

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/08/2019.

IRIS DOS SANTOS TEIXEIRA

Síntese enzimática de amins quirais via aminação redutiva

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

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre  
Coorientador: Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

T266s Teixeira, Iris dos Santos  
Síntese enzimática de aminas quirais via aminação reductiva / Iris dos Santos Teixeira. – Araraquara : [s.n.], 2018  
119 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Cintia Duarte de Freitas Milagre

Coorientador: Humberto Márcio Santos Milagre

1. Biocatálise. 2. Síntese assimétrica. 3. Enzimas microbianas. 4. Análise enzimática. 5. Biologia molecular.

I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

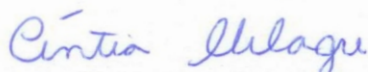
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Síntese enzimática de amins quirais via aminação redutiva"

AUTORA: IRIS DOS SANTOS TEIXEIRA

ORIENTADORA: CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

COORIENTADOR: HUMBERTO MÁRCIO SANTOS MILAGRE

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



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



Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA  
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. LEANDRO HELGUEIRA DE ANDRADE  
Departamento de Química Fundamental / Instituto de Química - USP - São Paulo

Araraquara, 19 de fevereiro de 2018

## DADOS CURRICULARES

### Dados Pessoais

Nome: Iris dos Santos Teixeira  
Nome em citações bibliográficas: Teixeira, I.S.  
Filiação: Aparecido da Silva Teixeira  
Rosalina dos Santos Teixeira  
Data de nascimento: 02 de outubro de 1991  
Naturalidade: Americana/SP  
Nacionalidade: Brasileira

### Formação Acadêmica

-Curso de pós-graduação modalidade Mestrado em química, área de concentração: Química, Título: “Síntese enzimática de amins quirais via aminação redutiva” sob a orientação da Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre, no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, no período de 2016 a 2018 com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

-Graduada em Química pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), de 2011 a 2015.

### Formação complementar

- Curso de curta duração “Asymmetric synthesis of bioactive compounds”, com carga horária de 9 horas, na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brasil, 2017.

- Curso de curta duração “Química Medicinal”, com carga horária de 12 horas, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araraquara, Brasil, 2013.

- Curso de curta duração “Química na elucidação de crimes: análises forenses”, com carga horária de 28 horas, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, São Paulo, Brasil, 2011.

### Estágios e Bolsas Auxílio

- Bolsa de mestrado no período de 2016 a 2018, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

- Programa de Estágio Docente na disciplina Química Orgânica Experimental I, do curso de graduação em química (BQ/BQT), sob a supervisão do Prof. Dr. Rafael Mafra de Paula Dias no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, em 2016.

- Estágio em Iniciação Científica “Estrógenos em sedimento e material particulado em ambiente marinho: estudo analítico”, sob a orientação da Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi, de 01/02/2014 a 01/01/2015, com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2013/20877-4).

### Apresentação de trabalho em Congressos

- **TEIXEIRA, I. S.**; Milagre, CDF. Enzymatic synthesis of chiral amines and/or alcohols from ketones, Workshop CERSUSCHEM, São Pedro, 2017.

- **TEIXEIRA, I. S.**; GONCALVES, R. M.; MARCHI, M. R. R. D. Aplicação do método QUECHERS na determinação de estrógenos em sedimento marinho: dados iniciais, XXVI Congresso de Iniciação Científica (CIC), 2014.

#### **Participação em eventos**

Workshop CERSUCHEM, 2017

Pint of Science Brasil, 2017

Workshop Inovações em análise de Enantiômeros, 2016.

Workshop Mulheres na Ciência: o gênero na pós graduação, 2016.

XXVI Congresso de Iniciação Científica (CIC), 2014.

*Para meus pais,  
Rosalina e Aparecido*

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre, pela convivência durante esses dois anos, pela confiança depositada em mim, pelo aprendizado, amizade, e conselhos dados.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre, pelas contribuições com esse trabalho, pela amizade e pelo aprendizado.

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

Ao CNPq pela bolsa concedida.

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

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

Aos amigos e colegas do grupo de pesquisa, cuja convivência diária tornaram o trabalho muito mais agradável.

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

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

Ao Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos pela colaboração e envio de um dos substratos.

À Profa. Dra. Maria Célia Bertolini pela concessão de uso da centrífuga. Ao mestrando Jonatas Campanella pelo auxílio em manusear o equipamento.

À Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento pelas análises de HPLC-CD. À Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos pela coluna de HPLC emprestada. À mestranda Camila pelos auxílios com o equipamento.

À minha família, meus pais Rosalina e Aparecido e minha irmã Iara, pelo incentivo, apoio e por sempre acreditarem em mim.

Ao Matheus, cujo apoio, presença, carinho e companheirismo foram fundamentais durante esse período.

À minha segunda família, Mônica e vó Clemilde, pelo carinho, confiança e incentivo.

.

*“Abram os olhos e vejam o máximo que puderem,  
antes que eles se fechem para sempre.” Anthony Doerr*

## RESUMO

As  $\omega$ -transaminases são enzimas dependentes de piridoxal-5-fosfato (PLP) que catalisam a transferência de grupos amino para aldeídos e/ou cetonas. Quando as cetonas utilizadas são pró-quirais, elas produzem aminas opticamente ativas por meio de síntese assimétrica. Nesse trabalho foram estudadas as sínteses assimétricas de aminas primárias, a partir de cetonas proquirais. Cinco diferentes substratos foram avaliados perante alguns biocatalisadores contendo  $\omega$ -transaminases, entre eles enzimas comerciais, micro-organismos da Coleção Microbiana do Milagre Research Group e enzimas selvagens expressas heterologicamente em *E. coli*. As enzimas comerciais foram empregadas na otimização das condições reacionais e avaliação dos substratos, com conversões e ee maiores que 99%, para dois dos substratos estudados. Os dois micro-organismos selvagens avaliados não foram capazes de realizar a reação de síntese assimétrica de aminas. Entretanto, observou-se a ação de enzimas ene-redutases no micro-organismo MLH 51, e de cetoredutases em ambos. As conversões, apesar de modestas, possuíram bons excessos enantioméricos (78-98%). Por fim, os as enzimas expressas heterologicamente em *E. coli* apresentaram potencial para a aminação redutiva de substratos contendo anéis heterocíclicos e estruturas planares. Embora os valores de conversão observados não sejam ainda satisfatórios, os excessos enantioméricos obtidos quando usadas essas enzimas foram de bons a excelentes (84 a >99%). Com os substratos estudados foi possível avaliar a classe de compostos adequados para as  $\omega$ -transaminases, sendo que a presença de um grupo éter mostrou-se ligada a melhores valores de conversão quando usada essa classe de enzima.

**Palavras-chave: Biocatálise, aminas quirais, transaminases**

## ABSTRACT

$\omega$ -transaminases are pyridoxal-5-phosphate (PLP)-dependent enzymes that catalyse the transfer of an amino group from an amino donor to an aldehyde and/or ketone. When the starting ketones are prochiral, they produce optically active amines by asymmetric synthesis. In this work the asymmetric synthesis of primary amines was studied from prochiral ketones. Five different substrates were evaluated towards some biocatalysts containing  $\omega$ -transaminases, among them commercial enzymes, microorganisms from the Microbial Collection of the Milagre Research Group and wild enzymes expressed heterologously in *E. coli*. Commercial enzymes were employed in the optimization of the reaction conditions and evaluation of the substrates, with conversions and ee higher than 99%, for two of the evaluated substrates. The two wild-type microorganisms evaluated were not able to perform the reductive amination reaction. However, the action of ene-reductase enzymes in the microorganism MLH 51 and ketoreductases in both were observed. Conversions, although modest, had good enantiomeric excesses (78-98%). Finally, enzymes expressed heterologously in *E. coli* presented potential for reductive amination of substrates containing heterocyclic rings and planar structures. Although the observed conversion values are still not satisfactory, the enantiomeric excesses obtained when using these enzymes were great to excellent (84 to >99%). With the substrates studied, it was possible to evaluate the class of compounds suitable for the  $\omega$ -transaminases, and the presence of an ether group was shown to be bound to better conversion values when this class of enzyme was used.

