

IRIS DOS SANTOS TEIXEIRA

Metodologias enzimáticas envolvendo nitrilas hidratases e
transaminases para aplicações em síntese orgânica

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

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre
Coorientadora: Prof. Dra. Fernanda Zanolli de Freitas

Araraquara
2022

T266m Teixeira, Iris dos Santos
Metodologias enzimáticas envolvendo nitrilas hidratases e transaminases para aplicações em síntese orgânica / Iris dos Santos Teixeira. -- Araraquara, 2022
139 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Cíntia Duarte de Freitas Milagre
Coorientadora: Fernanda Zanolli de Freitas

1. Química verde. 2. Biocatálise. 3. Enzimas microbianas. 4. Biologia molecular. 5. Expressão gênica. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: " Metodologias enzimáticas envolvendo nitrilas hidratases e transaminases para aplicações em síntese orgânica".

AUTORA: IRIS DOS SANTOS TEIXEIRA

ORIENTADORA: CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

COORIENTADORA: FERNANDA ZANOLLI FREITAS

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

Profa. Dra. CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. RODRIGO OCTAVIO MENDONÇA ALVES DE SOUZA (Participação Virtual)
Departamento Química Orgânica / Instituto de Química - UFRJ - Rio de Janeiro

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

Profa. Dra. SUZAN PANTAROTO DE VASCONCELLOS (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas (ICAQF) / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Diadema

Prof. Dr. ÁLVARO TAKEO OMORI (Participação Virtual)
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC - UFABC

Araraquara, 10 de outubro de 2022



Documento assinado digitalmente

CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

Data: 14/10/2022 16:32:13-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Iris dos Santos Teixeira

Nome em citações bibliográficas: Teixeira, I.S.

Formação Acadêmica

-Curso de pós graduação modalidade Doutorado em química, área de concentração química, Título: “Design e expressão de nitrilas hidratases para aplicações em síntese orgânica” sob a orientação da Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre, no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, no período de 2018 a 2022 com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

- Curso de pós-graduação modalidade Mestrado em química, área de concentração: Química, Título: “Síntese enzimática de aminas 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 Comunicação e Escrita Científica ministrado pelo Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior nos dias 07, 14 e 21 de outubro de 2020, por transmissão online, totalizando a carga horária de 4h30.

- Minicurso “Process chemistry in the pharmaceutical industry”, oferecido pelo Centro de Excelência para Pesquisa em Química Sustentável – CERSusChem, UFSCar, São Carlos, de 2 a 3 de outubro de 2019, com carga horária de 8 horas.

- Workshop “Redação de Patentes, Além dos Guias + Oficinas Práticas”, em 21 e 22 de janeiro de 2019, com carga horária de 12 horas.

- Oficina de formação pedagógica PAADES, Bauru, com carga horária de 22 horas, de 10 a 12 de dezembro de 2018.

- 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 doutorado no período de 2018 a 2022, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).
- Programa de aperfeiçoamento e apoio à docência no ensino superior – PAADES, ministrando a disciplina Química Orgânica II, no primeiro semestre de 2019, para a turma de Farmácia-Bioquímica noturno, com um total de 60 horas.
- Estágio científico no laboratório de Informática de Biosistemas e Genômica da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-MG), em Belo Horizonte, sob supervisão do Dr. Jerônimo Conceição Ruiz, de 4 a 22 de fevereiro de 2019.
- Estágio de docência durante o segundo semestre de 2018 na disciplina Biocatálise Fundamentos e Aspectos de Química Verde, optativa dos cursos de graduação em química (BQ/BQT/LIC) e engenharia química, sob supervisão da Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre.
- 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 Mafrá 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).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

- **TEIXEIRA, I. S.**; FARIAS, A. B.; HORTA, B. A. C.; Milagre, HMS; SOUZA, R. O. M. A.; BORNSCHEUER, U. T.; Milagre, CDF. Computer Modeling Explains the Structural Reasons for the Difference in Reactivity of Amine Transaminases Regarding Prochiral Methylketones. **International Journal of Molecular Sciences**, v.23, p.777, 2022.
- **TEIXEIRA, I. S.**; MILAGRE, C. D. F. Evolução dirigida de enzimas: pequenas modificações, melhores biocatalisadores. **Química Nova**, v. 43, n. 6, p. 773–786, 2020.

Artigos submetidos

- MORAES, M. I.; IGLESIAS, C.; **TEIXEIRA, I. S.**; GIORDANO, S. R. MILAGRE, C. D. F. "Biotransformations of nitriles mediated by in vivo nitrile hydratase heterologously expressed in *E. coli*" (Submitted)

Capítulos de livros

- TEIXEIRA, I. S., Souza, T. R., Milagre, H. M. S. and Milagre, C. D. F. "7 The role of biocatalysis in green and sustainable chemistry". Green Chemistry: and UN Sustainability Development Goals, edited by Mark Anthony Benvenuto and Steven Kosmas, Berlin, Boston: De Gruyter, 2022, pp. 159-174. <https://doi.org/10.1515/9783110723960-007>
- TEIXEIRA, I. S.; Milagre, C. D. F. Biocatálise na valorização da biomassa. In: Corrêa, A. G.; Gallo, J. M. R. (org). Biomassa: Estrutura, Propriedades e Aplicações. São Carlos: Edufscar, 368 p. 2020. ISBN – 978-65-80216-28-4.

Divulgação Científica

- Vídeo para difusão científica em rede social: Uso de catalisadores biológicos em reações químicas: do pão ao prêmio Nobel. Elaborado para o canal CERSusChem-Difusão no youtube. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=fQWtQfrHT2c&t=3s>

Apresentação de trabalho em Congressos

- TEIXEIRA, I. S.; Farias, A. B.; Carvalho, A. C. L. M.; Milagre, H. M. S.; Mattos, M. C.; Horta, B. A. C.; Souza, R. O. M. A.; Bornscheuer, U. T.; Milagre, C. D. F.; "Bioamination of prochiral methylketones employing amine transaminases" no Biotrans 2021, participação online, de 19 a 22 de julho de 2021.

Apresentação de trabalho em modalidade oral: TEIXEIRA, I. S.; MORAES, M. I.; MILAGRE, C. D. F.; "Avaliação do efeito do cossolvente na reação de hidratação biocatalítica de nitrilas" no I Simpósio do ACS UFRJ Student Chapter, participação online, de 15 a 18 de março de 2021.

- **TEIXEIRA, I. S.**; Milagre, H. M. S.; Milagre, C. D. F. "Bioamination of prochiral ketones using omega-transaminases" no 17th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, Salvador, de 21 a 24 de outubro de 2018.

- **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

- Participação como avaliadora no XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, online, 2021.
- Biotrans, 2021
- I Simpósio ACS Student Chapter – UFRJ, 2021.
- Participação no evento “Virtual Meetings on Organic Synthesis and Catalysis”, online, 2020,
- 24th Annual Green Chemistry & Engineering Conference, *online version*, 2020.
- Participação como avaliadora no XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, online, 2020.
- Participação como avaliadora no XXXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp, Araraquara, 2019.
- 17th Brazilian Meeting on Organic Synthesis (BMOS), Salvador, 2018.
- Oficina de formação pedagógica PAADES, Bauru, 2018
- Participação como avaliadora no XXX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, Araraquara, 2018
- 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.

Organização de eventos

- Participação como colaboradora do minicurso “Biocatálise: fundamentos e imobilização de biocatalisadores” durante a 1ª Escola de Verão em Química realizada no Instituto de Química de Araraquara - UNESP, no período de 26 de fevereiro a 02 de março de 2018.
- Organização de evento de extensão: Festival Internacional de Divulgação Científica Pint of Science Brasil, realizado em Araraquara entre os dias 14, 15 e 16 de maio de 2018, com carga horária de 15 horas.

Coorientação

- Supervisão científica da aluna de iniciação científica Anna Carolina Toledo Borges, no período de 01/09/2018 a 01/03/2019.

*Para Matheus,
Cujo amor e suporte foram fundamentais*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre, pela convivência e amizade durante esses seis anos. Pela confiança que depositou em mim, por todo o aprendizado, conselhos, e por ter me ajudado a crescer, tanto como pesquisadora e como pessoa.

A minha coorientadora Profa. Dra. Fernanda Zanolli de Freitas, pelas contribuições com esse trabalho, por toda a ajuda e ensinamentos com biologia molecular.

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

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

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

Ao Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre, pelas contribuições com esse trabalho e pela amizade ao longo desses anos.

Ao Dr. Jerônimo Conceição Ruiz e a Dra. Daniela Rezende, pelas contribuições com esse trabalho. Aos demais membros do laboratório de Informática de Biosistemas e Gênômica do Instituto René Rachou, Fiocruz Minas, em especial a Grace e Leilane por toda ajuda prestada.

Ao Dr. Rodrigo Duarte Gonçalves pelas contribuições com esse trabalho.

À Profa. Dra. Maria Célia Bertolini pela concessão de uso de equipamentos do laboratório, e ao Dr. Jonatas Campanella pelo auxílio prestado.

Aos amigos e colegas do grupo de pesquisa, cuja convivência diária tornaram o trabalho muito mais agradável. Laíza, Laerte, Letícia, Shirley e a todos que não mencionei aqui: obrigada pelos momentos descontraídos, pela ajuda, pela convivência.

A todos os amigos que ganhei durante a pós graduação, que deixaram um pouquinho de si em mim, e que espero que eu tenha de alguma forma contribuído com eles também.

À minha rede de apoio maravilhosa, meus pais Rosalina e Aparecido, minha irmã Iara, e meu companheiro Matheus: Obrigada por sempre torcerem por mim. Obrigada também por sempre me levantarem, não importa quantas vezes eu caia.

A todos que inevitavelmente esqueci de mencionar aqui, mas que me auxiliaram pra que eu chegasse onde cheguei, meu muito obrigada.

"Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas."
Marie Curie

RESUMO

A biocatálise consiste no uso de enzimas e outros catalisadores biológicos na transformação de substâncias orgânicas não naturais. Ela é uma ferramenta importante na síntese orgânica, já que as enzimas são seletivas, atuam em condições reacionais brandas e em solventes ambientalmente amigáveis.

Entre os biocatalisadores disponíveis, as transaminases (ATAs) são enzimas dependentes de piridoxal-5-fosfato (PLP) que catalisam a transferência de grupos amino para aldeídos e/ou cetonas. Nesse trabalho foram estudadas as reações de aminação redutiva de cetonas proquirais, com foco em avaliar a presença de heterociclos e de um sistema insaturado nos compostos. Foram empregadas um conjunto de cinco enzimas selvagens recombinantes e uma enzima comercial. Quando se avaliou a presença do heterociclo na furilmetilcetona, foi observado que a conversão diminuiu drasticamente quando comparado a cetona acetofenona, indicando que a presença do heteroátomo no anel de cinco membros influenciou negativamente essa reação. Em relação a cetona α - β -insaturada 4-fenilbut-3-en-2-ona, também foi demonstrado que a conversão caiu drasticamente em relação a seu análogo saturado 1-fenil-3-butanona (78 - >99%), e esse sistema foi posteriormente estudado com maior profundidade com o auxílio de técnicas de ancoragem molecular. As nitrilas hidratases (NHases) são enzimas amplamente empregadas industrialmente, que realizam a reação de hidratação enzimática de nitrilas a suas correspondentes amidas. Nesse trabalho primeiramente foi investigada a presença de uma NHase na bactéria *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI 2094, previamente identificada como um dos microrganismos responsáveis pela biodegradação do herbicida benzonitrilado Totril® através de triagens enzimáticas. Para identificação do gene responsável pela NHase foram usadas duas abordagens: uma abordagem *in silico* através de técnicas de bioinformática, e também através de reações em cadeia da polimerase (PCR) investigativas. Por meio das duas estratégias não foi possível identificar o gene correspondente a enzima de interesse. Posteriormente a reação de hidratação enzimática com a NHase de *Rhodococcus erythropolis* foi otimizada com o uso de maior porcentagem de DMSO como cossolvente no meio reacional, melhorando os resultados de conversão para as nitrilas testadas. Por fim a NHase de *R. erythropolis* foi usada como molde para a obtenção de variantes enzimáticas através de mutagênese sítio dirigida. Com auxílio de ancoragem molecular para determinação da localização das mutações pontuais, foram obtidas três variantes enzimáticas: W118A, W118D e W118H e elas foram empregadas em reações com um conjunto de nitrilas,

Palavras chave: biocatálise, transaminases, nitrilas hidratases, mutagênese

ABSTRACT

Biocatalysis consists of the use of enzymes and other biological catalysts in the transformation of unnatural organic substances. It is an important tool in organic synthesis, since enzymes are selective, act under mild reaction conditions and in environmentally friendly solvents.

Among the available biocatalysts, amine transaminases (ATAs) are pyridoxal-5-phosphate (PLP)-dependent enzymes that catalyze the transfer of amino groups to aldehydes and/or ketones. In this work, the reductive amination reactions of prochiral ketones were studied, focusing on evaluating the presence of heterocycles and an unsaturated system in the compounds. A set of five recombinant wild-type enzymes and a commercial enzyme were used. When the presence of the heterocycle in the furylmethylketone was evaluated, it was observed that the conversion decreased dramatically when compared to the ketone acetophenone, indicating that the presence of the heteroatom in the five-membered ring negatively influenced this reaction. Regarding the α - β -unsaturated ketone 4-phenylbut-3-en-2-one, it was also shown that the conversion dropped dramatically compared to its saturated analogue 1-phenyl-3-butanone (78 - >99%), and this system was later studied in greater depth with the aid of molecular anchoring techniques.

Nitriles hydratases (NHases) are enzymes widely used industrially, which carry out the enzymatic hydration reaction of nitriles to their corresponding amides. In this work, we first investigated the presence of a NHase in the bacterium *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI 2094, previously identified as one of the microorganisms responsible for the biodegradation of the benzonitrified herbicide Totril® through enzymatic screening. Two approaches were used to identify the gene responsible for NHase: an *in-silico* approach through bioinformatics, and also through investigative polymerase chain reactions (PCR). Using the two strategies it was not possible to identify the gene corresponding to the enzyme of interest. Subsequently, the enzymatic hydration reaction with NHase from *Rhodococcus erythropolis* was optimized using a higher percentage of DMSO as a co-solvent in the reaction medium, improving the conversion results for the tested nitriles. Finally, *R. erythropolis* NHase was used as a template to obtain enzymatic variants through site-directed mutagenesis. Molecular docking was used to determine the location of point mutations, and three enzymatic variants were obtained: W118A, W118D and W118H which were used in reactions with a set of nitriles..

Keywords: biocatalysis, amine transaminases, nitrile hydratases, mutagenesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 12 princípios da química verde	23
Figura 2. Ondas da biocatálise.	27
Figura 3. Reações não-naturais de enzimas desenvolvidas pelo grupo da professora Frances Arnold.	28
Figura 4. Exemplos de aplicações de processos biocatalíticos na indústria farmacêutica.....	29
Figura 5. Estratégias para obtenção das modificações nas enzimas	30
Figura 6. Estrutura tridimensional da ATA (R)-seletiva de <i>A. fumigatus</i>	36
Figura 7. Representação esquemática do sítio catalítico das transaminases	36
Figura 8. Reações com transaminases e escopo de substratos	38
Figura 9. Representação da estrutura tridimensional de uma enzima Nitrila hidratase de <i>Bacillus</i> sp (PDB ID 2DPP).....	50
Figura 10. Estrutura do centro metálico no sítio ativo de uma NHase	51
Figura 11. Perfil de substratos aceitos pelas NHases.....	54
Figura 12. Árvore filogenética de <i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	57
Figura 13. Gel de agarose (0,8%) das amplificações por PCR dos genes codificadores de NHase.....	60
Figura 14. Compostos nitrilados enviados pela Profa. Dra. Arlene G. Correa	64
Figura 15. Alinhamento de sequências da subunidade alfa entre as NHases de <i>Rhodococcus erythropolis</i> AJ270 (entrada CAG29809.1) e <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277 (entrada MH732727).....	66
Figura 16. Alinhamento de sequências da subunidade beta entre as NHases de <i>Rhodococcus erythropolis</i> AJ270 (entrada CAG29810.1) e <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277 (entrada MH732728)	67
Figura 17. Nitrilas utilizadas nos primeiros estudos de ancoragem molecular	67
Figura 18. Dockings com a NHase selvagem de <i>Rhodococcus erythropolis</i> . 68	
Figura 19. Comparação no sítio ativo entre a enzima selvagem e a enzima mutante hipotética.....	70
Figura 20. Variantes enzimáticas do triptofano 118.	71
Figura 21. Sobreposições da enzima selvagem com as variantes enzimáticas	73

Figura 22. Desenho dos primers para PCR com mutagênese sítio dirigida...	73
Figura 23. Gel de agarose da reação de PCR para mutagênese sítio dirigida	75
Figura 24. Gel SDS-page para os mutantes W118A-1, W118A-2, W118H-1, W118D-1	76
Figura 25. Gel de agarose da purificação das reações de PCR para mutação sítio dirigida	80
Figura 26. Gel de agarose 1% da análise de restrição do plasmídeo pACYC-duet1 com a NHase selvagem (sem mutações) e as enzimas Aval e NcoI	82
Figura 27. Gel de agarose 1% da análise de restrição das variantes enzimáticas com as enzimas Aval e NcoI	83
Figura 28. Visualização do alinhamento do <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> CBMAI-2094 contra o genoma de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> C3-41	98
Figura 29. Esquema de montagem da pseudomolécula do genoma de <i>L. boronitolerans</i>	99
Figura 30. Janela de visualização do Artemis mostrando as CDS's preditas como highlights em azul no genoma de <i>L. boronitolerans</i> CBMAI-2094.	100
Figura 31. Visualização no Artemis da integração dos resultados obtidos pelo InterProScan contra os bancos de dados CDD, Pfam e Superfamily para o genoma de <i>L. boronitolerans</i> CBMAI-2094.	102
Figura 32. Distribuição do conteúdo enzimático classificado em EC Number, obtido pelo BLAST2GO para o microrganismo <i>L. boronitolerans</i> CBMAI-2094.	103
Figura 33. Representação do ciclo de PCR utilizado para amplificação do gene de nitrila hidratase	106
Figura 34. Difenilacetoneitrila.....	109
Figura 35. Representação do ciclo de PCR utilizado para amplificação do gene de nitrila hidratase	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conversões e excessos enantiomérico da reação de acetofenona e furilmetilcetona com o conjunto de quatro ATAs	40
Tabela 2. Conversões e excessos enantiomérico da reação de 1-fenil-3-butanona com o conjunto de seis ATAs	41
Tabela 3. Conversões e excessos enantiomérico da reação de 4-fenilbut-3-en-2-ona com o conjunto de seis ATAs	43
Tabela 4 Primers usados na PCR investigativa	59
Tabela 5. Comparação da porcentagem de cossolvente DMSO nas reações de hidratação enzimática de nitrilas	62
Tabela 6. Reações de hidratação enzimática de nitrilas volumosas com NHase de <i>R. erythropolis</i>	65
Tabela 7. Variantes construídas no software Maestro®.....	69
Tabela 8. Primers para realização das mutações	74
Tabela 9. Reações da NHase selvagem de <i>R. erythropolis</i> e dos mutantes W118A-1, W118D-1 e W118H-1	78
Tabela 10. Condições das reações de PCR para amplificação do gene de nitrila hidratase.....	106
Tabela 11. Condições das reações de “PCR – Site directed mutageneis” para amplificação do gene de nitrila hidratase	110

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reação catalisada pela enzima hidroxinitrila liase	26
Esquema 2. Tipos de reações catalisadas pelas transaminases	34
Esquema 3. Proposta mecanística de atuação de transaminases	35
Esquema 4. Reação de aminação redutiva da acetofenona e furilmetilcetona catalisada por ATAs e empregando IPA como doador de amina	39
Esquema 5. Reação de aminação redutiva da 1-fenil-3-butanona catalisada por ATAs e empregando IPA como doador de amina	41
Esquema 6. Reação de aminação redutiva da 4-fenilbut-3-en-2-ona catalisada por ATAs e empregando IPA como doador de amina	42
Esquema 7. Reação catalisada pela NHase	48
Esquema 8. Vias metabólicas para degradação de nitrilas	48
Esquema 9. Reação de obtenção da acrilamida para síntese da poliacrilamida	49
Esquema 10. As três possibilidades de mecanismo inicialmente propostos para as NHases	52
Esquema 11. Nova proposta mecanística para nitrilas hidratases (tipo Fe), com o resíduo Cys-SOH atuando como nucleófilo	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. A relação entre a biocatálise e os princípios da Química Verde. ...25

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APS – Persulfato de amônio
ATA – transaminase
ATCC – *American Type Culture Collection*
BLAST – *Basic Local Alingnment Search Tool*
BSA – Albumina de Soro Bovino
CBMAI – Coleção Brasileira De Micro-Organismos De Ambiente E Indústria
CCD – Cromatografia Em Camada Delgada
CCDP – Cromatografia Em Camada Delgada Preparativa
CDD – *Conserved Domains Database*
CDS – *Coding sequence* (Sequência codificante proteína)
DMAP – 4-(dimetilamini)piridina
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucleico
DTT – Dithioheitol
EC Number – *Enzyme Comission Number*
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
Ee – excesso enantiomérico
epPCR – *error-prone* PCR
GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectometro de Massas
GC-FID – Cromatografia Gasosa Acoplada A Detector De Ionização Em Chama
GDH – glicose desidrogenase
GO – *Gene Ontology*
HHDH – haloidrina desalogenase
HNL – hidroxinitrila liase
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IFA – Ingrediente Farmacêutico Ativo
IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
KRED – Cetorredutase
LB – Luria Broth
Mix IP – mix inibidores de proteases
NADP(H) - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NB – Nutrient Broth
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NHases – Nitrilas Hidratases
Nr – *non-rendundant* database
OD – Densidade optica
ORF – *Open Reading Frames* (Janelas abertas de Leitura)
PCR – Reação Em Cadeia Da Polimerase
PDB – *Protein Data Bank*
Pfam – *Protein Families Database*
PLP – piridoxal-5-fosfato
PMP – piridoxamina-5-fosfato
PMSF – Phenylmethysulfonyl fluoride
RNA – Ácido ribonucleico
Rpm – rotações por minuto
SDS – dodecil sulfato de sódio
SDS-page – Eletroforese em gel de acrilamida com dodecil-sulfato de sódio
SOC – *Super Optimum Broth*

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA
TEMED – Tetrametiletilenodiamina

SUMARIO

1. Introdução geral	23
1.1. A Química verde e a importância de reações catalíticas	23
1.2. Biocatálise e química verde	24
1.3. Biocatálise: breve histórico e seu contexto atual	25
1.4. Surfando na terceira onda: as estratégias disponíveis para realizar as modificações nas enzimas	30
2. Introdução -Capítulo 1	33
2.1. Transaminases (ATAs)	33
3. Objetivos	37
4. Resultados e Discussão	38
4.1. Avaliando a influência de um heterociclo: reações com acetofenona, e furilmetilcetona	38
4.2. Estudo da influência da presença da ligação dupla em metil-cetonas dna reação catalisada por transaminases	40
5. Conclusões	45
6. Introdução – Capítulo 2	47
6.1. Vias catalíticas para obtenção de amidas	47
6.2. Nitrilas hidratases	47
6.3. Nitrilas hidratases: Estrutura, Ocorrência e Mecanismo	49
6.4. Nitrilas hidratases: limitações da enzima e áreas a serem exploradas	53
7. Objetivos	55
8. Resultados e discussão	56
8.1. <u>Primeira parte: A busca por uma nova nitrila hidratase – clonagem da NHase de <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> CBMAI 2094</u>	56
8.1.1. Busca pelo gene de nitrila hidratase na bactéria <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> CBMAI 2094	56
8.1.2. Busca pelo gene de nitrila hidratase na bactéria <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> CBMAI 2094 via análises de bioinformática	56
8.1.3. Busca pelo gene de nitrila hidratase na bactéria <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> CBMAI 2094 via reação em cadeia da polimerase (PCR) investigativa	59
8.2. <u>Segunda parte: Reações com a nitrila hidratase de <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277</u>	61
8.2.1. Estudo da porcentagem de cossolvente e sua influência na reação de hidratação enzimática de nitrilas	61
8.2.2. Reações com escopo de substratos estericamente impedidos	64
8.3. <u>Terceira parte: Estudos de mutagênese sítio dirigida na nitrila hidratase de <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277</u>	65
8.3.1. Estudos de ancoragem molecular com a enzima nitrila hidratase recombinante de <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	66
8.3.1.1. Determinação dos resíduos de aminoácidos a sofrerem mutações	66
8.3.1.2. Dockings com as enzimas mutantes e difenilacetonnitrila	68

8.3.1.3. Construção de modelos para as variantes W118A, W118S, W118H e W118D	72
8.3.2. Mutagênese sítio dirigida para obtenção dos mutantes	73
8.3.2.1. Desenho dos <i>primers</i> para a mutagênese sítio dirigida	73
8.3.2.2. Obtenção das variantes enzimáticas via PCR	75
8.3.2.3. Avaliação dos mutantes W118A-1, W118D-1, W118H-1	77
8.3.2.4. Nova tentativa para obtenção das variantes enzimáticas W118A, W118H, W118D e W118S	80
9. Conclusões	85
10. Procedimentos gerais	87
10.1. Métodos Cromatográficos	87
10.2. Meios de Cultura	88
10.3. Tampões e soluções utilizadas	89
10.4. Soluções SDS-page	90
10.5. Análise do DNA em gel de agarose	92
11. Primeiro capítulo: Reações com transaminases	93
11.1. Plasmídeos e expressão das proteínas recombinantes	93
11.2. Ensaio de Bradford	94
11.3. Procedimento Geral para reações com os extratos enzimáticos	94
11.4. Procedimento Geral para reações com ATA-256	95
11.5. Reação de aminação redutiva para síntese do composto 1-(furan-2-il)etanamina (CHEN <i>et al.</i> , 2010)	95
11.6. Procedimento geral para a acetilação de aminas	96
12. Segundo Capítulo	97
12.1. Busca pelo gene de nitrila hidratase na bactéria <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> CBMAI 2094 via análises de bioinformática	97
12.1.1. Ordenamento e orientação do genoma: ABACAS	97
12.1.2. Predição gênica – Anotação estrutural	99
12.1.3. BLASTp e RPS-BLAST	100
12.1.4. InterProScan	101
12.1.5. Predição de RNAs ribossomais e transportadores no genoma	102
12.1.6. BLAST2GO	102
12.1.7. OrthoMCL	104
12.1.8. Busca por similaridades de seqüências: tBLASTn	104
12.2. Busca pelo gene de nitrila hidratase na bactéria <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> CBMAI 2094 via reação em cadeia da polimerase (PCR) investigativa	105
12.2.1. Extração do DNA de <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> CBMAI 2094 e <i>Bacillus cereus</i>	105
12.2.2. PCR investigativa para seqüências conservadas de nitrilas hidratases	105
12.3. Segunda parte: Reações com a nitrila hidratase de <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	107

12.3.1. Procedimento geral para hidratações biocatalíticas de nitrilas com células úmidas	107
12.3.2. Procedimento para síntese química da o-toluamida.....	107
12.3.3. Procedimento para síntese química da 4-piridinacarboxamida (VERMA <i>et al.</i> , 2013)	108
12.4. <u>Terceira parte: Estudos de mutagênese sítio dirigida na nitrila hidratase de <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277</u>	108
12.4.1. Estudos de ancoragem molecular com a enzima nitrila hidratase recombinante de <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	108
12.4.2. Procedimento geral usado para reação em cadeia de polimerase (PCR) para mutagênese sítio dirigida.....	110
12.4.3. Procedimento geral para purificação das bandas de géis de agarose	111
12.4.4. Procedimento para reação de digestão com enzima DpnI (ThermoFisher Scientific)	111
12.4.5. Procedimento para reação de ligação com enzima T4 DNA Ligase (ThermoFisher Scientific)	111
12.4.6. Protocolo geral para preparo de células competentes de <i>E.coli</i>	111
12.4.7. Procedimento geral para transformação utilizando <i>E. coli</i> DH10 β quimicamente competente	112
12.4.8. Extração de DNA plasmidial usando kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit	112
12.4.9. Transformação em <i>E. coli</i> BL21 DE3	113
12.4.10. Protocolo geral para análise de proteína por SDS page	113
12.4.11. Procedimento alternativo para hidratações biocatalíticas de nitrilas com células úmidas	115
12.4.12. Procedimento para reação de digestão com enzimas Aval e NcoI (New England Biolabs).....	116

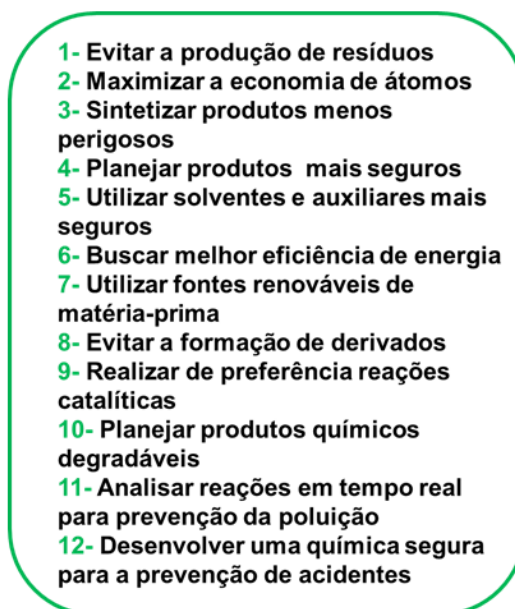
Introdução geral

1. Introdução geral

1.1. A Química verde e a importância de reações catalíticas

Em 1998, com a publicação do livro *Green Chemistry: Theory and Practice*, da autoria de Paul Anastas e de John Warner, a Química Verde foi oficialmente reconhecida pela comunidade científica. No livro foram postulados os 12 princípios da química verde, representados na Figura 1, que servem como um guia para a aplicação da química verde na manufatura dos produtos químicos (SHELDON, 2016).

