e a biomassa lavada com 4 mL de glicerol 10% frio. Finalmente, o conteúdo foi centrifugado a $5000 \times g$ e 4°C durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, a biomassa ressuspensa em 300 μL de glicerol 10% frio, aliquoteada em volumes de 40 μL e armazenadas em freezer a -70°C mas, preferencialmente, utilizadas no mesmo dia. Todas as etapas foram realizadas em ambiente estéril e banho de gelo.

5.10 Transformação de células de *E. coli* por eletroporação

Para a eletroporação das células de *E. coli* foi utilizado o aparelho MicroPulser™, (Bio-Rad). Às células competentes recém preparadas e aliquoteadas em 40 μL , adicionou-se 2,5 μL de DNA (gene incorporado ao vetor). Para cada micro-organismo, realizou-se um controle positivo, utilizando 1 μL do plasmídeo (pkk223-3 ou pACYCDuet-1), e um controle negativo, utilizando 2,5 μL dos controles negativos preparados. Após montado o sistema, este foi transferido para uma cubeta de eletroporação (0,2 cm), já previamente resfriada. A eletroporação foi realizada aplicando-se um pulso de 2,5 kV e, logo em seguida, adicionou-se 1 mL de meio SOC no interior da cubeta e homogeneizado com as células eletroporadas. As células foram então incubadas por uma hora a 37°C , sob agitação a 150 rpm. Decorrido este tempo, as células foram semeadas em placas contendo o meio LB-amp acrescido de 4 μL de IPTG (0,8 M) (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside- 1mM) e 12 μL de X-gal (50 mM) (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo) para *K. oxytoca* ou LB-cloranfenicol (34 $\mu\text{g/mL}$) para *R. erythropolis* e incubadas a 37°C por 24 horas.

5.11 Análise dos transformantes de *E. coli*

➤ *R. erythropolis*

Diversos clones de *R. erythropolis* foram obtidos, dos quais oito foram selecionados. Os oitos foram inoculados em 5 mL de meio líquido LB-can e

incubados a 37 °C e 150 rpm, *overnight*. Em um tubo tipo eppendorf de 2,0 mL foi transferido 2 mL dos cultivos e centrifugou-se a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Ao final do tempo o sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido para mais 2 mL dos cultivos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa ressuspensa em 400 µL de Resuspension Buffer (R3) contendo RNase A (PureLink™ HiPure Plasmid DNA Midiprep Kit). Em seguida, adicionou-se 400 µL de Lysis Buffer (L7) e agitou-se por inversão até a mistura ficar homogênea e incubou-se a mistura por 5 minutos a temperatura ambiente. Após o período de incubação adicionou-se 400 µL de Precipitation Buffer (N3) e a mistura foi agitada até ficar homogênea e centrifugada a 12.000 rpm a 4 °C durante 20 minutos. Separou-se 750 µL do sobrenadante que foi extraído com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) por agitação em vórtex (10 segundos), seguido de centrifugação a 100 rpm por 2 minutos. Recuperou-se 600 µL da fase aquosa, que acrescida de 750 µL de isopropanol, 7 µL de NaCl 4 mol/L. Em seguida, centrifugou-se a 12.000 rpm e 4 °C durante 35 min, descartou-se o sobrenadante, o DNA foi lavado em 750 µL de etanol 70% e centrifugado a 12.000 rpm e 4 °C durante 35 minutos. O sobrenadante foi removido e secou-se o DNA a 50 °C. Ao final, o DNA foi ressuspensado em 10 µL de água Milli-Q. Os clones positivos foram confirmados por PCR e analisados em gel de agarose a 0,8%.

➤ ***K. oxytoca***

A triagem branco-azulada é uma técnica rápida e eficiente para a identificação de bactérias recombinantes. Ela se baseia na atividade da β-galactosidase, uma enzima que ocorre em *E. coli*, que cliva a lactose em glicose e galactose e também é capaz de decompor o substrato X-gal para produzir um produto com uma cor azul. O IPTG foi usado junto com X-gal para triagem branco-azulada. O IPTG é um análogo não metabolizável da galactose que induz a expressão do gene lacZ (codifica a enzima β-galactosidase). Duas colônias brancas foram selecionadas e cultivadas em 5 mL de meio líquido LB com ampicilina e incubadas a 37 °C e 150 rpm, *overnight*, para realizar a miniprep (PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep Kit). O DNA foi enviado para sequenciamento.

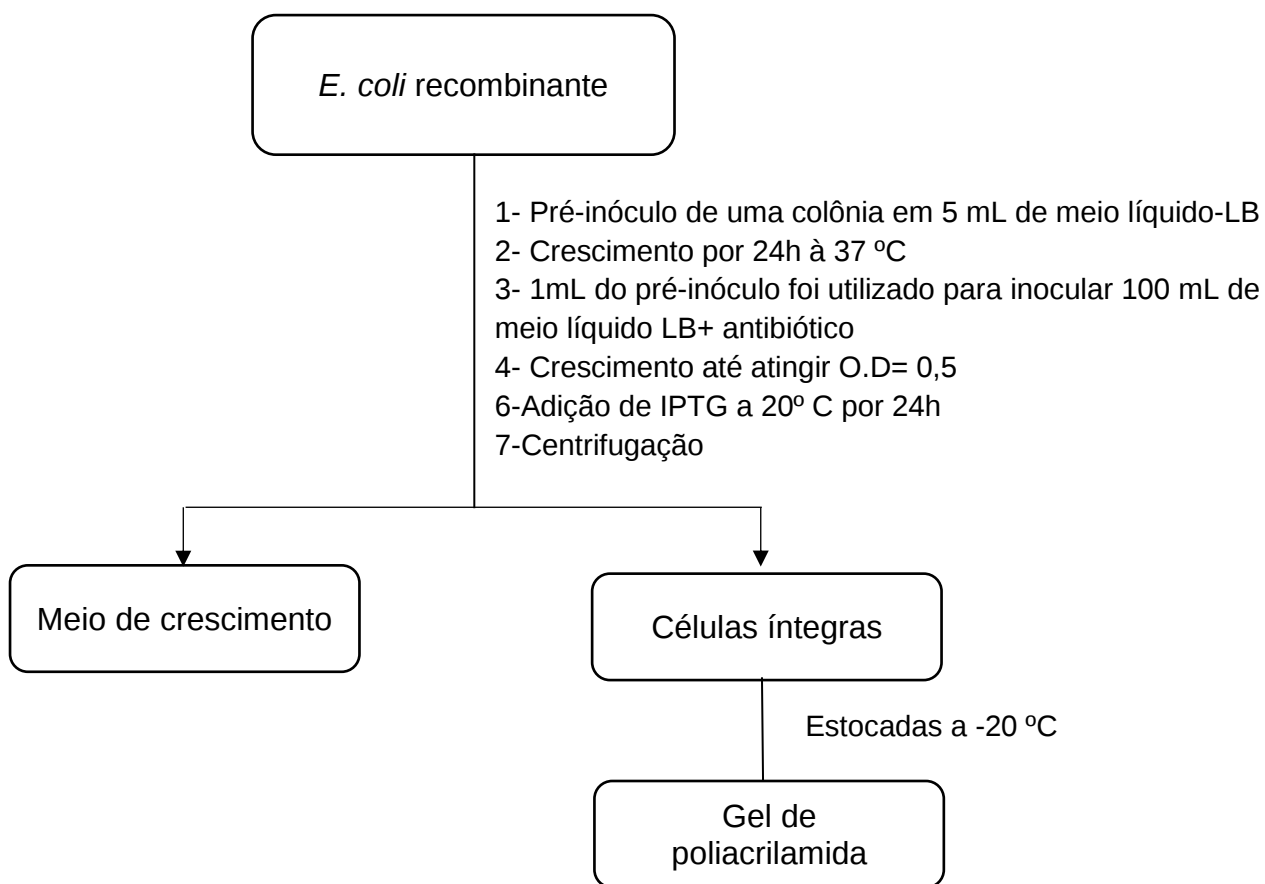
5.12 Análise das Sequência de DNA

As sequências de DNA foram analisadas e traduzidas usando o pacote de software Vector NTI (Invitrogen). Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram realizados usando a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ou ClustalX 2.1. A árvore filogenética foi construída usando MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 7.0. A representação tridimensional da NHase de *Rhodococcus erythropolis* AJ270 foi realizada utilizando o software PyMol.

5.13 Análise da expressão de proteínas

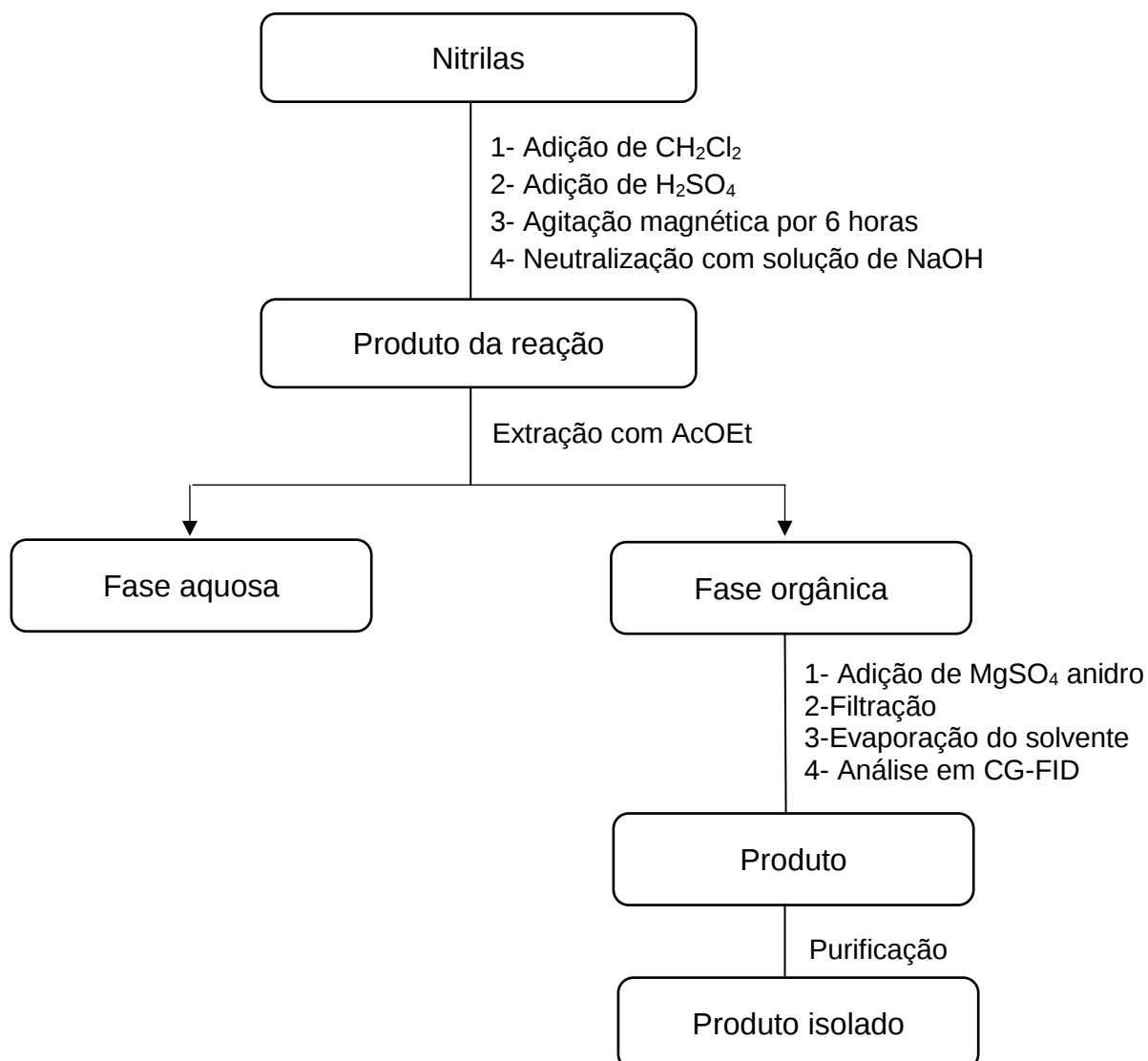
Placas frescas de *E. coli* BL21 (DE3) (pACYCDuet-1 recombinante) e JM109 (pKK233-3-recombinante) foram semeadas de estoques congelados, uma única colônia foi usada para inocular 5 mL de meio LB com antibiótico. A cultura foi incubada num agitador rotativo, overnight (200 rpm, 37 °C) e foi utilizado 1 mL desta cultura para inocular 100 mL de meio LB-cloranfenicol num erlenmeyer de 500 mL. A cultura fresca foi cultivada sob as mesmas condições até que atingisse uma DO₆₀₀ de 0,5 (aproximadamente 2,5 h), e então o IPTG foi adicionado a uma concentração final de 1 mM. Após 24 h de indução a 20 °C, as células de *E. coli* recombinantes foram recolhidas por centrifugação e utilizadas nas reações de biotransformação. Em paralelo, 1 mL desta cultura foi removido e as células foram centrifugadas (12.000 x g / 10 min) a 4 °C para detecção da proteína recombinante e armazenadas a -20 °C (Fluxograma 3).

Os níveis de expressão de NHase recombinante foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4-12%). O marcador de proteína de peso molecular 14,4-116 kDa (Unstained Protein Marker/SM 0431, Thermo Fisher Scientific) foi utilizado como referência. O SDS-PAGE foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Fluxograma 3. Etapas para análise do nível de proteínas em SDS-PAGE**3.14 Metodologias para as sínteses dos padrões e dados espectroscópicos dos compostos**

Reações de hidratação das nitrilas **2a**, **3a**, **6a** e **7a** catalisadas por ácido sulfúrico foram realizadas na obtenção das amidas padrões (Fluxograma 4).

Fluxograma 4. Etapas para a síntese das amidas padrões

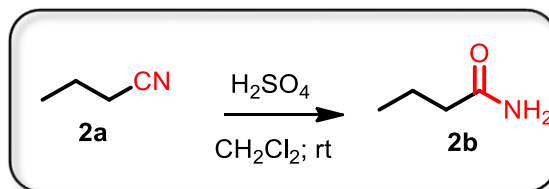


5.14.1 Síntese do composto butanamida (2b)

Em um balão de fundo redondo de 25,0 mL, adicionou-se **2a** (1 mmol; 87 μL) e CH_2Cl_2 anidro (4,0 mL). Após completa solubilização do substrato **2a**, gotejou-se H_2SO_4 98% (1,5 mL) sob agitação magnética suave em temperatura ambiente. Em seguida, a solução reacional foi mantida sob agitação magnética vigorosa em temperatura ambiente por 6 horas (Esquema 18). Logo após, foi neutralizada com NaOH 10 M e extraída com AcOEt (3 x 10 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl(aq)). Adicionou-se à fase orgânica MgSO_4 anidro e procedeu-se à filtração

por gravidade, utilizando papel de filtro pregueado. O produto apresentou-se como um sólido branco.