**Keywords: Biocatalysis, chiral amines,  $\omega$ -transaminases.**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fármacos contendo aminas quirais	18
Figura 2 Estratégias para obtenção de aminas quirais	19
Figura 3 Estrutura tridimensional da transaminase (R)-seletiva de <i>A. fumigatus</i> (THOMSEN et al., 2014)	28
Figura 4 Representação do sítio catalítico das $\omega$ -transaminases (HÖHNE et al., 2010)	28
Figura 5. Moléculas alvo desse estudo	29
Figura 6 Substratos estudados nesse trabalho	45
Figura 7 Fluxograma contendo a estratégia utilizada nas reações enzimáticas	46
Figura 8 Estrutura da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona <b>1d</b>	48
Figura 9 Estrutura da 4-(2-furanil)-2-butanona <b>1e</b>	49
Figura 10 Estrutura da 4-fenil-3-buten-2-amina <b>2b</b>	51
Figura 11 Estrutura da 4-fenil-2-butanamina <b>2c</b>	52
Figura 12 Estrutura da 4-(2-furanil)-3-buten-2amina <b>2d</b>	52
Figura 13 Estrutura da 4-(2-furanil)-2-butanamina <b>2e</b>	53
Figura 14 Espectro de massas (IE, 70 eV) da imina	55
Figura 15 Cromatograma obtido usando a isopropilamina como doador amino. *sinal presente nas reações enzimáticas usando essa enzima	56
Figura 16 Cromatograma da reação com a enzima a $\omega$ -transaminase comercial (R)-seletiva recombinante de <i>Aspergillus fumigatus</i> e composto <b>1c</b> . (Rosa: padrão racêmico da amina <b>2c</b> acetilada; em Preto: enantiômêro <i>R</i> puro)	58
Figura 17 Cromatograma referente a reação do micro-organismo MLH 51 e composto <b>1d</b>	61
Figura 18 Espectro de massas (IE, 70 eV), do 4-fenil-2-butanol	61
Figura 19 Espectro de massas (IE, 70 eV) do 4-(2-furanil)-2-butanol	61
Figura 20 Curva Analítica - Ensaio de Bradford	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Condições de expressão das $\omega$ -transaminases	36
Tabela 2. Rendimentos e conversões obtidos nas reações de aminação redutiva	40
Tabela 3. Condições empregadas na reação teste	54
Tabela 4. Condições otimizadas para a reação de transaminação	55
Tabela 5. Conversões obtidas variando o doador amino	56
Tabela 6. Reações empregando a $\omega$ -transaminase comercial (R)-seletiva recombinante de <i>Aspergillus fumigatus</i>	58
Tabela 7. Reações empregando como biocatalisadores os micro-organismos MLH 15 e MLH 51	59
Tabela 8 Reações de formação do álcool com os micro-organismos MLH 15 e MLH 51	60
Tabela 9 Curva analítica do Ensaio de Bradford	62
Tabela 8 Concentração das proteínas totais presentes nos extratos enzimáticos pós diálise	63
Tabela 11 Reações usando extratos enzimáticos frente aos substratos <b>1a-e</b>	64

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Etapa biocatalítica na síntese do Montelukaste	21
Esquema 2. Etapa biocatalítica da síntese da sitagliptina	22
Esquema 3 Etapas da reação de transaminação. Fonte: (MATHEW; YUN, 2012)	23
Esquema 4. Proposta mecanística de atuação de $\omega$ -transaminases. Fonte: (FUCHS; FARNBERGER; KROUTIL, 2015)	24
Esquema 5 Reações catalisadas pela $\omega$ -transaminase	25
Esquema 6 Métodos enzimáticos para remoção do piruvato	27
Esquema 7 Hidrogenação catalítica para síntese da 4-fenil-2-butanona <b>1c</b>	37
Esquema 8. Síntese da 4-(2-furânil)-3-buten-2-ona <b>1d</b>	38
Esquema 9 Síntese da 4-(2-furânil)-2-butanona <b>1e</b>	39
Esquema 10 Aminoação redutiva para síntese dos compostos <b>2b-2e</b>	40
Esquema 11. Reação modelo de aminoação redutiva	45
Esquema 12. Síntese da 4-fenil-2-butanona <b>1c</b>	47
Esquema 13. Síntese da 4-(2-furânil)-3-buten-2-ona <b>1d</b>	48
Esquema 14. Síntese da 4-(2-furânil)-2-butanona <b>1e</b>	49
Esquema 15. Aminoação redutiva para síntese dos padrões racêmicos das aminas	50
Esquema 16. Reação teste de biotransformação empregando as condições de Da Cruz	54
Esquema 17. Reação entre feniletilamina e composto <b>1a</b>	55
Esquema 18. Biotransformação empregando $\omega$ -transaminase (S)-seletiva recombinante de <i>E. coli</i> e composto <b>1b</b>	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

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

$^1\text{H}$  RMN - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

AlaDH – Alanina desidrogenase

ALS – acetolactato sintase

Amp – Ampicilina

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

BSA – *Bovine serum albumine* (Albumina do soro bovino)

Can – Kanamicina

CCD – Cromatografia em camada delgada

CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa

$\text{CDCl}_3$  – Clorofórmio deuterado

DMAP – 4-dimetilaminopiridina

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DSC – *Dry silica chromatography* (Cromatografia *flash* em sílica seca)

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

ee – excesso enantiomérico

FDH – Formato desidrogenase

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

GC-MS – *Gas chromatography with mass spectrometer* (Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas)

GDH – Glicose desidrogenase

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

IPTG - Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida

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

IV – Infravermelho

$J$  – constante de acoplamento

KRED – *Ketoreductases* (Cetorreductase)

LB – *Luria Broth*

LDH – Lactato desidrogenase

*m/z* – razão massa carga

NAD(P)H - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NB – *Nutrient Broth*

Pd/C – Paládio suportado em carvão ativado

PDC – Piruvato descarboxilase

PLP – Piridoxal-5-fosfato

PMP – Piridoxamina-5-fosfato

PMSF – *phenylmethylsulfonyl fluoride* (fluoreto de fenilmetilsulfonila)

ppm – partes por milhão

q.s.p – Quantidade suficiente para

rpm – rotações por minuto

SOC - *Super Optimal Broth*

t.a. – temperatura ambiente

TMS – Tetrametilsilano

$\omega$ -TA -  $\omega$ -transaminases

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Aminas quirais	18
1.2. Enzimas e Biocatálise	19
1.3. Transaminases	22
2. OBJETIVOS	30
3. PARTE EXPERIMENTAL:	31
3.1. Considerações Gerais	31
3.1.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ )	31
3.1.2. Métodos Cromatográficos	31
3.1.3. Espectroscopia no Infravermelho - (IV)	33
3.1.4. Ponto de Fusão	33
3.1.5. Biocatalisadores	33
3.1.6. Plasmídeos e linhagem de <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	34
3.1.7. Meios de cultura e condições de crescimento	34
3.1.8. Tampões	34
3.1.9. Transformação utilizando <i>E. coli</i> quimicamente competente	35
3.1.10. Expressão das $\omega$ -transaminases	35
3.1.11. Lise celular	36
3.1.12. Diálise dos extratos enzimáticos	36
3.1.13. Quantificação das enzimas - Método de Bradford	37
3.2. Procedimento experimental e dados espectroscópicos dos compostos sintetizados	37
3.2.1. Procedimento de hidrogenação catalítica para síntese da 4-fenil-2-butanona 1c	37
3.2.2. Procedimento de reação aldólica para síntese da 4-(2-furanil)-3-buten-2-ona 1d	38
3.2.3. Procedimento de hidrogenação catalítica para síntese da 4-(2-furanil)-2-butanona 1e	39
3.2.4. Procedimento geral da aminação reductiva	40
3.2.5. Procedimento geral para reação de acetilação das aminas	42
3.2.6. Procedimento geral para reação de redução com $\text{NaBH}_4$ para síntese dos padrões racêmicos dos álcoois	42
3.3. Reações enzimáticas	43
3.3.1. Procedimento geral para reação com enzima $\omega$ -transaminase comercial	43