Figura 1. 12 princípios da química verde

- 
- 1- Evitar a produção de resíduos
 - 2- Maximizar a economia de átomos
 - 3- Sintetizar produtos menos perigosos
 - 4- Planejar produtos mais seguros
 - 5- Utilizar solventes e auxiliares mais seguros
 - 6- Buscar melhor eficiência de energia
 - 7- Utilizar fontes renováveis de matéria-prima
 - 8- Evitar a formação de derivados
 - 9- Realizar de preferência reações catalíticas
 - 10- Planejar produtos químicos degradáveis
 - 11- Analisar reações em tempo real para prevenção da poluição
 - 12- Desenvolver uma química segura para a prevenção de acidentes

Fonte: elaborada pela autora

Em linhas gerais, pode-se sumarizar que a química verde está relacionada com a prevenção de poluição, através da minimização da geração de resíduos e do uso de substâncias tóxicas e perigosas na produção e aplicação de produtos químicos (SHELDON; WOODLEY, 2018). Nesse contexto, o *design* do produto se torna essencial, com a escolha de metodologias sintéticas sustentáveis, que englobem o maior número dos princípios da química verde possível.

Uma das principais fontes da formação de resíduos na indústria farmacêutica e de química fina é o uso de reagentes em quantidades estequiométricas nas metodologias sintéticas (SHELDON, 2016). Como exemplo, podem ser citadas

reações de redução com metais e hidretos metálicos, além de reações de oxidação com permanganato ou reagentes de cromo (IV), sendo que a última possui o agravante da toxicidade do resíduo gerado (SHELDON; WOODLEY, 2018). Para substituir as antigas metodologias torna-se imprescindível o uso de alternativas catalíticas mais sustentáveis na síntese orgânica (SHELDON, 2017).

1.2. Biocatálise e química verde

A biocatálise consiste no uso de enzimas e outros catalisadores biológicos na transformação de substâncias orgânicas não naturais (PELLIS et al., 2018). Ela é uma ferramenta importante na síntese orgânica, já que 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), e uso de solventes ambientalmente mais amigáveis. Elas ainda são oriundas de fontes renováveis, são biocompatíveis, biodegradáveis, e não são tóxicas ou perigosas (SHELDON; BRADY, 2022; TURNER; O'REILLY, 2013).

Quando se compara as enzimas aos catalisadores comumente usados em reações orgânicas, (metálicos, organometálicos e organocatalisadores), elas apresentam algumas vantagens. Esses catalisadores muitas vezes exigem condições reacionais extremas (tais como temperaturas e pressões reacionais elevadas, além de longos tempos reacionais), e podem gerar resíduos ambientais, sendo necessário tratamento do resíduo gerado. Outro fato a ser considerado é a alarmante escassez e finitude desses metais (PORTER; RUSLI; OLLIS, 2016; SHELDON; PEREIRA, 2017).

A biocatálise possui intrinsicamente algumas características que a aproximam dos princípios preconizados pela química verde, e tal relação está descrita no Quadro 1, a seguir.

Quadro 1. A relação entre a biocatálise e os princípios da Química Verde.

Princípio	Relação com a biocatálise
1	A seletividade enzimática evita etapas reacionais, diminuindo a geração de resíduos
2	As reações biocatalíticas apresentam alta economia atômica devido à seletividade das enzimas.
3	Os biocatalisadores são biodegradáveis e possuem baixa toxicidade.
4	Não se aplica apenas a processos biocatalíticos.
5	A maioria das reações biocatalíticas acontecem em água ou solventes pouco tóxicos.
6	Os biocatalisadores atuam em condições reacionais brandas, como pressão atmosférica e temperatura ambiente.
7	As enzimas são provenientes de fontes renováveis.
8	A alta seletividade dos biocatalisadores elimina a necessidade de etapas de proteção e desproteção.
9	As enzimas são catalisadores eficientes.
10	Não se aplica apenas a processos biocatalíticos.
11	É aplicável a processos biocatalíticos.
12	As condições reacionais são brandas e seguras para os operadores e para o meio ambiente.

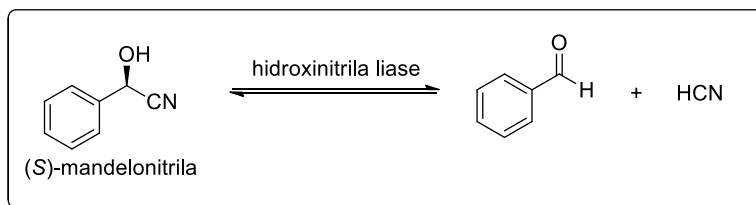
Fonte: Adaptado de (TEIXEIRA; MILAGRE, 2020b)

1.3. Biocatálise: breve histórico e seu contexto atual

O uso das enzimas pelo ser humano remonta da antiguidade, onde microrganismos eram empregados em processos fermentativos (REETZ, 2013). Como um marco para o início da descoberta da ação desses biocatalisadores, em 1837 os pesquisadores Liebig e Wöhler utilizaram um extrato bruto da amêndoa *Prunus amygdalus*, denominado por eles de emulsina, que continha a enzima hidroxinitrila liase (HNL) e observaram a formação de HCN a partir de um composto

que posteriormente foi identificado como (*R*)-mandelonitrila (Esquema 1) (HANEFELD; HOLLMANN; PAUL, 2022).

Esquema 1. Reação catalisada pela enzima hidroxinitrila liase



Fonte: Adaptado de (HANEFELD; HOLLMANN; PAUL, 2022)

Anos mais tarde Rosenthaler, em 1908, também usou um extrato de amêndoas para sintetizar (*R*)-mandelonitrila a partir do benzaldeído, a reação reversa da reação observada em 1837 por Liebig e Wöhler (BEHRENS et al., 2011; BORNSCHEUER et al., 2012). Essa fase inicial de estudo das reações biocatalíticas foi posteriormente denominada como sendo a primeira onda da biocatálise. Nessa etapa eram utilizados como fontes de biocatalisadores principalmente extratos de tecidos de plantas ou animais e cepas microbianas selvagens, o que acarretava problemas, como baixos rendimentos devido a reações paralelas e falta de estabilidade dos biocatalisadores (Figura 2) (BORNSCHEUER, 2018; BORNSCHEUER et al., 2012; REETZ, 2013).

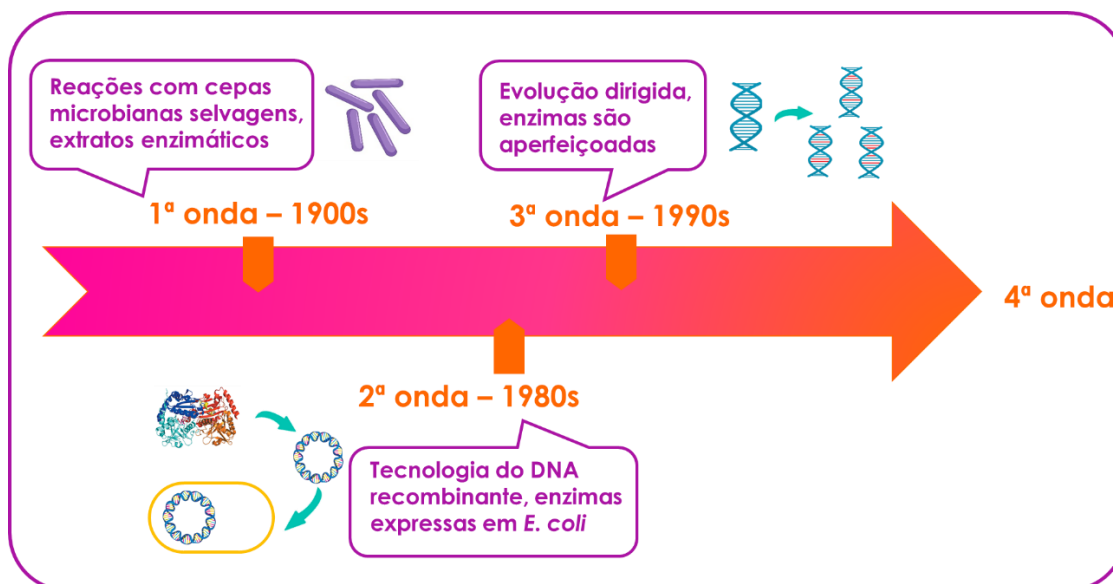
Com o advento da tecnologia do DNA recombinante no final dos anos 80, a biocatálise passou por um grande crescimento, no que foi então chamada de segunda onda da biocatálise (BORNSCHEUER et al., 2012). Enzimas foram clonadas em vetores e assim expressas em células de organismos procariotos ou eucariotos como *E. coli* ou *S. cerevisiae*, respectivamente, aumentando sua produção, e tornando os processos biocatalíticos vantajosos em nível industrial (Figura 2). Nessa época os estudos de mutagênese sítio dirigida tiveram início, e as propriedades dos biocatalisadores começaram a ser modificadas de maneira a aumentar o escopo de substratos aceitos pelas enzimas e assim aumentar seu uso na indústria farmacêutica e de química fina (BORNSCHEUER, 2018; BORNSCHEUER et al., 2012).

Nos anos 1990, com o trabalho de pesquisadores como Frances Arnold e Pim Stemmer, a terceira onda da biocatálise teve seu início (BORNSCHEUER et al., 2012). Foram desenvolvidas técnicas de evolução dirigida de enzimas, como DNA *shuffling* e *epPCR* (*error-prone* PCR – PCR: reação em cadeia da polímerase), e assim mutações foram introduzidas nas proteínas, adaptando os biocatalisadores para as

condições do processo, por exemplo, aumentando sua estabilidade, escopo de substratos e reações catalisadas. (BORNSCHEUER et al., 2012; DE SOUZA; MIRANDA; BORNSCHEUER, 2017; REETZ, 2013). Com essas tecnologias tornou-se possível nos dias atuais aperfeiçoar uma enzima para um determinado processo, e não é mais necessário modificar o processo para acomodar a enzima disponível, como era necessário há 25 anos (BADENHORST; BORNSCHEUER, 2018; PELLIS et al., 2018).

Um exemplo de uma enzima sendo modificada para se acomodar a um processo já desenvolvido industrialmente, é a obtenção da Sitagliptina (Figura 4), pela Merck. Empregando como biocatalisador a ATA-117 da codexis, após um total de 27 mutações, a enzima foi modificada de modo a acomodar a cetona volumosa prositagliptina em seu sítio ativo, além de operar em condições diferentes das naturais, com alta concentração de DMSO no meio reacional (50%), temperatura elevada (45 °C), além de alta concentração do substrato (100 g L⁻¹) (TEIXEIRA, MILAGRE, 2020).

Figura 2. Ondas da biocatálise.

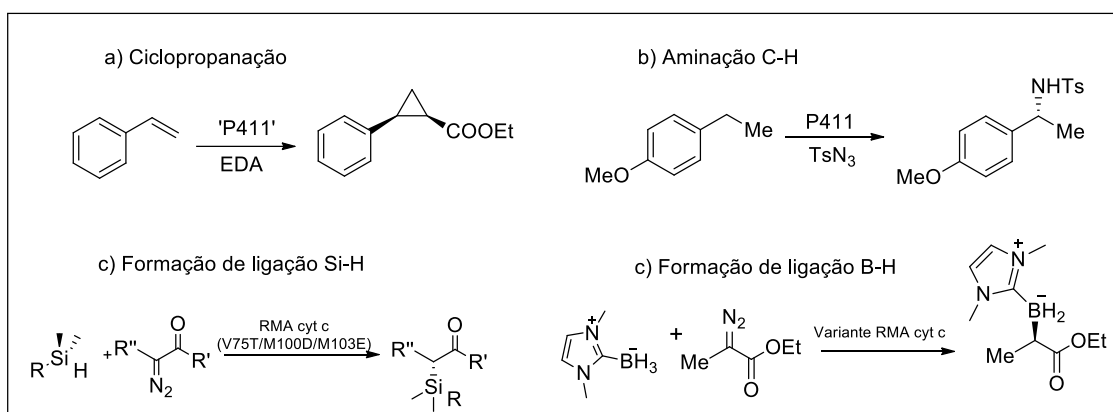


Fonte: elaborada pela autora.

Atualmente a biocatálise está prosseguindo para a quarta onda (BORNSCHEUER, 2018). Com o trabalho do *The Arnold Group*, liderado pela professora Frances Arnold, enzimas monoxigenases do citocromo P450 foram modificadas geneticamente para catalisar reações não existentes na natureza, criadas

por químicos orgânicos sintéticos. Entre elas reações de ciclopropanação através de transferência de carbenos (COELHO et al., 2013) e reações de aminação C-H através de transferência de nitrenos (PRIER et al., 2017). Foram também desenvolvidas enzimas que catalisam a formação de ligações Si-H (KAN et al., 2016) e B-H (JENNIFER KAN et al., 2017), fornecendo aos seres vivos a primeira atividade de formações de ligações carbono-silício e carbono-boro (ARNOLD, 2018; BORNSCHEUER, 2018; HAMMER; KNIGHT; ARNOLD, 2017). Essas reações encontram-se representadas na Figura 3.

Figura 3. Reações não-naturais de enzimas desenvolvidas pelo grupo da professora Frances Arnold.



Fonte: elaborada pela autora.

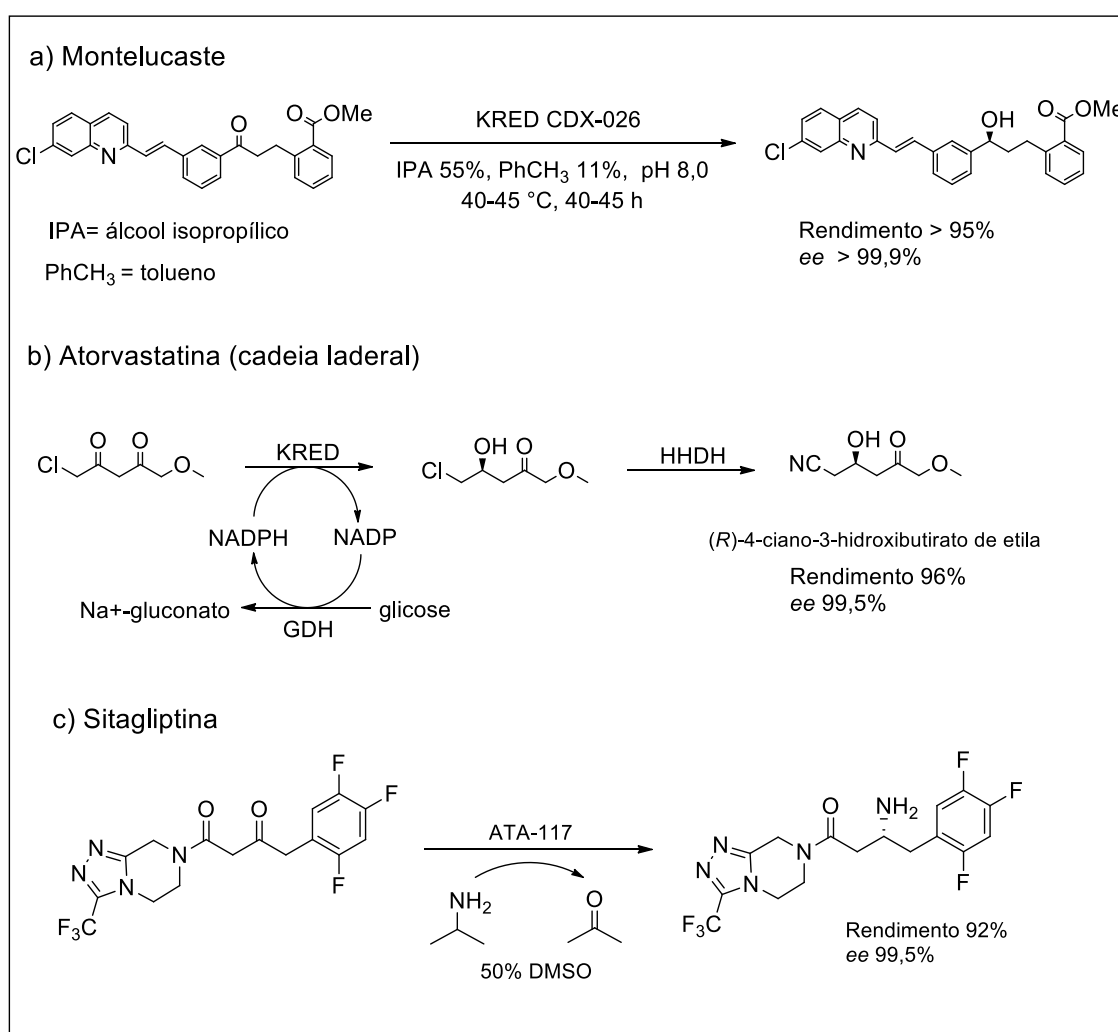
A relevância da contribuição das pesquisas do *The Arnold Group* para a sociedade foi evidenciada pelo Prêmio Nobel de Química 2018, que laureou Frances H. Arnold com metade do prêmio pelas suas contribuições na área de “*Evolução Dirigida de Enzimas*” e a outra metade foi dividida entre George P. Smith e Sir. Gregory P. Winter “*pelo desenvolvimento da tecnologia phage display de peptídeos e anticorpos*” (ARNOLD, 2019).

Em razão dos avanços recentes proporcionados pela terceira onda da biocatálise, principalmente evolução dirigida e engenharia de proteínas, aliados aos progressos nas técnicas de sequenciamento de genomas e a síntese de genes, a biocatálise passou a ser mais amplamente empregada pela indústria, principalmente no setor farmacêutico na síntese de IFAs (ingrediente farmacêutico ativo). Com o auxílio das técnicas citadas acima, o sucesso do emprego das enzimas pelas indústrias farmacêuticas foi evidenciado com a alta seletividade, rendimentos e excessos enantioméricos elevados, além de eliminação de usos de metais pesados,

cuja eliminação a um nível aceitável, requerido na síntese de fármacos, gera custos elevados (SHELDON; WOODLEY, 2018).

Entre os exemplos bem sucedidos de processos biocatalíticos na síntese de IFAs podem ser citadas a obtenção do montelucaste (Singulair) (LIANG et al., 2010), síntese da cadeia lateral da atorvastatina (Lipitor) (MA et al., 2010) e a obtenção da sitagliptina (Januvia) (SAVILE et al., 2010), como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4. Exemplos de aplicações de processos biocatalíticos na indústria farmacêutica



Fonte: Adaptado de (TEIXEIRA et al 2022)

Ilustrando a relevância do uso de catálise enzimática em nível industrial, a quantidade de processos biocatalíticos reportados em indústrias vêm apresentando uma tendência de aumento nos últimos anos: havia cerca de 60 processos em 1990,

134 em 2002 e em 2019 esse número já era da ordem de algumas centenas (HECKMANN; PARADISI, 2020).

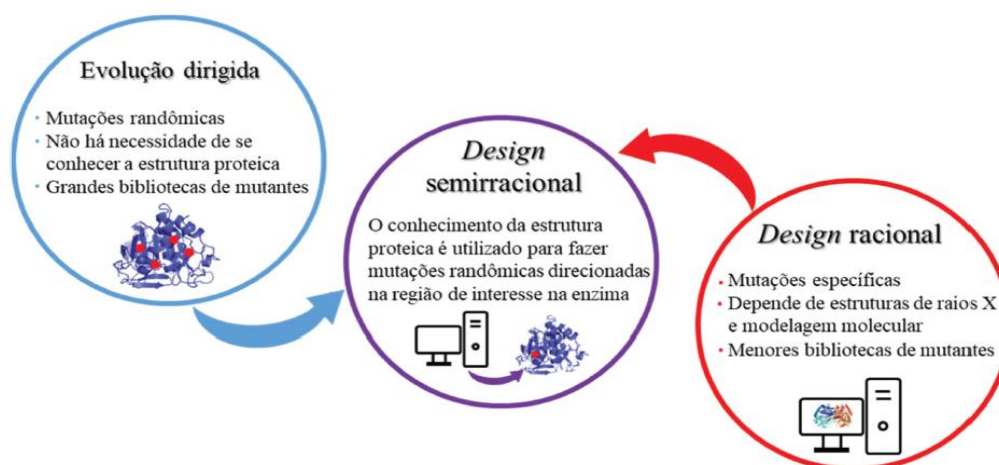
Apesar da biocatálise estar evoluindo para uma quarta onda no setor global, no Brasil as pesquisas ainda não se encontram nesse nível. Em artigo de revisão publicado em 2015, Birolli e colaboradores realizaram uma revisão do estado da biocatálise no Brasil e, apesar do crescimento na área, no país as pesquisas ainda se encontram em grande parte restritas ao emprego de células selvagens sem expressão da enzima de interesse, ou de enzimas microbianas já disponíveis comercialmente (BIROLI et al., 2015).

1.4. Surfando na terceira onda: as estratégias disponíveis para realizar as modificações nas enzimas

As estratégias disponíveis para a modificação de enzimas podem ser divididas entre três categorias principais, sendo elas (1) evolução dirigida, (2) *design* racional e (3) *design* semirracional, como ilustrado na

Figura 5. A principal diferença nas abordagens das estratégias mencionadas são: a necessidade de conhecimentos prévios da estrutura tridimensional da enzima e o número de mutantes enzimáticos gerados pelas técnicas, o que implicará diretamente em maior ou menor demanda nas etapas de ensaios de triagens enzimáticas para seleção dos candidatos mais promissores (BEHRENS *et al.*, 2011).

Figura 5. Estratégias para obtenção das modificações nas enzimas



Fonte: (TEIXEIRA; MILAGRE, 2020b)

Nas técnicas de evolução dirigida (Figura 5a), são criadas grandes bibliotecas de mutantes através de mudanças randômicas na sequência primária da enzima (BEHRENS et al., 2011). Cada mutante recém criado é submetido a ensaios de triagem enzimática para a propriedade de interesse e os melhores *hits* são selecionados e submetidos a novos ciclos de mutações, a fim de aperfeiçoar a característica escolhida, como por exemplo atividade enzimática, termoestabilidade, seletividade, dentre outras (OTTEN; HOLLMANN; ARENDS, 2010).

O *design* racional (Figura 5c), por sua vez, é baseado em mutações pontuais e específicas que dependem de conhecimento prévio da estrutura (primária, secundária e terciária) da enzima, além do domínio de técnicas de bioinformática e de modelagem molecular para prever as relações entre estrutura-atividade para a criação dos melhores mutantes (REETZ; KREBS, 2011). Já o *design* semirracional (Figura 5b) é uma combinação das duas estratégias anteriores e utiliza informações estruturais previamente identificadas em enzimas correlatas à enzima de interesse, quando esta não possui tais informações, e as utiliza no direcionamento das etapas de mutações randômicas (MARTÍNEZ; SCHWANEBERG, 2013).

Capítulo 1

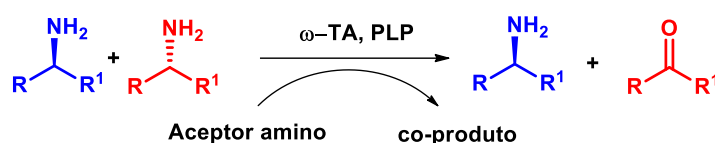
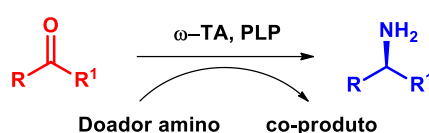
2. Introdução -Capítulo 1

2.1. Transaminases (ATAs)

As transaminases (EC 2.6.1.x), são enzimas que possuem como seu papel metabólico primário catalisar a transferência de um grupo amino de um aminoácido para um α -cetoácido (WILLIES et al., 2016). 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 (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). Como o cofator é regenerado, ele é necessário apenas em quantidades catalíticas (SIMON et al., 2014).

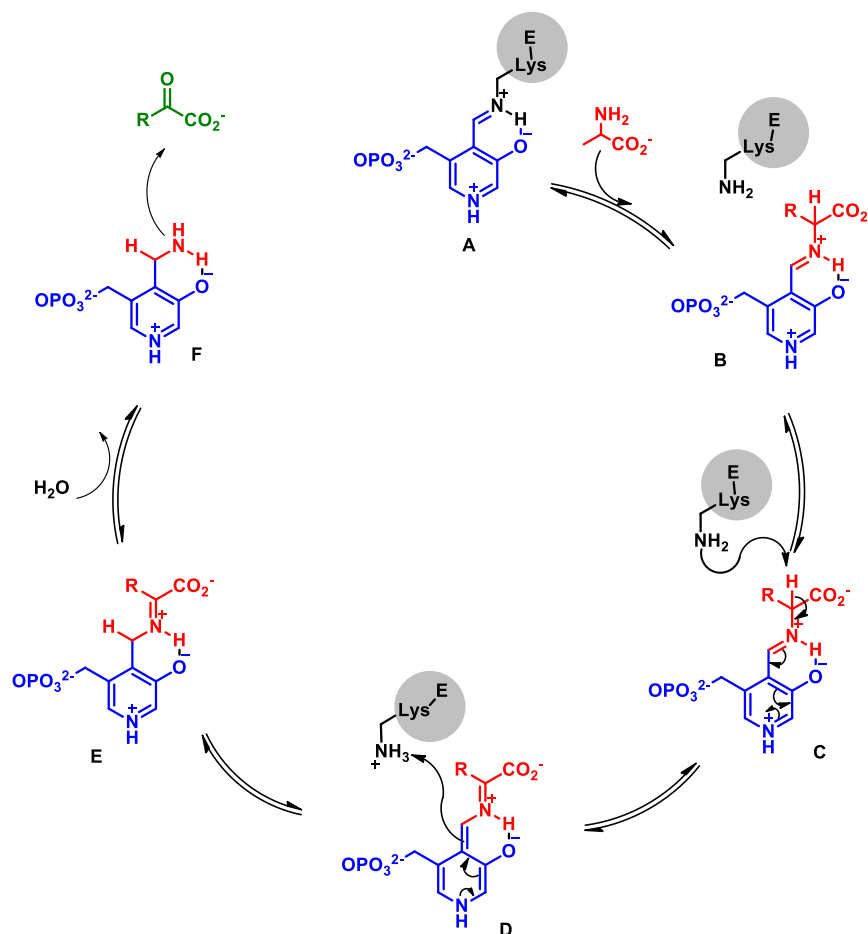
As transaminases produzem aminas de duas maneiras principais (Esquema 2): através de resolução cinética de misturas racêmicas de aminas primárias e por meio de síntese assimétrica, onde uma carbonila pró-quiral de cetona é convertida em uma amina com centro assimétrico definido. A aminação redutiva de cetonas é favorecida, já que pode levar a um rendimento teórico de 100%, enquanto que o da resolução cinética é de, no máximo, 50% (HÖHNE et al., 2010; MALIK; PARK; SHIN, 2012).