Esquema 18. Reação geral para hidrólise ácida da nitrila de **2a** em **2b**

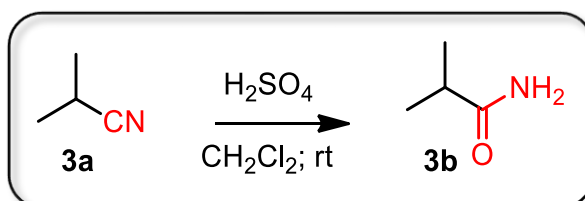


- **butanamida (2b):** F.M. $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$; MM $87,1 \text{ g mol}^{-1}$; EM (EI, 70 eV) m/z (abundância relativa %): $[\text{M}^+]$ 87 (5), 72(22), 60 (4), 59 (100).

5.14.2 Síntese do composto Isobutanamida (3b)

Em um balão de fundo redondo de 25,0 mL, adicionou-se **3a** (1mmol; 89 μL) e CH_2Cl_2 anidro (4,0 mL). Após completa solubilização do substrato **3a**, gotejou-se H_2SO_4 98% (1,5 mL) sob agitação magnética suave em temperatura ambiente. Em seguida, a solução reacional foi mantida sob agitação magnética vigorosa em temperatura ambiente por 6 horas (Esquema 19). Logo após, foi neutralizada com NaOH 10 M e extraída com AcOEt (3 x 10 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl(aq)). Adicionou-se à fase orgânica MgSO_4 anidro e procedeu-se à filtração por gravidade, utilizando papel de filtro pregueado. O produto bruto foi purificado por CCDP (eluente: heptano/AcOEt 2:8). Após purificação, obteve-se um rendimento de 60 %. O produto apresentou-se como um sólido branco.

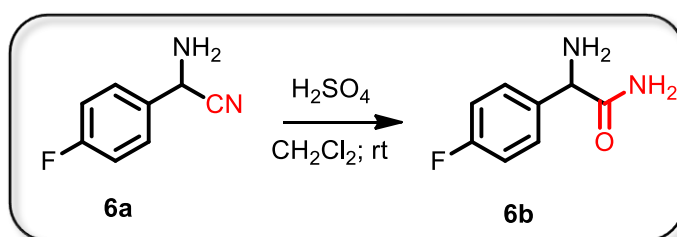
Esquema 19. Reação geral para hidrólise ácida da nitrila de **3a** em **3b**



5.14.3 Síntese do composto 2-amino-2-(4-fluorofenil)acetanamida (6b)

Em um balão de fundo redondo de 25,0 mL, adicionou-se **6a** (0,2 mmol; 0,03 g) e CH₂Cl₂ anidro (1,0 mL). Após completa solubilização do substrato **6a**, gotejou-se H₂SO₄ 98% (500 µL) sob agitação magnética suave em temperatura ambiente. Em seguida, a solução reacional foi mantida sob agitação magnética vigorosa em temperatura ambiente por 6 horas (Esquema 20). Logo após, foi neutralizada com NaOH 10 M e extraída com AcOEt (3 x 10 mL). 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). Após purificação, obteve-se um rendimento de 30%. O produto apresentou-se como um sólido amarelo.

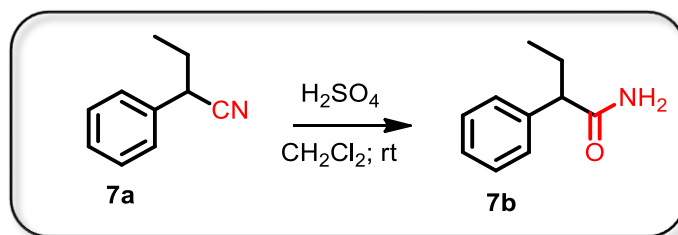
Esquema 20. Reação geral para hidrólise ácida da nitrila de **6a** em **6b**



5.14.4 Síntese do composto 2-fenilbutanamida (7b)

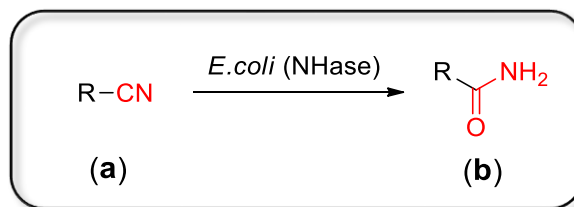
Em um balão de fundo redondo de 25,0 mL, adicionou-se **7a** (1 mmol; 149 µL) e CH₂Cl₂ anidro (4,0 mL). Após completa solubilização do substrato **7a**, gotejou-se H₂SO₄ 98% (1,5 mL) sob agitação magnética suave em temperatura ambiente. Em seguida, a solução reacional foi mantida sob agitação magnética vigorosa em temperatura ambiente por 6 horas (Esquema 21). Logo após, foi neutralizada com NaOH 10 M e extraída com AcOEt (3 x 10 mL). 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 5:5). Após purificação, obteve-se um rendimento de 80 %. O produto apresentou-se como um sólido branco.

Esquema 21. Reação geral para hidrólise ácida da nitrila de **7a** em **7b**

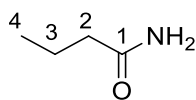


5.15 Procedimento geral para as biotransformações e dados espectroscópicos das amidas

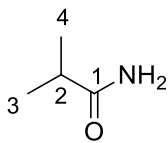
Esquema 22. Esquema geral das biotransformações



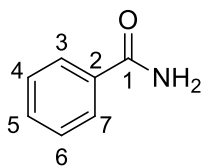
As reações de biotransformação com NHase recombinante (pNHaseRE2) foram testadas com várias nitrilas alifáticas e aromáticas (Esquema 22). Os pellets celulares (~ 1,5 g de massa úmida) foram ressuspensos em 50 mL de tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ (0,1 M, pH = 7,5) contendo 0,2 mM dos substratos (solubilizados em DMSO). As reações foram realizadas a 28 °C e 150 rpm sob agitação orbital durante 24 horas. As células foram removidas por centrifugação e o sobrenadante foi extraído com acetato de etila, seco com sulfato de magnésio anidro e analisado por GC-MS e GC-FID, obtendo-se as amidas benzílicas **2b-8b**.



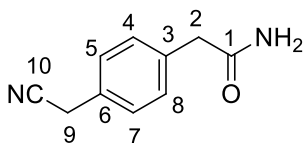
butanamida (2b): F.M. C_4H_9NO ; MM 87,01 g mol⁻¹; EM (EI, 70 eV) m/z (abundância relativa %): [M⁺] 87 (5), 72(22), 60 (4), 59 (100).



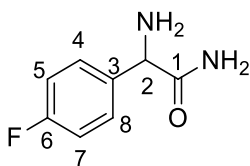
isobutanamida (3b): F.M. C_4H_9NO ; MM 87,01 g mol⁻¹; EM (EI, 70 eV) m/z (abundância relativa %): [M⁺] 87 (63), 72(60), 60 (3), 59 (44), 44 (100).
RMN de ¹H (600,13 MHz, CDCl₃): δ=5,42 (s, 2H, NH₂); 2,45 – 2,41 (m, 1H); 1,18 (d, 6H, CH₃); **RMN de ¹³C** (150,3 MHz, CDCl₃): δ =179,4; 34,9; 19,5.



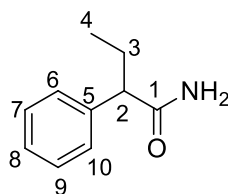
benzamida (4b): F.M. C_7H_7NO ; MM 121,05 g mol⁻¹; EM (EI, 70 eV) m/z (abundância relativa %): [M⁺]121 (78), 105 (100), 77 (72), 51 (20), 50 (9), 44 (10).



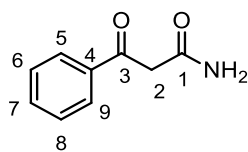
4-(cianometil)benzenoacetanamida(5b): F.M. $C_{10}H_{10}N_2O$; MM 174,08 g mol⁻¹; **RMN de ¹H** (600.13 MHz, CDCl₃): δ= 7,34-7,30 (q, J= 8.2 Hz, 4H, H_{Ar}); 5,43 (s, 2H, NH₂); 3,75 (s, 2H, CH₂); 3,59 (s, 2H, CH₂); **RMN de ¹³C** (150,3 MHz, CDCl₃): δ = 172,4; 134,8; 130,2; 129,2; 128,6; 117,7; 42,7; 23,3; **IV** (ATR) ν_{max} (cm⁻¹): 3373, 3198, 2248, 1921 e 1649.



2-amino-2-(4'-fluorofenil)acetanamida (6b): F.M. $C_8H_9FN_2O$; MM 168,07 g mol⁻¹; **RMN de ¹H** (600,13 MHz, CD₃OD): δ 7,47-7,45 (dd, J= 8,5 Hz, 2H, H_{Ar}); 7,10-7,07 (t, J= 8,7 Hz, 2H, H_{Ar}); 4,61 (s, 2H, NH₂); 1,29 (s, 1H, NH₂); 4.51 (s, 1H); **RMN de ¹³C** (150,3 MHz, CD₃OD): δ 130,1; 116,4; 59,0.



2-fenilbutanamida (7b): $[\alpha]_D^{28} + 8.5$ (c 0.1, CHCl₃), [lit. -23.2 (CHCl₃) (R)-(-)-2-phenylbutyramide]; **F.M** C₁₀H₁₃NO; **MM** 163,10 g mol⁻¹; **RMN de ¹H** (600,13 MHz, CDCl₃): δ 7,35-7,28 (m, 5H, H_{Ar}); 5,33 (s, 2 H, NH₂); 3,30 (t, J = 7.6 Hz, 1 H, CH); 2.20 (m, 1 H); 1.80 (m, 1 H); 0.90 (t, J = 7.4 Hz, 3 H, CH₃); **RMN de ¹³C** (150,3 MHz, CDCl₃): δ 178,0; 140,0; 129,0; 128,0; 127,5; 54,7; 26,2; 12,4.



benzoilacetanamida (8b): **F.M** C₉H₉NO₂; **MM** 163,06 g mol⁻¹; **EM** (IE, 70eV) m/z (abundância relativa %): 120 (35), 105 (100) e 77 (65).

5.16 Quantificação das proteínas - Método de Bradford

Para preparo do Reagente de Bradford, 25 mg de azul de brilhante Coomassie G-250 foram dissolvidos em 25 mL de etanol 95%. A essa solução foram adicionados 50 mL de H₃PO₄ 85%. A solução resultante foi adicionada em 425 mL de água destilada e armazenada em geladeira. Para a curva analítica, foi preparada uma solução 1 mg/mL de Soro Albumina Bovina (BSA) que foi diluída sucessivamente a 0,5, 0,25 e 0,125 mg/mL. 20 μ L da solução de BSA foram adicionados a 1,58 mL de água Milli-Q e 0,4 mL de reagente de Bradford, que foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos. Após o período de incubação foi medida a Absorbância em 595 nm. As análises foram realizadas em triplicata. Para o branco, foi usado 1,6 mL de água Milli-Q e 0,4 mL de reagente de Bradford. Para quantificação das enzimas de interesse, foram utilizados 20 μ L dos extratos enzimáticos (pós diálise).

5.17 Procedimento para as reações com extratos enzimáticos

5.17.1 Lise celular

Os pellets celulares (~5 g de massa úmida de *E. coli* recombinante) obtidos após a centrifugação dos cultivos celulares foram ressuspensos em tampão de lise 20 mM pH 7,0 a 4 °C. As células foram lisadas por sonicador (Bandelin Sonopuls HD-2070), com 30-40% da potência máxima em 9 ciclos de 30 segundos com pulsação contínua, sendo que entre cada ciclo de lise foram realizados intervalos de 1 minuto. Todo procedimento foi realizado mantendo-se a suspensão celular em banho de gelo. A suspensão formada após a lise foi centrifugada a 14000 rpm durante 20 minutos a 4 °C para remover os detritos celulares. O sobrenadante contendo as enzimas solúveis foi então coletado, e os extratos foram submetidos a pré-purificação por diálise.

5.17.2 Diálise dos extratos enzimáticos

Os extratos enzimáticos foram submetidos à uma pré-purificação por diálise em tubos de celulose semipermeável com tamanho de poro equivalente a 14000 Da. Cada 8 mL de extrato enzimático foi dialisado contra 250 mL de tampão de diálise durante 24 horas, à uma temperatura de 4 °C. Ao término do processo, foram preparadas alíquotas contendo 1,0 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de glicerol 20%, e os extratos foram armazenados no freezer -20 °C.

5.17.3 Reação com extratos enzimáticos dialisados

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 5 mL do extrato enzimático e 0,2 mM de benzonitrila (solubilizada em dimetilsulfóxido). A reação continuou a 28 °C e 150 rpm sob agitação durante 24 horas. O produto da reação foi extraído com acetato de etila, seco com sulfato de magnésio anidro e analisado por GC-FID.

5.18 Determinação da atividade enzimática

Em um tubo do tipo eppendorf de 2 mL, adicionou-se 1 mL tampão KH_2PO_4 / K_2HPO_4 (0,1 M, pH = 7,5), benzonitrila (9,7 μmol) e células inteiras de *E. coli* (100 mg de peso úmido). A reação foi incubada a 28 °C durante 5 min e

interrompida com adição de 0,1 mL de HCl 1M. As células foram removidas por centrifugação a 5000 x g durante 10 min. A quantidade de benzamida foi determinada por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chamas (GC-FID). A atividade específica na produção da benzamida foi definida como a quantidade de células por miligramas que catalisa a formação de 1 μ mol de benzamida por minuto.

5.19 Reações de biocatálise com NHase comercial

Para determinar a especificidade do 1,4 fenilenodiacetonitrila, 1 mL de tampão fosfato de sódio (pH =7,0) enriquecido com solução traço de cobalto e ferro e 5 μ L de solução enzimática foram adicionados em um tubo tipo eppendorff de 2 mL. Esta mistura foi deixada exposta a luz natural por 1,5 h em banho de gelo. Em seguida, os eppendorfs foram levados para termomixer a 25 °C e, após atingir esta temperatura, adicionou-se 1,0 mg (0,006 mmol) do substrato que ficou sob agitação por 8h a 1000 rpm. As reações foram interrompidas pela adição de acetato de etila e a fase orgânica foi analisada por GC-FID, para determinação da conversão.