3.3.2.	Procedimento geral para reação com extratos enzimáticos dialisados	43
3.3.3.	Procedimento geral para reação utilizando micro-organismos	43
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO:	45
4.1.	Estratégia de trabalho	45
4.2.	Síntese dos substratos e padrões racêmicos	47
4.2.1.	Síntese da 4-fenil-2-butanona 1c	47
4.2.2.	Síntese da 4-(2-furânil)-3-buten-2-ona 1d	48
4.2.3.	Síntese da 4-(2-furânil)-2-butanona 1e	49
4.2.4.	Aminação redutiva para síntese dos compostos 2b-2e	50
4.3.	Reações enzimáticas	54
4.3.1.	Otimização das condições reacionais	54
4.3.2.	Reação com a enzima $\omega$ -transaminase (S)-seletiva recombinante de <i>E. coli</i> e substrato 1b	57
4.3.3.	Reação com $\omega$ -transaminase comercial (R)-seletiva recombinante de <i>Aspergillus fumigatus</i>	57
4.3.5.	Reações com extratos enzimáticos	61
5.	CONCLUSÕES	67
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
7.	ANEXOS	73

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aminas quirais

As aminas enantiomericamente puras e seus derivados desempenham um importante papel nas indústrias química, agroquímica e farmacêutica, sendo blocos construtores chaves na síntese de fármacos e pesticidas (ANDRADE; KROUTIL; JAMISON, 2014; BORNSCHEUER; DE SOUZA; MIRANDA, 2017; GHISLIERI; TURNER, 2014; LIU; WANG; ZHANG, 2013; MALIK; PARK; SHIN, 2012). É estimado que cerca de 40% dos fármacos possuem em sua estrutura um grupo amino quiral (GHISLIERI; TURNER, 2014). Na Figura 1 encontram-se representados alguns exemplos de fármacos contendo aminas quirais.

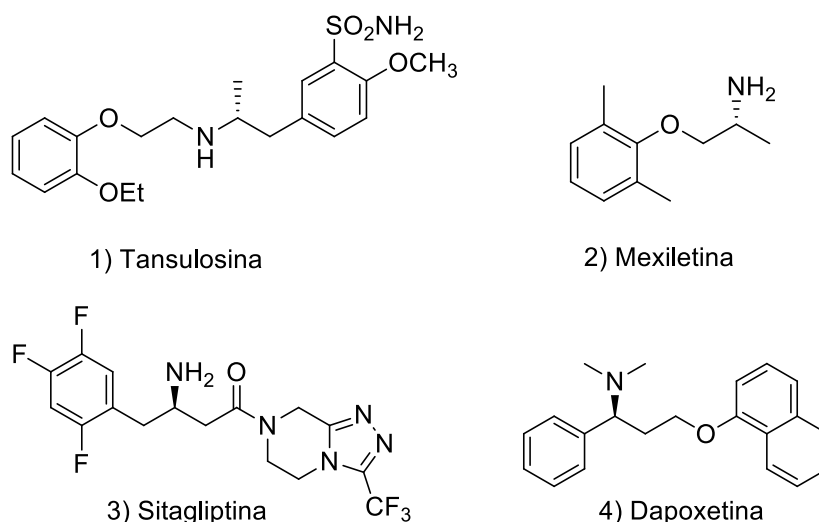


Figura 1 Fármacos contendo aminas quirais

Diversas abordagens são descritas para a obtenção de aminas quirais (Figura 2), como aminação C-H enantiosseletiva, adição nucleofílica à iminas, aminação redutiva assimétrica e redução enantiosseletiva de iminas ou enaminas. (GHISLIERI; TURNER, 2014, NUGENT *et al*, 2013). Além disto, devido a seu baixo custo, a cristalização diastereoisomérica de aminas racêmicas utilizando ácidos carboxílicos é uma estratégia de considerável importância na indústria farmacêutica, apesar do rendimento teórico máximo de 50% (GHISLIERI; TURNER, 2014; HÖHNE; BORNSCHEUER, 2009).

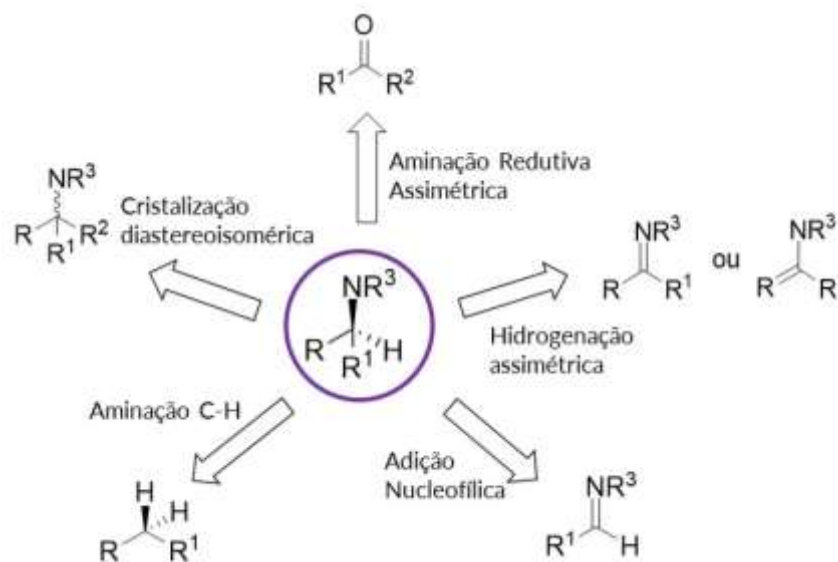


Figura 2 Estratégias para obtenção de aminas quirais

Além da síntese desses intermediários ou produtos quirais pelas vias químicas tradicionais, com o advento da tecnologia do DNA recombinante as vias biocatalíticas passaram a ser alternativas vantajosas.

## 1.2. Enzimas e Biocatálise

As enzimas são os catalisadores biológicos responsáveis para que as mais diversas reações que sustentam o metabolismo dos seres vivos aconteçam em tempo hábil, com condições brandas de temperatura e pH, além de alta especificidade (PORTER; RUSLI; OLLIS, 2016). Devido a essas características, o interesse em aplicá-las em síntese orgânica é crescente.

O uso das enzimas pelo ser humano remonta da antiguidade, onde micro-organismos eram empregados em processos fermentativos. No século XIX Pasteur empregou o fungo *Penicillium glaucum* na resolução cinética de uma solução do sal de ácido tartárico, tornando-se então um marco para a biocatálise (REETZ, 2013). Por volta de um século atrás o estudo das enzimas como catalisadores para a síntese orgânica teve início. Rosenthaler, em 1908, usou um extrato de amêndoas para sintetizar (*R*)-mandelonitrila a partir do benzaldeído (BEHRENS et al., 2011; BORNSCHEUER et al., 2012; REETZ, 2013).

Nos anos 50, pesquisadores nas grandes indústrias farmacêuticas, como Pfizer e Merck, utilizaram fungos para fazer a hidroxilação oxidativa da progesterona (BORNSCHEUER, U. T. et al., 2012; REETZ, 2013). Com o avanço das técnicas de

isolamento e purificação das enzimas, elas então passaram a ser empregadas em um escopo mais amplo de substratos não naturais (REETZ, 2013). Entre outros exemplos posteriores estão o uso da glicose isomerase para converter glicose em frutose e penicilina G acilase na fabricação de antibióticos semissintéticos. Esta fase foi denominada de primeira onda da biocatálise (BORNSCHEUER, U. T. *et al.*, 2012).