Esquema 2. Tipos de reações catalisadas pelas transaminases**A) Resolução cinética de aminas racêmicas****B) Aminoação redutiva assimétrica**

Fonte: Elaborada pela autora

O mecanismo dessa reação se sucede da seguinte maneira: na ausência do substrato o PLP encontra-se ligado covalentemente à um resíduo de lisina do sítio catalítico, como ilustrado no Esquema 3, 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).

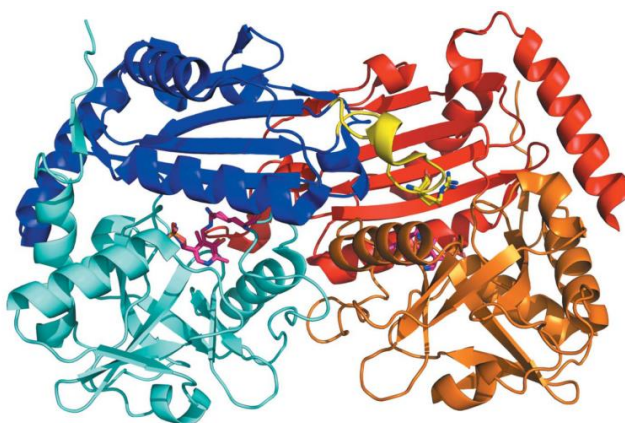
O resíduo de lisina então abstrai um próton do carbono quaternário, que ficou mais ácido devido a formação da imina. Assistida pelo par de elétrons do anel piridínico, os elétrons da ligação dupla abstraem um próton do resíduo de lisina, formando a cetimina E. A imina então é hidrolisada, liberando o 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 3. Proposta mecanística de atuação de transaminases

Fonte: Adaptado de (FUCHS; FARNBERGER; KROUTIL, 2015)

Em relação à sua estrutura proteica tridimensional, as 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 6 (ŁYSKOWSKI et al., 2014; THOMSEN et al., 2014).

Figura 6. Estrutura tridimensional da ATA (R)-seletiva de *A. fumigatus*

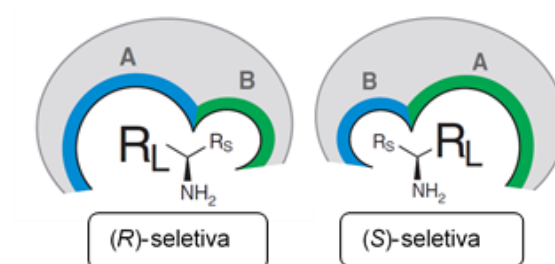


Fonte: (THOMSEN et al., 2014)

Cada monômero está dividido por cores. Os domínios menores estão representados em azul escuro e vermelho, e os 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 7. 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 7. Representação esquemática do sítio catalítico das transaminases



Fonte: (HÖHNE et al., 2010)

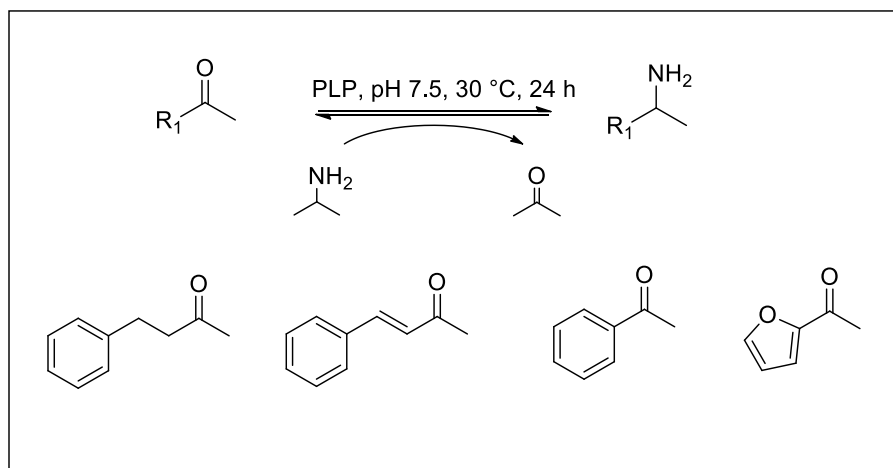
3. Objetivos

Esse trabalho teve como objetivo estudar a reação de aminação redutiva enzimática de cetonas pró-quirais, visando a síntese de blocos construtores quirais de interesse comercial. Focou-se em avaliar a presença de uma insaturação em uma cetona α,β -insaturada, bem como de moléculas com heterociclos. Para isso foram utilizados como biocatalisadores transaminases comerciais e transaminases selvagens expressas heterologicamente em *E. coli*.

4. Resultados e Discussão

De modo a expandir o escopo de substratos para a reação de aminação reductiva catalisada por transaminases, em continuação a trabalho realizado durante o mestrado da autora, foram realizadas algumas reações empregando como biocatalisadores as transaminases (ATAs) recombinantes provenientes dos microrganismos *Aspergillus terreus*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Ruegeria pomeroyi*, *Vibrio fluvialis* e *Chromobacterium violaceum*. O esquema geral para essas reações está representado na Figura 8.

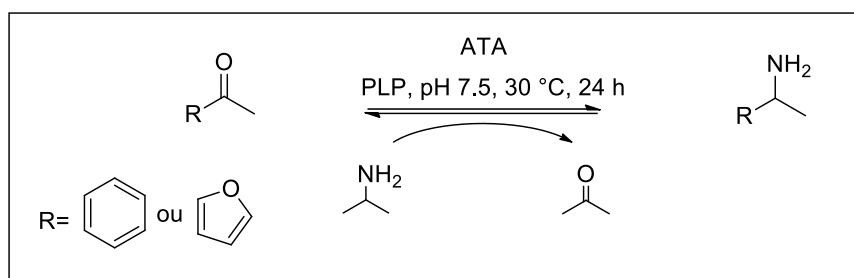
Figura 8. Reações com transaminases e escopo de substratos



4.1. Avaliando a influência de um heterociclo: reações com acetofenona, e furilmetilcetona

A acetofenona, uma metil-cetona pró-quiral com duas regiões de tamanhos distintos ao redor da carbonila, é uma cetona que tradicionalmente é bastante empregada em reações com transaminases. A cetona análoga, com um anel furano no lugar do benzeno, no entanto, não é tão explorada na literatura. Empregamos então esses dois compostos em uma reação com quatro ATAs (*Aspergillus terreus*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Ruegeria pomeroyi*, e *Chromobacterium violaceum*) na forma de extrato enzimático bruto (Esquema 4), usando como composto doador de amina a isopropilamina, uma amina já testada em condição já otimizada anteriormente (TEIXEIRA, 2018).

Esquema 4. Reação de aminação redutiva da acetofenona e furilmetilcetona catalisada por ATAs e empregando IPA como doador de amina



Considerando a baixa concentração de proteína obtida no ensaio de Bradford e, portanto, a baixa concentração de ATA, alguns resultados obtidos são bastante promissores. Esses resultados estão listados na Tabela 1. Nas reações com a acetofenona, foi obtida conversão de 45-99% com 3 das 4 enzimas avaliadas, e em todos os casos foi obtida alta seletividade, com o ee >99%. Já no caso do composto análogo com anel furânico, apenas com a enzima de *M. vanbaalenii* foi obtida uma conversão de 8%. Dunbabin e colaboradores estudaram vários substratos derivados de biomassa, principalmente aldeídos, na aminação redutiva usando as ATAs de *C. violaceum* e *M. vanbaalenii* (DUNBABIN et al., 2017). Diferentemente da condição reacional aqui utilizada, eles empregaram como composto doador de amina a feniletilamina, sendo capazes de obter para a furilmetilcetona conversões superiores as daqui obtidas (18 -54%).

Tabela 1. Conversões e excessos enantiomérico da reação de acetofenona e furilmetilcetona com o conjunto de quatro ATAs

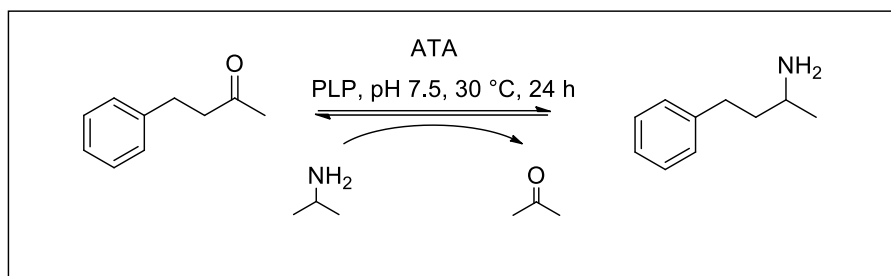
Substrato	<i>C. violaceum</i>		<i>A. terreus</i>		<i>M. vanbaalenii</i>		<i>R. pomeroyi</i>	
	(S)-ATA		(R)-ATA		(R)-ATA		(S)-ATA	
	c. [%]	ee _p [%]	c. [%]	ee _p [%]	c. [%]	ee _p [%]	c. [%]	ee _p [%]
Acetofenona	0	-	45	>99	>99	>99	72	>99
Furilmetilcetona	0	-	0	-	8	-	0	-

Condições: 20 mM cetona, 300mM IPA, 1% DMSO, 1 mM PLP, 1.5 mL extrato enzimático bruto, 30°C, 24 h. Conversões foram determinadas por cromatografia gasosa (GC-FID). Os excessos enantioméricos foram determinados por análises quirais de GC usando coluna Hydrodex® β-3P column (25 m x 0.25 mm x 0.25 μm; Machery-Nagel).

4.2. Estudo da influência da presença da ligação dupla em metil-cetonas na reação catalisada por transaminases

A fim de se estudar a influência da presença de uma insaturação no substrato para a reação catalisada por transaminases, foram escolhidos dois substratos com estrutura semelhante, diferenciando-se apenas pela presença da ligação dupla. Os experimentos foram feitos primeiramente empregando-se a cetona 1-fenil-3-butanona (Esquema 5) e a isopropilamina como doador de amina, que já havia sido definido como um bom doador de amina em trabalho anterior (TEIXEIRA, 2018).

Esquema 5. Reação de aminação reductiva da 1-fenil-3-butanona catalisada por ATAs e empregando IPA como doador de amina



Foram empregados como biocatalisadores um conjunto de cinco ATAs recombinantes provenientes dos microrganismos *C. violaceum*, *R. pomeroyi*, *A. terreus*, *M. vanbaalenii* e *V. fluvialis* na forma de extratos enzimáticos brutos, e também a enzima comercial ATA-256, que é uma enzima mutante da de *V. fluvialis* e foi adquirida da empresa Codexis. Os resultados dessas reações encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Conversões e excessos enantiomérico da reação de 1-fenil-3-butanona com o conjunto de seis ATAs

Entrada	ATA	Conv. (%)	e.e. (%)
1	<i>C. violaceum</i>	80	97 (S)
2	<i>R. pomeroyi</i>	>99	>99 (S)
3	<i>A. terreus</i>	93	>99 (R)
4	<i>M. vanbaalenii</i>	>99	>99 (R)
5	<i>V. fluvialis</i>	97	78 (S)
6	ATA-256	>99	>99 (S)

Condições: 20 mM cetona, 300mM IPA, 1% DMSO, 1 mM PLP, 1.5 mL extrato enzimático bruto, 30°C, 24 h. Conversões foram determinadas por cromatografia gasosa (GC-FID). Os excessos enantioméricos foram determinados por análises quirais de GC usando coluna Hydrodex® β-3P column (25 m x 0.25 mm x 0.25 μm; Machery-Nagel).

As reações de aminação reductiva empregando a cetona 1-fenil-3-butanona em geral obtiveram valores de conversões altos (80 - >99%) e bons excessos

enantioméricos (78 - >99%). O menor valor de conversão obtido foi empregando a ATA (S)-seletiva de *C. violaceum* (Entrada 1), com uma conversão de 80% e ee de 97%, valor similar ao descrito na literatura por Kroutil e colaboradores, embora eles tenham empregado outro doador de amina na reação (KOSZELEWSKI et al., 2010).

Em relação as outras enzimas (S)-seletivas, com a ATA de *R. pomeroyi* (Entrada 2) as conversões e ee alcançados foram excelentes, ambos maiores que 99%, valores superiores ao já descrito na literatura com esse substrato e doador de amina (MALLIN; HÖHNE; BORNSCHEUER, 2014). Com a ATA selvagem de *V. fluvialis* (Entrada 5) obtivemos um bom valor de conversão (97%) e um ee moderado (78%). Esses valores foram elevados quando se empregou a ATA-256 (Entrada 6), variante engenheirada da enzima de *V. fluvialis*, sendo obtida conversão total no produto, com uma alta seletividade pelo enantiômero S (ee > 99%).

Por fim, quando foram empregadas as duas enzimas (R)-seletivas, com a ATA de *Aspergillus terreus* (Entrada 3) foi obtida uma boa conversão com alta seletividade para o enantiômero (R), e com a ATA de *Mycobacterium vanbaalenii* foram obtidos excelentes conversões e ee (ambos maiores que 99%).

O outro substrato estudado foi a cetona α - β insaturada 4-fenilbut-3-en-2-ona (Esquema 6), composto que, devido à planaridade que a ligação dupla confere à molécula, é um substrato mais desafiador que o primeiro avaliado (1-fenil-3-butanona) para a enzima. Para esse composto também foram empregados as cinco ATAs recombinantes na forma de extratos enzimáticos brutos, e também a ATA-256 da Codexis. Os resultados encontram-se listados na Tabela 3.

Esquema 6. Reação de aminação reductiva da 4-fenilbut-3-en-2-ona catalisada por ATAs e empregando IPA como doador de amina

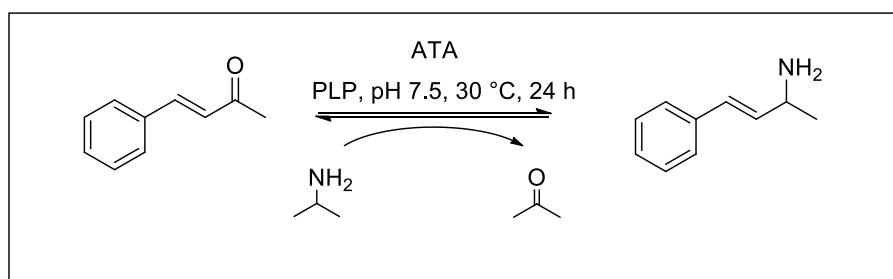


Tabela 3. Conversões e excessos enantiomérico da reação de 4-fenilbut-3-en-2-ona com o conjunto de seis ATAs

Entrada	ATA	Conv. (%)	e.e. (%)
1	<i>C. violaceum</i>	0	-
2	<i>R. pomeroyi</i>	9	>99 (S)
3	<i>A. terreus</i>	3	>99 (R)
4	<i>M. vanbaalenii</i>	4	>99 (R)
5	<i>V. fluvialis</i>	5	90 (S)
6	ATA-256	87	>99 (S)

Condições: 20 mM cetona, 300mM IPA, 1% DMSO, 1 mM PLP, 1.5 mL extrato enzimático bruto, 30°C, 24 h. Conversões foram determinadas por cromatografia gasosa (GC-FID). Os excessos enantioméricos foram determinados por análises quirais de GC usando coluna Hydrodex® β -3P column (25 m x 0.25 mm x 0.25 μ m; Machery-Nagel).

Utilizando-se a 4-fenilbut-3-en-2-ona como substrato, as conversões caíram drasticamente, em relação ao seu análogo saturado. Com o conjunto de enzimas selvagens recombinantes, o melhor resultado obtido foi com a enzima (S) seletiva de *R. pomeroyi*, com uma conversão de 9% e ee maior que 99%. A seletividade manteve-se, de maneira geral, alta para a maioria das enzimas avaliadas, com exceção da enzima de *V. fluvialis*, que apresentou um ee de 90%. Na reação com a ATA-256 da Codexis, no entanto, foi obtido uma conversão elevada de 87%, com excelente seletividade para o enantiômero (S), maior que 99%. Em artigo recente, Gotor e colaboradores também verificaram que a ATA-256 foi a melhor transaminase que eles avaliaram para a reação com a 4-fenilbut-3-en-2-ona (ALBARRÁN-VELO; LAVANDERA; GOTOR-FERNÁNDEZ, 2020).

De posse desses resultados, optamos por, em parceria com o laboratório LabMMol da UFRJ, liderado pelo Prof. Dr. Bruno Horta realizar um estudo de ancoragem molecular com esses dois compostos e as enzimas estudadas, para verificar se há no sítio ativo algum fator que ajude a explicar os resultados obtidos.

As conversões mais altas (80-99%) e enantiosseletividades (78-99%) obtidas quando usada a cetona saturada 2-fenilbutanona em relação a sua análoga

insaturada, foram atingidas devido principalmente à diminuição da flexibilidade que a ligação dupla conferiu à cetona insaturada, que ocasionaram em um menor número de interações intramoleculares favorecidas no sítio ativo. A diferença de atividade da ATA de *V. fluvialis* quando comparada a ATA-256 foi principalmente ocasionada em decorrência da presença de quatro mutações pontuais V153S, K163L, S284A e A323T, que resultaram em interações intramoleculares mais favoráveis para a ATA-256, e diminuição da distância para ataque nucleofílico. A discussão com maior profundidade pode ser encontrada na publicação decorrente desses experimentos (TEIXEIRA et al., 2022).

5. Conclusões

No decorrer desse trabalho foi possível estudar a reação de aminação redutiva assimétrica de cetonas, empregando um conjunto de cinco ATAs recombinantes expressas em *E. coli*, as ATAs (*R*)-seletivas provenientes dos microrganismos *Aspergillus terreus* e *Mycobacterium vanbaalenii*, e as ATAs (*S*)-seletivas de *Chromobacterium violaceum*, *Ruegeria pomeroyi*, *Vibrio fluvialis*, e uma enzima comercial, a ATA-256 da Codexis, que é uma variante engenheirada de enzima de *V. fluvialis*.

Quando foi avaliado a presença de um heterociclo no composto furilmetilcetona, quando se comparando com a acetofenona, conseguimos observar um decréscimo na atividade frente à reação estudada, sendo que apenas a enzima de *M. vanbaalenii* foi capaz de converter a cetona em sua respectiva amina, com uma conversão modesta de 8%. Os resultados aqui obtidos ainda são preliminares, e um ponto de partida para que as condições reacionais possam ser otimizadas a fim de se obter um resultado mais interessante quando empregando-se esse composto.

Em relação ao estudo comparando-se a presença de insaturação na cetona α - β -insaturada 4-fenilbut-3-en-2-ona em relação a seu análogo sem insaturação 1-fenil-3-butanona, observamos que os resultados com o composto saturado foram superiores, com conversões (80 a 99%) e enantiosseletividade (78 a 99% ee) mais elevadas que para a cetona α - β -insaturada. O melhor resultado obtido para a 4-fenilbut-3-en-2-ona foi com a enzima ATA-256 da Codexis. Em estudo de ancoragem molecular foi possível observar que a diminuição da flexibilidade na molécula devido a sua insaturação foi o fator decisivo para a diminuição da atividade enzimática.

Capítulo 2

6. Introdução – Capítulo 2

6.1. Vias catalíticas para obtenção de amidas

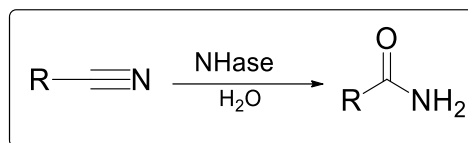
A obtenção de amidas é de grande interesse na indústria química e farmacêutica. Nos últimos 40 anos, 21,3% das reações empregadas na obtenção de fármacos envolveram a formação de uma amida (SCHNEIDER et al., 2016). Além disso, as amidas também são utilizadas como materiais de partida na obtenção de vários polímeros de importância econômica, como a poliacrilamida (AHMED; KNAPP; TYLER, 2011).

As metodologias clássicas para síntese de amidas a partir de nitrilas apresentam uma série de desvantagens, como alta demanda energética, condições reacionais extremas e a geração de coprodutos, como o ácido carboxílico formado na hidrólise da amida. A geração do ácido orgânico compromete o rendimento e também implica em etapas de purificação posteriores no processo, o que irá demandar mais recursos, como solventes e energia (AHMED; KNAPP; TYLER, 2011).

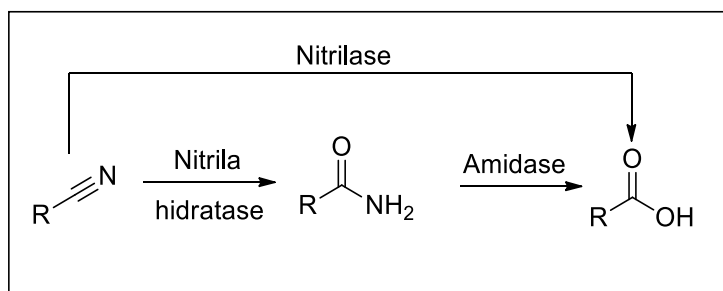
A importância de aprimoramento nas metodologias para obtenção de amidas foi enfatizada quando o Instituto Americano de Química Verde elencou “formação de amida evitando reagentes com baixa economia atômica” como um desafio para a química orgânica em 2007 (DORR; FUERST, 2018; PITZER; STEINER, 2016). Dessa maneira metodologias para obtenção de amidas de maneira ambientalmente amigável são de grande interesse na indústria.

6.2. Nitrilas hidratases

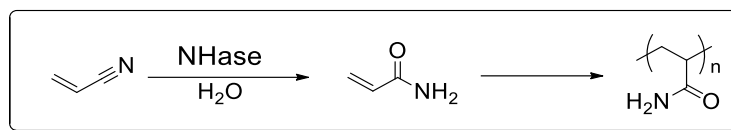
Dentre as abordagens biocatalíticas para obtenção de amidas destacam-se as nitrilas hidratases (NHases). As nitrilas hidratases (EC 4.2.1.84) são enzimas importantes no catabolismo de nitrilas, catalisando a reação de hidratação de uma nitrila em sua correspondente amida, como ilustrado no Esquema 7 (CHEN et al., 2009; DORR; FUERST, 2018; GONG et al., 2017).

Esquema 7. Reação catalisada pela NHase

Existem duas vias metabólicas principais para o catabolismo de nitrilas, como está ilustrado no Esquema 8. A primeira rota envolve uma reação direta, catalisada por uma enzima nitrilase (EC 3.5.5.1), que consiste de uma reação de hidrólise da nitrila diretamente ao ácido carboxílico correspondente, gerando como coproduto uma molécula de amônia (CHHIBA-GOVINDJEE et al., 2019). Já na segunda rota, a nitrila é primeiramente convertida em uma amida, por ação da nitrila hidratase, e a seguir ela é convertida no ácido carboxílico corresponde por ação de uma enzima amidase (EC 3.5.1.4) (GONG et al., 2017).

Esquema 8. Vias metabólicas para degradação de nitrilas

As NHases foram primeiramente reportadas no microrganismo *Rhodococcus rhodochrous* J-1 (antigamente identificado como *Arthrobacter* sp. J-1) por Asano e colaboradores, onde foi observada uma nova enzima com ação de degradação de acetonitrila (ASANO; TANI; YAMADA, 1980). Asano e colaboradores também desenvolveram uma metodologia para obtenção de acrilamida, a partir da acrilonitrila, catalisada por NHases, como ilustrado no Esquema 9 (ASANO; YASUDA; TANI, 1982; CHEN et al., 2009; PRASAD; BHALLA, 2010).

Esquema 9. Reação de obtenção da acrilamida para síntese da poliacrilamida

A acrilamida é um produto químico *commodity* usado como monômero na manufatura de poliacrilamida, um polímero que possui várias aplicações, entre elas na indústria petrolífera, em tratamento de água, e nas indústrias de papel e têxtil (DORR; FUERST, 2018). Sua síntese a partir da acrilonitrila, catalisada por nitrila hidratase, talvez seja um dos exemplos mais bem sucedidos da aplicação de uma rota biocatalítica na indústria (JIAO et al., 2020). Esse processo vem sendo realizado com sucesso há 40 anos e atualmente a acrilamida é obtida em uma quantidade superior a 600.000 toneladas por ano no processo catalisado por NHases (DORR; FUERST, 2018; KOBAYASHI; NAGASAWA; YAMADA, 1992).

6.3. Nitrilas hidratases: Estrutura, Ocorrência e Mecanismo

As nitrilas hidratases são metaloenzimas, dependentes de ferro não-heme de baixo spin (Fe^{3+}) ou de cobalto não corrinóide de baixo spin (Co^{3+}) (AHMED; KNAPP; TYLER, 2011; DORR; FUERST, 2018). A presença do íon metálico contribui para o melhoramento na capacidade de hidratação da nitrila além de auxiliar no dobramento da proteína, aumentando sua estabilidade (CHEN et al., 2009; GONG et al., 2017).

As NHases do tipo Fe ainda apresentam fotorreatividade regulada por um óxido nítrico endógeno. Quando incubadas no escuro a atividade da NHase é perdida, sendo completamente recuperada após irradiação luminosa (PEI et al., 2014). Nas enzimas tipo Fe a molécula de NO endógena permanece ligada ao Fe^{3+} no sítio ativo até receber irradiação luminosa, quando então o óxido nítrico é substituído por uma molécula de água ou OH^- , resultando na recuperação da atividade original da NHase (BANERJEE; SHARMA; BANERJEE, 2002). As NHases tipo Co não possuem fotorreatividade mediada por NO, sendo que no sítio de coordenação do metal há no lugar uma molécula de água (CHENG; XIA; ZHOU, 2020).

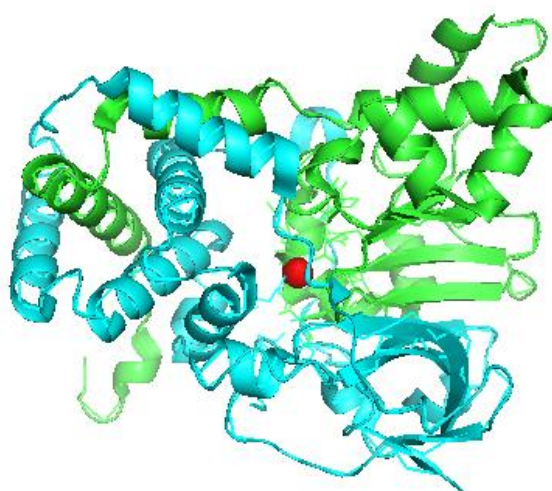
No que diz respeito à especificidade de substratos, era reportado na literatura que as nitrilas hidratases do tipo Fe possuíam uma maior predileção para as nitrilas

alifáticas, enquanto as NHases tipo Co atuam na hidratação de nitrilas aromáticas, embora estudos recentes indiquem que a especificidade pelo substrato não está ligada ao tipo de íon metálico na enzima (MASHWEU et al., 2020).