A fim de se obter maior quantidade do produto aumentou-se a escala da reação como descrito abaixo:

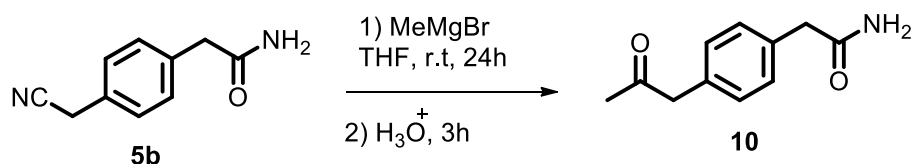
- 10 mL de tampão fosfato com 50 μ L de solução enzimática (NHase 009) e 10 mg do substrato.
- 50 mL de solução tampão com 250 μ L da solução enzimática (NHase 009) e 50 mg do substrato. Ao fim de seis reações enzimáticas com NHase 009 foram obtidos 250,4 mg do 4-(cianometil)benzenoacetanamida.
- 100 mL de solução tampão, 500 μ L de solução enzimática NHase 001 e 017 e 100 mg do substrato. Ao fim de cinco reações foram obtidos 357,0 mg do 4-(cianometil)benzenoacetanamida.

5.20 Procedimento geral para obtenção do composto 4-(2-propanona)benzenoacetanamida (10)

Procedimento 1:

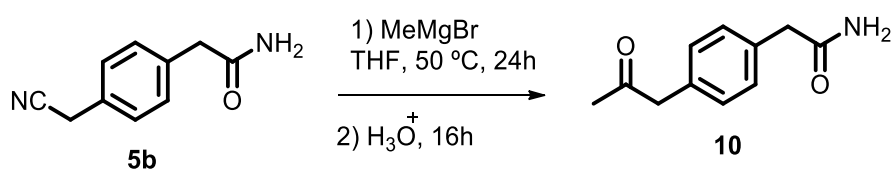
Em um balão de fundo redondo de duas bocas, 0,5 mmol (87 mg) do 4-(cianometil)benzenoacetanamida foram dissolvidos em 5 mL de THF anidro e mantidos sob atmosfera de N₂ por 10 minutos. Após este período adicionou-se gota-a-gota 2 mmol (0,7 mL) de MeMgBr (3M em Et₂O). O sistema foi mantido sob agitação magnética a temperatura ambiente e refluxo. Após 24h de reação a reação foi acidificada com uma solução de HCl (1M) e permaneceu por agitação por mais 3 horas (Esquema 23). Transcorrido esse tempo a solução foi basificada com uma solução de aquosa de NH₃ (pH=9) e extraída com AcOEt e analisada em GC-FID.

Esquema 23. Esquema para reação de Grignard com composto 5b



Procedimento 2:

Em um balão de fundo redondo de duas bocas, 0,5 mmol (87 mg) do 4-(cianometil)benzenoacetanamida foram dissolvidos em 5 mL de THF anidro e mantidos sob atmosfera de N₂ por 10 minutos. Após este período adicionou-se gota-a-gota 2 mmol (0,7 mL) de MeMgBr (3M em Et₂O). O sistema foi mantido sob agitação magnética a 50 °C e refluxo. Após 24h de reação a reação foi acidificada com uma solução de HCl (1M) e permaneceu por agitação por mais 3 horas (Esquema 24). Transcorrido esse tempo a solução foi basificada com uma solução de aquosa de NH₃ (pH=9) e extraída com AcOEt e analisada em GC-FID.

Esquema 24. Reação de Grignard com composto 5b**5.21 Reação de transamidação do 4-(cianometil)benzenoacetanamida (5b)**

Em um frasco de vidro, adicionou-se 50 mg de CAL-B (lipase de *Candida antarctica B* imobilizada em resina acrílica, enzima comercializada com o nome de Novozyme 435), 4-(cianometil)benzenoacetanamida (0,034 mmol, 6,0 mg), MTBE (5 mL) e propilamina (0,05 mmol, 5,0 µL). Agitou-se a 50 °C por 24 h. O produto bruto reacional foi analisado por CG-FID. Uma reação controle foi realizada na presença de **5b** e propilamina empregando as mesmas condições, mas sem a CALB.

REFERÊNCIAS

ABEBE, M.; MACCOLL, A.; BOWEN, R. D. Part 17 : 1 selected aliphatic amides. v. 208, p. 197–208, 1997.

ASANO, Y.; TANI, Y.; YAMADA, H. A new enzyme “nitrile hydratase” which degrades acetonitrile in combination with amidase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2251-2252, 1980.

BANERJEE, A.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. The nitrile-degrading enzymes: Current status and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1–2, p. 33–44, 2002.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3ª ed. Editora Artmed, 2015.

BAUER, R.; KNACKMUSS, H. J.; STOLZ, A. Enantioselective hydration of *arylpropionitriles* by a nitrile hydratase from *Agrobacterium tumefaciens* strain d3. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 89–95, 1998.

BEARD, T.; COHEN, M. A.; PARRATT, J. S.; TURNER, N. J.; CROSBY, J.; MOILLIET, J. Stereoselective hydrolysis of nitriles and amides under mild conditions using a whole cell catalyst. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 4, n. 6, p. 1085–1104, 1993.

BERGERON, S.; CHAPLIN, D. A.; EDWARDS, J. H.; ELLIS, B.S.W.; HILL, C. L.; HOLT-TIFFIN, K.; KNIGHT, J. R.; MAHONEY, T.; OSBORNE, A. P.; RUECROFT, G. Nitrilase-Catalysed Desymmetrisation of 3-Hydroxyglutaronitrile: Preparation of a Statin Side-Chain Intermediate. **Organic Process Research and Development**, v. 10, n. 3, p. 661–665, 2006.

BIROLI, W. G.; ALVARENGA, N.; FERREIRA, I. M.; BIROLI, W. G.; SANTOS, D. DE A.; MATOS, I. L. DE; COMASSETO, J. V.; PORTO, A. L. M. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 481–510, 2015.

BLACK, G. W.; GREGSON, T.; MCPAKE, C. B.; PERRY, J. J.; ZHANG, M. Biotransformation of nitriles using the solvent-tolerant nitrile hydratase from *Rhodopseudomonas palustris* CGA009. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 13, p. 1639–1641, 2010.

BLAKEY, A. J.; COLBY, J.; WILLIAMS, E.; O'REILLY, C. Regio- and stereo-

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

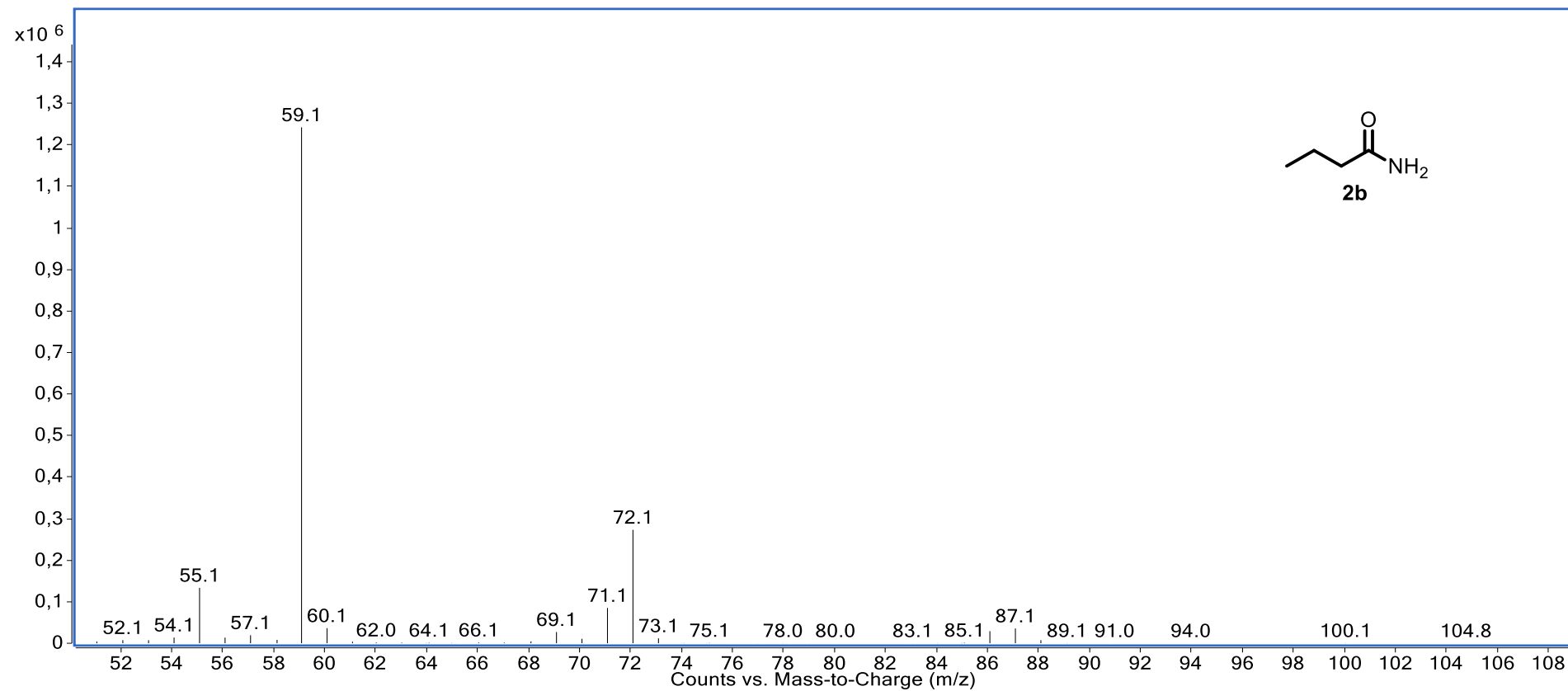
ZHANG, H.; LI, M.; LI, J.; WANG, G.; LI, F.; XIONG, M. Chaperone-assisted maturation of the recombinant Fe-type nitrile hydratase is insufficient for fully active expression in *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 56, p. 37–44, 2017.

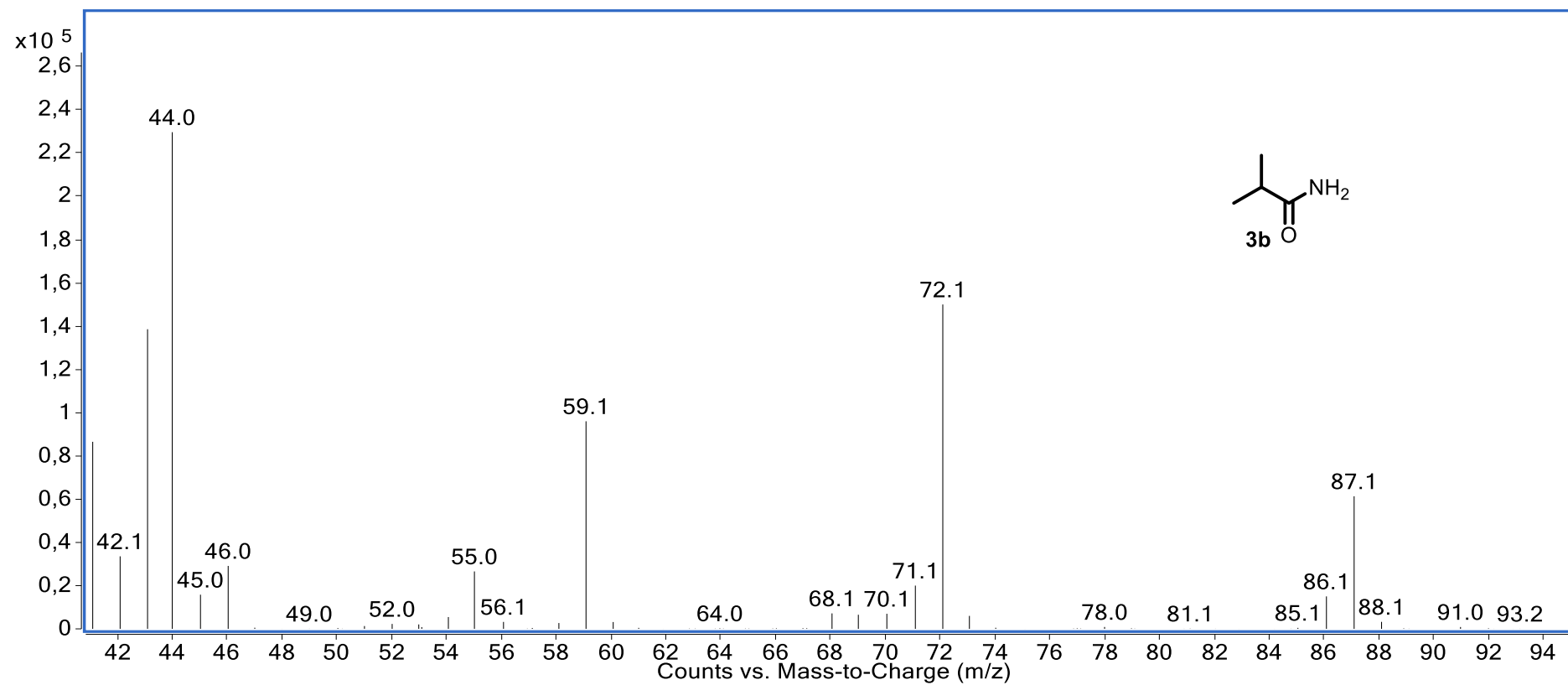
ZHENG, R. C.; YANG, Z. Y.; LI, C. C.; ZHENG, Y. G.; SHEN, Y. C. Industrial production of chiral intermediate of cilastatin by nitrile hydratase and amidase catalyzed one-pot, two-step biotransformation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 161–166, 2014.