Nas décadas de 80 e 90 surgiu a segunda onda da biocatálise com os estudos de engenharia de proteínas, que possibilitaram aumentar o escopo de substratos aceitos pelas enzimas e assim aumentar seu uso na indústria farmacêutica e de química fina (BORNSCHEUER, U. T. *et al.*, 2012). A terceira e atual onda da biocatálise utiliza-se da tecnologia do DNA recombinante, da evolução dirigida, além de apoio de técnicas computacionais, para introduzir mutações nas enzimas, assim aperfeiçoando suas características, como: promiscuidade catalítica, estabilidade, tolerância à co-solventes, além de quimio, régio e enantiosseletividade (BORNSCHEUER; DE SOUZA; MIRANDA, 2017; BORNSCHEUER, U. T. *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009; REETZ, 2013). Com a ampliação de substratos aceitos pelas enzimas, a biocatálise oferece uma alternativa viável na síntese orgânica, frente à outras metodologias mais tradicionais existentes (TURNER; O'REILLY, 2013).

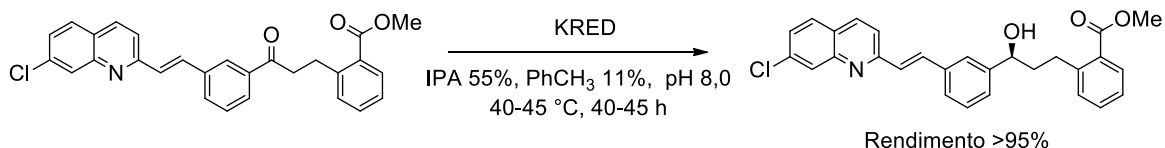
Os catalisadores comumente usados em reações orgânicas, (metálicos, organometálicos e organocatalisadores) muitas vezes exigem condições reacionais extremas (tais como temperaturas e pressões reacionais elevadas, longos tempos reacionais), podem gerar resíduos ambientais, além de serem custosos *per se*, sendo necessário tratamento do resíduo gerado. Outro fato a ser considerado é a alarmante escassez e finitude desses metais. (PORTER; RUSLI; OLLIS, 2016; SHELDON, 2017).

Devido à sua natureza quiral, as enzimas catalisam as reações de forma potencialmente quimio, régio e estereosseletiva, além de atuarem em condições reacionais brandas (pH fisiológico, temperatura e pressão ambientes), com economia de átomos, custos mais baixos e uso de solventes ambientalmente amigáveis. Elas ainda são oriundas de fontes renováveis, são biocompatíveis, biodegradáveis, e não são tóxicas ou perigosas (DE OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009; SHELDON, 2017; TURNER; O'REILLY, 2013).

Como exemplo do uso de biocatalisadores na indústria, é possível citar a síntese do Montelucaste. Montelucaste é um fármaco com ação antiasmática,

comercializado com o nome de Singulair® pela Merck (LIANG *et al.*, 2010; SHELDON; PEREIRA, 2017). Em uma das etapas de sua síntese foi empregada uma enzima cetorredutase (KRED), que converte cetonas e aldeídos nos respectivos álcoois. A reação está representada no Esquema 1.

Esquema 1 Etapa biocatalítica na síntese do Montelukaste



IPA= álcool isopropílico

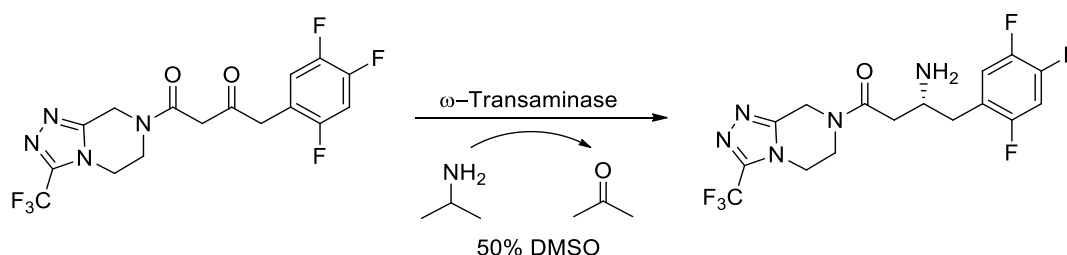
PhCH<sub>3</sub> = tolueno

Primeiramente uma série de KREDs foram avaliadas, porém a baixa solubilidade do substrato em fase aquosa, mesmo quando adicionados cossolventes ao meio reacional, rendeu conversões baixas, com poucos excessos enantioméricos satisfatórios (SHELDON; PEREIRA, 2017). Pesquisadores da empresa Codexis realizaram então evolução dirigida na enzima KRED CDX-026, com foco em melhorar sua atividade e a estabilidade. Após cinco ciclos de mutações a atividade da enzima foi aumentada em 3000 vezes e o produto foi obtido com rendimento >95%, excessos enantioméricos 99,9% e 98,5% de pureza (LIANG *et al.*, 2010).

Outro exemplo de sucesso do emprego de um biocatalisador na indústria farmacêutica é a síntese da sitagliptina (estrutura 3, Figura 1). A sitagliptina é um fármaco usado no tratamento de diabetes tipo 2, comercializada sob o nome de Januvia® e Janumet® também pela Merck (CHOI; HAN; KIM, 2015). Pesquisadores da empresa Codexis, em colaboração com a Merck, trabalharam na modificação genética do sítio catalítico de uma enzima ω-transaminase (ATA-117) de *Arthrobacter* sp. de modo que ela aceitasse substratos maiores em seu sítio catalítico. Após 27 mutações, o sítio catalítico da enzima foi modificado de modo a acomodar a cetona pro-sitagliptina e converte-la em sitagliptina em uma etapa com 92% de rendimento e excesso enantiomérico > 99,95%, Esquema 2 (CHOI; HAN; KIM, 2015; GHISLIERI; TURNER, 2014; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012; SAVILE, 2012; SHELDON; PEREIRA, 2017). Quando comparado com o catalisador quiral a base de ródio utilizado anteriormente para síntese da sitagliptina, foi observado um aumento de 10% no rendimento global, além de aumento na produtividade (kg/L por dia) de

53% (GHISLIERI; TURNER, 2014; SAVILE, 2012). Foi também observada 19% de eliminação de formação total de resíduos (MATHEW; YUN, 2012; SAVILE, 2012).

Esquema 2. Etapa biocatalítica da síntese da sitagliptina



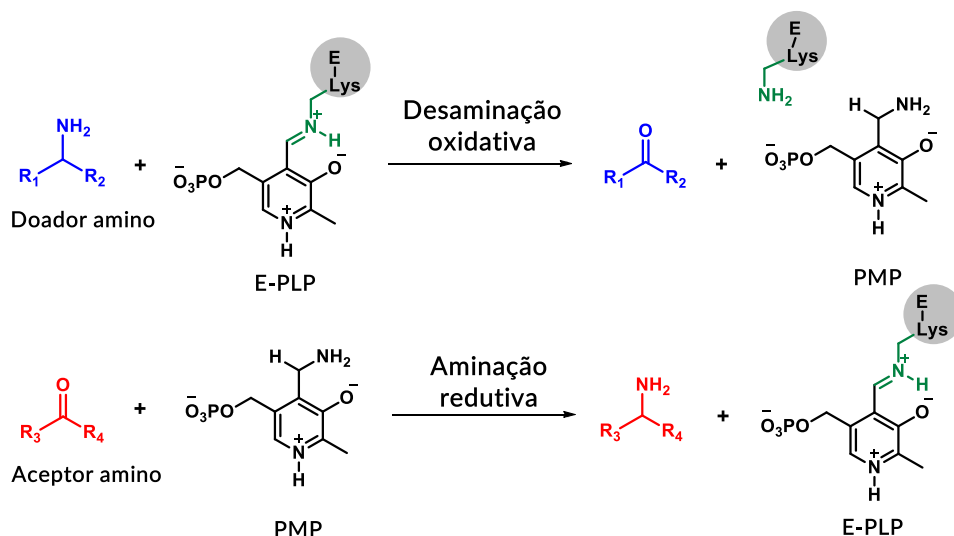
### 1.3. Transaminases

As transaminases (também denominadas aminotransferases), são enzimas cujo papel metabólico primário é catalisar a transferência de um grupo amino de um aminoácido para um  $\alpha$ -cetoácido (MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012; WILLIES *et al.*, 2016). De acordo com a nomenclatura para enzimas definida pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) elas são classificadas como 2.6.1.x, sendo a classe 2 designada para as transferases, na subclasse 6 para reações de transferência de grupos nitrogenados e no grupo 1 das transaminases (RUDAT; BRUCHER; SYLDATK, 2012).