As nitrilas hidratases do tipo Fe possuem uma ocorrência menor do que as do tipo Co. A bactéria *Rhodococcus erythropolis* é o principal organismo produtor das NHases tipo Fe, sendo que essas enzimas também já foram reportadas nos microrganismos *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida* e *Bacillus* sp. Já as NHases tipo Co possuem uma ocorrência muito maior, sendo que a NHase de *Rhodococcus rhodochrous* é um exemplo de uma tipo-Co muito estudada e empregada. Outros exemplos de organismos em que já foram descobertas NHases com Co como íon metálico são *Pseudonocardia thermophila* e também em *P. putida* (CHENG; XIA; ZHOU, 2020).

Em relação à sua estrutura tridimensional, as NHases são constituídas por duas subunidades (subunidades α e β), sem homologia na sequência de aminoácidos, podendo existir na forma de um heterodímero $\alpha\beta$ ou um heterotetrâmero $\alpha_2\beta_2$ (GONG et al., 2017; KAYANUMA et al., 2015; PEI et al., 2017). O sítio ativo contendo o íon metálico se encontra na interface das subunidades (PEI et al., 2017). Na Figura 9 encontra-se representada uma NHase de *Bacillus* sp.

Figura 9. Representação da estrutura tridimensional de uma enzima Nitrila hidratase de *Bacillus* sp (PDB ID 2DPP).

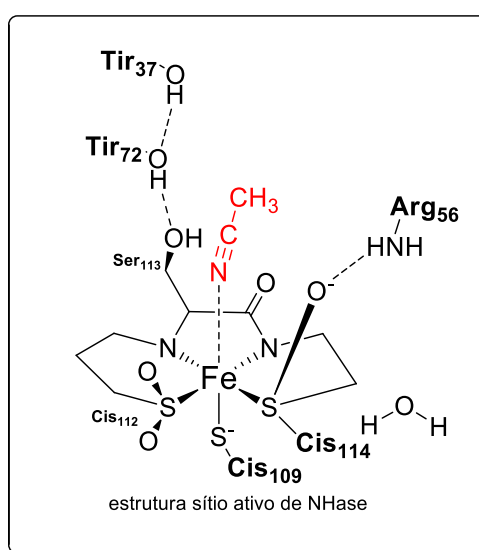


Fonte: Elaborada pela autora usando o software Pymol®.

(As subunidades a e b estão representadas em verde e azul, respectivamente. A esfera vermelha representa o cofator Co^{3+} .)

No sítio ativo das NHases o íon metálico está coordenado a três resíduos de cisteína altamente conservados, dois nitrogênios de amida e uma molécula de água (Figura 10) (GONG et al., 2017; GUMATAOTAO et al., 2013). Duas das cisteínas são modificadas em um processo pós-traducional a cisteína ácido sulfínico (Cys-SO₂H) e cisteína ácido sulfênico (Cys-SOH) (PEI *et al.*, 2017). Além disso, os resíduos de serina, tirosina e arginina também são conservados no sítio ativo (GONG et al., 2017).

Figura 10. Estrutura do centro metálico no sítio ativo de uma NHase

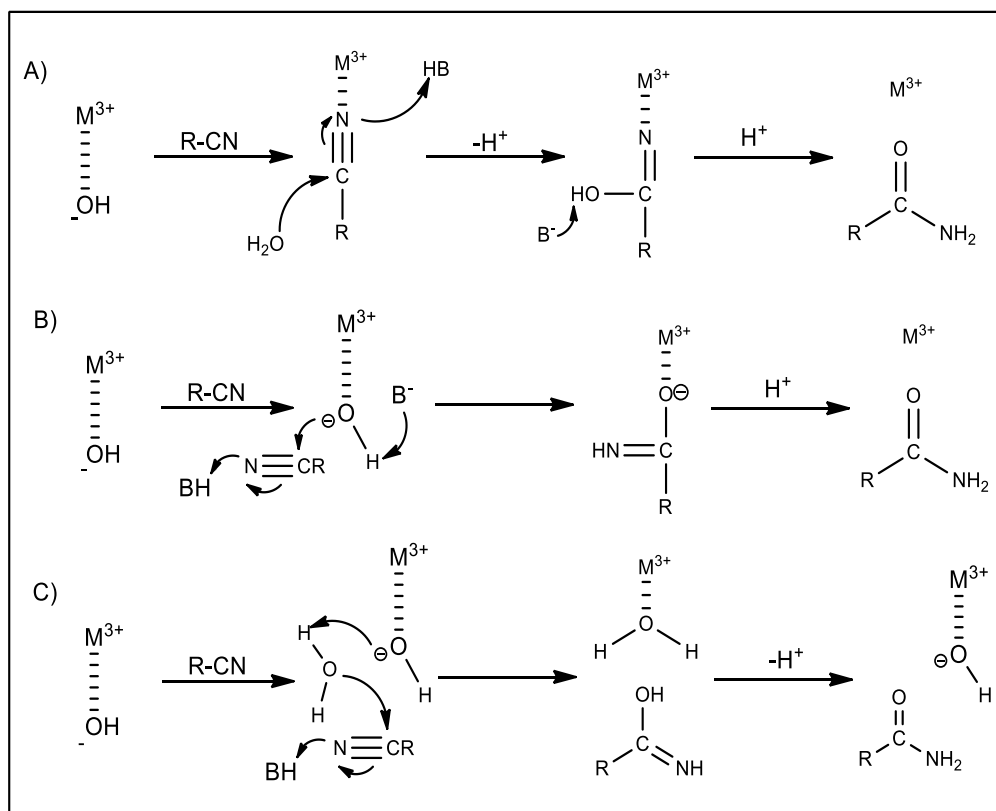


O mecanismo catalítico para essa enzima ainda não foi completamente elucidado, e algumas propostas mecanísticas foram reportadas na literatura. Existem três hipóteses principais de como a reação procede, I) o mecanismo de esfera interna, o II) mecanismo de esfera externa e III) o “novo” mecanismo de esfera externa, como está ilustrado no Esquema 10 (GONG et al., 2017).

Na primeira proposta (Esquema 10-a), o mecanismo procede via coordenação da nitrila do substrato ao átomo metálico, substituindo assim a molécula de água ou hidróxido que anteriormente estavam ligados ao íon metálico (HOPMANN; GUO; HIMO, 2007). Essa ligação enfraquece a ligação tripla CN e a torna mais suscetível ao ataque de uma molécula de água (GUMATAOTAO et al., 2013). Essa é a proposta mecanística que mais foi aceita, e os resíduos de aminoácidos, β Tyr72, α Ser113 e α Cys-SOH foram sugeridos como potenciais candidatos a atuarem como nucleófilos nessa reação (HOPMANN; HIMO, 2008; MITRA; HOLZ, 2007; YAMANAKA et al., 2010).

Na segunda proposta (Esquema 10-b), a hidrólise seria catalisada por um íon hidróxido, coordenado ao átomo metálico (PRASAD; BHALLA, 2010). Por fim, na terceira proposta mecanística (Esquema 10-c), a hidroxila coordenada ao átomo metálico ativaria uma molécula de água livre no sítio ativo, e esta molécula iria catalisar a hidrólise da nitrila (GONG et al., 2017; MITRA; HOLZ, 2007; YAMANAKA et al., 2010).

Esquema 10. As três possibilidades de mecanismo inicialmente propostos para as NHases



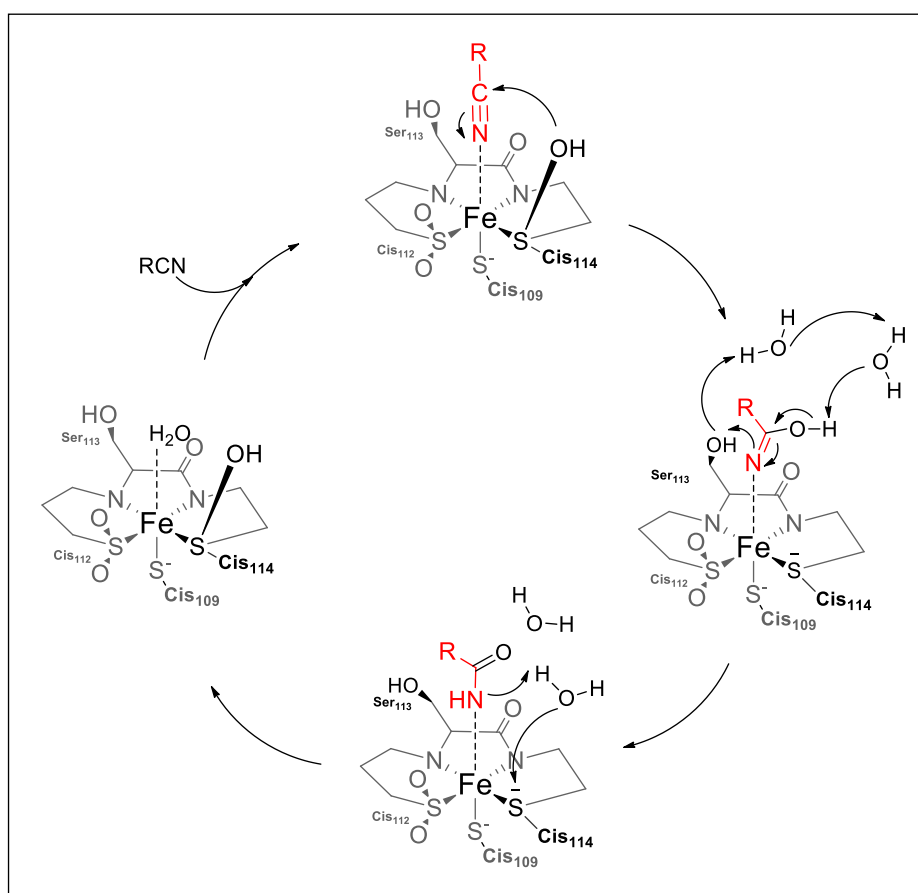
Fonte: Adaptado de (PRASAD; BHALLA, 2010)

Recentemente um quarto mecanismo foi proposto, em que o resíduo α Cys-SOH113 (nas NHases tipo Co) ou α Cys114-SOH (nas NHases tipo-Fe) atuaria como nucleófilo, sendo o responsável pelo ataque à nitrila. Os autores observaram que o oxigênio da carboxamida seria então oriundo desse aminoácido (NELP et al., 2016). Posteriormente, um estudo de mecânica quântica (Esquema 11) determinou o mecanismo de como essa reação aconteceria (PREJANÒ et al., 2017).

Quando o substrato nitrilado estiver coordenado ao átomo de Fe^{3+} ou Co^{3+} , o grupo hidroxila da Cys-SOH ataca o carbono nitrílico, e o par de elétrons é deslocado para o nitrogênio. Na próxima etapa, uma molécula de água atua como base,

abstraíndo o próton ligado ao oxigênio da hidroxila, possibilitando que a carbonila seja restaurada. Movido pela restauração da ligação dupla C=O, o par de elétrons da ligação dupla C=N é deslocado para o nitrogênio que, por sua vez, abstrai um próton do resíduo α Ser113. Após essa etapa, a amida é formada com auxílio de uma molécula de água, e o sítio ativo da enzima é restaurado para o próximo ciclo catalítico (PREJANÒ et al., 2017).

Esquema 11. Nova proposta mecanística para nitrilas hidratases (tipo Fe), com o resíduo Cys-SOH atuando como nucleófilo



Fonte: Adaptado de (PREJANÒ et al., 2017)

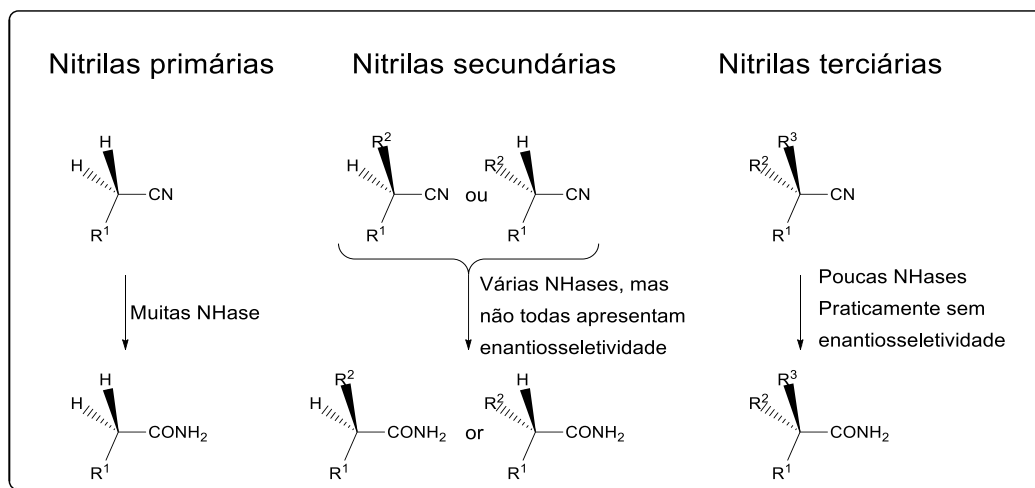
6.4. Nitrilas hidratases: limitações da enzima e áreas a serem exploradas

Apesar de já serem enzimas amplamente empregadas industrialmente, como mencionado antes, a maioria das NHases já reportadas na literatura apresentam a desvantagem de possuir baixa estabilidade térmica. Em geral, a temperatura operacional ótima dessas enzimas está em uma faixa entre 20 – 35 °C (PRASAD;

BHALLA, 2010). Por exemplo, as NHases de *P. chlororaphis* B23 e *Rhodococcus* sp. N-774 são instáveis em temperaturas acima de 20°C (CHENG; XIA; ZHOU, 2020). Além disso, a reação de hidratação de nitrilas é exotérmica, o que implicaria em geração de custos para manter os reatores em temperaturas mais baixas, limitando a aplicação dessas enzimas em nível industrial (CHENG; XIA; ZHOU, 2020). Entre as técnicas já empregadas para se aumentar a estabilidade desses biocatalisadores, incluem-se integração de pontes de dissulfeto, criação de pontes salinas na superfície da proteína (CHEN et al., 2012) e integração de peptídeos de automontagem às extremidades C- ou N- terminais da enzima (GONG et al., 2017; LIU et al., 2014a, 2014b).

As NHases já reportadas na literatura também apresentam baixa enantiosseletividade e aceitam uma gama de substratos reduzida (BHALLA et al., 2018). Em geral essas enzimas exibem preferência por nitrilas com pouca substituição no carbono alfa, reagindo melhor com nitrilas primárias como substrato, apresentando pouca atividade em nitrilas secundárias e terciárias, como pode ser observado na Figura 11 (PRASAD; BHALLA, 2010).

Figura 11. Perfil de substratos aceitos pelas NHases



Fonte: Elaborada pela autora.

7. Objetivos

Objetivo geral

Esse trabalho possui como objetivo identificar novas enzimas nitrilas hidratases, para atuar como biocatalisadores na conversão de nitrilas secundárias e terciárias e que sejam impedidas estericamente.

Objetivos específicos:

- Busca da nitrila hidratase de *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI-2094, fazendo uso de técnicas de bioinformática além de PCR investigativa.
- Mutagênese sítio dirigida na nitrila hidratase de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 com objetivo de alterar o sítio ativo dessa enzima, possibilitando reações com nitrilas impedidas estericamente.

8. Resultados e discussão

8.1. Primeira parte: A busca por uma nova nitrila hidratase – clonagem da NHase de *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI 2094

8.1.1. Busca pelo gene de nitrila hidratase na bactéria *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI 2094

Anteriormente, neste grupo de pesquisa, vinte e nove linhagens de bactérias coletadas de solos expostos ao herbicida benzonitrilado Totril® foram triadas para avaliar a presença de enzimas com potencial para degradação de nitrilas. As cepas microbianas que obtiveram melhores resultados nas reações de biodegradação, foram identificadas como sendo os microrganismos *Lysinibacillus boronitolerans* e *Bacillus cereus* (OLIVEIRA *et al.*, 2018). As linhagens dessas bactérias foram depositadas junto a CBMAI (Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria). Para este trabalho optou-se por prosseguir as análises de bioinformática com o microrganismo *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI-2094, devido à ausência de dados em reações biocatalíticas com esse microrganismo na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

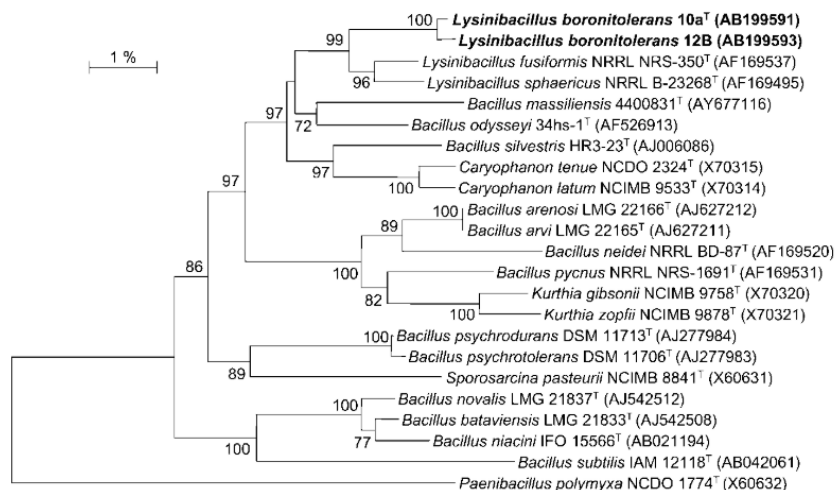
O sequenciamento e montagem do genoma foi realizado pela empresa BPI-Biotecnologia Pesquisa e Inovação LTDA, localizada em Botucatu – SP. As análises de bioinformática foram feitas em colaboração com o Dr. Jeronimo Conceição Ruiz, do laboratório de Informática de Biosistemas e Gênômica da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-MG).

8.1.2. Busca pelo gene de nitrila hidratase na bactéria *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI 2094 via análises de bioinformática

A montagem do genoma de *L. boronitolerans* fornecida pela BPI já possui um nível de organização superior às montagens depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para esse microrganismo. O arquivo originado na montagem foi reordenado e orientado de acordo com o genoma do organismo filogeneticamente próximo *Lysinibacillus sphaericus* C3-41, como pode ser observado

na Figura 12 (AHMED et al., 2007), gerando uma pseudomolécula do genoma bacteriano.

Figura 12. Árvore filogenética de *Lysinibacillus boronitolerans*



Fonte: (AHMED et al., 2007)

Para essa etapa de ordenamento e orientação do genoma foi utilizado o algoritmo de alinhamento ABACAS (ASSEFA et al., 2009). O microrganismo *Lysinibacillus fusiformis* RB-21 também foi considerado nesta etapa, porém o alinhamento com *L. sphaericus* resultou em um maior número de fragmentos do genoma (*scaffolds*) alinhados.

Após a ordenação e orientação do genoma foi realizada a predição gênica, etapa necessária para que as regiões da molécula referentes a possíveis genes sejam identificadas. Para a etapa de predição gênica foi utilizado o pipeline para anotação automática de genomas bacterianos FgenesB (SOLOVYEV; SALAMOV, 2010). Para a pseudomolécula do genoma de *L. boronitolerans* foram preditas pelo Fgenesb um total de 4.471 CDS's (CDS – *Coding sequence* – sequência codificante proteína).

Com auxílio do software Artemis, as 4.471 CDS's preditas tiveram suas sequências traduzidas a aminoácidos para realização de busca por similaridade de sequências contra bancos de proteínas usando o algoritmo BLASTp (ALTSCHUL et al., 1990). O primeiro *hit* de cada sequência de busca foi selecionado, e montou-se um arquivo tabular contendo essas informações. A busca pelo parâmetro “nitrile hydratase”, do inglês para nitrila hidratase, não produziu resultados para as buscas contra nenhum dos bancos de dados.

Como essa primeira busca não retornou resultados positivos para a presença da enzima de interesse, foram feitas buscas adicionais usando as estratégias InterProScan, BLAST2GO e OrthoMCL.

O InterPro fornece análise funcional de sequências de proteínas, classificando-as em famílias e prevendo a presença de domínios e outros locais importantes. Por meio do InterproScan foram feitas buscas contra as bases de dados CDD, Pfam e Superfamily. Apesar de não terem sido encontrados hits positivos para a enzima nitrila hidratase, a ferramenta conseguiu identificar uma sequência referente à uma proteína chaperona, que atua como ativadora para a NHase.

O BLAST2GO é uma ferramenta que, combinando o uso de BLAST contra o banco de dados do consórcio Gene Ontology, faz análises funcionais nos genes e produtos gênicos, estabelecendo relações e classificando-os nos seguintes níveis: 1) o compartimento celular em que o gene é expresso; 2) a função biológica do produto associado a ele; e 3) os processos biológicos de que o produto gênico participa. Fazendo-se uso dessa estratégia, os genes referentes às enzimas de *L. boronitolerans* foram localizados e classificados de acordo com seu EC Number. Usando-se essa abordagem, também não foi possível encontrar o gene responsável pela codificação da NHase.

O OrthoMCL é um algoritmo capaz de identificar grupos ortólogos de proteínas entre dois ou mais organismos, encontrando assim regiões que preservam o conteúdo gênico em vários genomas. Foi realizada uma busca do tipo “todos contra todos”, usando os genomas de *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI-2094, *Lysinibacillus sphaericus* C3-41, *Lysinibacillus fusiformis* RB-21, *Rhodococcus erythropolis* BG43 e *Bacillus cereus* ATCC 14579, além de sequências de enzimas nitrilas hidratases depositadas no Uniprot, não gerando resultados positivos para a busca da enzima nitrila hidratase em *L. boronitolerans*.

Por fim, como com as metodologias anteriores não foi possível localizar o gene de interesse, optou-se por fazer um tBLASTn, onde as sequências de busca estão no formato de nucleotídeo e são traduzidas a proteína para a busca contra uma base de dados de proteínas. Como parâmetro de entrada, foi utilizada a pseudomolécula do genoma de *L. boronitolerans* como um todo, contra sequências depositadas de enzimas nitrilas hidratases no Uniprot. Decidimos por utilizar o genoma completo de *L. boronitolerans*, e não apenas as CDS's já preditas, para verificar se a predição com o FgenesB deixou de incluir a sequência de interesse. Usando-se essa metodologia,

mesmo diminuindo os graus de confiança da busca, não foi possível localizar o gene de interesse.

8.1.3. Busca pelo gene de nitrila hidratase na bactéria *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI 2094 via reação em cadeia da polimerase (PCR) investigativa

Como as análises de bioinformática não conseguiram identificar o gene que codifica a nitrila hidratase no genoma de *L. boronitolerans*, optou-se por realizar uma reação em cadeia da polimerase (PCR) investigativa, para mais uma tentativa de localização da sequência codificante de nitrila hidratase nesse organismo. Foi utilizada a metodologia proposta por Precigou e colaboradores para identificação de genes de nitrila hidratase em genomas completos bacterianos a partir de PCR (PRECIGOU; GOULAS; DURAN, 2001).

Foram usados dois pares de primers, um específico para nitrilas hidratases do tipo Ferro, e um para nitrilas hidratases do tipo Cobalto. Os primers foram sintetizados pela empresa Exxtend, e suas sequências 5'-3' se encontram na **Tabela 4**. Esses primers foram projetados possuindo como base sequências altamente conservadas encontradas na região codificadora da subunidade α , correspondente ao local de ligação do metal (PRECIGOU; GOULAS; DURAN, 2001).

Tabela 4. Primers usados na PCR investigativa

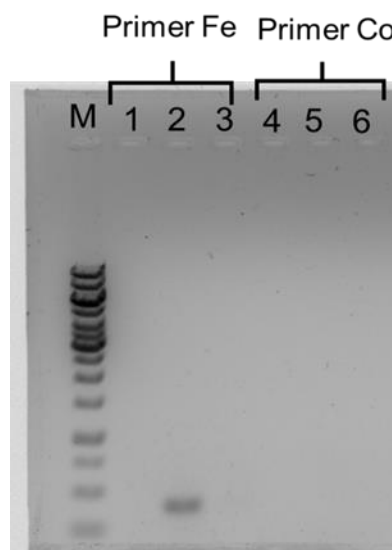
	Primers	Sequência (5'-3')
Primer Fe	NHFe1	CCCGACGGTTACGTCTGAG
	NHFe2	CCATGTAGCGAGTTTCGGCG
Primer Co	NHCo1	GTCGTGGCGAAGGCCTGG
	NHCo2	GTCGCCGATCATCGAGTC

As condições usadas nas reações de PCR também foram as otimizadas por Precigou e colaboradores, e encontram-se na Parte Experimental. (PRECIGOU; GOULAS; DURAN, 2001).

Ao todo foram feitas seis PCRs, três com primer para NHase de Ferro, e três com primer para NHase de Cobalto. As três reações com cada primer totalizaram: uma reação com o DNA de interesse (de *L. boronitolerans*), um controle positivo

(NHase de *R. erythropolis* do tipo Fe) e um controle negativo (sem adição de DNA). O gel de agarose contendo as seis reações de PCR encontra-se na Figura 13.

Figura 13. Gel de agarose (0,8%) das amplificações por PCR dos genes codificadores de NHase



M=marcador de massa molecular; Linhas 1-3: Reações com primer Fe (1 – *L. boronitolerans*, 2 – *R. erythropolis*, 3 – controle negativo); Linhas 4-6 reações primer Co (4 – *L. boronitolerans*, 5 – *R. erythropolis*, 6 – controle negativo).

Como pode ser observado na figura acima, a única amplificação que aconteceu foi a do controle positivo: a reação com o primer para NHases do tipo Fe e o DNA plasmidial contendo a NHase de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, que é uma nitrila hidratase do tipo Ferro.

O resultado obtido através dessa abordagem corroborou o obtido via análises de bioinformática. As possibilidades de conclusões obtidas nessa etapa são: i) existe uma nitrila hidratase no microrganismo *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI 2094, porém ela é muito diferente das descritas na literatura, e, portanto, não pode ser identificada; ii) houve um resultado falso positivo na triagem funcional realizada anteriormente neste grupo de pesquisa (OLIVEIRA *et al*, 2018); iii) se o resultado da triagem funcional não foi falso positivo pode ter ocorrido uma contaminação da cultura de microrganismo armazenada no laboratório. Com base nos resultados obtidos optou-se por não dar continuidade com as pesquisas com o microrganismo *Lysinibacillus boronitolerans*.

8.2. Segunda parte: Reações com a nitrila hidratase de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

8.2.1. Estudo do efeito do cossolvente e sua influência na reação de hidratação enzimática de nitrilas

As reações enzimáticas são realizadas, na maior parte dos casos, em fases aquosas, cujo pH é mantido constante com a ação de um tampão. Entretanto as moléculas orgânicas são, na maioria das vezes, pouco solúveis nesses sistemas, e o uso de um cossolvente, normalmente um solvente orgânico, torna-se necessário para auxiliar na solubilização do substrato nas reações biocatalíticas.

Anteriormente, nesse grupo de pesquisa, foi avaliado a ação da enzima nitrila hidratase de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 expressa heterologicamente em *E. coli* em um escopo de nitrilas (MORAES, 2019). Nesse trabalho foi observado que, para as nitrilas com maior solubilidade em água, a conversão do substrato em produto foi excelente, atingindo conversões maiores que 99%. Entretanto, para aquelas com menor solubilidade as conversões obtidas foram modestas. A fim de testar essa hipótese, e verificar se a solubilidade dos compostos estava afetando a sua disponibilidade para a enzima, propusemos aumentar a quantidade do cossolvente utilizado (DMSO) de 0,05% para 1%. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.