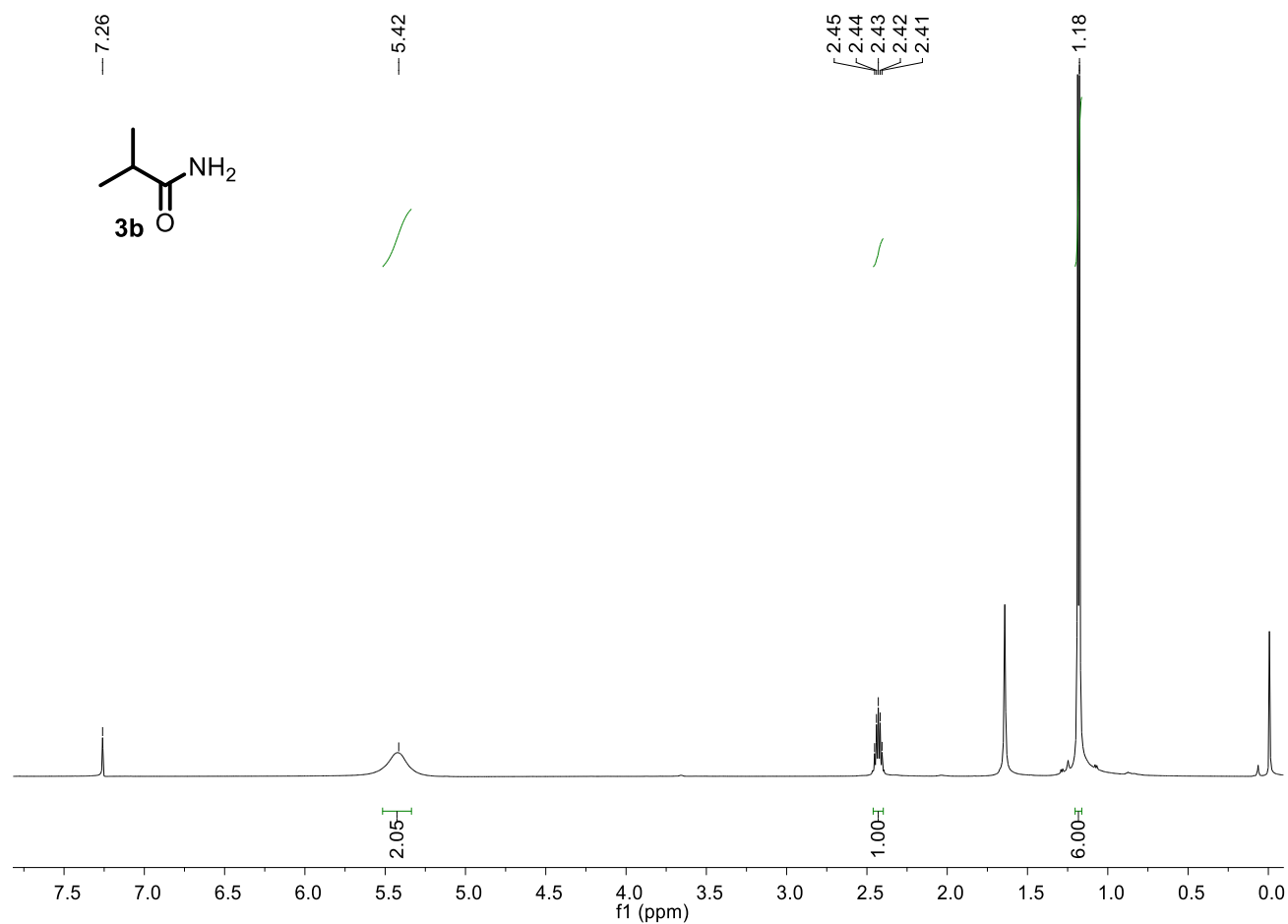
7- APÊNDICES

LISTA DE APÊNDICE

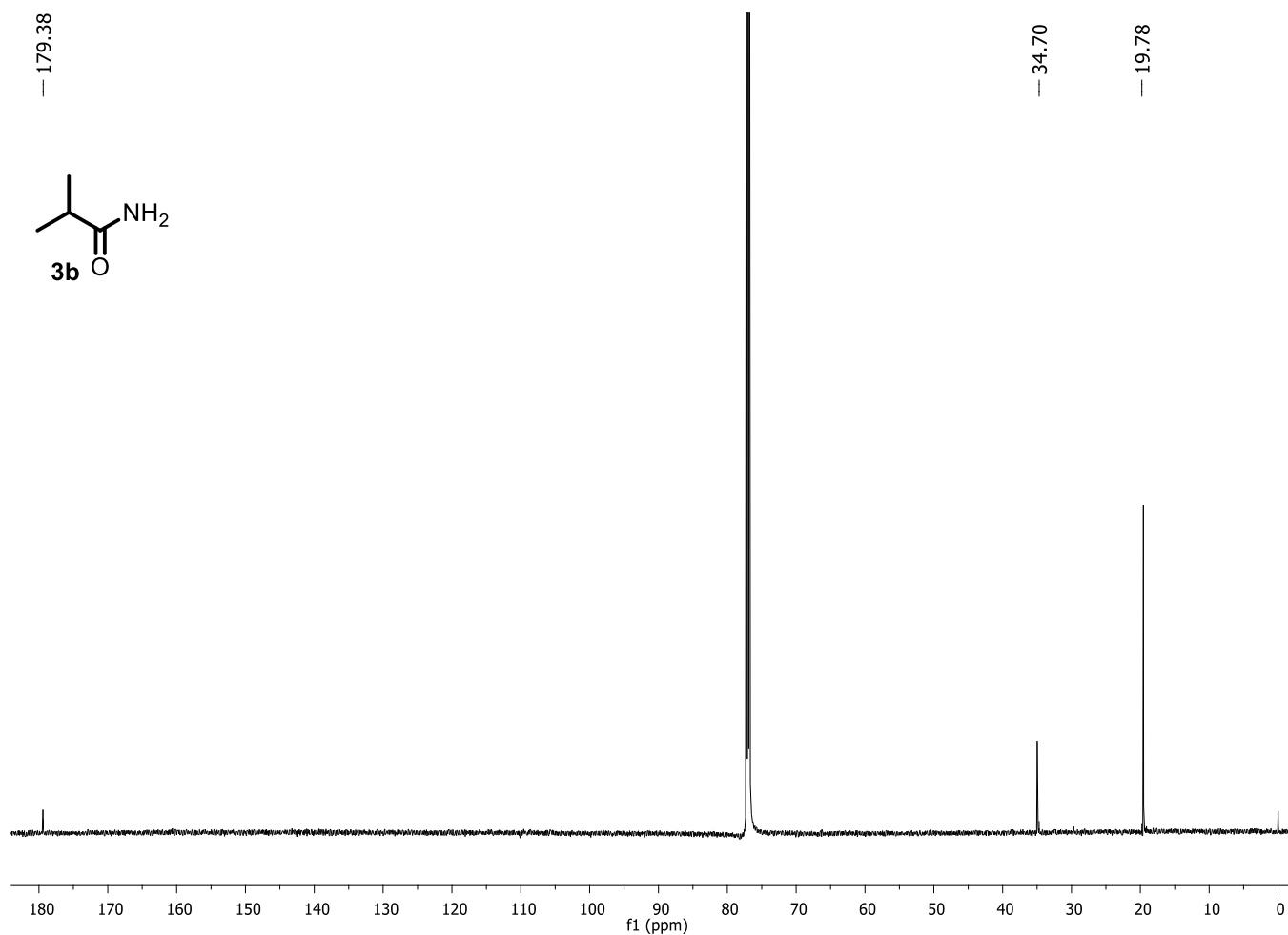
E1. Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto 2b	103
E2. Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto 3b	104
E3. Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) da isobutanamida 3b	105
E4. Espectro de RMN de ^{13}C (150,90 MHz, CDCl_3) da isobutanamida 3b	106
E5. Espectro de massas (IE, 70 eV) da benzamida 4b	107
E6. Espectro de massas (IE, 70 eV) do 4-(cianometil)benzenoacetanamida 5b	108
E7. Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do 4-(cianometil)benzenoacetanamida 5b	109
E8. Espectro de RMN de ^{13}C (150,90 MHz, CDCl_3) do 4-(cianometil)benzenoacetanamida 5b	110
E9. Espectro no IV do 4-(cianometil)benzenoacetanamida 5b	111
E10. Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-amino-2-(4'-fluorofenil) acetamida 6b	112
E11. Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, MeOD) do 2-amino-2-(4'-fluorofenil) acetamida 6b	113
E12. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (150,90 MHz, MeOD) do 2-amino-2-(4'-fluorofenil) acetamida 6b	114
E13. Espectro de HSQC (600.13 MHz, MeOD) do 2-amino-2-(4'-fluorofenil) acetamida 6b	115
E14. Espectro de HMBC (600.13 MHz, MeOD) do 2-amino-2-(4'-fluorofenil) acetamida 6b	116
E15. Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-fenilbutiramida 7b	117
E16. Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do 2-fenilbutiramida 7b	118
E17. Espectro de RMN de ^{13}C (150,90 MHz, CDCl_3) do 2-fenilbutiramida 7b	119
E18. Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto 4-(2-propanona)benzenoacetanamida (10).....	120
E19. Sequência de aminoácidos das subunidades α e β e gene ativador da NHase de <i>R. erythropolis</i> ATCC 4277.....	121

E1. Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto **2b**

E2. Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto **3b**

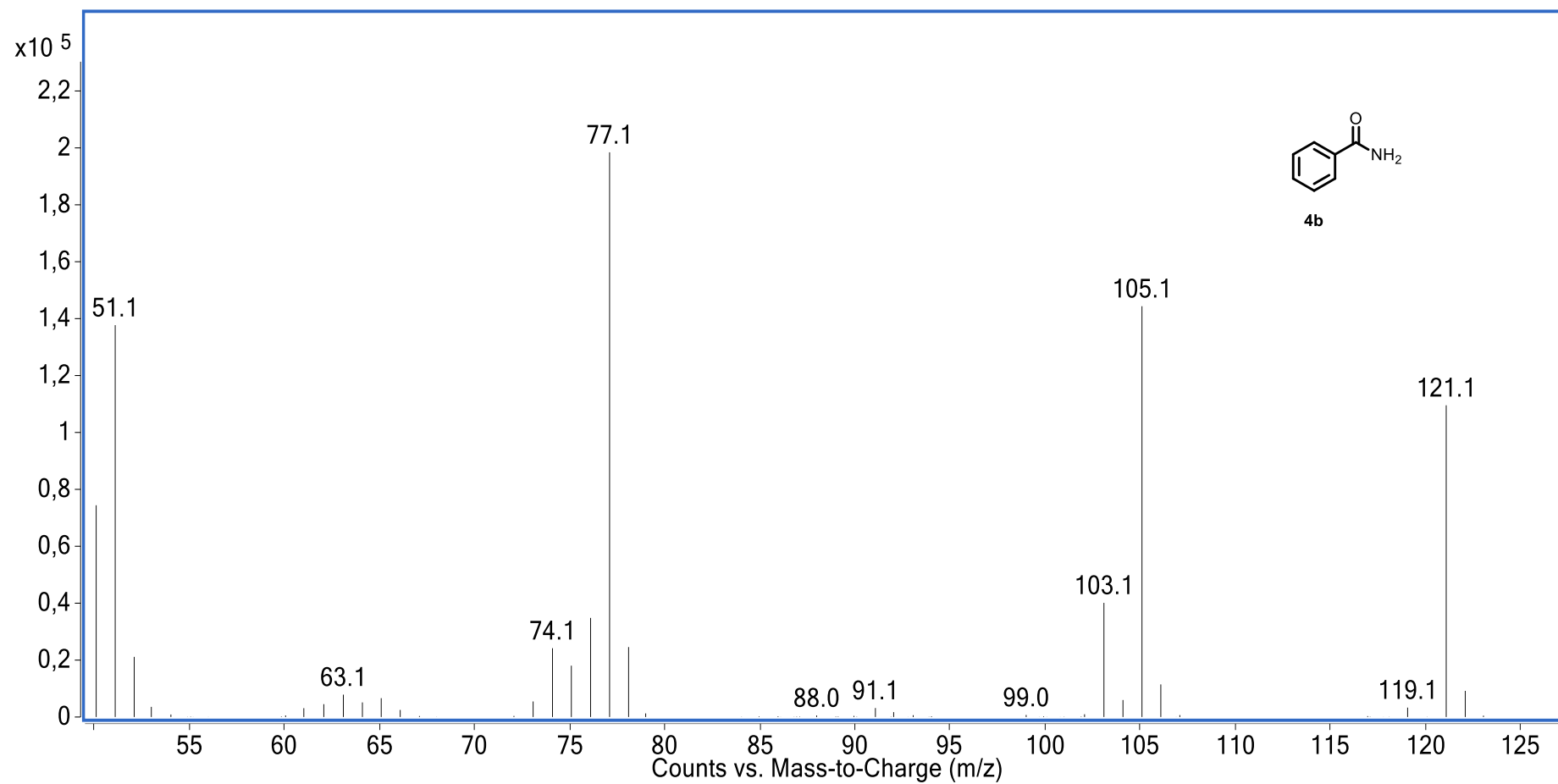
E3. Espectro de RMN de ¹H (600,13 MHz, CDCl₃) da isobutanamida **3b**

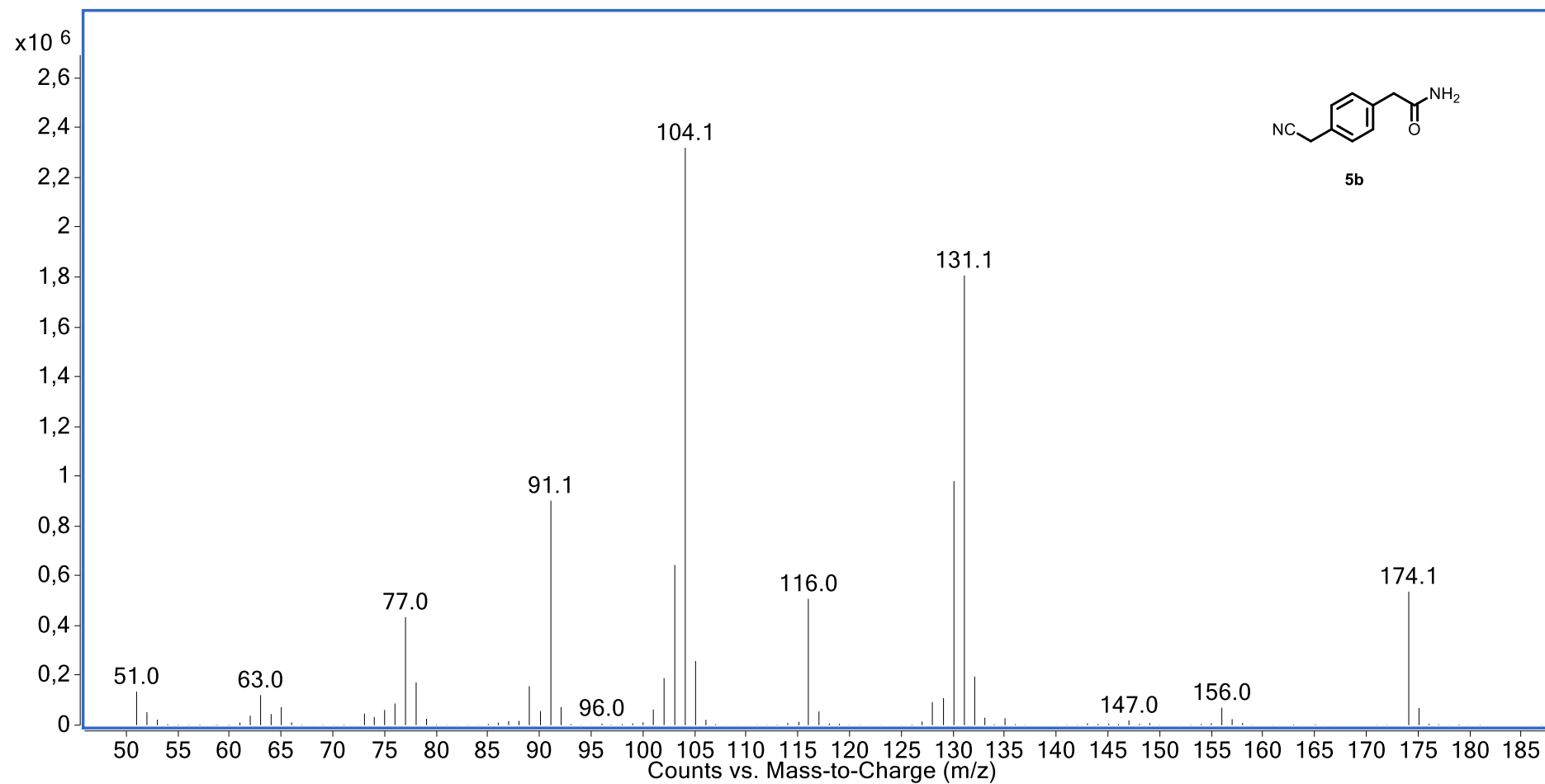
	Parameter	Value
1	Data File Name	
2	Title	Maraylla_iso_but_a mida
3	Comment	
4	Origin	Bruker BioSpin GmbH
5	Owner	nmrsu
6	Site	
7	Spectrometer	spect
8	Author	
9	Solvent	CDCl ₃
10	Temperature	296.2
11	Pulse Sequence	zg30
12	Number of Scans	32
13	Receiver Gain	18
14	Relaxation Delay	1.0000
15	Pulse Width	7.0000
16	Acquisition Time	2.7263
17	Acquisition Date	2018-08-27T20:10:26
18	Modification Date	2018-08-27T20:10:28
19	Spectrometer Frequency	600.13
20	Spectral Width	12019.2
21	Lowest Frequency	-923.6
22	Nucleus	¹ H
23	Acquired Size	32768
24	Spectral Size	65536