Essas enzimas são ainda divididas em quatro subgrupos, sendo que as enzimas pertencentes aos subgrupos I, III e IV exclusivamente catalisam a transferência de um grupo amino ligado a um carbono  $\alpha$  de um aminoácido, sendo denominadas de  $\alpha$ -transaminases (MALIK; PARK; SHIN, 2012). Já as pertencentes ao subgrupo II possuem uma maior margem de atuação: elas conseguem transferir um grupo amino que não esteja necessariamente em um carbono  $\alpha$ , podendo aminorar não apenas  $\alpha$ -cetoácidos, mas também cetonas e aldeídos, tornando-as muito atrativas na síntese orgânica de aminas oticamente ativas. Estas enzimas são chamadas de  $\omega$ -transaminases (FUCHS; FARNBERGER; KROUTIL, 2015; HÖHNE *et al.*, 2010; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012; RUDAT; BRUCHER; SYLDATK, 2012). Elas são ainda divididas de acordo com a enantiosseletividade, podendo ser (*R*)- ou (*S*)-seletivas, sendo que a maioria das  $\omega$ -transaminases existentes são (*S*)-seletivas (MATHEW; YUN, 2012).

Para a reação de transaminação a enzima requer como cofator o piridoxal-5-fosfato (PLP), que age como um intermediário na transferência do grupo amino (Esquema 3) (FUCHS; FARNBERGER; KROUTIL, 2015; SIMON *et al.*, 2014). A reação pode ser classificada como uma reação redox neutra, composta por duas meias reações: sendo que a primeira etapa é de desaminação oxidativa do doador amino, convertendo o PLP à sua forma reduzida PMP, seguida por uma aminação redutiva do acceptor amino, sendo que o PMP é novamente oxidado à PLP (MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012; RUDAT; BRUCHER; SYLDATK, 2012). Essa reação está representada no Esquema 3. Como o cofator é regenerado, ele é necessário apenas em quantidades catalíticas (SIMON *et al.*, 2014).

Esquema 3 Etapas da reação de transaminação. Fonte: (MATHEW; YUN, 2012)

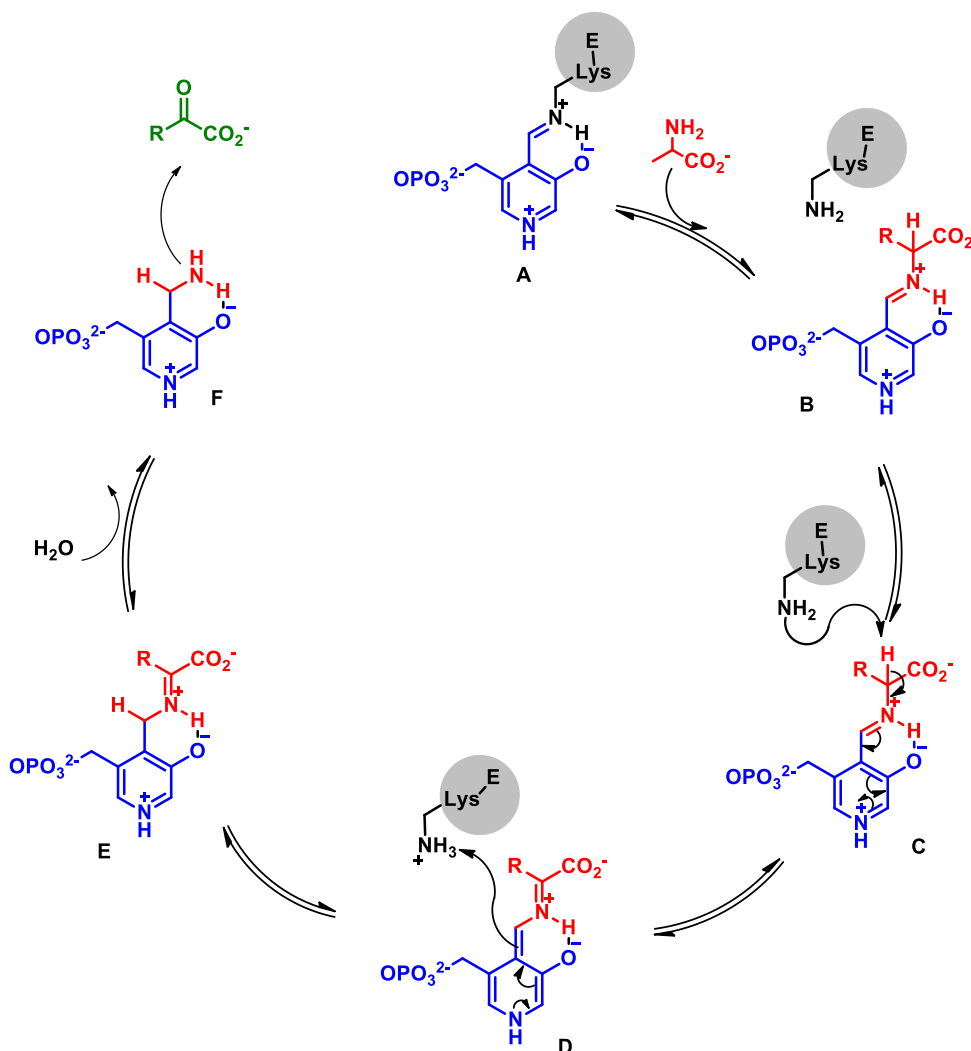


Na ausência do substrato o PLP encontra-se ligado covalentemente à um resíduo de lisina do sítio catalítico, como ilustrado no Esquema 4, formando a aldimina interna (A) (RUDAT; BRUCHER; SYLDATK, 2012). Com a presença do doador amino, o carbono da ligação C=N da base de Schiff sofre um ataque nucleofílico pelo par de elétrons do doador amino, neste caso uma alanina, formando uma imina entre o doador amino e o PLP (B), liberando o resíduo de lisina. Esse ataque é facilitado pelo oxigênio fenólico do PLP e por uma molécula de água do sítio ativo, que estabilizam o intermediário formado através de ligações de hidrogênio (FUCHS; FARNBERGER; KROUTIL, 2015).

O resíduo de lisina então abstrai um próton do carbono quaternário, que ficou mais ácido devido a formação da imina. Assistida pelo par de elétrons do anel

piridínico, os elétrons da ligação dupla abstraem um próton do resíduo de lisina, formando a cetimina E. A imina então é hidrolisada, liberando o doador amino, agora na forma de cetona, e o PLP é convertido na sua forma reduzida PMP (F), que por sua vez está pronta para transferir o grupo amino para uma cetona pelo caminho inverso da reação, já que todas as etapas são reversíveis (FUCHS; FARNBERGER; KROUTIL, 2015).