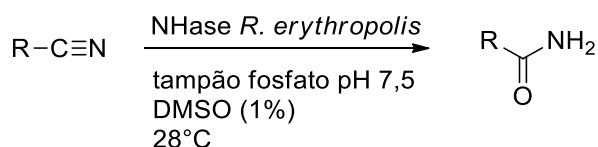
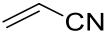
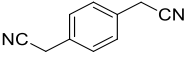
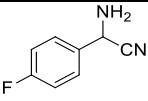
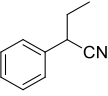
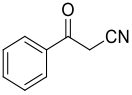
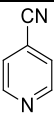
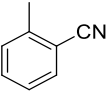


Tabela 5. Comparação da porcentagem de cossolvente DMSO nas reações de hidratação enzimática de nitrilas

Entrada	Substrato ^a	Conversão (0,05% DMSO) ^{b,c}	Conversão (1% DMSO) ^b
1	 acrilonitrila	0	0
2	 1,4-fenilenodiacetonitrila	21%	>99%
3	 2-amino-2-(4'-fluorofenil)acetonitrila	88%	95%
4	 2-fenilbutironitrila	11%	>99%
5	 benzoilacetonitrila	1%	33%
6	 4-cianopiridina	0	9,4%
7	 o-tolunitrila	>99	>99

a- Condições reacionais: 1,5 g de células úmidas, 0,2 mmol substrato, 1% DMSO, 100 mM tampão fosfato pH 7,5, 28°C, 24 h. b-Determinada por GC-FID; c- conversão para acrilonitrila determinada via HPLC-PAD

Como pode ser observado, a adição de maior quantidade de DMSO ao meio reacional não influenciou negativamente a enzima, causando desnaturação ou

inibição da mesma. De modo geral, a presença de maior quantidade de DMSO afetou positivamente a todos os substratos, com exceção da acrilonitrila (Entrada 1 – Tabela 5).

Os compostos das entradas 2 e 4 apresentaram excelentes conversões, passando de 21 e 11%, respectivamente, a conversões >99%. O composto 1,4-fenilenodiacetonitrila (Entrada 2) foi totalmente convertido na monoamida correspondente, o que demonstrou uma excelente regiosseletividade da NHase de *R. erythropolis* ATCC 4277.

Em relação a 2-fenilbutironitrila (Entrada 4), pode ser visto que a questão da solubilidade do substrato também afetou o resultado da reação, pois os resultados melhoraram de 11% para conversão >99% em 2-fenilbutiramida em 24 horas. Esses últimos resultados também são interessantes visto que, em baixas concentrações de DMSO, quando o substrato não estava totalmente disponível para a enzima, a amida apresentou um ee de 60%, favorecendo a formação do enantiômero (S) (MORAES, 2019). Com o aumento da solubilidade do composto no meio reacional, auxiliado pelo cossolvente, o substrato foi totalmente convertido na sua respectiva amida, desaparecendo com a enantiosseletividade da enzima.

Para a nitrila 2-amino-2-(4'-fluorofenil)acetonitrila (Entrada 3), a conversão também foi ligeiramente melhorada, subindo de 88% a 95% de formação da amida em 24 horas. No caso dos compostos das entradas 5 e 6, pudemos verificar que a conversão aumentou com o aumento de cossolvente, entretanto os valores ainda são modestos, indicando que a solubilidade não é o único fator a ser considerado nesses casos.

Para o composto da Entrada 6, 4-cianopiridina, esse substrato em experimentos anteriores não apresentou conversão para a sua respectiva amida e, com o aumento do cossolvente, foi possível atingir uma conversão de 9% na amida 4-piridinacarboxamida.

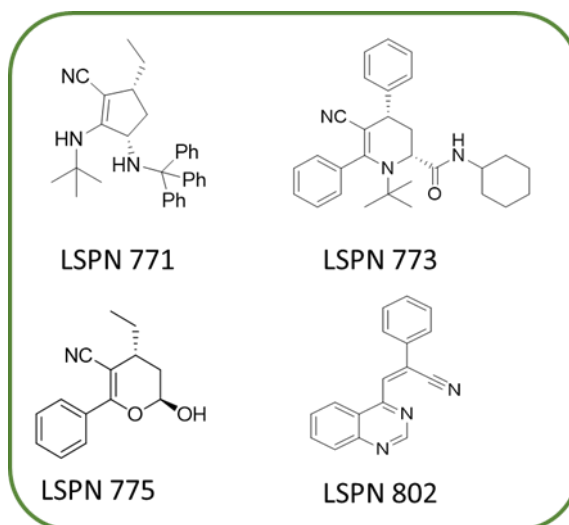
Por fim, foi também avaliada como substrato para essa enzima a nitrila *o*-tolunitrila (Entrada 7), que não estava no escopo de substratos do trabalho original (MORAES, 2019). Com a *o*-tolunitrila, que difere da benzonitrila devido a um grupo metil em posição *orto* a nitrila, a conversão para *o*-toluamida se manteve a mesma obtida em reação com a benzonitrila (superior a 99%) (MORAES, 2019), indicando que o aumento do impedimento estérico próximo ao grupo nitrila não afeta essa reação. Nesse caso, a solubilidade do substrato não foi um fator importante para o

resultado da reação, visto que se manteve superior a 99% nas duas concentrações de DMSO.

8.2.2. Reações com escopo de substratos estericamente impedidos

Em colaboração com a Profa. Dra. Arlene G. Correa (DQ/UFSCar) foi realizado um estudo em um escopo de substratos estericamente impedidos. Foram utilizados quatro compostos nitrilados, cujas estruturas estão representadas na Figura 14, para serem avaliados em relação a reação de hidratação enzimática de nitrilas com a enzima nitrila hidratase de *R. erythropolis* ATCC 4277. Esses compostos possuem características desafiadoras para a enzima: as nitrilas são secundárias, são volumosos e, no caso do LSPN 802, são planares com alta conjugação de ligações duplas.

Figura 14. Compostos nitrilados enviados pela Profa. Dra. Arlene G. Correa



Fonte: Elaborada pela autora

Neste caso, por serem compostos com solubilidade ainda menor em água, optou-se por elevar a quantidade de DMSO utilizada de 1% para 5%. Como pode ser previsto pela estrutura desses compostos, eles de fato foram desafiadores para a enzima estudada, não sendo possível obter nenhuma conversão das nitrilas em amidas, como pode ser observado pelos resultados de conversão listados na Tabela 6. Uma possibilidade de se contornar esse problema, e obter uma atividade da enzima

com esses compostos, seria a realização de engenharia de proteínas nessa enzima, visando um aumento de seu sítio ativo para acomodação de nitrilas volumosas.

Tabela 6. Reações de hidratação enzimática de nitrilas volumosas com NHase de *R. erythropolis*

Substrato	Conversão (%)^b
LSPN 771	n.r
LSPN 773	n.r
LSPN 775	n.r
LSPN 802	n.r

n.r = não reagiu. Condições reacionais: 1,5 g de células úmidas, 5 mg substrato, 5% DMSO, 100 mM tampão fosfato pH 7,5, 28°C, 24 h. b-Determinada por GC-FID

8.3. Terceira parte: Estudos de mutagênese sítio dirigida na nitrila hidratase de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

Como mencionado na Introdução desse capítulo, embora as NHases sejam bons catalisadores para a reação de hidratação de nitrilas, reagindo em condições reacionais mais brandas e evitando a formação de coprodutos quando comparadas as metodologias químicas, a aplicação das NHases ainda possui algumas limitações. Até o momento, a maioria das NHases selvagens já reportadas na literatura apresentam baixa estabilidade térmica, baixa enantiosseletividade e aceitam uma gama de substratos reduzida, preferindo nitrilas primárias como substrato (BHALLA et al., 2018; SUPREETHA et al., 2019).

Tendo em vista as limitações das NHases reportadas na literatura, optamos por explorar o escopo de substratos aceitos pela enzima, expandindo-o. Para isso, utilizamos como biocatalisador a NHase de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, previamente clonada neste grupo de pesquisa (MORAES, 2019).

Para isso, foi escolhida como estratégia para inserção das mutações na enzima a mutagênese sítio-dirigida, uma das técnicas baseadas na estratégia de *design* racional. Na mutagênese sítio dirigida mutações pontuais são inseridas nas proteínas de interesse em uma PCR usando *primers* contendo as mutações (SILOTO; WESELAKE, 2012).

O foco de inserção das mutações foi no sítio ativo da enzima, de modo a aumentar o espaço ali disponível, assim permitindo que compostos mais volumosos, entre eles nitrilas secundárias e terciárias, possam ser usados como substrato pela NHase.

8.3.1. Estudos de ancoragem molecular com a enzima nitrila hidratase recombinante de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

8.3.1.1. Determinação dos resíduos de aminoácidos a sofrerem mutações

Para a realização dos ensaios de ancoragem molecular, foi selecionada a proteína de entrada “PDB ID 2qdy”, do Protein Data Bank (SONG et al., 2007), correspondente à nitrila hidratase de *Rhodococcus erythropolis* AJ270. Para verificar a semelhança das estruturas entre essa proteína e a NHase *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 foi feito um alinhamento de sequências. O alinhamento da subunidade alfa da enzima está na Figura 15 e da subunidade beta na Figura 16.

Figura 15. Alinhamento de sequências da subunidade alfa entre as NHases de *Rhodococcus erythropolis* AJ270 (entrada CAG29809.1) e *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 (entrada MH732727)

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

CAG29809.1	MSVTIDHTTENAAPAQPVSDRAWALFRALDGGKGLVPDGYVEGWKKTFEEDFSPRRGAEL	60
MH732727	MSVTIDHTTENAAPAQPVSDRAWALFRALDGGKGLVPDGYVEGWKKTFEEDFSPRRGAEL	60

CAG29809.1	VARANTDPEFRQLLLTDGTAAVAQYGYLGPQGEYIVAVEDPTLKNVIVCSLCSCETANPI	120
MH732727	VARANTDPEFRQLLLTDGTAAVAQYGYLGPQGEYIVAVEDPTLKNVIVCSLCSCETANPI	120

CAG29809.1	LGLPPTWYKSFYRVRVREPRKVLSEMGTEIASDVEIRVYDTTAETRYMVLQRPAGTE	180
MH732727	LGLPPTWYKSFYRVRVREPRKVLSEMGTEIASDVEIRVYDTTAETRYMVLQRPAGTE	180

CAG29809.1	GWSQEQLQEIVTKDCLIGVAIPQVPTV	207
MH732727	GWSQEQLQEIVTKDCLIGVAIPQVPTV	207

Fonte: Elaborada pela autora usando a ferramenta Clustal Omega

Os resíduos de aminoácidos destacados em amarelo possuem diferenças nas sequências de aminoácidos

Figura 16. Alinhamento de sequências da subunidade beta entre as NHases de *Rhodococcus erythropolis* AJ270 (entrada CAG29810.1) e *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 (entrada MH732728)

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

CAG29810.1  MDGVHDLAGVQGFQKVPHTVNADIGPTFHAWEHLPSLMFAGVAELGAFSVDEVRYWVE  60
MH732728    MDGVHDLAGVQGFQKVPHTVNADIGPTFHAWEHLPSLMFAGVAELGAFSVDEVRYWVE  60
*****

CAG29810.1  RMEPRHYMTFYERYVIGVATLMVEKGILTQDEESLAGGPFPLSRPSESEGRPAVET  120
MH732728    RMEPRHYMTFYERYVIGVATLMVEKGILTQDEESLAGGPFPLSRPSESEGRPAVDT  120
*****

CAG29810.1  TTFEVGQRRVRDEYVPGHIRMPAYCRGRVGTISHRTTEKWPFPDAIGHGRNDAGEEPTY  180
MH732728    TTFEVGQRRVRDEYVPGHIRMPAYCRGRVGTISHRTTEKWPFPDAIGHGRNDAGEEPTY  180
*****