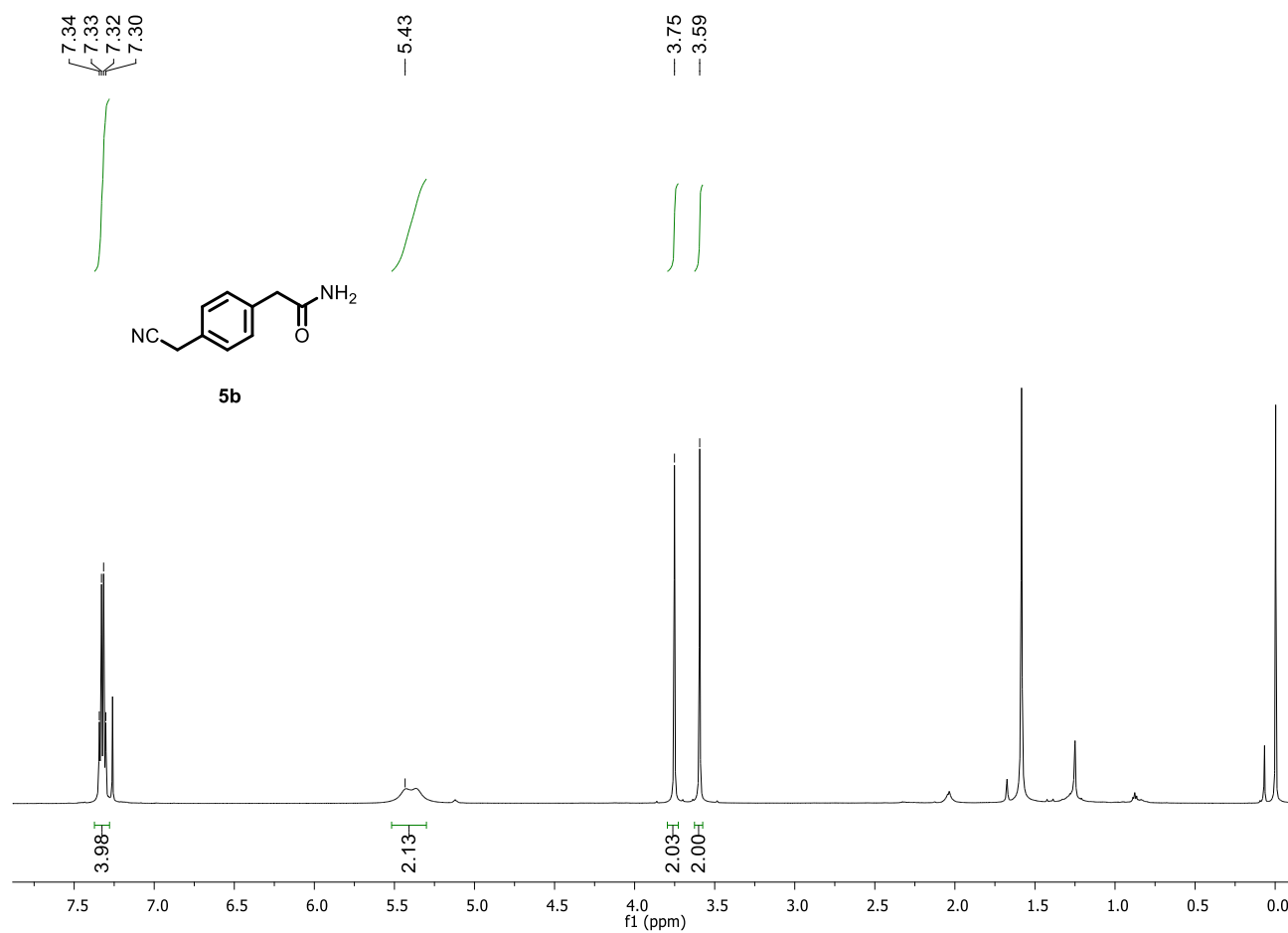


E4. Espectro de RMN de ¹³C (150,90 MHz, CDCl₃) da isobutanamida **3b**

	Parameter	Value
1	Data File Name	
2	Title	Maraylla_iso_but_a mida
3	Comment	
4	Origin	Bruker BioSpin GmbH
5	Owner	nmrsu
6	Site	
7	Spectrometer	spect
8	Author	
9	Solvent	CDCl ₃
10	Temperature	296.1
11	Pulse Sequence	zgpg30
12	Number of Scans	512
13	Receiver Gain	203
14	Relaxation Delay	2.0000
15	Pulse Width	13.5000
16	Acquisition Time	0.4325
17	Acquisition Date	2018-08- 27T20:32:46
18	Modification Date	2018-08- 27T20:32:48
19	Spectrometer Frequency	150.90
20	Spectral Width	37878.8
21	Lowest Frequency	-1136.4
22	Nucleus	¹³ C
23	Acquired Size	16384
24	Spectral Size	32768

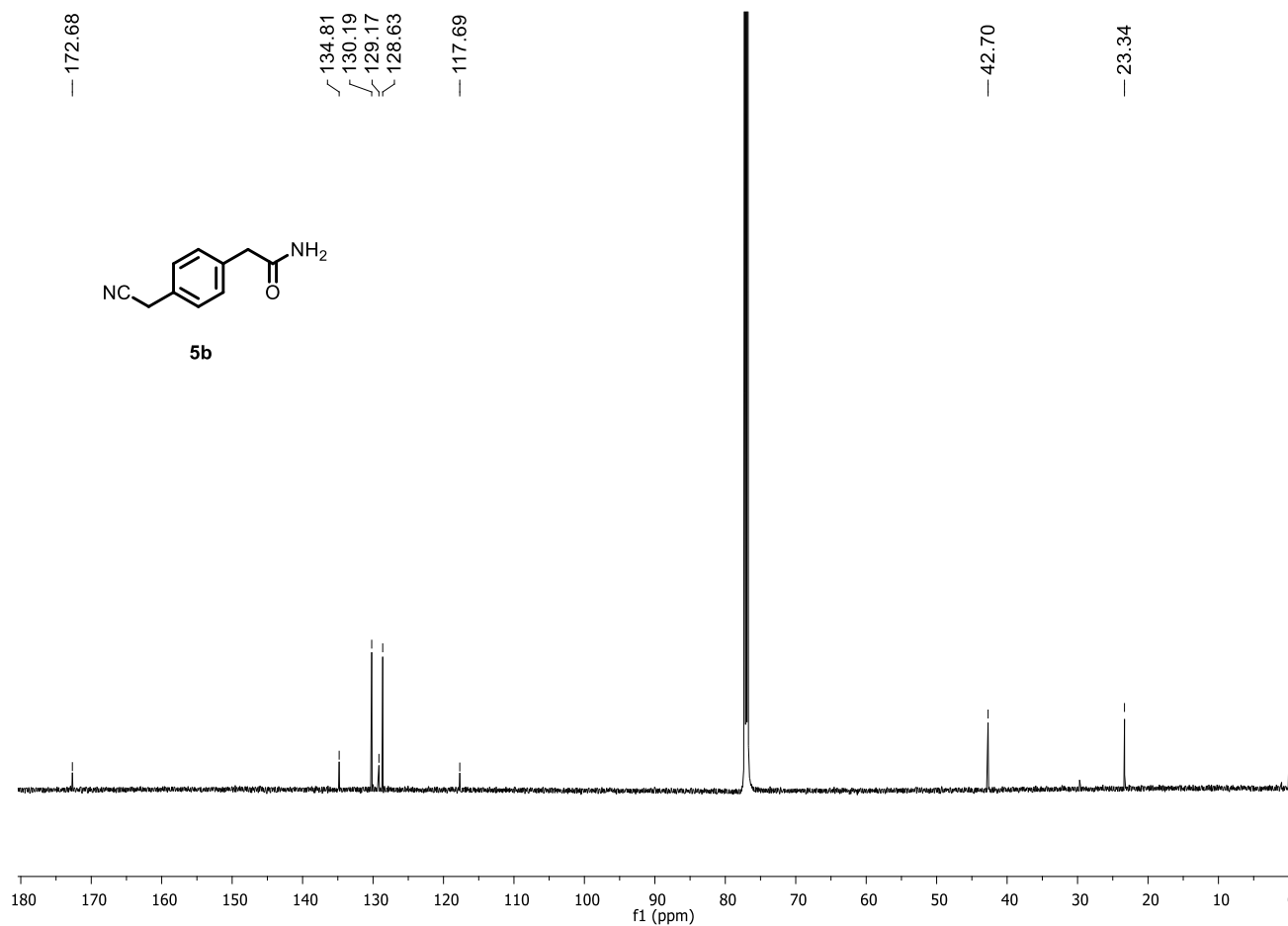
E5. Espectro de massas (IE, 70 eV) da benzamida **4b**

E6. Espectro de massas (IE, 70 eV) do 4-(cianometil)benzenoacetanamida **5b**



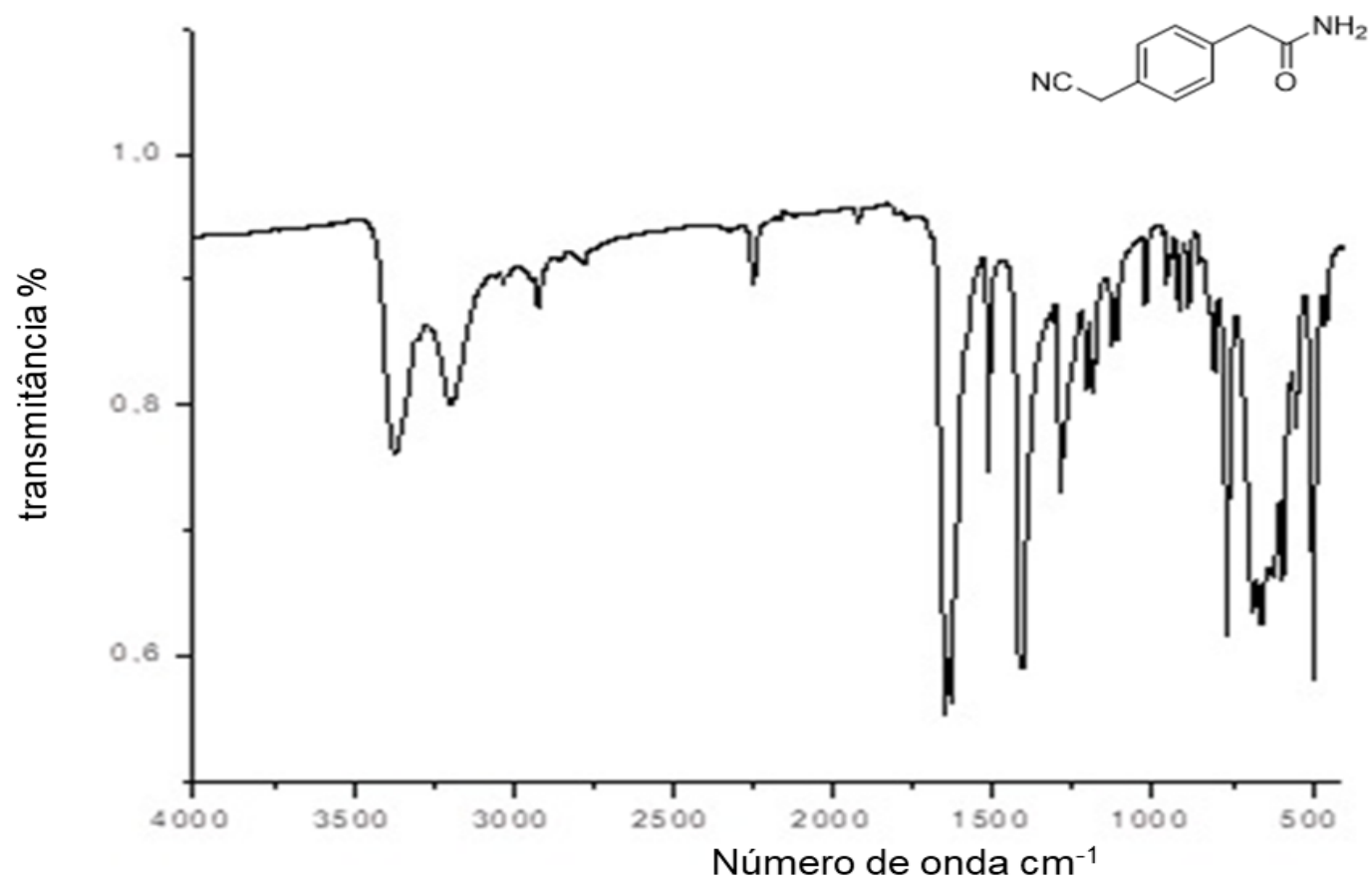
E7. Espectro de RMN de ^1H (600,13 MHz, CDCl_3) do 4 (cianometil)benzenoacetanida **5b**