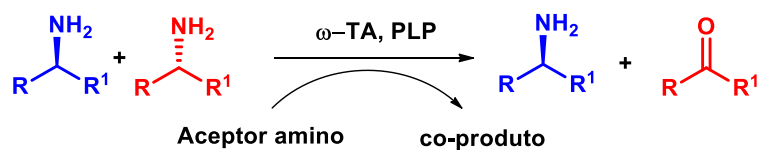
Esquema 4. Proposta mecanística de atuação de  $\omega$ -transaminases. Fonte: (FUCHS; FARNBERGER; KROUTIL, 2015)



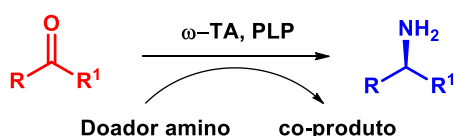
Entre as reações possíveis de serem catalisadas pelas  $\omega$ -transaminases se encontram a resolução cinética de amins racêmicas e a aminação redutiva assimétrica (MATHEW; YUN, 2012). No Esquema 5 estão representadas essas reações.

Esquema 5 Reações catalisadas pela  $\omega$ -transaminase

## A) Resolução cinética de amins racêmicas



## B) Aminoação redutiva assimétrica



O método da resolução cinética parte de quantidades estequiometricamente equivalentes dos reagentes (doador e aceptor amino) e é uma reação termodinamicamente favorável, com o equilíbrio deslocado no sentido da formação do produto carbonilado (KOSZELEWSKI *et al.*, 2010). Essa reação é capaz de converter amins racêmicas em amins opticamente puras com um rendimento teórico máximo de 50%. Entretanto, além do baixo rendimento possível, a grande desvantagem desse método é a inibição pela formação do produto carbonilado (HÖHNE *et al.*, 2010; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012). Para contornar essa desvantagem é essencial a remoção do produto do meio reacional, sendo que para esse fim algumas estratégias foram desenvolvidas (MATHEW; YUN, 2012).

Uma das estratégias é a extração do produto do meio reacional com solventes orgânicos, conduzindo assim a reação em sistemas bifásicos (GUO; BERGLUND, 2016; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012). Essa metodologia se mostrou bastante viável devido a sua simplicidade e altas conversões obtidas pelos pesquisadores (SHIN, J. S.; KIM, 1997). Com o objetivo de evitar o contato da enzima com o solvente orgânico foram posteriormente desenvolvidos reatores de enzima-membrana (GUO; BERGLUND, 2016; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MATHEW; YUN, 2012; SHIN, J.-S.; KIM; SHIN, 2001). Outra metodologia empregada é realizar a reação sob pressão reduzida quando são usadas amins de baixa massa molecular, devido à volatilidade das cetonas formadas e sua fácil remoção do meio (KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MATHEW; YUN, 2012; YUN; CHO; KIM, 2004). Também como forma de remoção do coproduto foi reportado o acoplamento de

enzimas cetorredutases visando a redução da cetona formada no correspondente álcool (BEA *et al.*, 2011; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MATHEW; YUN, 2012).

Por sua vez, a reação de síntese assimétrica é uma das mais importantes estratégias para obtenção de aminas quirais e vem sendo continuamente reportada devido à sua intrínseca vantagem de rendimento teórico de 100%, frente ao limitado 50% da resolução cinética (HÖHNE *et al.*, 2010; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012). Nessa reação uma carbonila proquiral de cetona é convertida em uma amina com centro assimétrico definido. A principal desvantagem dessa metodologia, entretanto, é o equilíbrio termodinamicamente desfavorecido da reação, sendo que alternativas para contorna-lo vêm sendo bastante estudadas (MALIK; PARK; SHIN, 2012).

Para a síntese assimétrica ideal, os doadores e aceptores aminos devem ser mais reativos do que seus respectivos coprodutos, auxiliando assim no equilíbrio da reação (MATHEW; YUN, 2012). Além disso, a maneira mais fácil de se deslocar o equilíbrio na direção da formação dos produtos é usar um excesso do doador amino. Outra alternativa, ainda, é a remoção do coproduto formado do meio reacional (GUO; BERGLUND, 2016; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012).

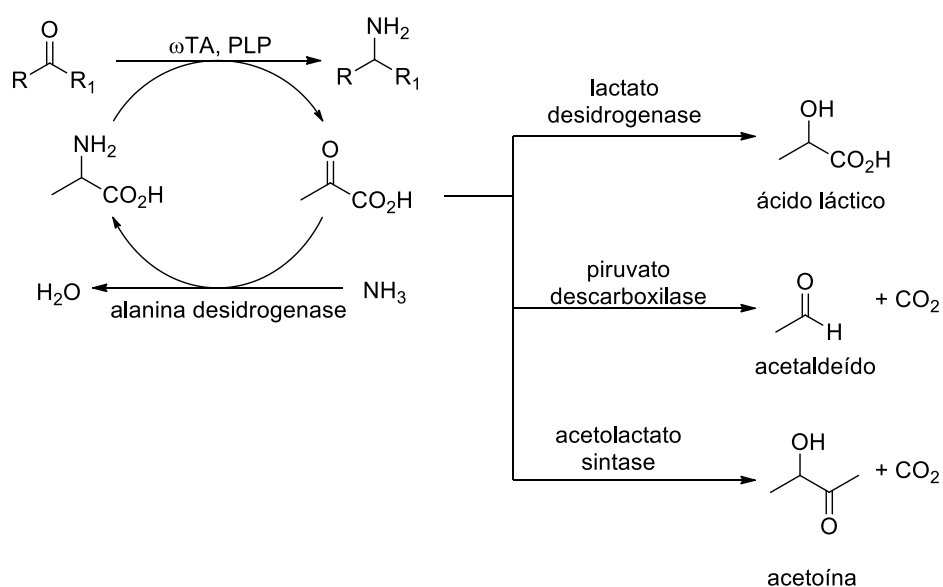
Aliado a isso, o uso de isopropilamina como doador amino têm se mostrado muito atrativo, devido a seu baixo custo, fácil obtenção e a alta volatilidade do coproduto formado (acetona), que é facilmente removido do meio reacional em pressões reduzidas (GUO; BERGLUND, 2016; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012). Essa metodologia mostrou-se muito eficiente na síntese da sitagliptina (Esquema 2), onde a isopropilamina foi usada como doador amino e a acetona foi removida do reator com um fluxo de nitrogênio (MALIK; PARK; SHIN, 2012; SAVILE, 2012).

Outro doador amino que vem sendo comumente reportado nas reações de síntese assimétrica empregando transaminases é a alanina. Entretanto, quando ela é utilizada é necessária a remoção do piruvato (coproduto) do meio reacional, a fim de compensar o equilíbrio da reação, que é favorável para a formação da alanina (GUO; BERGLUND, 2016; KOSZELEWSKI *et al.*, 2010; MALIK; PARK; SHIN, 2012; MATHEW; YUN, 2012).

A degradação do piruvato pode ser realizada por meio de três enzimas (Esquema 6): lactato desidrogenase (LDH), piruvato descarboxilase (PDC) e

acetolactato sintase (ALS) que convertem o piruvato formado em lactato, acetaldeído e acetoína, respectivamente (GUO; BERGLUND, 2016; MATHEW; YUN, 2012; SIMON *et al.*, 2014). O uso da LDH é dependente do cofator NAD(P)H, portanto é necessária a regeneração do mesmo, sendo empregadas para isso, com bastante eficiência, as enzimas formato desidrogenase (FDH) ou glicose desidrogenase (GDH) (GUO; BERGLUND, 2016; MATHEW; YUN, 2012). Também é possível a conversão do piruvato de volta à alanina, com uso de alanina desidrogenases (AlaDH) (GUO; BERGLUND, 2016; MATHEW; YUN, 2012; SIMON *et al.*, 2014).

Esquema 6 Métodos enzimáticos para remoção do piruvato



Em relação à sua estrutura proteica tridimensional, as  $\omega$ -transaminases existem como um homodímero, com duas subunidades idênticas. Cada subunidade é composta por um domínio maior e um menor. Os dois sítios ativos se encontram na interface entre os dois domínios, como ilustrado na Figura 3. (ŁYSKOWSKI *et al.*, 2014; THOMSEN *et al.*, 2014).