CAG29810.1  HVTFAAEELFGSDTDGGSVVVDLFEGLYPAA  212
MH732728    HVTFAAEELFGSDTDGGSVVVDLFEGLYPAA  212
*****

```

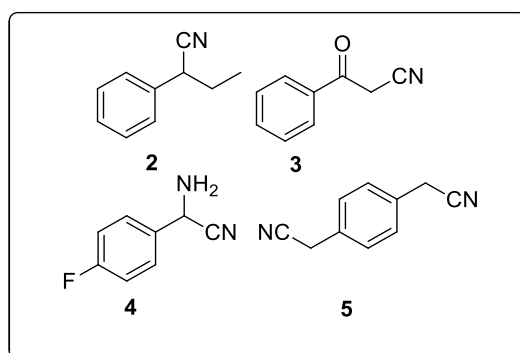
Fonte: Elaborada pela autora usando a ferramenta Clustal Omega

Os resíduos de aminoácidos destacados em amarelo possuem diferenças nas sequências de aminoácidos

Como não houveram diferenças significativas entre as sequências das duas proteínas, e nenhuma delas aconteceu no sítio ativo da enzima, decidiu-se por usar a entrada PDB 2qdy nos estudos de ancoragem molecular.

Para estudar quais resíduos de aminoácidos no sítio ativo contribuem para gerar impedimento estérico no local, optamos por primeiramente fazer os experimentos de ancoragem molecular utilizando o escopo de nitrilas da Figura 17, que foi previamente estudado em reações com a enzima selvagem (sem mutações).

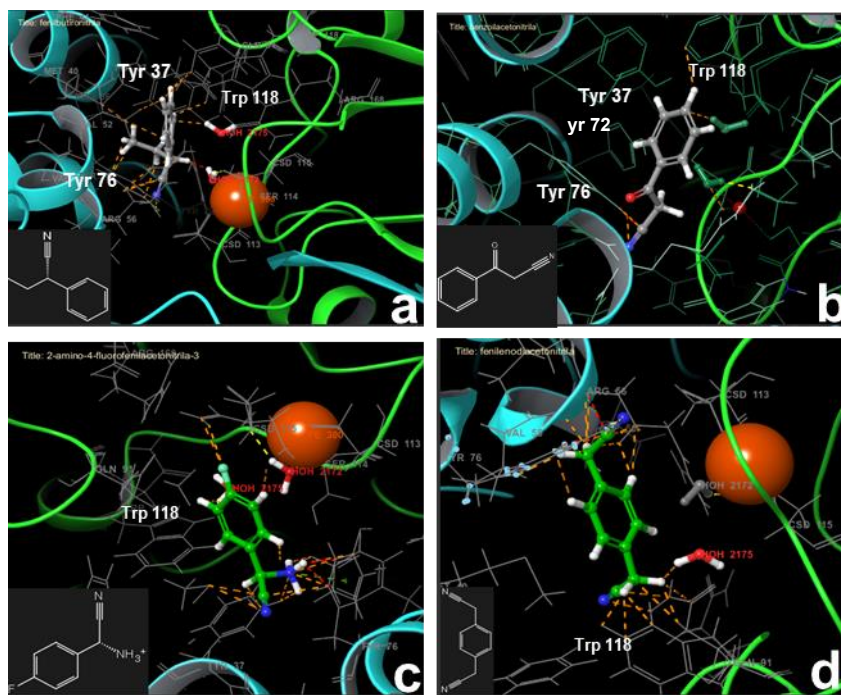
Figura 17. Nitrilas utilizadas nos primeiros estudos de ancoragem molecular



O objetivo dos *dockings* iniciais consistiu em verificar quais os resíduos que faziam interações negativas com os substratos **2-5**, focando nos resíduos com cadeia

lateral volumosa. Na Figura 18 estão sumarizadas as imagens de ancoragem molecular dos substratos **2-5** com a enzima selvagem.

Figura 18. Dockings com a NHase selvagem de *Rhodococcus erythropolis*.



Fonte: elaborada pela autora usando o software Maestro ®

Como pode ser observado pela Figura 18, nessa fase inicial foram identificados quatro resíduos volumosos no sítio ativo que acarretaram em interações negativas com os substratos: três tirosinas (Tyr37, Tyr72 e Tyr76) pertencentes à cadeia beta da enzima, e um resíduo de triptofano (Trp118) pertencente à cadeia alfa. Esses resíduos foram então selecionados como opções para a construção dos mutantes, e submetidos à novos experimentos de ancoragem molecular com as proteínas mutantes e uma nitrila secundária mais volumosa, a difenilacetoneitrila.

8.3.1.2. Dockings com as enzimas mutantes e difenilacetoneitrila

Como os experimentos anteriores indicaram, foram escolhidos quatro aminoácidos para sofrerem as mutações separadamente: Tyr37, Tyr72, Tyr76 e Trp118. Inicialmente, optamos por construir quatro variantes para cada mutação, substituindo o aminoácido selecionado por: alanina, serina, histidina e aspartato.

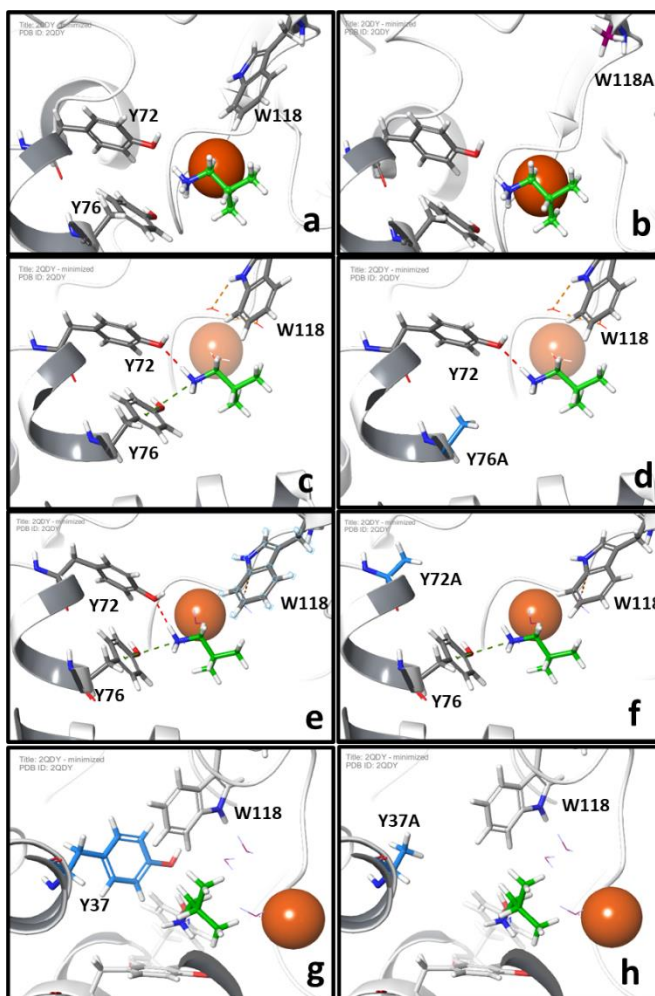
Esses aminoácidos foram selecionados por englobar o grupo dos aminoácidos apolares, polares, aromáticos e carregados. Além disso, todos os resíduos selecionados para construção dos mutantes possuem menor impedimento estérico que os aminoácidos originais. Assim, as proteínas mutantes, construídas no software Maestro®, estão relacionadas na Tabela 7.

Tabela 7. Variantes construídas no software Maestro®

Posição	Variante
Tyr37	Y37A, Y37S, Y37H, Y37D
Tyr72	Y72A, Y72S, Y72H, Y72D
Tyr76	Y76A, Y76S, Y76H, Y76D
Trp118	W118A, W118S, W118H, W118D

Na Figura 19 estão ilustradas as diferenças entre a enzima selvagem e as variantes das proteínas com a substituição dos aminoácidos indicados por um resíduo de alanina. Como pode-se notar pelas imagens a seguir, a substituição acarreta em um aumento do sítio ativo da enzima.

Figura 19. Comparação no sítio ativo entre a enzima selvagem e a enzima mutante hipotética

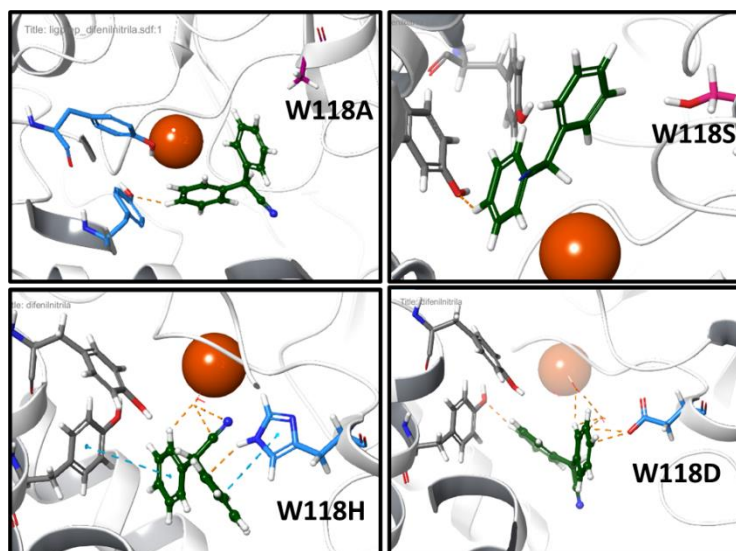


Fonte: elaborada pela autora usando o software Maestro ®.

Em verde em todas as imagens: isobutironitrila. (a, c, e, g) = representam a enzima selvagem e (b, d, f, h) representam as variantes substituindo-se cada um dos aminoácidos por alanina.

Foram feitas ancoragens moleculares com cada uma das variantes enzimáticas e a difenilacetona. Nas mutações com o resíduo triptofano 118, o aminoácido de maior cadeia lateral do sítio ativo, foi possível ancorar o composto nas quatro variantes obtidas, como pode ser visualizado na Figura 20. Esses resultados preliminares indicam que as mutações substituindo esse resíduo por algum dos quatro aminoácidos selecionados permitirão que substratos mais volumosos se acomodem no sítio ativo da enzima.

Figura 20. Variantes enzimáticas do triptofano 118.



Fonte: elaborada pela autora usando o software Maestro ®

Em relação às variantes enzimáticas com a tirosina 76, nas variantes Y76A, Y76S e Y76D foi possível ancorar **1** no sítio ativo, já com o mutante Y76H isso não ocorreu. Tal fato pode ser justificado pela proximidade de tamanho da cadeia lateral da tirosina e da histidina. O mesmo fato aconteceu com a tirosina 37, onde nas variantes Y37A, Y37S e Y37D foi possível ancorar a difenilnitrila, e na variante Y76H isso não foi possível.

Já as mutações com a tirosina 72 não foram bem sucedidas, não sendo possível ancorar a difenilnitrila com nenhuma das variantes enzimáticas geradas. Esse resíduo também representa um importante papel no ciclo catalítico da enzima, e, portanto, não seria um candidato adequado a mutagênese sítio dirigida, devido a possibilidade de alteração na atividade enzimática (HOPMANN; HIMO, 2008).

Para direcionar os estudos de mutagênese, optamos por, a princípio, investir nas mutações com o triptofano 118, já que este é o aminoácido de maior cadeia lateral do sítio ativo e em todas as variantes foi possível ancorar a nitrila impedida estericamente difenilnitrila.

8.3.1.3. Construção de modelos para as variantes W118A, W118S, W118H e W118D

A fim de ter uma previsão mais robusta se as variantes enzimáticas W118A, W118S, W118H e W118D seriam proteínas estáveis, foram criados modelos proteicos usando o software Modeller® (ŠALI; BLUNDELL, 1993). Para cada uma das variantes foi selecionado o modelo proteico com a menor energia livre, e foram plotados gráficos de Ramachandran para cada um deles. Os gráficos de Ramachandran das variantes enzimáticas bem como da enzima selvagem (sem mutações) encontram-se nos Anexos.

O gráfico de Ramachandran representa todas as combinações possíveis de ângulos diédricos Ψ versus ângulos de torção ϕ nos aminoácidos de uma cadeia polipeptídica, medindo as combinações mais estáveis de ângulos C alfa-N e C alfa-C (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963). De acordo com o gráfico de Ramachandran, um modelo de boa qualidade deve ter no mínimo 90% dos aminoácidos na região “mais favorecida” do gráfico, o que aconteceu para as quatro variantes geradas, indicando que as proteínas geradas serão estáveis.

Foi também plotada uma sobreposição entre a enzima selvagem e os quatro modelos das variantes W118A, W118S, W118H e W118D. Como pode ser observada pela imagem da Figura 21, a inserção das mutações causa uma mudança na alfa hélice, abrindo-a para a direita. A variante W118A foi a que apresentou o maior desvio da alfa hélice original, provavelmente devido ao menor tamanho da cadeia lateral da alanina (que é de apenas um grupo metila).

Figura 21. Sobreposições da enzima selvagem com as variantes enzimáticas



Fonte: elaborada pela autora usando o software Pymol®.

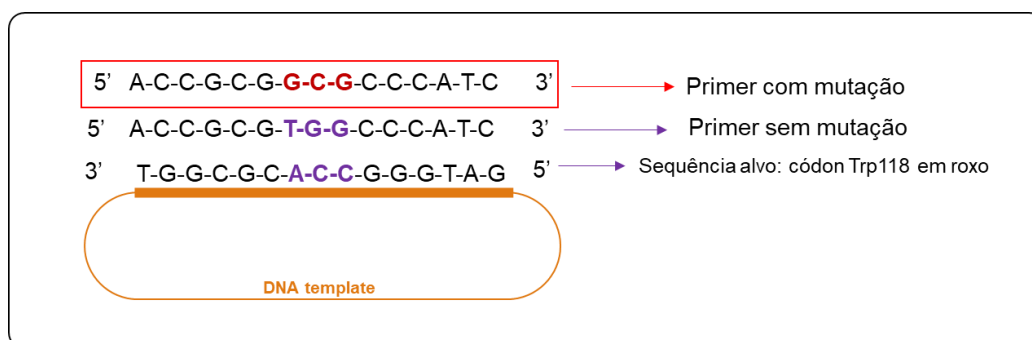
Legenda: enzima selvagem (verde), variantes enzimáticas W118A (azul), W118S (rosa claro), W118H (amarelo) e W118D (magenta). Em vermelho está selecionada a posição 118.

8.3.2. Mutagênese sítio dirigida para obtenção dos mutantes

8.3.2.1. Desenho dos *primers* para a mutagênese sítio dirigida

Na técnica de mutagênese sítio dirigida, com o auxílio dos *primers* contendo a mutação desenhados, é inserido um erro na PCR de modo que a mutação pontual de interesse seja ali inserida. Para isso, a sequência que seria usada no *primer* sem as mutações sofre uma pequena alteração nos pares de bases nitrogenadas originais, de modo que passem a codificar um outro aminoácido de interesse. Na Figura 22 está ilustrado como a inserção da mutação ocorre.

Figura 22. Desenho dos primers para PCR com mutagênese sítio dirigida



Fonte: Elaborada pela autora

Levando em consideração que a enzima DNA polimerase faz síntese da nova cadeia de nucleotídeos no sentido da extremidade 5'→3', o *primer forward* (que é o representado na figura) é desenhado de modo a ser complementar a fita 3'→5'. O *primer* sem a mutação (sequência do meio - Figura 22) tem todas as bases complementares às da fita 3'→5' do DNA molde. Já o *primer* com a mutação tem uma ligeira diferença, como pode ser visto na Figura 22. Em vermelho, o códon que deveria ser referente ao Trp118 (TGG) foi substituído pelo códon “GCG”, que codifica a alanina. Dessa maneira, as mutações pontuais de interesse podem ser inseridas na PCR.

Foram então desenhados *primers* contendo as mutações desejadas, com os códons para alanina, serina, histidina e aspartato. Na metodologia empregada, para uma maior taxa de sucesso na inserção correta dessas mutações, elas devem estar localizadas no meio do oligonucleotídeo, com aproximadamente dez pares de bases em cada extremidade. Além disso, os *primers forward* e *reverse* não devem ser totalmente sobrepostos, mas apresentar uma sobreposição parcial das bases nitrogenadas (XIA et al., 2015). Os *primers* para as mutações estão sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8. Primers para realização das mutações

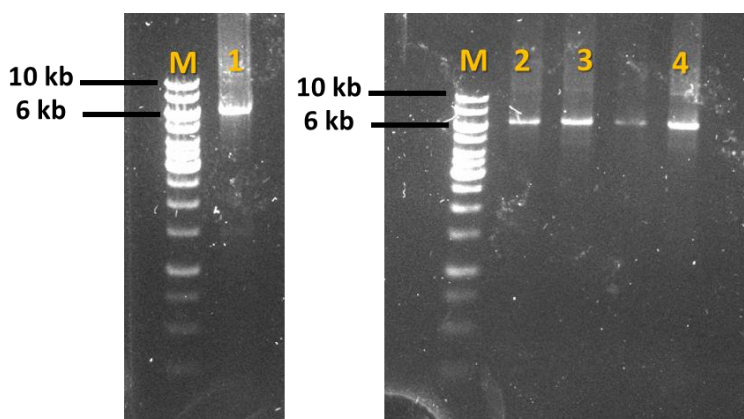
Primer	Sequência 5'-3'
W118A -F	CATGCACCGCGGCGCCCATCCTCGGTCTG
W118A -R	CCGAGGATGGGCGCCGCGGTGCATGAACA
W118D -F	CATGCACCGCGGATCCCATCCTCGGTCTG
W118D -R	CCGAGGATGGGATCCGCGGTGCATGAACA
W118H -F	CATGCACCGCGCATCCCATCCTCGGTCTG
W118H -R	CCGAGGATGGGATGCGCGGTGCATGAACA
W118S -F	CATGCACCGCGAGCCCCATCCTCGGTCTG
W118S -R	CCGAGGATGGGGCTCGCGGTGCATGAACA

8.3.2.2. Obtenção das variantes enzimáticas via PCR

A metodologia empregada, usa a enzima Phusion DNA polimerase, uma enzima de amplificação de DNA de alta fidelidade. O DNA molde usado nas reações de PCR foi o plasmídeo com a NHase de *Rhodococcus erythropolis*, e foram usados os *primers* descritos na Tabela 8. As condições usadas na PCR e quantidades dos reagentes estão descritas na parte experimental.

Como pode ser visto pelo gel da Figura 23 houve amplificação na região de 6 kb. O plasmídeo original consiste de um vetor pACYCDuet-1, e o tamanho dele mais o inserto (correspondente às subunidades α e β da NHase, além de um gene ativador), é de um total de 6312 pb, consistente com o tamanho da amplificação da região.

Figura 23. Gel de agarose da reação de PCR para mutagênese sítio dirigida



Condições: Amostra 1 = 3 μ L, amostras 2, 3 e 4 = 1 μ L. (M = marcador de peso molecular DNA Gene Ruler 1 kb. 1 = W118A, 2 = W118S, 3 = W118H, 4 = W118D.)

Após a amplificação por PCR, o produto foi submetido a uma reação de digestão com a enzima de restrição DpnI. A digestão com DpnI cliva DNA metilado e, como o DNA isolado da maioria das cepas de *E. coli* é metilado, ele é suscetível à essa digestão. Desse modo, a DpnI é usada após a reação de PCR para digerir o modelo de DNA parental metilado usado como molde, e assim selecionar o DNA recém-sintetizado contendo as mutações.

Após a digestão com DpnI, e purificação do conteúdo reacional, foi feita uma reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase, de modo a recircularizar o plasmídeo. O produto da reação com a DNA Ligase foi usado na transformação em *E. coli* DH10 β , linhagem de *E. coli* escolhida por não ter resistência a antibióticos, já que o vetor

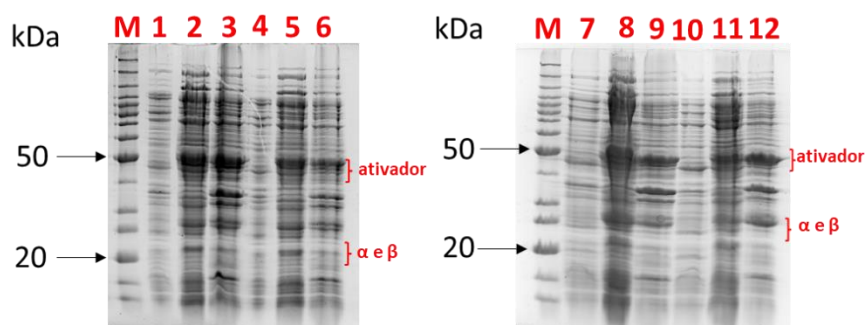
utilizado é resistente a cloranfenicol. Foram selecionadas 4 colônias da variante W118H, 3 colônias da variante W118S e 3 colônias de W118D.

Após *miniprep* para extração dos plasmídeos contendo as mutações, eles foram enviados para sequenciamento do DNA. Foi confirmada a inserção da mutação correta em duas colônias de W118A, uma colônia de W118H e uma de W118D. Nesse estágio em nenhum dos clones enviados com a mutação W118S foi inserida a mutação. O resultado do sequenciamento das proteínas mutantes com a mutação encontra-se nos anexos.

Foram feitas tentativas posteriores em relação à variante W118S, refazendo o processo desde a PCR, mas os quatro clones que foram enviados para sequenciamento nessa outra tentativa também não retornaram com a mutação desejada, portanto optou-se por prosseguir as análises com as três variantes que a mutação foi inserida.

As quatro colônias em que houve confirmação da inserção da mutação, W118A-1, W118A-2, W118H-1 e W118D-1, foram transformadas em uma linhagem de *E. coli* BL21 DE3. Para verificar como estava a produção de proteína recombinante, foi feito um gel de SDS-page, analisando a fração não induzida, antes de adicionar o IPTG como indutor da produção das proteínas, a fração solúvel e a fração insolúvel (resultantes após a lise das bactérias). O gel para os quatro mutantes encontra-se na Figura 24.

Figura 24. Gel SDS-page para os mutantes W118A-1, W118A-2, W118H-1, W118D-1



Legenda: M= marcador de peso molecular (Benchmark™ Unstained Protein Ladder), 1= fração não induzido W118A-1, 2= fração solúvel W118A-1, 3= fração insolúvel W118A-1, 4= fração não induzido W118A-2, 5= fração solúvel W118-2, 6= fração insolúvel W118A-2, 7= fração não induzido W118D-1, 8= fração solúvel W118D-1, 9= fração insolúvel W118D-1, 10= fração não induzido W118H-1, 11= fração solúvel W118H-1, 12= fração insolúvel W118H-1.

A análise SDS-PAGE em geral mostrou o tamanho esperado para a subunidade α e β (23 kDa) e para a proteína ativadora (43 kDa). Em análise qualitativa do gel, nota-se também uma baixa expressão para as subunidades α e β , em especial que para as variantes W118A-1 e W118A-2, onde há um menor nível de expressão na fração solúvel do que para as W118D-1 e W118H-1. Como as subunidades α e β possuem tamanho semelhante, não foi possível avaliar o nível de expressão das subunidades individuais por SDS-PAGE, como já foi reportado anteriormente por Song e colaboradores (SONG et al., 2008).

Após análise do gel concluiu-se que há proteína recombinante na fração solúvel após indução de IPTG, então essas variantes foram empregadas em reações biocatalíticas com um escopo de nitrilas. Entre as variantes W118A-1 e W118A-2, ambas com mutação de alanina, optou-se por prosseguir os experimentos com a variante W118A-1.

8.3.2.3. Avaliação dos mutantes W118A-1, W118D-1, W118H-1

As três enzimas foram então avaliadas com um conjunto de nitrilas, para verificar a sua atividade frente a esses compostos, comparando com a atividade da enzima selvagem (sem as mutações). Os resultados dessas reações podem ser vistos na Tabela 9.

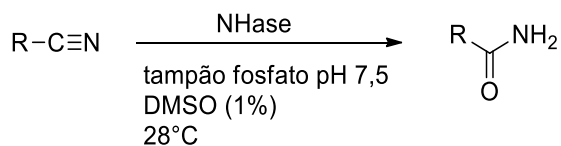
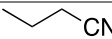
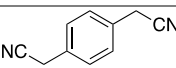
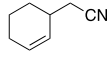
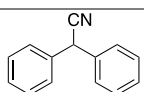


Tabela 9. Reações da NHase selvagem de *R. erythropolis* e dos mutantes W118A-1, W118D-1 e W118H-1

Entrada	Substrato	NHase selvagem	W118A	W118D	W118H
1	 butironitrila	>99	n.r	n.r	n.r
2	 benzonitrila	>99	n.r	n.r	n.r
3	 o-toluidiacetonitrila	>99	n.r	n.r	n.r
4	 2,2'-(1,4-fenileno)diacetonitrila	>99	n.r	n.r	n.r
5	 4-cianopiridina	13	n.r	n.r	n.r
6	 3-cianopiridina	8	n.r	n.r	n.r
7	 Tiofeno-3-carbonitrila	87	n.r	n.r	n.r
8	 2-(ciclohex-2-en-1-il)acetonitrila	94	n.r	n.r	n.r
9	 difenilacetonitrila	n.r	n.r	n.r	n.r

Condições reacionais: 0,3 g de células úmidas, 0,04 mmol substrato, 1% DMSO, 10 mL tampão fosfato pH 7,5 100 mM, 28°C, 24 h. Conversões determinada por GC-FID.

Com o conjunto das proteínas mutantes, foram avaliados primeiramente duas nitrilas amplamente empregadas em reações com nitrilas hidratases, a butironitrila (Entrada 1) uma nitrila alifática, e a benzonitrila (Entrada 2) uma nitrila aromática. Nenhuma das variantes enzimáticas desenvolvidas neste trabalho apresentou atividade em relação a estes compostos, enquanto a enzima selvagem apresentou conversões superiores a 99%.

A seguir avaliou-se algumas nitrilas (que já haviam sido avaliadas anteriormente – seção 8.2.1), além de três substratos novos (Entradas 6-8) e a difenilacetonnitrila (Entrada 9), a nitrila secundária usada nos estudos de ancoragem molecular. Não houve atividade para as variantes enzimáticas com nenhum dos substratos estudados. Com a difenilacetonnitrila também não houve atividade com a enzima selvagem, confirmando os estudos de ancoragem molecular, onde não foi possível ancorar este substrato no sítio ativo da enzima.

Em relação aos compostos das Entradas (6-8) com a enzima selvagem, observou-se que para a 3-cianopiridina (Entrada 6) foi obtida uma conversão de 8% usando a enzima. A síntese da nicotinamida empregando enzimas nitrilas hidratases já é um processo bem estabelecido, sendo que a NHase de *Rhodococcus rhodochrous* J-1, uma NHase tipo Co, é amplamente empregada nessas reações, sendo inclusive usada a nível industrial (CHENG; XIA; ZHOU, 2020; NAGASAWA et al., 1988; WANG et al., 2017). Em um trabalho de 2008, Banerjee e Kamble obtiveram uma conversão de 3-cianopiridina em nicotinamida de 93%, empregando como catalisador células íntegras de *Rhodococcus erythropolis* MTCC 1526 e condições reacionais diferentes das aqui utilizadas (pH 6,85, 24,8 °C, concentração celular 190,98 mg/mL, concentração substrato 21,98 mM) indicando que a reação com esse substrato poderia ser otimizada a fim de atingir conversões superiores, porém como esse não é o objetivo deste presente trabalho, essa vertente não foi aqui explorada (KAMBLE; BANERJEE, 2008).

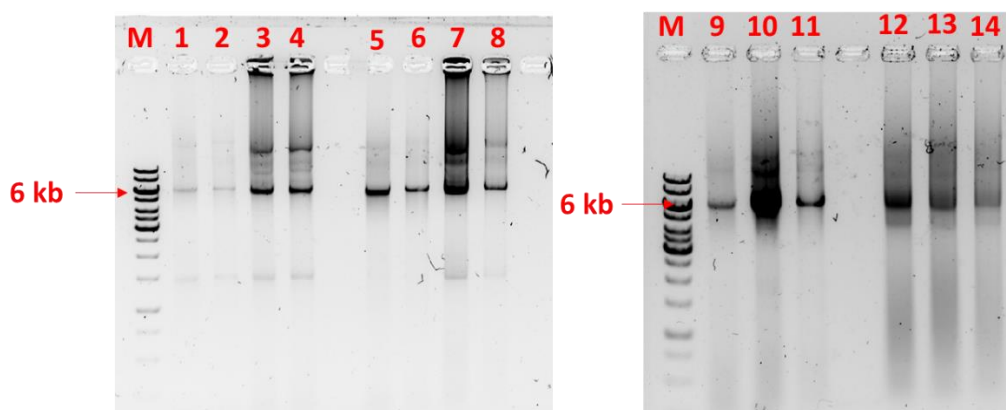
Com a NHase selvagem, os compostos das Entrada 7 e 8, apresentaram conversões elevadas de 87% e 94% respectivamente, e até onde pudemos verificar, esse é o primeiro exemplo desses compostos sendo empregados em uma reação com nitrila hidratase já descrita na literatura.

8.3.2.4. Nova tentativa para obtenção das variantes enzimáticas W118A, W118H, W118D e W118S

Como não houve atividade para as três enzimas mutantes obtidas anteriormente, optamos por repetir o processo de mutagênese sítio dirigida via PCR. As reações foram realizadas novamente para as quatro possibilidades de mutações (W118A, W118H, W118D e W118S). Foi escolhido repetir o processo desde o princípio pois, anteriormente, após a reação de PCR com os *primers* contendo as mutações, não foi realizada uma etapa de purificação para recolher apenas o fragmento de DNA com 6 kb de tamanho (o plasmídeo contendo a NHase e o gene ativador possui 6312 pb).

Foram realizadas novamente as reações de PCR. O conteúdo total das reações foi aplicado em gel de agarose 1% para purificação, e esses géis podem ser visualizados na Figura 25. Como pode ser visto pelos géis, há amplificações de fragmentos de peso molecular tanto de massa maior do que a de interesse (que é de aproximadamente 6 kb), como de massa menor. Os fragmentos da massa de interesse foram então cortados do gel, e purificados com auxílio de kit.

Figura 25. Gel de agarose da purificação das reações de PCR para mutação sítio dirigida



M = marcador de peso molecular DNA Gene Ruler 1 kb. Amostras 1-4 = W118A, 5-8 = W118S, 9-11 = W118D, 12-14 = W118H. (Concentrações: W118A e W118S = 11 µL/lane; W118D e W118H 15 µL/lane).

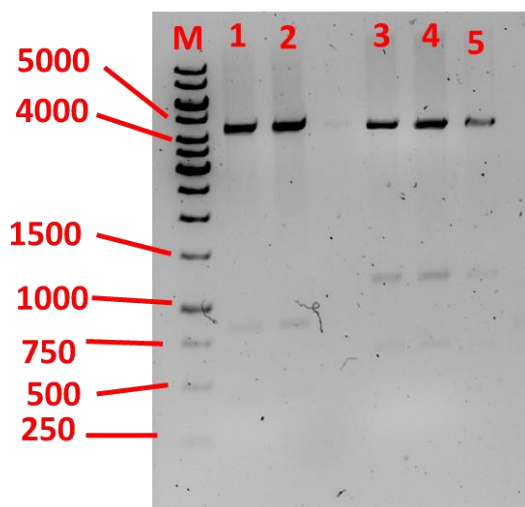
As etapas seguintes, de reação com DpnI para clivagem de DNA parental remanescente e de recircularização do plasmídeo com T4 DNA Ligase, foram feitas da mesma maneira que na seção anterior. Após transformação em *E. coli* DH10β foram

obtidas 2 colônias para W118A, 8 colônias para W118D, 10 colônias para W118H e 5 colônias para W118S. Dessas colônias foram selecionados os dois clones de W118A (A-1 e A-2) e três clones de cada uma das outras variantes para prosseguir com os experimentos (D-3, D-4, D-7, S-1, S-2, S-5, H-4, H-8 e H-10).

Antes de enviar os clones selecionados para sequenciamento, optamos por fazer uma análise de restrição do DNA plasmidial, para verificar se os fragmentos gerados pelas variantes enzimáticas estão iguais ao do plasmídeo original. A análise de restrição consiste em reações do DNA de interesse com enzimas de restrição, que são enzimas que cortam o DNA. Cada enzima reconhece uma ou mais sequências alvo e corta o DNA nestas sequências.

Para analisar a sequência do plasmídeo pACYC-duet-1 com a NHase de *R. erythropolis*, e verificar quais seriam as enzimas de restrição escolhidas para a análise, foi usada a ferramenta Webcutter, disponível online (<http://heimanlab.com/cut2.html>). Após análise, optamos por usar como enzimas de restrição as enzimas Aval e NcoI. A enzima Aval corta o plasmídeo e gera quatro fragmentos: 4500 pb, 863 pb, 453 pb, 270 pb e 213 pb. Já na reação com a enzima NcoI são gerados três fragmentos 4450 pb, 1202 pb e 662 pb. O gel contendo o plasmídeo molde (sem as mutações) após reação com as enzimas de restrição encontra-se na Figura 26.

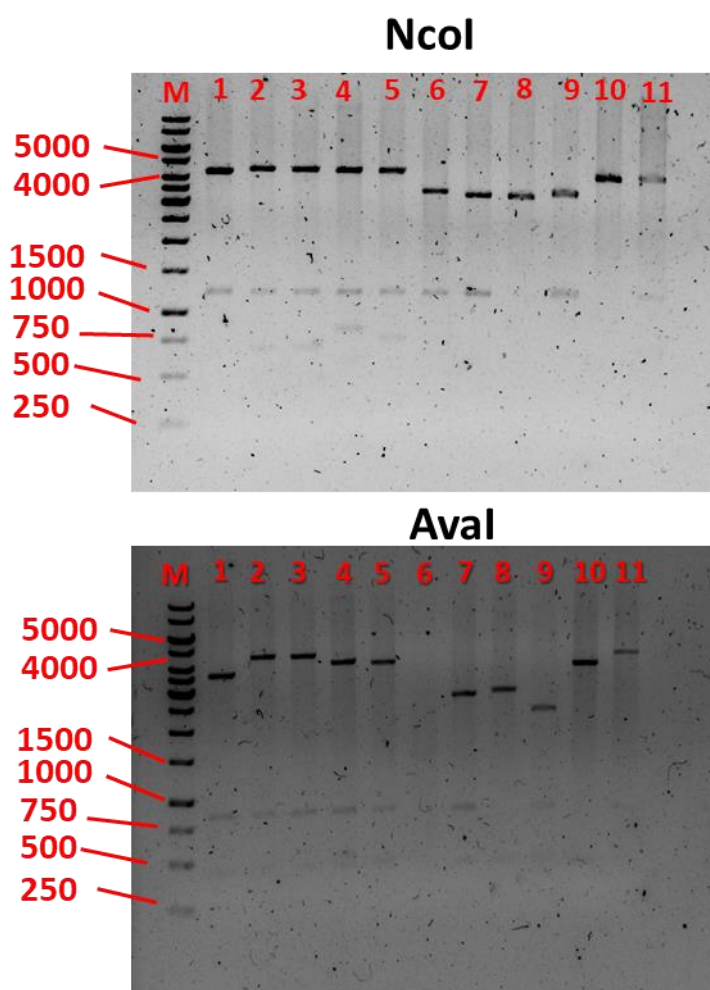
Figura 26. Gel de agarose 1% da análise de restrição do plasmídeo pACYC-duet1 com a NHase selvagem (sem mutações) e as enzimas Aval e NcoI



M= marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb da ThermoFisher Scientific. Lanes 1 e 2 = reação com Aval e Lanes 3-5= reação com NcoI.

Foram então feitas as reações com as enzimas Aval e NcoI e os 11 clones selecionados após as transformações em *E. coli* DH10 β . Na Figura 27 encontra-se a foto dos géis com as reações dos clones e as enzimas NcoI (parte superior) e Aval (parte inferior). Para determinar quais seriam os clones enviados para sequenciamento, foi avaliada a presença dos fragmentos esperados pós reação de digestão, comparando com o gel das reações com o plasmídeo sem mutação (Figura 26).

Figura 27. Gel de agarose 1% da análise de restrição das variantes enzimáticas com as enzimas Aval e NcoI



M= marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb da ThermoFisher Scientific. 1= S-1, 2= S-2, 3= S-5, 4= D-3, 5= D-4, 6= D7, 7= H-4, 8= H-8, 9 = H-10, 10 = A-1, 11= A-2.

A partir da análise dos géis, foram escolhidos para a mutação W118S, os clones S-2 e S-5, já que foi verificada a presença dos 3 fragmentos gerados pós reação com NcoI, além de três dos quatro fragmentos pós reação com Aval (um dos fragmentos da reação com Aval, o de 213 pb, é muito pequeno e não aparece no gel). Da mutação W118D foram escolhidos os clones D-3 e D-4, que apresentam dois dos fragmentos para NcoI e três dos fragmentos com Aval. Para a mutação W118A foi escolhido o clone A-2, que apresentou no gel dois fragmentos tanto na reação com Aval, como na reação com NcoI. Não foram selecionados clones com a mutação W118H, já que na análise de restrição dessa mutação, os fragmentos gerados não possuíam os tamanhos corretos.

Os cinco clones selecionados foram enviados para sequenciamento, porém em nenhum deles a mutação correta foi inserida. Devido ao final do prazo do doutorado da autora, os experimentos foram interrompidos e optou-se por não prosseguir com os experimentos de mutagênese.

9. Conclusões

Na primeira etapa desse capítulo, foi investigada a presença de uma enzima nitrila hidratase na bactéria *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI 2094, previamente identificada em trabalho anterior como um dos microrganismos responsáveis pela biodegradação do herbicida benzonitrilado Totril®, por meio de triagens enzimáticas. Para identificação do gene responsável pela NHase foram usadas duas abordagens: uma abordagem *in silico* com uso de técnicas de bioinformática, e também através de PCRs investigativas. Através das duas estratégias utilizadas não foi possível identificar a presença do gene responsável pela nitrila hidratase.

Os resultados obtidos nessa etapa levam a algumas conclusões possíveis. É possível que essa NHase possua uma sequência que difere das enzimas já estudadas na literatura, impossibilitando-a de ser identificada. Pode também ser possível que uma ocorreu uma contaminação da cultura microbiana usada na triagem, e a atividade NHase foi atribuída erroneamente a essa bactéria. De todo modo, como não pudemos afirmar se uma dessas suposições aqui listadas é a correta, optamos por prosseguir os estudos com outra NHase.

Nas reações com a nitrila hidratase de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, em uma primeira etapa foi possível emprega-la em um escopo de nitrilas diversas, e otimizar a reação de hidratação enzimática de nitrilas por meio de aumento da porcentagem do cossolvente DMSO no meio reacional, melhorando os resultados de conversão previamente obtidos em trabalho anterior. Com os resultados obtidos nessa etapa uma publicação já foi submetida.

Após, optamos por utilizar essa enzima como base para estudos de mutagênese sítio dirigida, visando a obtenção de uma NHase capaz de aceitar como substratos nitrilas volumosas. Foram realizados estudos de ancoragem molecular para seleção das variantes enzimáticas a serem produzidas, e foram selecionadas quatro mutações pontuais a serem inseridas: W118A, W118D, W118S e W118H. As variantes enzimáticas foram produzidas por meio de PCR usando *primers* desenhados contendo as mutações desejadas, e conseguimos obter três das quatro variantes propostas (W118A, W118D, e W118H). Essas enzimas foram empregadas em reações com um escopo de nitrilas, e não foi observada atividade para nenhuma das variantes obtidas.

Parte Experimental

10. Procedimentos gerais

10.1. Métodos Cromatográficos

As análises cromatográficas em camada delgada (CCD), para monitoramento das reações e acompanhamento da purificação dos produtos, foram realizadas empregando-se cromatoplasmas de alumínio (20 x 20 cm), da marca Macherey Nagel, sobre suporte de alumínio com filme de sílica gel 60 com indicador UV₂₅₄.

A revelação dos compostos em cromatoplasmas foi feita por irradiação com lâmpada UV₂₅₄ para os compostos que continham grupos cromóforos e/ou pulverização com solução de ácido fosfomolibdico e/ou anisaldeído, e subsequente aquecimento a 300°C com pistola de ar quente.