	Parameter	Value
1	Data File Name	
2	Title	Maraylla_4_Met_benz_amida
3	Comment	
4	Origin	Bruker BioSpin GmbH
5	Owner	nmrsu
6	Site	
7	Spectrometer	spect
8	Author	
9	Solvent	CDCl_3
10	Temperature	296.2
11	Pulse Sequence	zg30
12	Number of Scans	32
13	Receiver Gain	23
14	Relaxation Delay	1.0000
15	Pulse Width	7.0000
16	Acquisition Time	2.7263
17	Acquisition Date	2018-08-27T19:14:30
18	Modification Date	2018-08-27T19:14:32
19	Spectrometer Frequency	600.13
20	Spectral Width	12019.2
21	Lowest Frequency	-922.9
22	Nucleus	^1H
23	Acquired Size	32768
24	Spectral Size	65536

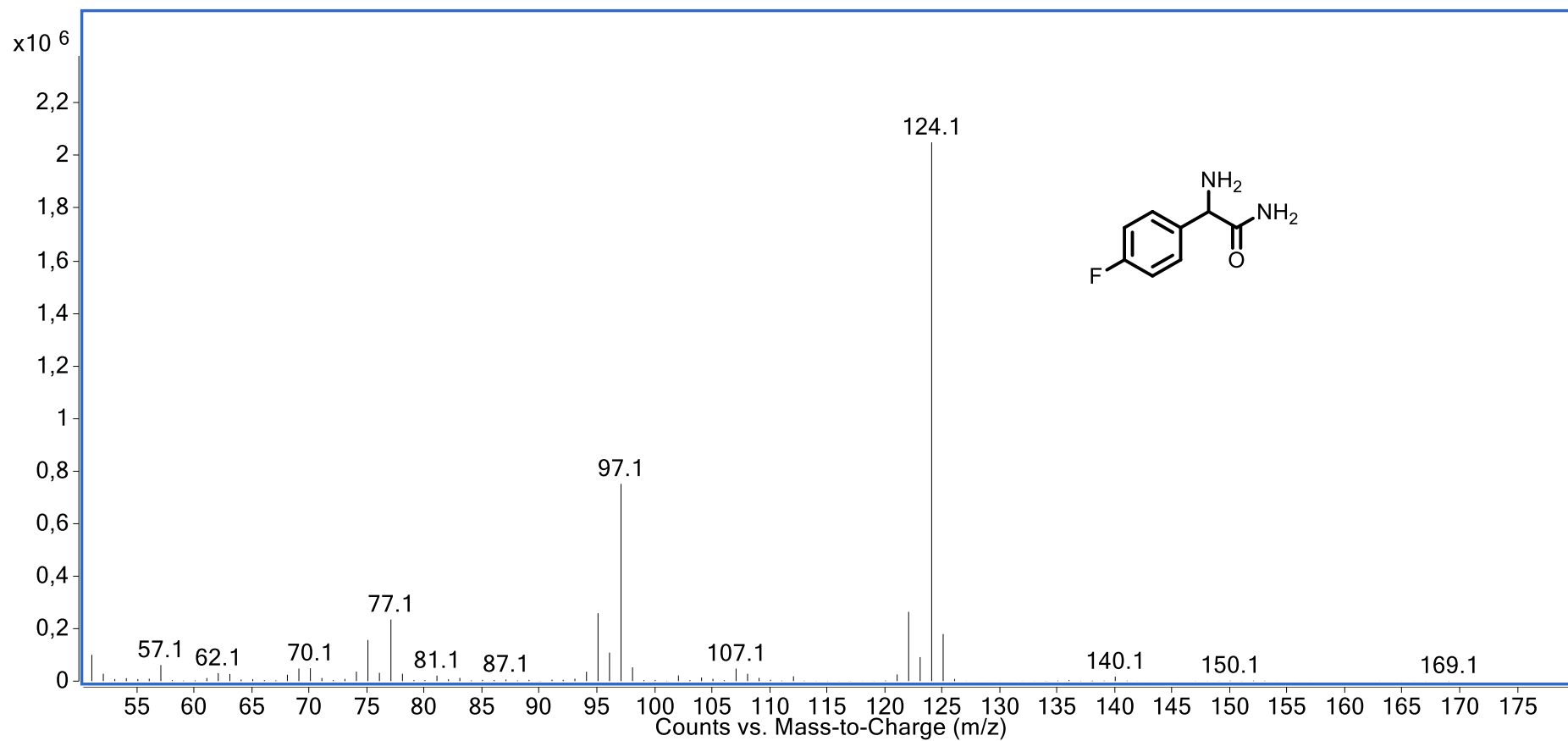


	Parameter	Value
1	Data File Name	
2	Title	Maraylla_4_Met_benz_amida
3	Comment	
4	Origin	Bruker BioSpin GmbH
5	Owner	nmrsu
6	Site	
7	Spectrometer	spect
8	Author	
9	Solvent	CDCl3
10	Temperature	296.1
11	Pulse Sequence	zgpg30
12	Number of Scans	512
13	Receiver Gain	203
14	Relaxation Delay	2.0000
15	Pulse Width	13.5000
16	Acquisition Time	0.4325
17	Acquisition Date	2018-08-27T19:36:47
18	Modification Date	2018-08-27T19:36:48
19	Spectrometer Frequency	150.90
20	Spectral Width	37878.8
21	Lowest Frequency	-1132.9
22	Nucleus	13C
23	Acquired Size	16384
24	Spectral Size	32768

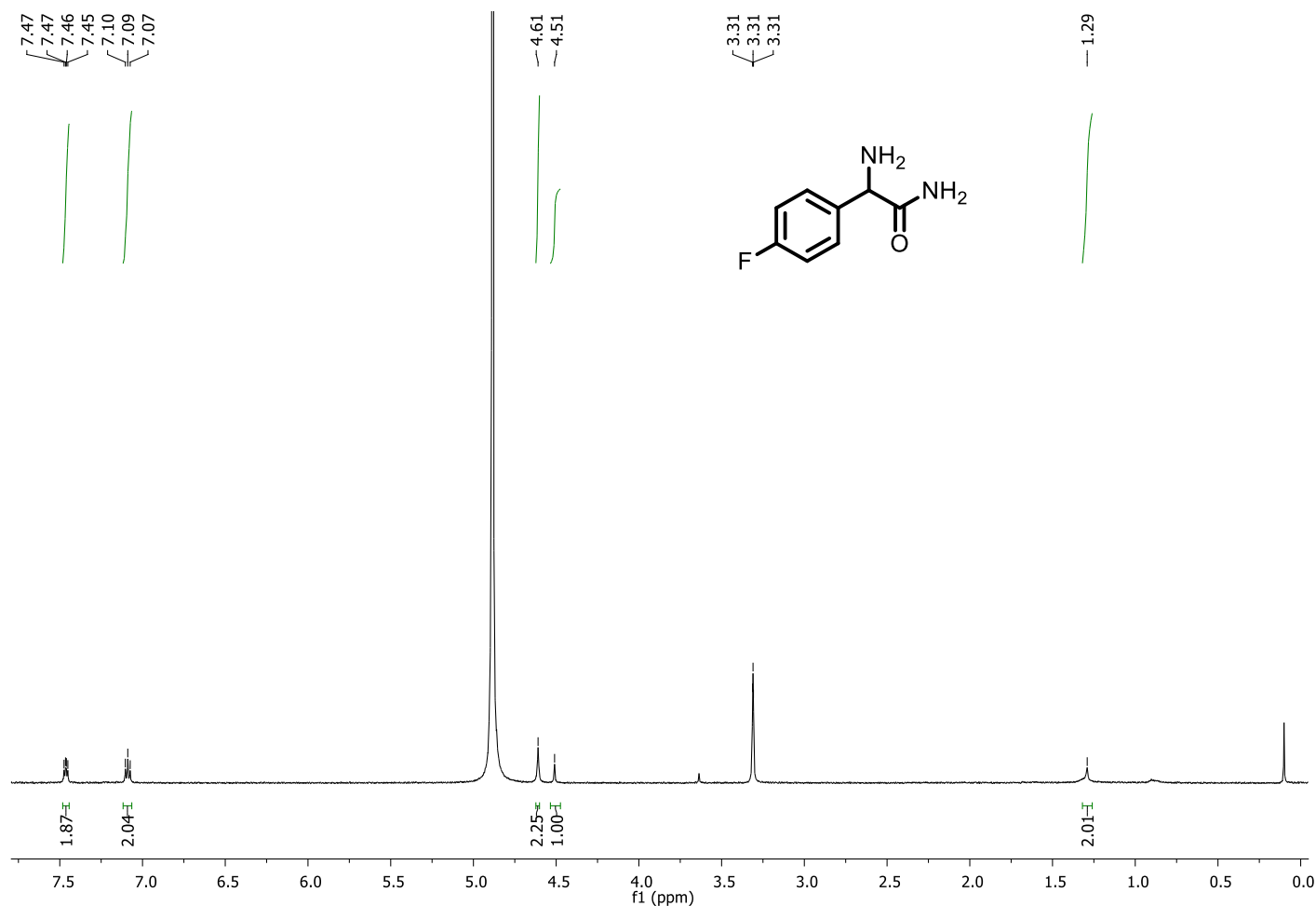
E8. Espectro de RMN de ¹³C (150,90 MHz, CDCl₃) do 4 -(cianometil)benzenoacetanamida **5b**



E9. Espectro no IV do 4 -(cianometil)benzenoacetanamida **5b**

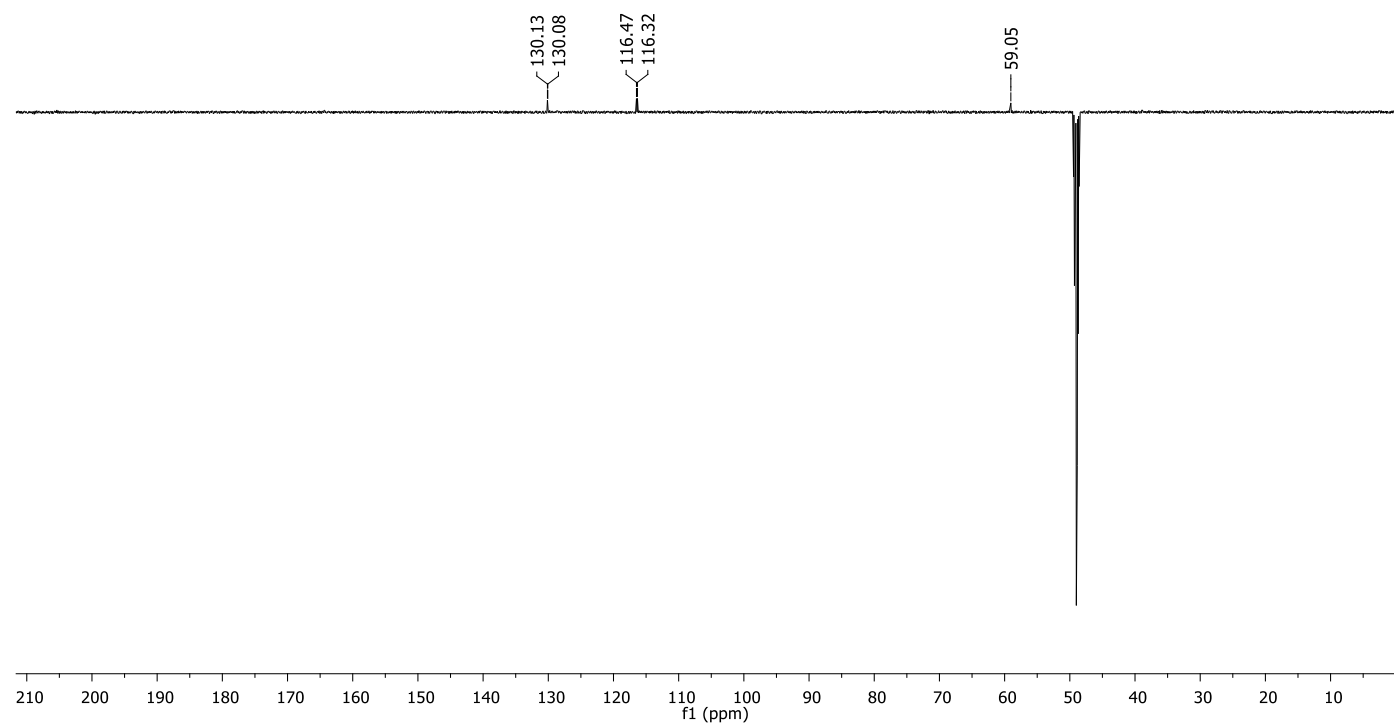
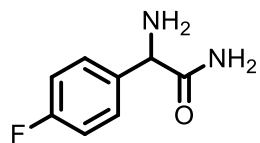


E10. Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-amino-2- (4'-fluorofenil) acetamida **6b**