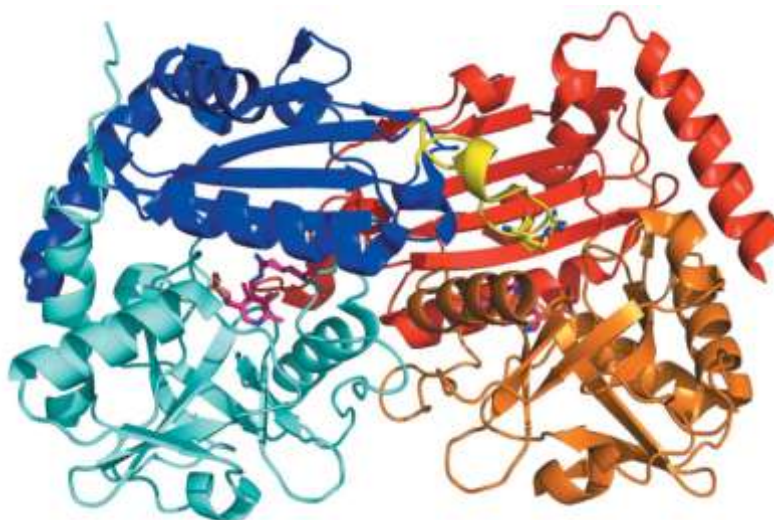


Figura 3 Estrutura tridimensional da transaminase (*R*)-seletiva de *A. fumigatus* (THOMSEN *et al.*, 2014)

Cada monômero está dividido por cores. Os domínios menores estão representados em azul escuro e vermelho, e o maiores em azul claro e laranja. O cofator PLP está ligado à Lys179 na interface dos domínios (mostrado em rosa).

O sítio catalítico de uma transaminase é constituído de dois bolsões, um maior e outro menor, como representado na Figura 4. A forma do sítio catalítico explica a especificidade e estereosseletividade que essas enzimas possuem em relação ao substrato. Quando o substrato se encontra no sítio catalítico, ocorre reconhecimento duplo dos grupos hidrofóbicos e carboxilato no bolsão maior, sendo que o grupo carboxilato sofre forte repulsão no bolsão menor. Bons substratos para a enzima são aqueles que possuem duas regiões de tamanhos distintos ao redor da carbonila, de modo que possam interagir efetivamente no sítio catalítico, sendo que o substituinte menor, vital no reconhecimento do substrato, não deve ser maior do que um grupo etila (MALIK; PARK; SHIN, 2012).

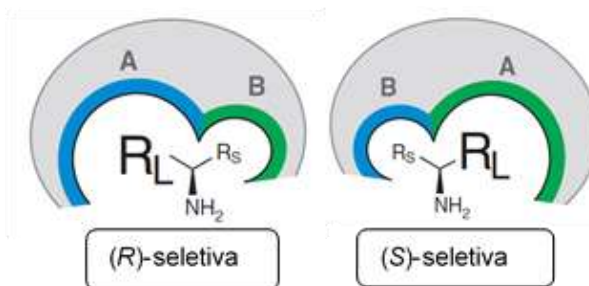


Figura 4 Representação do sítio catalítico das  $\omega$ -transaminases (HÖHNE *et al.*, 2010)

Os substratos selecionados para estudo, além de respeitarem a estrutura da enzima, considerando o tamanho dos substituintes ao redor da carbonila, são importantes blocos de construção na síntese de fármacos. Estas moléculas estão representadas na Figura 5.

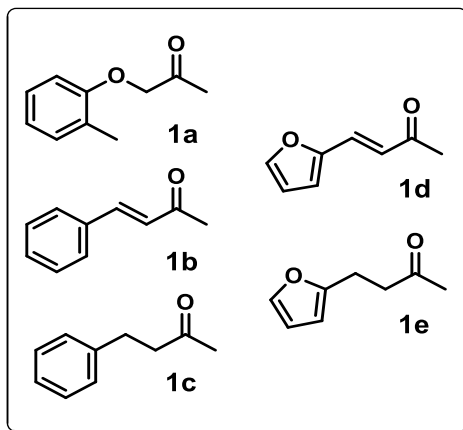


Figura 5. Moléculas alvo desse estudo

## 5. CONCLUSÕES

Na primeira etapa do trabalho foram sintetizados os substratos para as reações enzimáticas além dos padrões racêmicos das suas respectivas aminas. Todos os compostos foram caracterizados a partir de espectrometria de massas, espectroscopia no infravermelho, e ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Foram também desenvolvidos os métodos de separação em colunas quirais (de GC e HPLC) das aminas estudadas.

A reação de síntese assimétrica enzimática das aminas foi otimizada, e em seguida foram empregados como biocatalisadores duas enzimas de origem comercial, dois micro-organismos selvagens, além de cinco extratos enzimáticos contendo  $\omega$ -transaminases recombinantes expressas em *E. coli*. No escopo dos substratos utilizados foi avaliado a influência que a estrutura do composto tem na reação catalisada pela enzima, variando a presença de estruturas planares, heterocíclicas e presença de heteroátomos.

Os dois micro-organismos selvagens avaliados não foram capazes de realizar a reação de síntese assimétrica de aminas. Entretanto, observou-se a ação de enzimas ene-redutases no micro-organismo MLH 51, capaz de reduzir a dupla do substrato **1b** 4-fenil-3-buten-2-ona, com conversão de 9%. Foram também observadas enzimas cetorredutases, em ambos os micro-organismos, cuja conversão, apesar de modesta, possuiu bons excessos enantioméricos (78-98%). Ressalta-se que os compostos obtidos possuem interesse comercial, sendo blocos construtores nas indústrias química e farmacêutica.

Por fim, os extratos enzimáticos apresentaram potencial para a aminação redutiva de substratos contendo anéis heterocíclicos e estruturas planares, cuja conversão, apesar de modesta, mostrou-se ligada à baixa concentração de enzima presente nos extratos enzimáticos produzidos, de acordo com a dosagem realizada pelo Ensaio de Bradford. Embora os valores de conversão observados não sejam ainda satisfatórios, os excessos enantioméricos obtidos quando usadas essas enzimas foram de bons a excelentes (84 a >99%), sendo um bom ponto de partida para otimização das condições reacionais e futuro emprego desses biocatalisadores.

Além disso, com os substratos estudados também foi possível avaliar a classe de compostos adequados para as  $\omega$ -transaminases, sendo que a presença de um

grupo éter no composto **1a** mostrou-se relacionada a melhores valores de conversão quando usada essa enzima.