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

Nas purificações de compostos por DSC (cromatografia *flash* em sílica seca) foram utilizadas sílica gel 230-400 mesh da marca Macherey Nagel com gradiente de eluição em diclorometano/metanol.

As análises por Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Ionização de Chama (GC-FID) foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo Shimadzu GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i e acoplado a um detector de ionização de chama. Para as análises de rotina utilizou-se coluna capilar de sílica fundida Restek Rtx®-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano) ou coluna capilar HP-5MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano; marca Agilent).

O método de rotina para análise das amostras foi: fluxo constante de gás H₂ de 1,22 mL/min, com temperatura do injetor igual a 260 °C e temperatura do detector igual a 300 °C. 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 5 minutos. O volume de injeção das amostras foi de 1 µL na concentração de 0,5 – 1 mg mL⁻¹ no modo *split*. O tempo total da análise foi de 14,67 minutos.

O cálculo das conversões foi baseado nas áreas obtidas para cada composto no cromatograma, da seguinte forma:

$$\text{conv.(\%)} = [A_{\text{produto}} / (A_{\text{substrato}} + A_{\text{produto}})] \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

As análises de Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-EM) foram realizadas no Laboratório Multiusuário I de Análises Químicas do Instituto de Química – UNESP Araraquara, em cromatógrafo gasoso da marca Agilent – modelo 7890B, com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% fenil-metilsiloxano) – acoplado a um espectrômetro de massas Modelo 5977A, com fonte de ionização por elétrons com energia de ionização de 70 eV e operando na faixa de m/z 45-500. O cromatógrafo operou com fluxo constante de gás He de 1 mL min⁻¹, temperatura do injetor e da interface a 260 °C e 280 °C, respectivamente. As injeções das amostras foram de 1 µL na concentração de 0,5–1 mg mL⁻¹. A programação de temperatura utilizada foi de 3 minutos a 80 °C, seguida de rampa de aquecimento 80-280 °C a 30 °C min⁻¹ e mantido em 280 °C por 3 minutos.

As análises de GC-FID em fase quiral para determinação dos excessos enantioméricos (ee) das aminas foram realizadas utilizando-se coluna Hydrodex® β-3P (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Macherey-Nagel). Foi mantido um fluxo constante de gás de 0,9 mL/min, com temperatura de 180 °C no injetor e 180 °C no detector. O volume de injeção das amostras foi de 1 µL na concentração de 0,5 – 1 mg/mL no modo *split*.

A programação de temperatura utilizada, para o Método Hydrodex 1 (composto 4-phenilbut-3-en-2-amina) foi de 5 minutos a 170 °C, 170-180 °C com taxa de 5 °C/min e mantido a 180 °C por 10 minutos. A programação de temperatura utilizada para o Método Hydrodex 2 (composto 4-fenilbutan-2-amina) foi de 155-175 °C com taxa de 1 °C/min, 175-180 °C com taxa de 10 °C/ min e mantido a 180 °C por 10 minutos.

10.2. Meios de Cultura

Os meios de cultura listados a seguir foram utilizados para o cultivo dos microrganismos. Após o preparo, os meios de cultura foram esterilizados em autoclave vertical Quimis a 121 °C e 1 Kgf/cm², por 15 minutos. A descontaminação do material biológico utilizado foi feita na autoclave vertical Quimis a 121 °C e 1 Kgf/cm², por 45 minutos.

Nutrient Broth (NB)

O meio de cultura Nutrient Broth (NB) foi adquirido junto a empresa Acumedia. Seu preparo foi realizado de acordo com instrução contida no rótulo.

Luria-Broth (LB)Composição:

Triptona – 10 g/L

Extrato de levedura – 5 g/L

NaCl – 10 g/L

- LB-ágar – Ágar 15 g para 1 L de meio de cultura líquido LB.

Meio 2-YT+gliComposição:

Triptona – 16 g/L

Extrato de levedura – 10 g/L

NaCl – 10 g/L

Glicose – 2 g/L

10.3. Tampões e soluções utilizadas**TAMPÃO DE LISE**

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

20 μ M de PLP

1000 mL Tampão fosfato pH 7,5; 50 mM

TAMPÃO TAE 50X (1 LITRO)

242 g de Tris base

57,1 mL de ácido acético glacial

100 mL 0,5M EDTA (pH 8)

Água q.s.p. 1L

10.4. Soluções SDS-page**GEL DE RESOLUÇÃO 12% (pH 8,8; 10 mL)**

2 mL tampão de resolução 5x

4 mL solução acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)

4 mL água

100 μ L APS 10%

10 μ L TEMED

GEL DE EMPACOTAMENTO 12% (pH 6,8; 5 mL)

1 mL tampão de empacotamento 5x

900 μ L solução acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)

3,2 mL água

50 μ L APS 10%

5 μ L TEMED

TAMPÃO DE LAEMMLI 5x

375 mM Tris-HCl pH 6,8

60% Glicerol

5% SDS (dodecil sulfato de sódio)

15% β -mercaptoetanol

Traços de azul de bromofenol sal sódico

RUNNING BUFFER 10x

250 mM Tris base

1,92 M Glicina

1% SDS (dodecil sulfato de sódio)

SOLUÇÃO CORANTE

50% metanol

40% água

10% ácido acético glacial

0,05% Coomassie Blue Brilliant R-250

SOLUÇÃO DESCORANTE

30% metanol

63% água

7% ácido acético glacial

TAMPÃO DE RESOLUÇÃO 5X

1,875M Tris base

1% SDS (dodecil sulfato de sódio)

Acertar pH em 8,8 com HCl.

TAMPÃO DE EMPACOTAMENTO 5X

1,875M Tris base

1% SDS (dodecil sulfato de sódio)

Acertar pH em 6,8 com HCl.

TAMPÃO DE LISE

50 mM Tris-HCl pH 8,0

300 mM NaCl

0,01% Triton X-100

20 mM Imidazol

10% glicerol

Mix IP

Mix de inibidores de proteases (Mix IP)

5 mM benzamidina

1 mM DTT

0,5 mM PMSF

1mM NaF

10.5. Análise do DNA em gel de agarose

A análise dos fragmentos de DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Os géis foram preparados solubilizando-se a agarose em tampão TAE 1X, seguido por aquecimento em micro-ondas até completa solubilização. Para visualização das bandas de DNA foi adicionado 0,1 µL/mL de SYBRTM Safe ou 0,1 µL/mL de brometo de etídio como indicador de fluorescência e, em seguida, adicionou-se a mistura no suporte para solidificação.

As análises foram realizadas em cuba de eletroforese horizontal Kasvi, com fonte de eletroforese OWL EC300 da Thermo Scientific. O tampão de corrida usado foi TAE 1X, sob voltagem constante de 100 V durante 50 minutos do polo negativo para o positivo. Como marcador de peso molecular para DNA foi usado o GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific. Os géis foram revelados no equipamento ChemiDoc Imaging Systems, da BIORAD.

11. Primeiro capítulo: Reações com transaminases

11.1. Plasmídeos e expressão das proteínas recombinantes

Células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS foram usadas para a expressão das proteínas recombinantes. Os plasmídeos contendo genes sintéticos que codificam transaminases de *Aspergillus terreus*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Ruegeria pomeroyi*, *Vibrio fluvialis* e *Chromobacterium violaceum* foram construídos em vetores pET e pGASTON, e cedidos pelo professor doutor Uwe Bornscheuer.

Para a transformação, aproximadamente 50 ng dos plasmídeos foram adicionados a 100 µL de células competentes. As células foram mantidas em gelo por 30 minutos, seguidos por 2 minutos a 42 °C, depois foram incubados novamente em gelo por 2 minutos. Depois disso, 1 mL de meio SOC foi adicionado as células e estas foram incubadas a 37 °C por 1 h, sob agitação orbital (300 rpm). Dessa suspensão celular, 100 µL foram inoculados em placas de meio LB, suplementado com kanamicina ou ampicilina, dependendo do antibiótico de resistência, e as placas foram mantidas a 37 °C *overnight*.

Para expressão de proteínas, 30 mL de uma cultura *overnight* foram inoculados em 600 mL de meio LB, suplementado com o antibiótico de resistência. Primeiramente, a cultura foi incubada a 37 °C e 130 rpm até atingir uma OD₆₀₀ de 0,7. Em seguida, foi adicionado IPTG (concentração final 0,1 mM) para as ATAs de *C. violaceum*, *V. fluvialis* e *R. pomeroyi*, ou ramnose (0,2%) para as ATAs de *A. terreus* e *M. vanbaalenii*. O tempo e a temperatura de indução variaram, dependendo da enzima expressa. A indução ocorreu *overnight* para todas as enzimas, com exceção do *R. pomeroyi* ATA, onde a indução levou 6 horas. A temperatura de indução foi de 20 °C (*A. terreus* e *M. vanbaalenii*) ou 30 °C (*C. violaceum*, *V. fluvialis* e *R. pomeroyi*).

Após a expressão, as células foram colhidas por centrifugação (10 min, 15.000 g, 20 °C). Os *pellets* celulares foram ressuspensos em tampão de lise gelado (tampão de fosfato de sódio, pH 7,0, 20 mM, 20 mM PLP, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5% de glicerol). Em seguida, as células foram lisadas por sonicação (Bandelin Sonopuls HD-2070), com 30–40% da potência máxima, em 9 ciclos de 30 s, em modo contínuo, com pausas de 1 min entre os ciclos. Todos os procedimentos foram conduzidos em banho de gelo. A suspensão de células foi centrifugada (20 min, 20.000 g, 4 °C) para remover detritos celulares.

O sobrenadante foi pré-purificado por diálise, em tubos de celulose (poros de 14.000 Da), por 24 h a 4 °C. Para cada 8 mL de extrato livre de células, 250 mL de tampão de diálise foi usado (tampão de fosfato de sódio, pH 7,5, 50 mM, 20 M PLP). No final do processo, foram preparadas alíquotas, contendo 1,0 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de 20% glicerol, e os extratos livres de células foram armazenados no freezer a -20 °C.

11.2. Ensaio 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, 0,125, 0,062 e 0,031 mg/mL. 20 µL 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 595nm. 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 µL dos extratos enzimáticos (pós diálise). A concentração de proteínas totais nos extratos foram: *C. violaceum* (0,426 mg mL⁻¹), *A. terreus* (não quantificado, abaixo do intervalo da curva analítica), *V. fluvialis* (0,345 mg mL⁻¹), *M. vanbaalenii* (0,033 mg mL⁻¹), *R. pomeroyi* (0,247 mg mL⁻¹).

11.3. Procedimento Geral para reações com os extratos enzimáticos

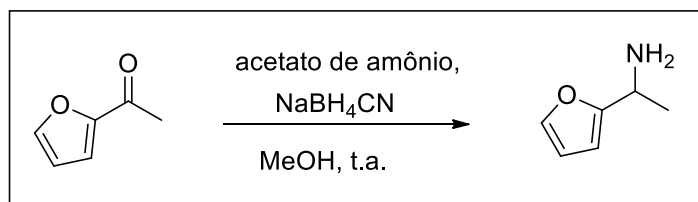
Em um tubo tipo eppendorf de 2 mL, 20 mM da cetona foi adicionado, solubilizado em 15 µL de DMSO (1%), seguido pela adição de 1 mM de PLP e 300 mM de isopropilamina (preparados em tampão fosfato de sódio, 100 mM, pH 7,5). Depois disso, o extrato enzimático foi adicionado (q.s.p. 1,5 mL) e o pH foi corrigido para 7. A reação foi mantida sob agitação orbital (850 rpm) a 30 °C por 24 horas. A reação foi terminada pela adição de NaOH (10 M) até atingir um pH de 10-12, seguido

de extração com acetato de etila (2 x 1,5 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO_4 anidro, e o solvente foi evaporado.

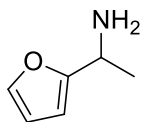
11.4. Procedimento Geral para reações com ATA-256

Em um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL, 10 mM da cetona foi adicionado, solubilizado em 25 μL de DMSO (2,5%), seguido pela adição de 1 mM de PLP e 1 M de isopropilamina (preparados em tampão fosfato de sódio, 100 mM, pH 7,5). Em seguida, o pH foi corrigido para 7, então a enzima foi adicionada com o tampão restante (volume total de 1 mL). A reação foi mantida sob agitação orbital (850 rpm) a 45 °C por 24 horas. A reação foi terminada pela adição de NaOH (10 M) até atingir um pH de 10-12, seguido de extração com acetato de etila (2 x 1,5 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO_4 anidro, e o solvente foi evaporado.

11.5. Reação de aminação redutiva para síntese do composto 1-(furan-2-il)etanamina (CHEN et al., 2010)



Em um balão de fundo redondo adicionou-se 1 mmol da cetona (110 mg), 3,15 mL de metanol grau HPLC e 10 mmol de acetato de amônio (770,8 mg). Após completa solubilização do acetato de amônio, adicionou-se 0,7 mmol cianoborohidreto de sódio (44 mg) em uma porção única, e o sistema foi mantido sob agitação magnética, a temperatura ambiente, *overnight*. Após o tempo reacional, o conteúdo do balão foi evaporado no rotaevaporador. Ao resíduo que sobrou no balão, foi adicionado 1,5 mL de água destilada, e o pH foi acertado para 13 com adição de NaOH 10M. A fase aquosa foi extraída três vezes com acetato de etila, as fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO_4 anidro, e o solvente foi evaporado em rotaevaporador.



1-(furan-2-il)etanamina (IMM et al., 2010): GC-MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) 111 (32), [M⁺] 96 (100), 82 (15), 69 (14), 57 (5).

11.6. Procedimento geral para a acetilação de aminas

Em 1,0 mL de acetato de etila, foram adicionados 1 mg da amina, 10 µL de anidrido acético e um cristal pequeno de DMAP. O sistema foi mantido sob agitação por 10 minutos, e após isso a fase orgânica foi lavada com NaOH (2 M), seca com MgSO₄ anidro, e analisado via GC-FID

12. Segundo Capítulo

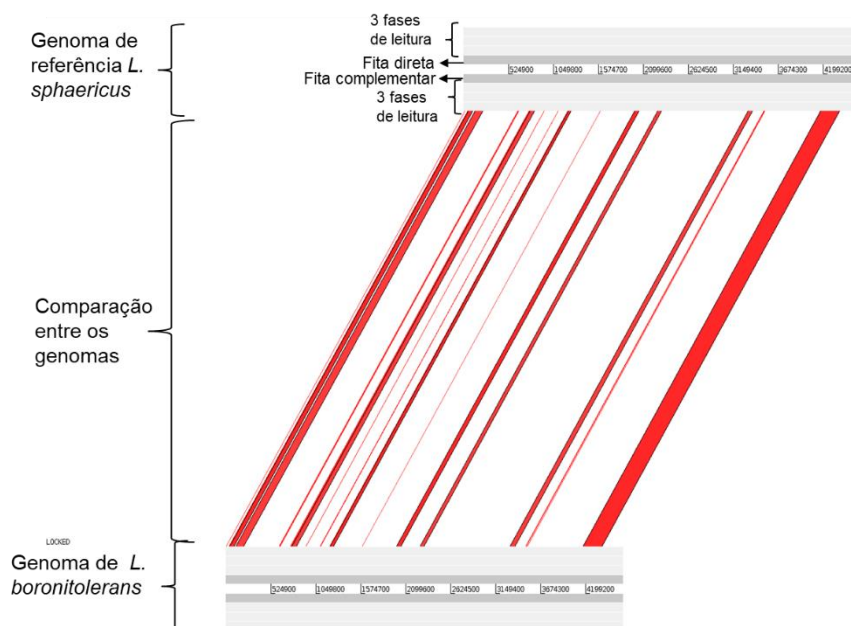
12.1. Busca pelo gene de nitrila hidratase na bactéria *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI 2094 via análises de bioinformática

12.1.1. Ordenamento e orientação do genoma: ABACAS

Para ordenamento e orientação do genoma, foi utilizado o algoritmo de alinhamento ABACAS (versão 1.3.1 para GNU/Linux) (ASSEFA et al., 2009). O ABACAS usa o algoritmo MUMmer (KURTZ et al., 2004) para encontrar posições de alinhamento e áreas de correspondência dos *contigs* contra o genoma de referência. O arquivo de saída do programa é uma pseudomolécula, obtida em formato fasta, que leva em conta as sobreposições e as áreas de *gap* (onde não houve correspondência), representadas por N's. O ABACAS gera também um arquivo de comparação que pode ser utilizado para visualizar os *contigs* ordenados e orientados no programa *Artemis Comparison Tool* (ACT)(BERRIMAN et al., 2005).

Como resultado da predição do ABACAS para o alinhamento do genoma de *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI-2094 com o genoma do organismo *Lysinibacillus fusiformis* RB-21, 17 dos 57 *scaffolds* foram ordenados e alinhados. Já o resultado da predição do alinhamento entre o genoma do microrganismo *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI-2094 com *Lysinibacillus sphaericus* foi de 20 *scaffolds* ordenados e alinhados. Optou-se por utilizar o alinhamento com *L. sphaericus* C3-41 para ordenar e orientar o genoma, já que com o genoma desse organismo mais *scaffolds* foram alinhados. Na Figura 28 é possível visualizar, no ACT (v 13.0.0 para GNU/Linux), o arquivo de alinhamento com *L. sphaericus* C3-41.

Figura 28. Visualização do alinhamento do *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI-2094 contra o genoma de *Lysinibacillus sphaericus* C3-41

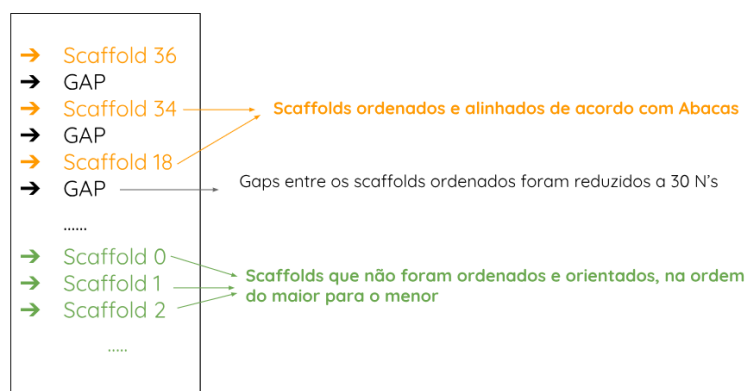


Fonte: Elaborada pela autora.

Janela de visualização do Artemis Comparison Tool. Na parte superior está representado o genoma de referência de *L. sphaericus* C3-41 e, na parte inferior, o genoma de *L. boronitolerans* CBMAI-2094. As regiões em vermelho são as regiões alinhadas entre o genoma de interesse e a referência, e os *gaps* são os espaços brancos.

Para criar a pseudomolécula com o genoma ordenado e orientado de acordo com a referência, o arquivo de saída gerado pelo ABACAS foi reorganizado. As regiões de *gaps*, que variavam de tamanho, foram todas normalizadas para 30 N's, e inseriu-se depois uma nota com o tamanho do *gap* original. Após os 20 *scaffolds* alinhados, os demais, que não tiveram alinhamento, foram inseridos do maior para o menor. O esquema de como a pseudomolécula foi montada encontra-se representado na **Figura 29**.

Figura 29. Esquema de montagem da pseudomolécula do genoma de *L. boronitolerans*



Fonte: elaborada pela autora.

12.1.2. Predição gênica – Anotação estrutural

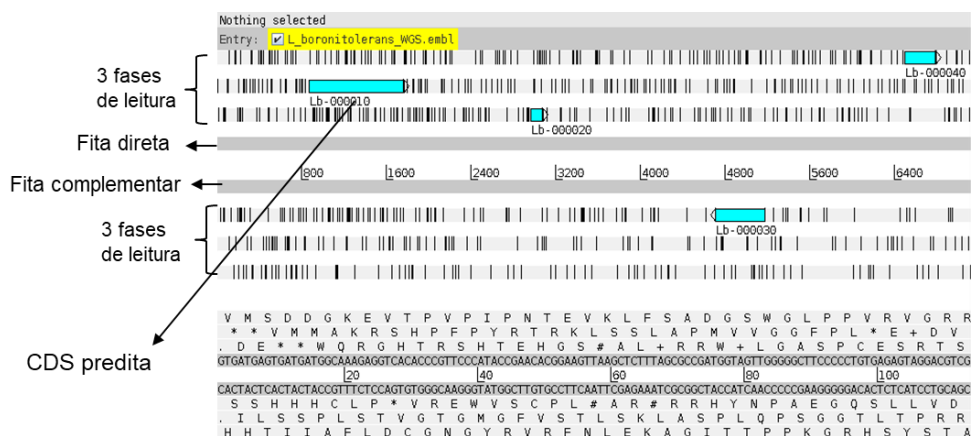
Para a etapa de predição gênica foi utilizada uma metodologia *ab initio*, que utiliza modelos matemáticos para identificar genes e determinar a localização de suas sequências. Foi utilizado o *pipeline* para anotação automática de genomas bacterianos FgenesB (SOLOVYEV; SALAMOV, 2010). O FgenesB realiza anotação estrutural completamente automática de sequências genômicas bacterianas. O *pipeline* é capaz de identificar genes codificadores de proteínas, genes de tRNA e rRNA, e encontra potenciais promotores, terminadores e *operons*.

A versão utilizada neste trabalho foi a disponível na web (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesb&group=programs&subgroup=gfindb>). Como parâmetros de entrada, foram usados a sequência fasta da pseudomolécula obtida na etapa anterior, a tabela de código genético 11 e como organismo mais próximo *Bacillus subtilis*. O arquivo de saída gerado pelo FgenesB fornece as coordenadas de início e fim das janelas abertas de leitura (do inglês ORFs - *Open Reading Frames*), que são marcadas como sequências codificantes (do inglês CDS - *Coding sequences*). Para a pseudomolécula do genoma de *L. boronitolerans* foram preditas um total de 4.471 CDS's.

O arquivo fasta da pseudomolécula foi então convertido para o formato embl, que é um formato que aceita anotações. Esse arquivo foi aberto no programa Artemis (v 16.0.0 para GNU/Linux) para inserir as anotações das coordenadas referentes às ORF's preditas. Com auxílio de um *script* que retirou as coordenadas de início e fim das CDS's do arquivo de saída gerado pelo FgenesB, essas informações foram

inseridas na pseudomolécula com a sequência gênômica de *L. boronitolerans*, como pode ser visto na Figura 30. Quando visualizado no Artemis é possível observar as CDS's preditas em uma das fases de leitura da fita direta ou complementar do DNA. As anotações inseridas estão em azul.

Figura 30. Janela de visualização do Artemis mostrando as CDS's preditas como highlights em azul no genoma de *L. boronitolerans* CBMAI-2094.



Fonte: elaborada pela autora

12.1.3. BLASTp e RPS-BLAST

Com auxílio do Artemis, as 4.471 CDS's preditas foram traduzidas a aminoácidos para realização de busca por similaridade de sequências usando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Foi utilizado o programa BLASTp (versão 2.2.31, para GNU/Linux), onde a sequência de busca inserida é de sequência de proteínas e a busca é realizada contra um banco de dados de proteínas.

A busca por similaridade de sequências foi realizada contra os bancos de dados nr (non-redundant database, do NCBI), CDD (Conserved Domain Database, também do NCBI) e Pfam (Protein Families database, do EMBL-EBI – European Bioinformatics Institute). O nr é um banco de dados não redundante, ou seja, com sequências duplicadas removidas. Ele contém sequências não redundantes de traduções do GenBank juntamente com sequências de outros bancos de dados. Contra esse banco de dados foi feito BLASTp.

Os bancos de dados CDD e Pfam são bancos de matrizes, e a versão utilizada do BLAST para esse tipo de bancos de dados foi a RPS-BLAST (versão 2.2.26 para GNU/Linux). O CDD consiste em uma coleção de modelos de alinhamento de

sequência múltipla bem anotados para domínios antigos e proteínas. Estes estão disponíveis como matrizes de pontuação específicas da posição (PSSMs) para identificação rápida de domínios conservados em sequências de proteínas via RPS-BLAST. Já o banco de dados Pfam é uma grande coleção de famílias de proteínas, cada uma representada por múltiplos alinhamentos de sequências e modelos ocultos de Markov (HMM's – Hidden Markov Models).

Como parâmetros de entrada para o BLASTp foram utilizados: números de alinhamento igual a 5, números de descritores igual a 5 e *evaluate* de 10^{-5} . Como parâmetros de entrada para o RPS-BLAST foram utilizados: números de alinhamento igual a 10, números de descritores igual a 10 e *evaluate* de 10^{-3} . Quando o BLAST foi finalizado, o primeiro *hit* de cada sequência de busca foi selecionado, e montou-se um arquivo tabular contendo essas informações.

12.1.4. InterProScan

O InterPro fornece análise funcional de sequências de proteínas, classificando-as em famílias e prevendo a presença de domínios e outros locais importantes. Para classificar as proteínas dessa maneira, o InterPro usa assinaturas (modelos preditivos), fornecidos por vários bancos de dados diferentes que compõem o consórcio InterPro (POTTER et al., 2018). O InterPro conta com 14 bancos de dados, sendo que cada um deles possui sua especialidade, e, assim, eles oferecem níveis complementares de informações. O pacote de softwares que realizam a busca é denominado de InterProScan (BINNS et al., 2014).

Um arquivo no formato das anotações usadas no Artemis foi criado, e no arquivo da sequência genômica com as anotações dos genes preditos foram também inseridas as anotações das buscas realizadas pelo InterProScan contra os bancos de dados CDD, Pfam e Superfamily. O genoma anotado com essas informações pode ser visualizado no Artemis, e encontra-se representado na Figura 31.

Figura 31. Visualização no Artemis da integração dos resultados obtidos pelo InterProScan contra os bancos de dados CDD, Pfam e Superfamily para o genoma de *L. boronitolerans* CBMAI-2094.



12.1.5. Predição de RNAs ribossomais e transportadores no genoma

Para dar continuidade à anotação funcional, foram usados dois algoritmos preditores para busca de RNA transportador e RNA ribossomal. O RNAmmer (versão 1.2 online) prediz em sequências genômicas completas RNA's ribossomais 5s/8s, 16s/18s, e 23s/28s (LAGESEN et al., 2007). Como parâmetro de entrada foi utilizada a sequência genômica da pseudomolécula no formato fasta. Utilizando-se o RNAmmer, para o genoma de *L. boronitolerans* foram preditos um total de 12 RNA's ribossomais. A anotação de RNA's transportadores foi feita utilizando o programa tRNAscan (versão 1.4 online). Para o genoma de *L. boronitolerans* foram preditos 79 RNA's transportadores. Os RNAs preditos foram integrados ao genoma anotado do microrganismo.

12.1.6. BLAST2GO

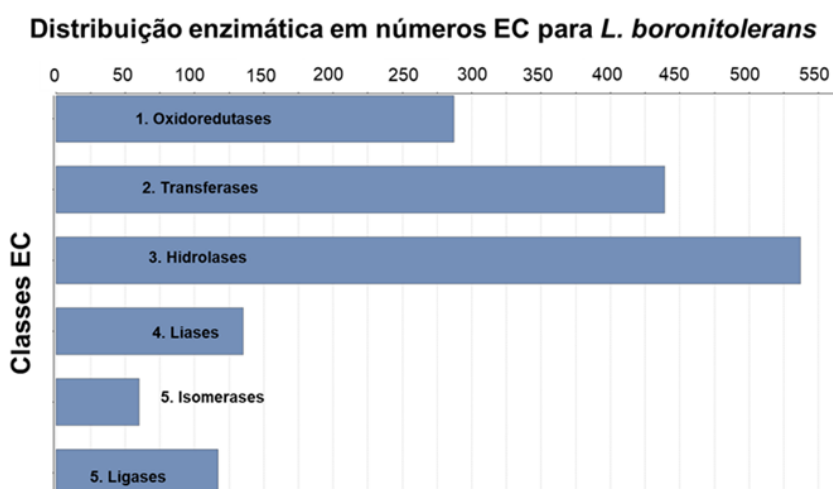
O Gene Ontology (GO) é um consórcio mantido pelo Gene Ontology Consortium que foi criado originalmente para compartilhamentos de dados genômicos de três organismos-modelo: levedura, camundongo e drosófila (ASHBURNER et al., 2000). Posteriormente o escopo do consórcio foi expandido para todos os seres vivos, e eles fornecem identificadores para classificação de genes ou produtos gênicos em três níveis: 1) o compartimento celular em que o gene é expresso; 2) a função

biológica do produto associado a ele; e 3) os processos biológicos de que o produto gênico participa (FREITAS; SCHULZ; MORAES, 2009).

O BLAST2GO faz uso do BLAST para encontrar homólogos para sequências de entrada no formato fasta. O programa extrai os termos GO para cada *hit* obtido através de mapeamento realizado com base em associações de anotações já existentes, e os termos GO são atribuídos à sequência de consulta. Anotação e análises funcionais podem ser visualizadas em forma de gráficos, reconstruindo os relacionamentos GO e destacando as áreas mais relevantes (CONESA et al., 2005; CONESA; GÖTZ, 2008; TALON et al., 2008). A versão utilizada do BLAST2GO foi a versão pro 5.2.5.

Para essa análise foi feito primeiramente um BLASTp contra o nr (*non-redundant database*), porém mudando o formato de saída para XML (formato requerido para o BLAST2GO). Em seguida esses dados foram carregados no programa, e as associações GO foram criadas. Um exemplo de dado que foi obtido por essa análise é a distribuição do conteúdo enzimático identificado para o microrganismo, que pode ser visualizado na Figura 32. As enzimas identificadas para a sequência de busca já são associadas com o EC Number delas, permitindo rápida identificação das enzimas de interesse. Buscas pelos termos “Nitrile Hydratase” ou pelo EC Number “EC. 4.2.1.84” não produziram resultados.

Figura 32. Distribuição do conteúdo enzimático classificado em EC Number, obtido pelo BLAST2GO para o microrganismo *L. boronitolerans* CBMAI-2094.



Fonte: Elaborada pela autora usando o software BLASTGO

12.1.7. OrthoMCL

Quando se compara relações evolutivas e funcionais entre genes de espécies diferentes, torna-se útil fazer a comparação de ortólogos, isso é, de genes cuja origem remonta a um ancestral comum, mas que divergiram por especiação. O algoritmo OrthoMCL realiza a identificação de grupos ortólogos de proteínas entre dois ou mais organismos, encontrando regiões que preservam o conteúdo gênico em vários genomas (LI; JR; ROOS, 2003). A partir das sequências proteicas de interesse, o programa faz uma comparação do tipo “todos contra todos” utilizando BLASTp seguido pelo algoritmo de agrupamento de Markov (Markov cluster – MCL) para formação dos grupos, sendo que o último é baseado em probabilidade e teoria dos grafos.

As sequências proteicas utilizadas foram: *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI-2094, *Lysinibacillus sphaericus* C3-41, *Lysinibacillus fusiformis* RB-21, *Rhodococcus erythropolis* BG43, *Bacillus cereus* ATCC 14579 e sequências de enzimas nitrilas hidratases depositadas no Uniprot. Todas as sequências genômicas utilizadas foram obtidas através do GenBank. Não foram obtidos resultados positivos para a presença de nitrilas hidratases por essa abordagem.

12.1.8. Busca por similaridades de seqüências: tBLASTn

Como não haviam sido encontradas as proteínas de interesse do trabalho por meio das abordagens descritas, foi feita mais uma tentativa, dessa vez empregando uma busca de similaridade de seqüências usando o algoritmo BLAST. Entretanto, dessa vez foi utilizado o tBLASTn, onde as seqüências de busca estão no formato de nucleotídeo e são traduzidas a proteína para a busca contra uma base de dados de proteínas. Foi utilizada a pseudomolécula do genoma de *L. boronitolerans* como um todo, contra seqüências depositadas de enzimas nitrilas hidratases no Uniprot. Optou-se por utilizar o genoma completo de *L. boronitolerans* e não apenas as CDS's já preditas para verificar se a predição com o FgenesB deixou de incluir a seqüência de interesse.