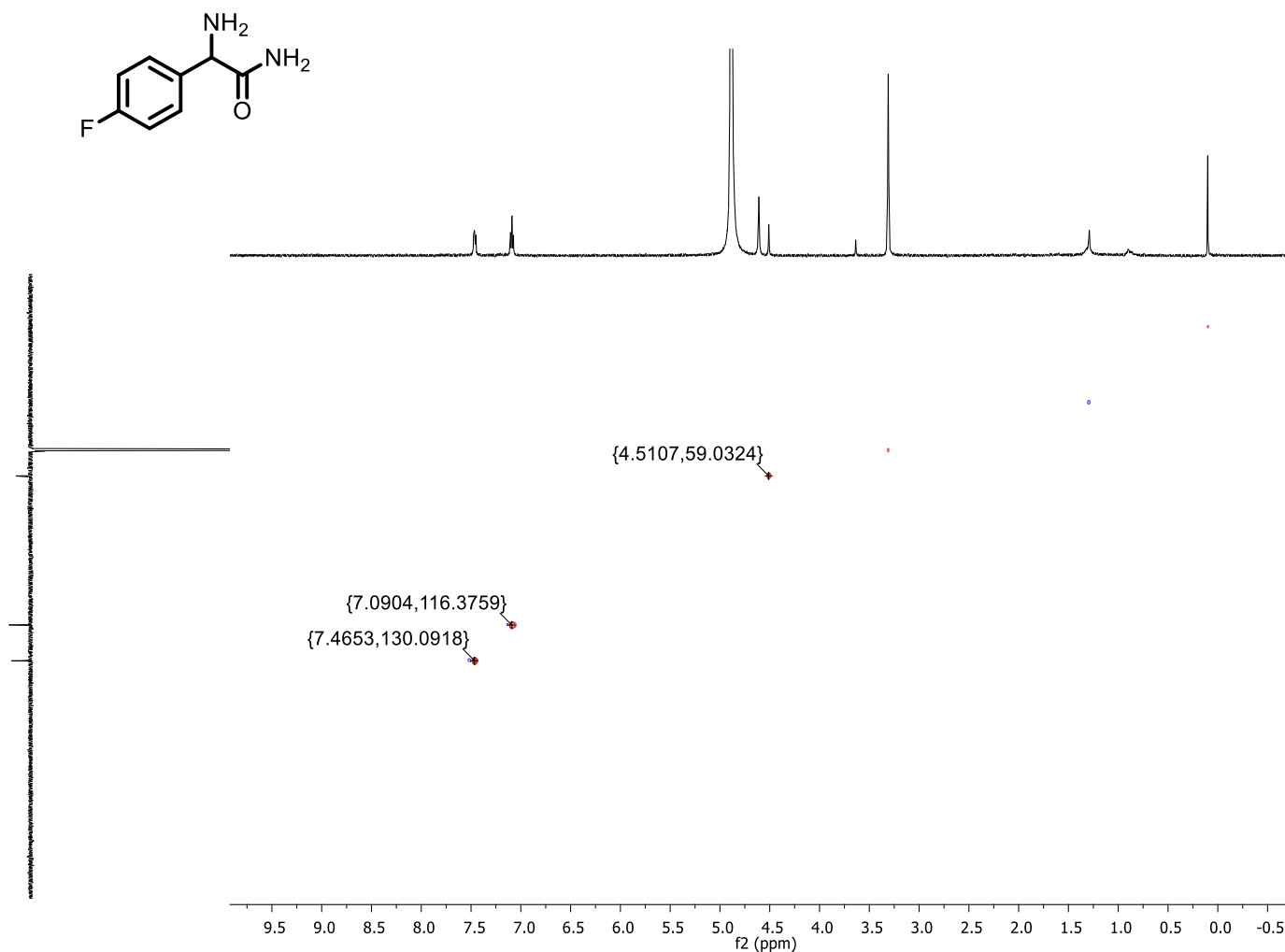
E11. Espectro de RMN de ¹H (600,13 MHz, MeOD) do 2-amino-2- (4'-fluorofenil) acetamida **6b**

	Parameter	Value
1	Data File Name	C
2	Title	2_am_4F_acetonamida
3	Comment	
4	Origin	Bruker BioSpin GmbH
5	Owner	nmrsu
6	Site	
7	Spectrometer	spect
8	Author	
9	Solvent	MeOD
10	Temperature	296.2
11	Pulse Sequence	zg30
12	Number of Scans	32
13	Receiver Gain	114
14	Relaxation Delay	1.0000
15	Pulse Width	11.0000
16	Acquisition Time	2.7263
17	Acquisition Date	2019-03-21T10:09:03
18	Modification Date	2019-03-21T10:09:04
19	Spectrometer Frequency	600.13
20	Spectral Width	12019.2
21	Lowest Frequency	-3078.3
22	Nucleus	¹ H
23	Acquired Size	32768
24	Spectral Size	65536



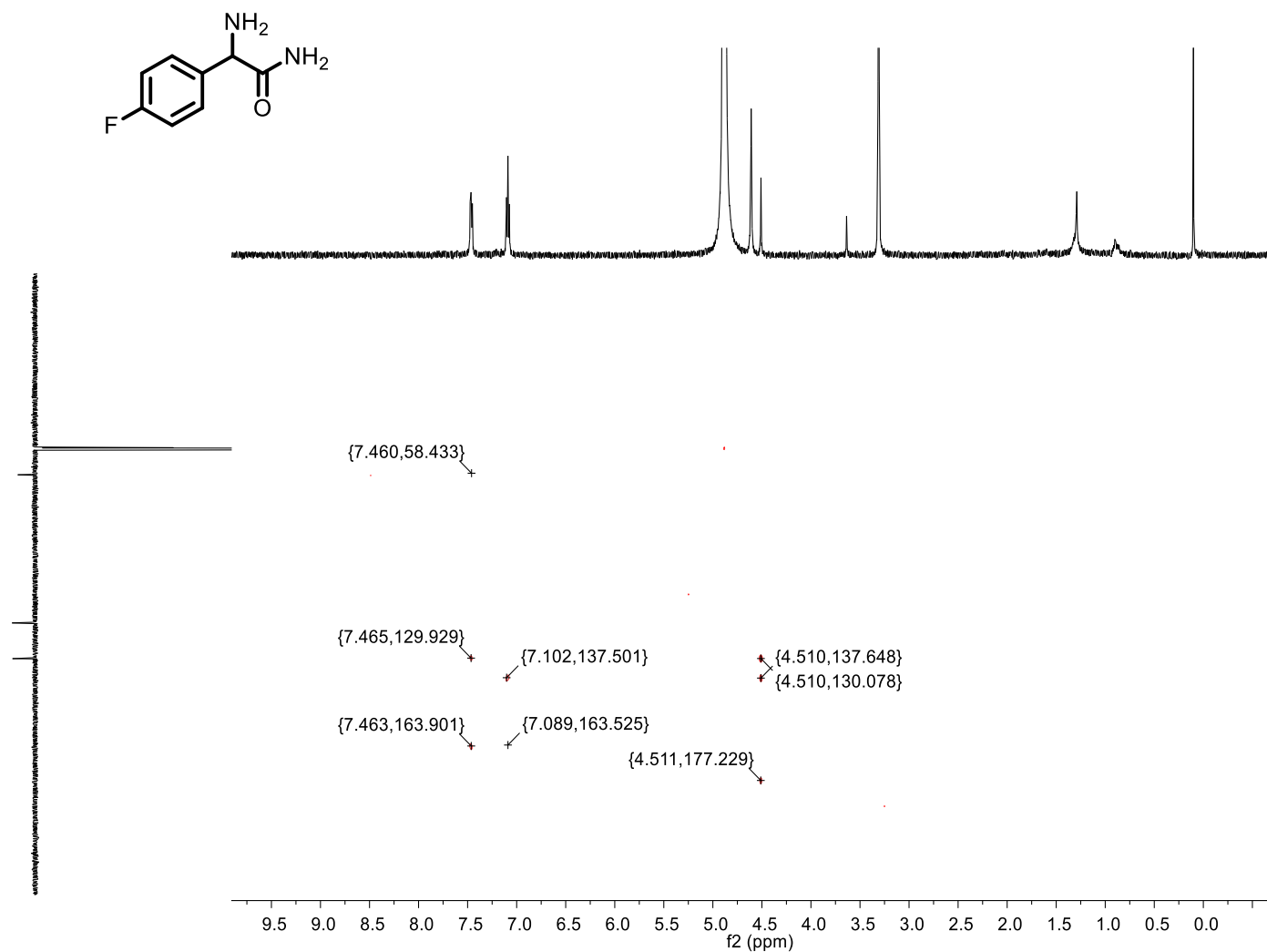
	Parameter	Value
1	Data File Name	
2	Title	2_am_4F_acetonamida
3	Comment	
4	Origin	Bruker BioSpin GmbH
5	Owner	nmrsu
6	Site	
7	Spectrometer	spect
8	Author	
9	Solvent	MeOD
10	Temperature	296.1
11	Pulse Sequence	deptqgppsp
12	Number of Scans	7000
13	Receiver Gain	203
14	Relaxation Delay	2.0000
15	Pulse Width	11.0000
16	Acquisition Time	0.9044
17	Acquisition Date	2019-03-21T22:25:28
18	Modification Date	2019-03-21T22:25:30
19	Spectrometer Frequency	150.90
20	Spectral Width	36231.9
21	Lowest Frequency	-2811.8
22	Nucleus	13C
23	Acquired Size	32768
24	Spectral Size	32768

E12. Espectro de RMN de ^{13}C - DEPTQ (150,90 MHz, MeOD) do 2-amino-2- (4'-fluorofenil) acetamida **6b**



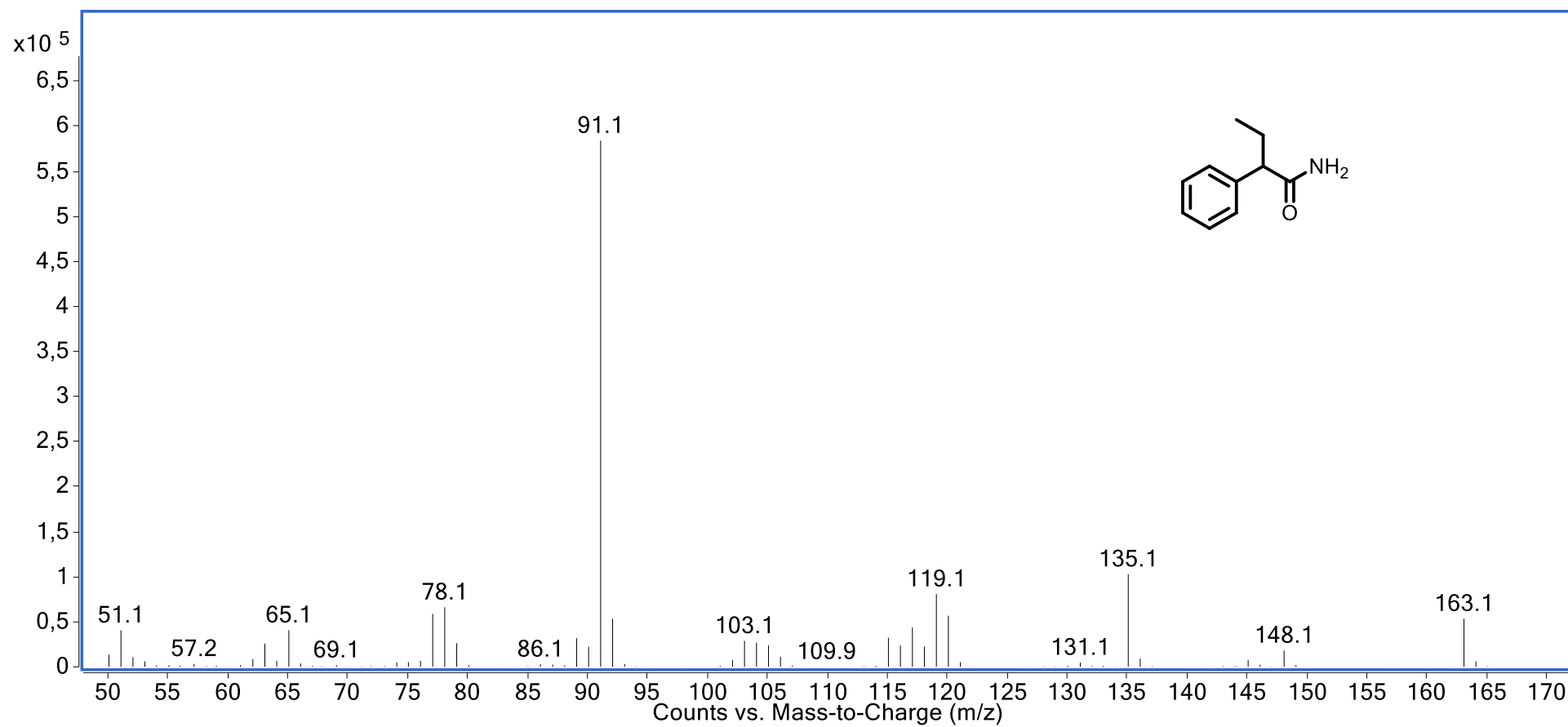
	Parameter	Value
1	Data File Name	r
2	Title	2_am_4F_acetonamida
3	Comment	
4	Origin	Bruker BioSpin GmbH
5	Owner	nmrsu
6	Site	
7	Spectrometer	spect
8	Author	
9	Solvent	MeOD
10	Temperature	296.1
11	Pulse Sequence	hsqcedetgpsisp2.4
12	Number of Scans	32
13	Receiver Gain	128
14	Relaxation Delay	1.5000
15	Pulse Width	11.0000
16	Acquisition Time	0.0797
17	Acquisition Date	2019-03-22T07:16:51
18	Modification Date	2019-03-22T07:38:04
19	Spectrometer Frequency	(600.13, 150.90)
20	Spectral Width	(6421.2, 36231.9)
21	Lowest Frequency	(-467.6, -2793.3)
22	Nucleus	(^1H , ^{13}C)
23	Acquired Size	(512, 26)
24	Spectral Size	(1024, 1024)

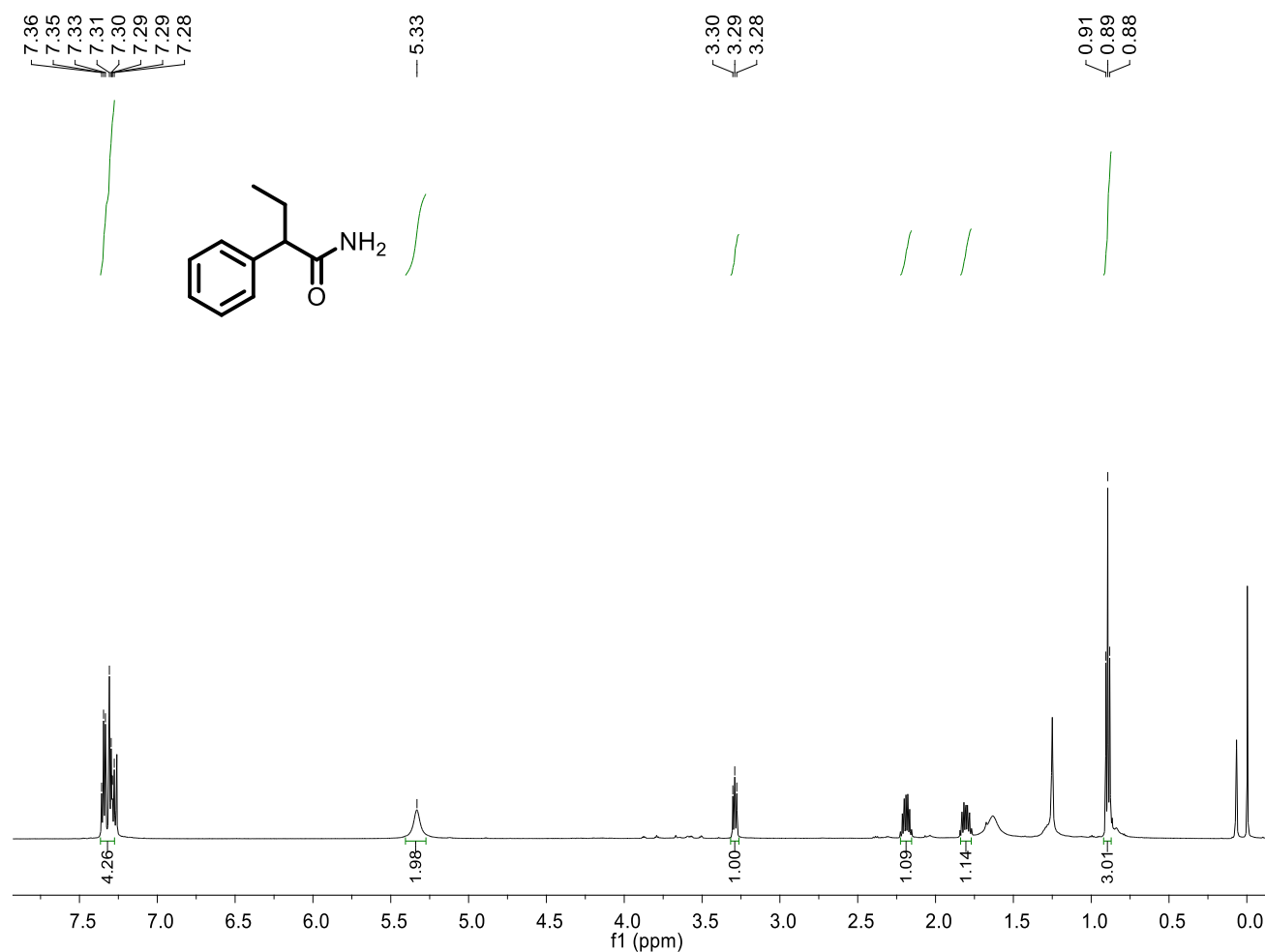
E13. Espectro de HSQC (600.13 MHz, MeOD) do 2-amino-2- (4'-fluorofenil) acetamida **6b**