No decorrer desse trabalho foi possível estudar a reação de aminação redutiva assimétrica empregando enzimas  $\omega$ -transaminases de origem microbiana como biocatalisadores. A importância de estudos nessa área já é bastante conhecida, e o trabalho realizado demonstra como a biocatálise pode contribuir para fornecer alternativas eficientes e potencialmente quimio- e estereosseletivas para a transformação de compostos orgânicos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, L. H.; KROUTIL, W.; JAMISON, T. F. Continuous flow synthesis of chiral amines in organic solvents. **Organic letters**, v. 16, p. 6092–6095, 2014.
- BEA, H.-S.; PARK, H.-J.; LEE, S.-H.; YUN, H. Kinetic resolution of aromatic  $\beta$ -amino acids by  $\omega$ -transaminase. **Chemical Communications**, v. 47, n. 20, p. 5894–5896, 2011.
- BEHRENS, G. A. et al. Discovery and protein engineering of biocatalysts for organic synthesis. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2191–2215, 2011.
- DE SOUZA, R. O. M. A.; MIRANDA, L. S. M.; BORNSCHEUER, U. A retrosynthesis approach for biocatalysis in organic synthesis. **Chemistry - A European Journal**, v.23, p. 12040–12063, 2017.
- BORNSCHEUER, U. T. et al. Engineering the third wave of biocatalysis. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 185–194, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CHEN, S.-J.; LU, G.-P.; CAI, C. A base-controlled chemoselective transfer hydrogenation of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones catalyzed by  $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$  with 2-propanol. **RSC Advances**, v. 5, 13208–13211, 2015.
- 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.
- DA CRUZ, R. S. **Síntese enantiosseletiva de  $\beta$  -aminoésteres quirais através de sistemas enzimáticos envolvendo transaminases**. 2016. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.
- DE OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742–756, 2009.
- FERREIRA, D. S. P. et al. Tuning lipase-catalysed kinetic resolution of 2-substituted thiophenes and furans: a scalable chemoenzymatic route to masked  $\gamma$ -bis-oxo-alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 126, p 37–45, 2016
- FESKO, K. et al. Investigation of one-enzyme systems in the  $\omega$ -transaminase-catalyzed synthesis of chiral amines. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 96, p. 103–110, 2013.
- FUCHS, M.; FARNBERGER, J. E.; KROUTIL, W. The industrial age of biocatalytic transamination. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 32, p. 6965–6982, 2015.
- GHISLIERI, D.; TURNER, N. J. Biocatalytic approaches to the synthesis of enantiomerically pure chiral amines. **Topics in Catalysis**, v. 57, n. 5, p. 284–300, 2014.

GRUBER, C. C. et al. From a racemate to a single enantiomer: deracemization by stereoinversion. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 348, n. 14, p. 1789–1805, 2006.

GUO, F.; BERGLUND, P. Transaminase biocatalysis: optimization and application. **Green Chemistry**, v. 19, p. 333–360, 2016.

HÖHNE, M. et al. Rational assignment of key motifs for function guides in silico enzyme identification. **Nature Chemical Biology**, v.6, n. 11, p. 807–813, 2010.

HÖHNE, M.; BORNSCHEUER, U. T. Biocatalytic routes to optically active amines. **ChemCatChem**, v.1, n. 1, p. 42–51, 2009.

KALAITZAKIS, D.; et al. Photooxygenation of furylalkylamines: easy access to pyrrolizidine and indolizidine scaffolds. **Angewandte Chemie**, v. 55, p. 4605–4609, 2016.

KATRITZKY, A.R., et al. Handbook of heterocyclic chemistry. 3 edição, Amsterdam: Elsevier, 2010.

KOSZELEWSKI, D. et al.  $\omega$ -Transaminases for the synthesis of non-racemic  $\alpha$ -chiral primary amines. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 324–332, 2010.

LIANG, J. et al. Development of a biocatalytic process as an alternative to the (-) -DIP-Cl-mediated asymmetric reduction of a key intermediate of montelukast. **Organic Process Research & Development**, v. 14, p.193–198, 2010.

LIU, T.-L.; WANG, C.-J.; ZHANG, X. Synthesis of chiral aliphatic amines through asymmetric hydrogenation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 32, p. 8416–8419, 2013.

ŁYSKOWSKI, A. et al. Crystal structure of an (*R*)-selective  $\omega$ -transaminase from *Aspergillus terreus*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87350, 2014.

MALIK, M. S.; PARK, E. S.; SHIN, J. S. Features and technical applications of  $\omega$ -transaminases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 5, p. 1163–1171, 2012.

MATHEW, S.; YUN, H.  $\omega$ -Transaminases for the production of optically pure amines and unnatural amino acids. **ACS Catalysis**, v. 2, n. 6, p. 993–1001, 2012.

MIRIYALA, B.; BHATTACHARYYA, S.; WILLIAMSON, J. S. Chemoselective reductive alkylation of ammonia with carbonyl compounds: synthesis of primary and symmetrical secondary amines. **Tetrahedron**, v. 60, n. 7, p. 1463–1471, 2004.

MUTTI, F. G. et al. Stereoselectivity of four (*R*)-selective transaminases for the asymmetric amination of ketones. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 17, p. 3227–3233, 2011.

NUGENT, T.C. Chiral Amine Synthesis: Methods, Developments and Applications. 1 edição, Brehan: Wiley-VCH, 2010.

PAVIA, D. L., et al. Introdução à Espectroscopia. 5 edição, São Paulo: Cengage Learning, 2015.

- PLANCHESTAINER, M. et al. Continuous flow biocatalysis: production and in-line purification of amines by immobilised transaminase from *Halomonas elongata*. **Green Chemistry**, v. 53, p. 3007–3048, 2017.
- PORTER, J. L.; RUSLI, R. A.; OLLIS, D. L. Directed evolution of enzymes for industrial biocatalysis. **ChemBioChem**, v. 2601, p. 197–203, 2016.
- REETZ, M. T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, p.12480–12496, 2013.
- ROBERTSON, J.; NORTH, C.; SADIG, J. E. R. Asymmetric synthesis of the C(6-18) bis(tetrahydropyran)spiroacetal fragment of the litarines. **Tetrahedron**, v. 67, n. 27–28, p. 5011–5023, 2011.
- RUDAT, J.; BRUCHER, B. R.; SYLDATK, C. Transaminases for the synthesis of enantiopure beta-amino acids. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 11, 2012.
- SAVILE, C. K. et al. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. **Science**, v. 239, p. 305-309, 2012.
- SHABBIR, S. et al. Pd nanoparticles on reverse phase silica gel as recyclable catalyst for Suzuki-Miyaura cross coupling reaction and hydrogenation in water. **Journal of Organometallic Chemistry**, v.846, p. 296-304, 2017.
- SCHMIDT, N. G.; SIMON, R. C.; KROUTIL, W. Biocatalytic asymmetric synthesis of optically pure aromatic propargylic amines employing  $\omega$ -transaminases. **Advanced Synthesis and Catalysis**, p. 1815–1821, 2015.
- SHELDON, R. A. The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. **Green Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 903–906, 2017.
- SHELDON, R. A.; PEREIRA, P. C. Biocatalysis engineering: the big picture. **Chemical Society Reviews**, v. 46, p. 2678-2691, 2017.
- SHIN, J.-S.; KIM, B.-G.; SHIN, D.-H. Kinetic resolution of chiral amines using packed-bed reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 4, p. 232–239, 2001.
- SHIN, J. S.; KIM, B. G. Kinetic resolution of  $\alpha$ -methylbenzylamine with  $\omega$ -transaminase screened from soil microorganisms: application of a biphasic system to overcome product inhibition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, n. 2, p. 348–358, 1997.
- SIMON, R. C. et al. Recent developments of cascade reactions involving  $\omega$ -transaminases. **ACS Catalysis**, v. 4, n. 1, p. 129–143, 2014.
- SLABU, I. et al. *n*-Butylamine as an alternative amine donor for the stereoselective biocatalytic transamination of ketones. **Catalysis Today**, p. 3–8, 2017.
- THOMSEN, M. et al. Crystallographic characterization of the (*R*)-selective amine transaminase from *Aspergillus fumigatus*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 70, n. 4, p. 1086–1093, 2014.
- TURNER, N. J.; O'REILLY, E. Biocatalytic retrosynthesis. **Nature Chemical Biology**, v. 9, n. 5, p. 285–288, 2013.

WEI, Z. Z. et al. Highly efficient and chemoselective hydrogenation of alpha,beta-unsaturated carbonyls over Pd/N-doped hierarchically porous carbon. **Catalysis Science & Technology**, v. 5, n. 1, p. 397–404, 2015.

WILLIES, S. C. et al. A stereospecific solid-phase screening assay for colonies expressing both (*R*)- and (*S*)-selective  $\omega$ -aminotransferases. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2061, p. 20150084, 2016.

YUN, H.; CHO, B. K.; KIM, B. G. Kinetic resolution of (*R,S*)-sec-butylamine using omega-transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 under reduced pressure. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, n. 6, p. 772–778, 2004.