	Parameter	Value
1	Data File Name	
2	Title	2_am_4F_acetonamida
3	Comment	
4	Origin	Bruker BioSpin GmbH
5	Owner	nmrsu
6	Site	
7	Spectrometer	spect
8	Author	
9	Solvent	MeOD
10	Temperature	296.2
11	Pulse Sequence	hmbcetgpl3nd
12	Number of Scans	24
13	Receiver Gain	203
14	Relaxation Delay	2.0000
15	Pulse Width	11.0000
16	Acquisition Time	0.1595
17	Acquisition Date	2019-03-22T07:40:20
18	Modification Date	2019-03-22T08:36:50
19	Spectrometer Frequency	(600.13, 150.90)
20	Spectral Width	(6421.2, 36231.9)
21	Lowest Frequency	(-477.1, -2819.7)
22	Nucleus	(1H, 13C)
23	Acquired Size	(1024, 64)
24	Spectral Size	(2048, 1024)

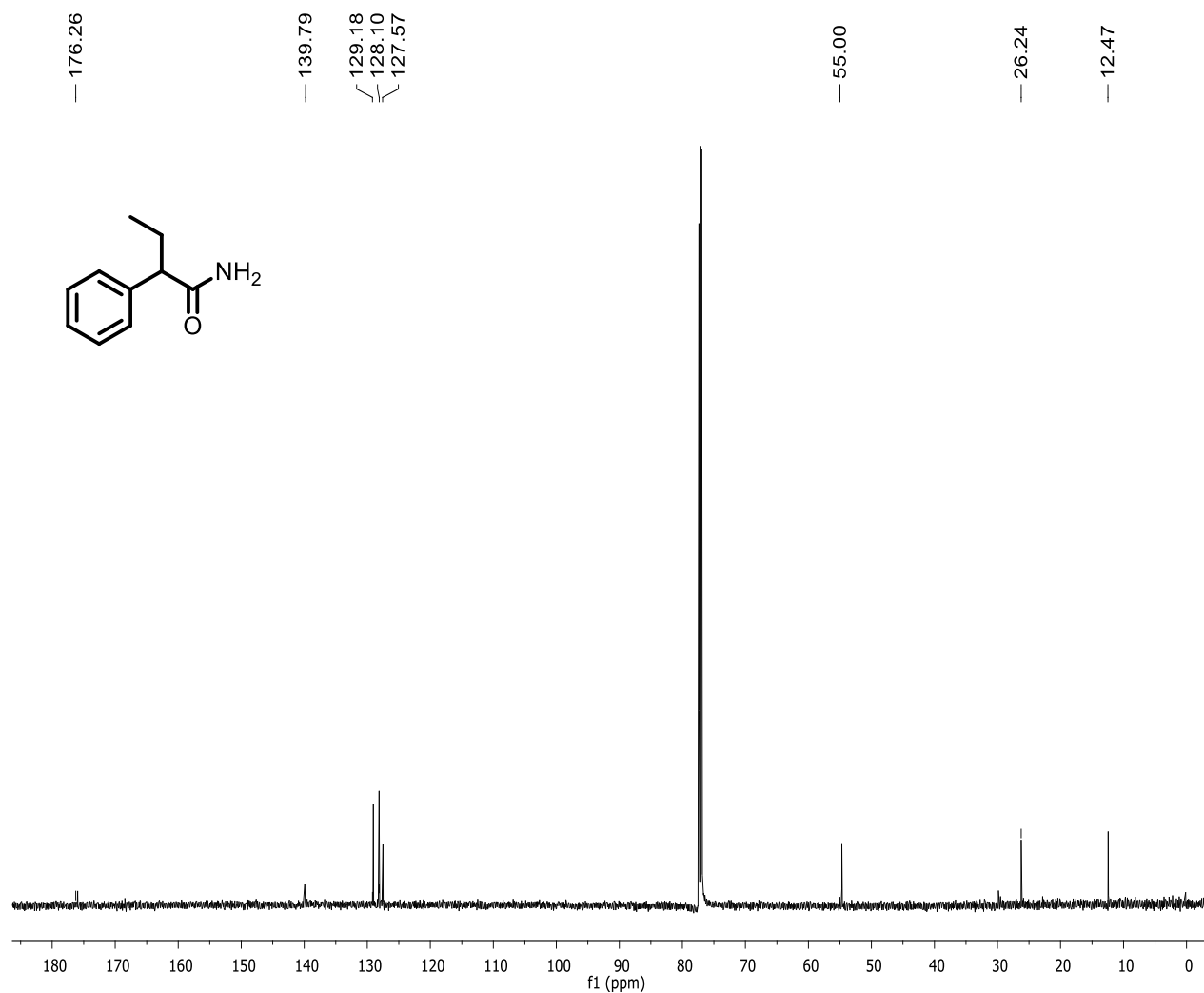
E14. Espectro de HMBC (600.13 MHz, MeOD) do 2-amino-2- (4'-fluorofenil) acetamida **6b**

E15. Espectro de massas (IE, 70 eV) do 2-fenilbutiramida **7b**

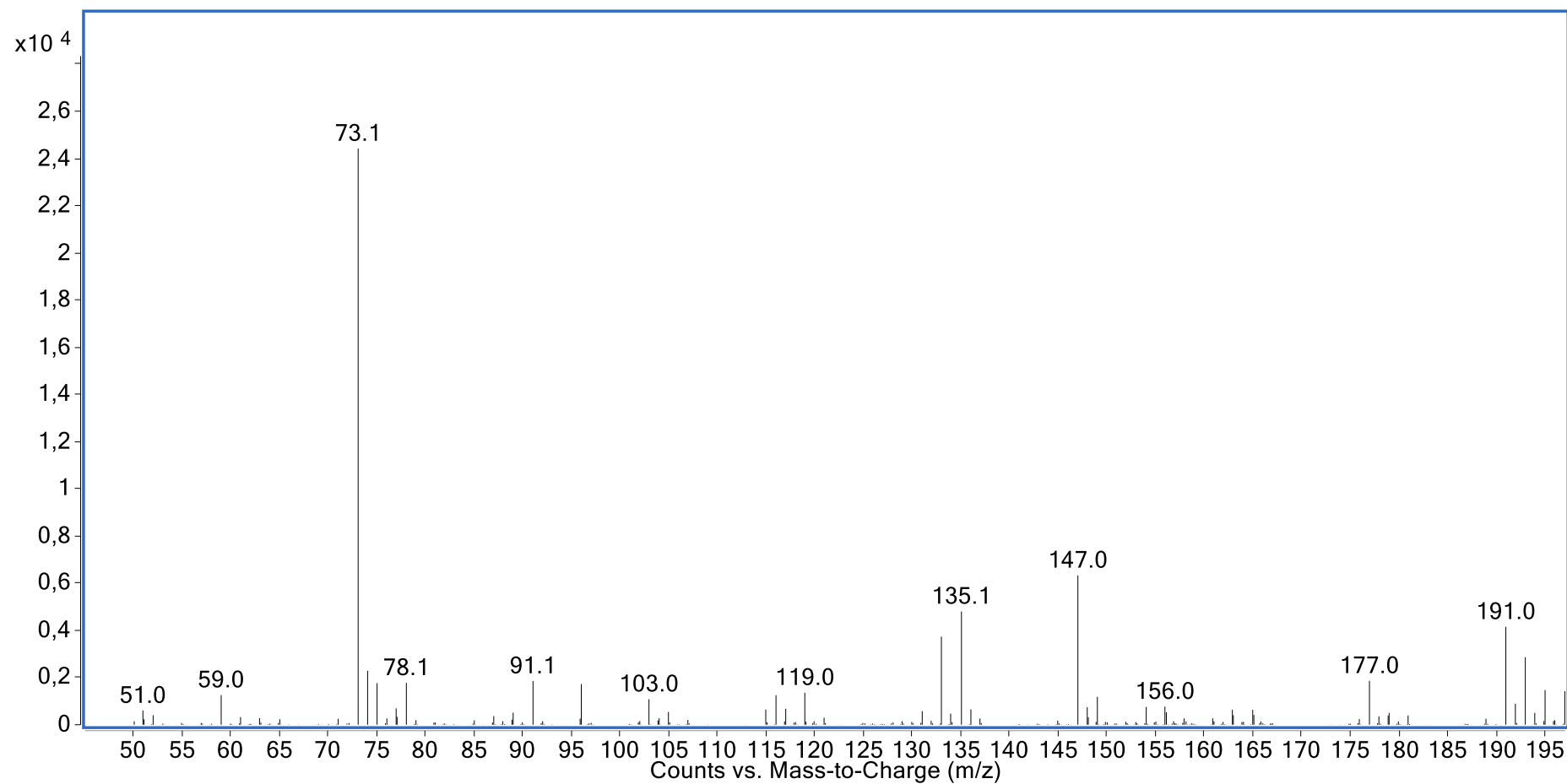


E16. Espectro de RMN de ¹H (600,13 MHz, CDCl₃) do 2-fenilbutiramida **7b**

	Parameter	Value
1	Data File Name	
2	Title	Maraylla_2_fen_but_amida
3	Comment	
4	Origin	Bruker BioSpin GmbH
5	Owner	nmrsu
6	Site	
7	Spectrometer	spect
8	Author	
9	Solvent	CDCl ₃ _3mm
10	Temperature	296.2
11	Pulse Sequence	zg30
12	Number of Scans	32
13	Receiver Gain	23
14	Relaxation Delay	1.0000
15	Pulse Width	7.0000
16	Acquisition Time	2.7263
17	Acquisition Date	2018-08-27T18:20:05
18	Modification Date	2018-08-27T18:20:06
19	Spectrometer Frequency	600.13
20	Spectral Width	12019.2
21	Lowest Frequency	-923.0
22	Nucleus	1H
23	Acquired Size	32768
24	Spectral Size	65536

E17. Espectro de RMN de ¹³C (150,90 MHz, CDCl₃) do do 2-fenilbutiramida **7b**

	Parameter	Value
1	Data File Name	
2	Title	Maraylla_2_fen_but_amida
3	Comment	
4	Origin	Bruker BioSpin GmbH
5	Owner	nmrsu
6	Site	
7	Spectrometer	spect
8	Author	
9	Solvent	CDCl ₃ _3mm
10	Temperature	296.2
11	Pulse Sequence	zgpg30
12	Number of Scans	512
13	Receiver Gain	203
14	Relaxation Delay	2.0000
15	Pulse Width	13.5000
16	Acquisition Time	0.4325
17	Acquisition Date	2018-08-27T18:42:22
18	Modification Date	2018-08-27T18:42:24
19	Spectrometer Frequency	150.90
20	Spectral Width	37878.8
21	Lowest Frequency	-1112.6
22	Nucleus	¹³ C
23	Acquired Size	16384
24	Spectral Size	32768



E18. Espectro de massas (IE, 70 eV) do composto 4-(2-propanona)benzenoacetanamida (**10**)

Seq1 [Rhodococcus erythropolis ATCC 4277] nha gene, nitrila hidratase alfa subunidade

MSVTIDHTTENAAPAQAPVSDRAWALFRALDGKGLVPDGYVEGWKKTFEEDFSPRRGAELVARAWTDPDFRQLLLTDGT
AAVAQYGYLGPQGGEYIVAVEDTPTLKNVIVCSLCSTAWPILGLPPTWYKSFEYRARVVREPRKVLSEMGTEIASDVEIRV
YDTTAETRYMVLPQRPAGTEGWSREQLQEIVTKDCLIGVAVPQVPTV

Seq2 [Rhodococcus erythropolis ATCC 4277] nha gene, nitrila hidratase beta subunidade

MDGVHDLAGVQGFGKVPHTVNADIGPTFHAEWEHLPYSLMFAGVAELGAFSVDEVRYVVERMEPRHYMMTSYYERYVIG
VAALMVEKGILTQEEESLAGGPFPLSRPSESEGRPARVDTTTFEVGQVRVRDEYVPGHIRMPAYCRGRVGTIAHRTTEK
WPFDAIGHGRNDAGEEPTYHVTFAAEELFGSDTDGGSVVVDLFEGYLEPAA

Seq3 [Rhodococcus erythropolis ATCC 4277] nha gene, nitrila hidratase ativador

MVDTRLPVTVLSGFLGAGKTTLLNEILRNREGRRVAVIVNDMSEINIDSAEVEREISLSRSEEKLVEMTNGCICCTLREDLLSEI
SALAADGRFDYLLIESSGISEPLPVAETFTFIDTDGHALADVARLDTMVTVDGNSFLRDYTAGGRVEADAPEDERDIADLLVD
QIEFADVILVSKADLVSQQHLVELTAVLRSLNATAAIVPMTLGRIPLDTILDTGLFSLEKAAQAPGWLQELQGERTPETEEYGIG
SVVYRERAPFHPQRLHDFLSSKWTNGKLLRAKGYWYVGRFTEIGSISQAGHLIRHGYVGRWWKFLPRDEWPADDYRRDG
ILDKWEEPVGDCRQELVFIGQAIDPSRLHRELDACLLTTAEIELGPDVWTTWSDPLGIGYTDQTV

E19. Sequência de aminoácidos das subunidades α e β e gene ativador da NHase de *R.erythropolis* ATCC4277