A versão utilizada do tBLASTn foi a 2.2.31 para GNU/Linux. Como parâmetros de entrada para o tBLASTn foram utilizados: números de alinhamento igual a 10,

números de descritores igual a 10 e *eval* de 10^{-3} . Conjuntamente foi feito outro tBLASTn sem restrição do *eval*. Na análise com *eval* de 10^{-3} não foram encontrados *hits* para as enzimas nitrilas hidratases. Na análise sem *eval* foram encontrados *hits*, porém sob maior escrutínio não foi possível confirmar a presença de NHase em *L. boronitolerans*.

12.2. Busca pelo gene de nitrila hidratase na bactéria *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI 2094 via reação em cadeia da polimerase (PCR) investigativa

12.2.1. Extração do DNA de *Lysinibacillus boronitolerans* CBMAI 2094

A extração do DNA genômico foi feita usando-se o kit *Quick DNA Fungal/Bacterial Miniprep kitTM*, da Zymo Research®. O *miniprep* foi realizado a partir de 5 mL de uma cultura *overnight* do microrganismo, preparada em meio Nutrient Broth (NB), a 28 °C, 150 rpm, e seguiu-se o protocolo do fabricante.

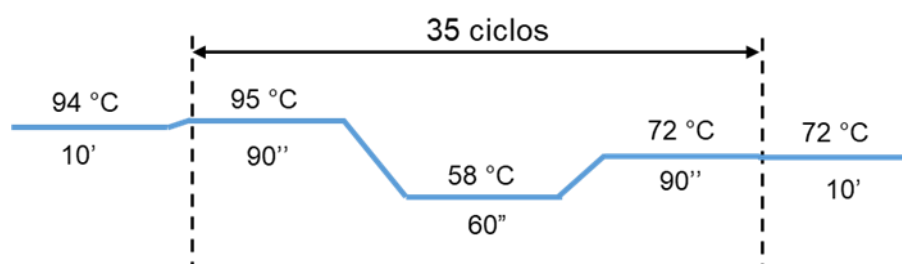
12.2.2. PCR investigativa para sequências conservadas de nitrilas hidratases

Para as reações de PCR investigativa, a síntese dos primers foi realizada pela empresa Exxtend (Paulínia – SP). Todas as PCRs foram realizadas em termociclador Heal Force T960. Como controle positivo foi utilizado o DNA plasmidial com a enzima nitrila hidratase tipo Fe de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277. Como controle negativo não foram adicionados DNA molde. As condições reacionais encontram-se listadas na Tabela 10.

Tabela 10. Condições das reações de PCR para amplificação do gene de nitrila hidratase

Componentes	Concentração
PCR buffer	1X
dNTP mix	200 μ M
MgCl ₂	1,5 mM
F. primer	1 μ M
R. primer	1 μ M
Taq polimerase	2,5 U
Template DNA	0,1 ng/ μ L
PCR H ₂ O	q.s.p. 100 μ L

As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos consistindo de desnaturação (90 s a 95 °C), anelamento (60 s a 58 °C) e extensão (90 s a 72 °C) e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Ao final da reação a mesma foi interrompida por resfriamento a 4 °C. O ciclo está representado na Figura 33.

Figura 33. Representação do ciclo de PCR utilizado para amplificação do gene de nitrila hidratase

Os produtos de reação de PCR foram analisados em gel de agarose a 0,8%. O tamanho dos fragmentos foi estimado em comparação com o marcador Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, da Thermo Scientific.

12.3. Segunda parte: Reações com a nitrila hidratase de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

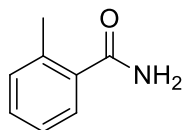
12.3.1. Procedimento geral para hidratações biocatalíticas de nitrilas com células úmidas

Uma colônia de *E. coli* BL21 (DE3) contendo a NHase recombinante foi usada para inocular 5 mL de meio LB com o antibiótico de resistência (cloranfenicol 34 µg/mL). A cultura foi então incubada *overnight* em um agitador rotativo a 37 °C e 150 rpm. Desta cultura *overnight*, foi utilizado 1,5 mL para inocular 100 mL de meio LB-cloranfenicol. Essa nova cultura foi mantida sob agitação orbital, a 37°C, até que se atingisse uma OD₆₀₀ de 0,5, quando foi adicionado IPTG a uma concentração final de 1 mM, e as células foram deixadas induzindo *overnight*, a 120 rpm e 20 °C.

As células foram recolhidas por centrifugação (15 minutos a 3200 rpm), e solubilizadas em 50 mL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,5). O substrato foi então adicionado no meio reacional (0,2 mmol, em 1% DMSO), e a reação foi mantida a 28 °C, 150 rpm por 24 horas. Ao término do tempo reacional a suspensão celular foi centrifugada (15 minutos a 3200 rpm), e a fase aquosa extraída com acetato de etila (3 x 30 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO₄ anidro, e evaporadas em rotaevaporador. O produto foi analisado via GC-FID ou GC-MS.

12.3.2. Procedimento para síntese química da o-toluamida

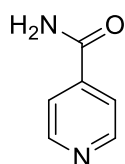
Em um balão de fundo redondo, 1 mmol (117 mg) da nitrila foi solubilizado em 4 mL de CH₂Cl₂ anidro. Após solubilização completa, H₂SO₄ concentrado foi adicionado gota a gota ao meio reacional, sob agitação magnética lenta. A reação foi mantida em temperatura ambiente por aproximadamente 6 horas, e monitorada por GC-FID. Após a conclusão, a reação foi terminada pela adição de NaOH 10 M até pH 8-10 e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila. secas com MgSO₄ anidro, e evaporadas em rotaevaporador. O produto foi analisado via GC-FID e GC-MS. O produto foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa (Hep/EtOAc 50%), com 47,5% de rendimento.



o-toluamida (ANGELES et al., 2010): GC-MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) [*M*⁺] 135 (98), 119 (100), 118 (63), 92 (14), 91 (97), 65 (32).

12.3.3. Procedimento para síntese química da 4-piridinacarboxamida (VERMA et al., 2013)

Em um balão de fundo redondo, 1 mmol (104 mg) da nitrila 4-cianopiridina foi solubilizada em 5 mL de EtOH-H₂O (1:1) e 0,75 mmol (28,4 mg) de borohidreto de sódio foi adicionado. A reação foi mantida a 80°C por 2 horas e monitorada por GC-FID. Após a conclusão, o meio de reação foi concentrado no rotaevaporador e a fase aquosa extraída com EtOAc (3 x 5 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO₄ anidro, e evaporadas em rotaevaporador. O produto foi analisado via GC-FID e GC-MS. O produto foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa (Hep/EtOAc 80%), com 47,5% de rendimento.



4-Piridinacarboxamida (ANGELES et al., 2010): GC-MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) [*M*⁺] 122 (100), 106 (49), 78 (51).

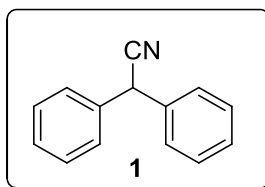
12.4. Terceira parte: Estudos de mutagênese sítio dirigida na nitrila hidratase de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

12.4.1. Estudos de ancoragem molecular com a enzima nitrila hidratase recombinante de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

Para identificação dos resíduos de aminoácidos passíveis de sofrer as mutações, foram realizados estudos de ancoragem molecular. Para a realização dos ensaios de ancoragem molecular, foi selecionada como receptor a proteína de entrada “PDB ID 2qdy”, do Protein Data Bank (SONG et al., 2007). Essa entrada corresponde à nitrila hidratase de *Rhodococcus erythropolis* AJ270. Como substrato modelo para

os *dockings* foi selecionada a difenilacetoneitrila (Figura 34) uma nitrila secundária com dois grupos fenila.

Figura 34. Difenilacetoneitrila



Os experimentos de ancoragem molecular foram realizados utilizando o conjunto de *softwares* Maestro® 2020, da SCHRODINGER®. A estrutura da proteína foi importada para o software e preparada para o estudo de ancoragem molecular utilizando a função *Protein Preparation Wizard*. O seguinte protocolo foi executado: (i) remoção das moléculas de água (exceto aquelas conservadas presentes no sítio ativo); (ii) adição de átomos de hidrogênio; (iii) preenchimento de cadeias laterais incompletas; (iv) minimização de energia utilizando o campo de força OPLS3. Para cada mutante desejado, o resíduo de aminoácido foi selecionado e mutado usando a opção “*Mutate residue*”, assim gerando as proteínas mutantes desejadas. Usando o software Glide®, a caixa de interação (“*grid*”) foi definida pelo *Receptor Grid Generation*, com dimensões de 10 Å x 10 Å x 10 Å. Com a conclusão do preparo das proteínas, os ligantes foram desenhados e importados no formato SDF para o software Maestro® e sua preparação se deu através da função *Ligand Preparation (LigPrep)* a fim de realizar a minimização de energia utilizando campo de força OPLS3, e obter a simulação dos possíveis estados de ionização em pH 7 ± 2.

Para determinar a eficiência de todos os parâmetros utilizados neste estudo, o modelo foi validado por redocking, onde o ligante original da proteína foi removido e seguidamente, ancorado no mesmo sítio enzimático. A qualidade deste resultado foi analisada pelo cálculo Root Mean Square Deviation (RMSD) entre o ligante co-cristalizado e o “redocado”. O valor obtido é considerado de confiança quando o RMSD for inferior a 2 Å (YUSUF *et al.* 2008).

12.4.2. Procedimento geral usado para reação em cadeia de polimerase (PCR) para mutagênese sítio dirigida

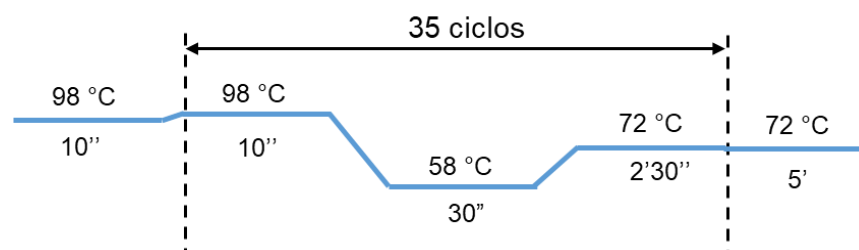
Para as reações de PCR, a síntese dos primers foi realizada pela empresa Exxtend (Paulínia – SP). Todas as PCRs foram realizadas em termociclador Heal Force T960. As condições reacionais com as quantidades de reagentes utilizados encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Condições das reações de “PCR – Site directed mutageneis” para amplificação do gene de nitrila hidratase

Componentes	Quantidade
Phusion Master mix	10 µL
F. primer	1 µL
R. primer	1 µL
Template DNA	1 µL
PCR H ₂ O	7 µL

As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial a 98 °C por 30 segundos, seguida de 35 ciclos consistindo de desnaturação (10 s a 98 °C), anelamento (30 s a 58 °C) e extensão (2 min e 30 s a 72 °C) e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Ao final da reação a mesma foi interrompida por resfriamento a 4 °C. O ciclo está representado na **Figura 35**

Figura 35. Representação do ciclo de PCR utilizado para amplificação do gene de nitrila hidratase



Fonte: Elaborada pela autora

Os produtos de reação de PCR foram analisados em gel de agarose a 0,8%. O tamanho dos fragmentos foi estimado em comparação com o marcador Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, da ThermoFisher Scientific.

12.4.3. Procedimento geral para purificação das bandas de géis de agarose

A purificação de fragmentos de DNA das bandas de géis de agarose foi realizada utilizando-se o kit: illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit. O gel de agarose foi alocado em Transiluminador, equipado com lâmpada UV, e as bandas correspondentes aos fragmentos desejados foram cortadas com auxílio de uma lâmina e armazenados em um tubo tipo eppendorf previamente pesado. Para purificação seguiu-se protocolo do fabricante.

12.4.4. Procedimento para reação de digestão com enzima DpnI (ThermoFisher Scientific)

Em um microtubo do tipo eppendorf foram adicionados 3 µL de 10X buffer Tango, 20 µL do produto de PCR purificado, 6 µL de água milliQ e 1 µL da enzima DpnI. O sistema foi homogeneizado e mantido a 37 °C *overnight*. A enzima foi inativada a 80 °C por 20 minutos, e após a inativação o produto foi purificado com kit illustra e eluído em 25 µL de água MilliQ.

12.4.5. Procedimento para reação de ligação com enzima T4 DNA Ligase (ThermoFisher Scientific)

Em um microtubo do tipo eppendorf foram adicionados 5 µL de 10X T4 DNA Ligase buffer, 25 µL do DNA, 15 µL de água milliQ e 1 µL da enzima T4 DNA Ligase. O sistema foi homogeneizado e após foi mantido a 22 °C por 1 hora. A enzima foi inativada a 65 °C por 10 minutos, e após a inativação o produto foi usado para transformação em linhagens bacterianas.

12.4.6. Protocolo geral para preparo de células competentes de *E.coli*

Uma colônia de *E. coli* foi inoculada em 5 mL de meio LB, e incubada a 37 °C, 150 rpm, *overnight*. Desta cultura, 1,5 mL foi transferido para 50 mL de meio LB. Essa nova cultura foi mantida a 37 °C, 150 rpm, até OD₆₀₀ de 0,5. A suspensão celular foi então centrifugada a 5000 rpm, 4 °C por 20 minutos. O *pellet* obtido foi gentilmente ressuspenso em 25 mL de CaCl₂ (100 mM) gelado e estéril. Essa suspensão foi

incubada em gelo por 15 minutos, e após esse período foi centrifugado novamente e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi então gentilmente ressuspensionado em 8 mL da solução de CaCl_2 gelada, e foram adicionados 2 mL de glicerol puro. Foram feitas alíquotas de 300 μL e as células armazenadas em freezer $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

12.4.7. Procedimento geral para transformação utilizando *E. coli* DH10 β quimicamente competente

O tubo contendo as células competentes foi retirado do freezer $-80\text{ }^\circ\text{C}$ e descongelado em gelo. À 100 μL das células foi adicionado 10 μL do produto da reação de ligação, e a suspensão foi gentilmente homogeneizada. As células foram mantidas em gelo durante 10 minutos e então submetidas a um choque térmico em banho seco a $42\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado 400 μL de meio 2YT+gli, as células foram incubadas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora sob agitação orbital a 300 rpm. Ao final de 1 hora, foram preparadas placas com 100 e 200 μL da suspensão celular em meio 2YT +gli sólido suplementado com o antibiótico de resistência (cloranfenicol – 34 $\mu\text{g/mL}$), e estas foram incubadas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ *overnight*. Foram selecionadas colônias que cresceram, e estas foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT + gli e usadas para fazer miniprep dos plasmídeos e armazenar as culturas no $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

12.4.8. Extração de DNA plasmidial usando kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit

Para o miniprep foi realizado o protocolo da fabricante. Cinco mL de uma cultura *overnight* das células de interesse (em meio LB) foram centrifugadas e todo o meio removido. Ao pellet foi adicionado 250 μL do “Resuspension Buffer (R3) with RNase A” e o pellet foi ressuspensionado até o meio estar homogêneo. Foi então adicionado 250 μL do “Lysis Buffer (L7)”. O meio foi homogeneizado delicadamente por inversão do tubo, e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Foi então adicionado 350 μL do “Precipitation Buffer (N4)”, e a mistura foi homogeneizada por inversão do tubo imediatamente. O lisado foi centrifugado a $12000 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi adicionado na coluna spin, acondicionada em um tubo de 2 mL, e a coluna foi centrifugada a $12000 \times g$ por 1 minuto. O eluato foi descartado. Para lavagem da

coluna, 500 µL do “Wash Buffer (W10)” foi adicionado na coluna, e incubado em temperatura ambiente por 1 minuto, seguido por uma centrifugação a 12000 × g por 1 minuto. O eluato foi descartado, e 700 µL de “Wash Buffer (W9)” foi adicionado na coluna, seguido por uma centrifugação a 12000 × g por 1 minuto. O eluato foi descartado e a coluna foi centrifugada novamente a 12,000 × g por 1 minuto, para remoção de resquícios das soluções de lavagem. A coluna foi colocada em um tubo limpo de 1,5 mL, e a eluição do DNA foi feita com 30 µL de água pré-aquecida, que foi adicionada ao centro da coluna, seguido por um período de incubação de 1 minuto. A coluna foi centrifugada a 14000 x g por 2 minutos, e o tubo com DNA plasmidial armazenado em freezer -20 °C.

12.4.9. Transformação em *E. coli* BL21 DE3

O tubo contendo as células competentes foi retirado do freezer -80 °C e descongelado em gelo. À 100 µL das células foi adicionado 1 µL do DNA plasmidial pós miniprep, e a suspensão foi gentilmente homogeneizada. As células foram mantidas em gelo durante 30 minutos e então submetidas a um choque térmico em banho seco a 42 °C por 2 minutos, e após esse tempo mantidas por mais 2 minutos em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado 500 µL de meio 2YT+gli, as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação orbital a 300 rpm. Ao final de 1 hora, foram preparadas placas com 100 µL da suspensão celular em meio 2YT +gli sólido suplementado com o antibiótico de resistência (cloranfenicol – 34 µg/mL), e estas foram incubadas a 37 °C *overnight*.

12.4.10. Protocolo geral para análise de proteína por SDS page

Uma colônia de *E. coli* BL21 (DE3) contendo a NHase recombinante foi usada para inocular 5 mL de meio LB com o antibiótico de resistência (cloranfenicol 34 µg/mL). A cultura foi então incubada *overnight* em um agitador rotativo a 37 °C e 150 rpm. Desta cultura *overnight*, foi utilizado 1,5 mL para inocular 100 mL de meio LB-cloranfenicol. Essa nova cultura foi mantida sob agitação orbital, a 37°C, até que se atingisse uma OD₆₀₀ de 0,5. Quando foi atingida a OD₆₀₀ de interesse, foi retirado 2 mL da cultura, e essa alíquota foi centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos. O

sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 200 µL de tampão de lise, e armazenado em -20 °C até análise por SDS-page. Ao restante da cultura foi adicionado IPTG a uma concentração final de 1 mM, e as células foram deixadas induzindo *overnight*, a 120 rpm e 20 °C.

Ao final da indução as células foram coletadas por centrifugação (3200 rpm – 15 minutos) e ressuspensionadas em 3,5 mL de tampão de lise (acrescido de mix IP) gelado. Nessa etapa a suspensão celular pode ser armazenada em freezer.

A seguir as células foram rompidas em sonificador (Bandelin Sonopuls HD-2070), operando com 30–40% da potência máxima (9 ciclos de 30 segundos, com intervalo de 1 minuto entre os ciclos, em banho de gelo). Os debris celulares foram separados por centrifugação (14000 rpm, 20 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e armazenado a -20 °C até análise por SDS-page, e o precipitado foi ressuspensionado em 3,5 mL de tampão de lise e também foi armazenado em -20 °C até análise por SDS-page.

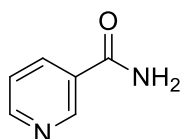
As amostras para SDS-page foram preparadas utilizando-se para o sobrenadante e precipitado 2 µL da amostra proteica pós lise, e completadas com 18 µL de água. Da amostra referente à fração não induzida foi pipetado 20 µL. À todas as amostras foram adicionados 5 µL de Tampão de Laemmli 6x, e a seguir as amostras foram homogeneizadas e levadas a banho seco a 95 °C por 5 minutos. Após esse período as amostras foram centrifugadas rapidamente (1000 rpm, 1 minuto) e aplicadas no gel. Como marcador de peso molecular foi usado BenchMark™ Protein Ladder da Invitrogen.

As análises foram realizadas em cuba de eletroforese vertical Kasvi, com fonte de eletroforese OWL EC300 da Thermo Scientific. O tampão de corrida usado foi Tris-Glicina 1X. Foi realizada uma pré-corrida a 75 V por 30 minutos para empacotar a amostra, seguida por uma corrida de 40 minutos a 200 V. Os géis foram corados com auxílio de solução corante, e descorados em solução descorante. Os géis foram documentados no equipamento ChemiDoc Imaging Systems, da Biorad.

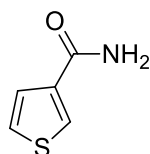
12.4.11. Procedimento alternativo para hidratações biocatalíticas de nitrilas com células úmidas

Uma colônia de *E. coli* BL21 (DE3) contendo a NHase recombinante foi usada para inocular 5 mL de meio LB com o antibiótico de resistência (cloranfenicol 34 µg/mL). A cultura foi então incubada *overnight* em um agitador rotativo a 37 °C e 150 rpm. Desta cultura *overnight*, foi utilizado 0,5 mL para inocular 30 mL de meio LB-cloranfenicol. Essa nova cultura foi mantida sob agitação orbital, a 37°C, até que se atingisse uma OD₆₀₀ de 0,5, quando foi adicionado IPTG a uma concentração final de 1 mM, e as células foram deixadas induzindo *overnight*, a 120 rpm e 20 °C.

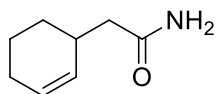
Da cultura deixada induzindo *overnight*, 20 mL foram recolhidos por centrifugação (15 minutos a 3200 rpm), e as células foram solubilizadas em 10 mL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,5) acrescido de 10 µL de solução traços de Fe (2 mg de FeCl₃/500 mL H₂O). O substrato foi então adicionado no meio reacional (0,04 mmol, em 1% DMSO), e a reação foi mantida a 28 °C, 150 rpm por 24 horas. Ao término do tempo reacional a suspensão celular foi centrifugada (15 minutos a 10000 rpm), e a fase aquosa extraída com acetato de etila (3 x 10 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO₄ anidro, e evaporadas em rotaevaporador. O produto foi analisado via GC-FID ou GC-MS.



nicotinamida: GC-MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) [*M*⁺] 122 (100), 106 (66), 78 (85), 51 (56), 44 (92).



tiofeno-3-carboxamida: GC-MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) [*M*⁺] 127 (76), 111 (100), 83 (21), 45 (18), 39 (40).



2-(ciclohex-2-en-1-il)acetamida: GC-MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) [*M*⁺] 139 (42), 95 (29), 81 (67), 67 (62), 59 (100), 44 (55), 41 (39), 39 (36).

12.4.12. Procedimento para reação de digestão com enzimas Aval e NcoI (New England Biolabs)

Em um microtubo do tipo eppendorf foram adicionados 1 μ L de CutSmart Buffer 10X (para Aval) ou 1 μ L de NEBuffer 10X (para NcoI), 5 μ L do DNA plasmidial de interesse, 3,5 μ L de água milliQ e 0,5 μ L da enzima. O sistema foi homogeneizado e mantido a 37 °C por 2 horas. A enzima foi inativada a 80 °C por 20 minutos, e após a inativação o produto foi analisado em gel de agarose.

Referências bibliográficas

- AHMED, I. *et al.* Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1117–1125, 2007.
- AHMED, T. J.; KNAPP, S. M. M.; TYLER, D. R. Frontiers in catalytic nitrile hydration: Nitrile and cyanohydrin hydration catalyzed by homogeneous organometallic complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 7–8, p. 949–974, 2011.
- ALBARRÁN-VELO, J.; LAVANDERA, I.; GOTOR-FERNÁNDEZ, V. Sequential Two-Step Stereoselective Amination of Allylic Alcohols through the Combination of Laccases and Amine Transaminases. **ChemBioChem**, v. 21, n. 1–2, p. 200–211, 2020.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ANGELES, N. A. *et al.* Novel synthesis of primary arylamides from aryl methyl ketone oxidations using iodine in aqueous ammonia. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 905–908, 2010.
- ARNOLD, F. H. Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 57, n. 16, p. 4143–4148, 2018.
- ARNOLD, F. H. Innovation by Evolution: Bringing New Chemistry to Life (Novel lecture). **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 58, n. 16, p. 2–9, 2019.
- ASANO, Y.; TANI, Y.; YAMADA, H. A New Enzyme “Nitrile Hydratase” which Degrades Acetonitrile in Combination with Amidase. **Agric. Biol. Chem.**, v. 44, n. 9, p. 2251–2252, 1980.
- ASANO, Y.; YASUDA, T.; TANI, Y. A New Enzymatic Method of Acrylamide Production producing strains. **Agric. Biol. Chem.**, v. 46, n. 5, p. 1183–1189, 1982.
- ASHBURNER, M. *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000.
- ASSEFA, S. *et al.* ABACAS: Algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. **Bioinformatics**, v. 25, n. 15, p. 1968–1969, 2009.
- BADENHORST, C. P. S.; BORNSCHEUER, U. T. Getting Momentum: From Biocatalysis to Advanced Synthetic Biology. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 180–198, 2018.

- BANERJEE, A.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. The nitrile-degrading enzymes: Current status and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 33-44, 2002.
- 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.
- BERRIMAN, M. *et al.* ACT: the Artemis comparison tool. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3422–3423, 2005.
- BHALLA, T. C. *et al.* Nitrile Metabolizing Enzymes in Biocatalysis and Biotransformation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 4, p. 925–946, 2018.
- BINNS, D. *et al.* InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1236–1240, 2014.
- BIROLI, W. G. *et al.* Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 481–510, 2015.
- BORNSCHEUER, U. T. *et al.* Engineering the third wave of biocatalysis. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 185–194, 2012.
- BORNSCHEUER, U. T. The fourth wave of biocatalysis is approaching. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 376, n. 2110, p. 1–7, 2018.
- CHEN, J. *et al.* Microbial Transformation of Nitriles to High-Value Acids or Amides. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 113, p. 33–77, 2009.
- CHEN, J. *et al.* Improving stability of nitrile hydratase by bridging the salt-bridges in specific thermal-sensitive regions. **Journal of Biotechnology**, v. 164, n. 2, p. 354–362, 2012.
- CHEN, L. *et al.* **Oxazolone and pyrrolidinone-substitute arylamides as P2X3 and P2X2/3 antagonists**. US 2010/0324069 A1. Depósito: 22 jun. 2009. Concessão: 22 jun. 2010.
- CHENG, Z.; XIA, Y.; ZHOU, Z. Recent Advances and Promises in Nitrile Hydratase: From Mechanism to Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. April, p. 1–18, 2020.
- CHHIBA-GOVINDJEE, V. P. *et al.* Bacterial nitrilases and their regulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 4679-4692, 2019.
- COELHO, P. S. *et al.* Olefin Cyclopropanation via Carbene Transfer Catalyzed by Engineered Cytochrome P450 Enzymes. **Science**, v. 339, n. 6117, p. 307–310, 2013.

- CONESA, A. *et al.* Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.
- CONESA, A.; GÖTZ, S. Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2008, p. 1–12, 2008.
- DE SOUZA, R. O. M. A.; MIRANDA, L. S. M.; BORNSCHEUER, U. T. A Retrosynthesis Approach for Biocatalysis in Organic Synthesis. **Chemistry - A European Journal**, v. 23, n. 50, p. 12040–12063, 2017.
- DORR, B. M.; FUERST, D. E. ScienceDirect Enzymatic amidation for industrial applications. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 43, p. 127–133, 2018.
- DUNBABIN, A. *et al.* Furfurylamines from biomass: Transaminase catalysed upgrading of furfurals. **Green Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 397–404, 2017.
- FREITAS, F.; SCHULZ, S.; MORAES, E. Pesquisa de terminologias e ontologias atuais em biologia e medicina. **Reciis**, v. 3, n. 1, p. 8–20, 2009.
- FUCHS, M.; FARNBERGER, J. E.; KROUTIL, W. The Industrial Age of Biocatalytic Transamination. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, p. 6965–6982, 2015.
- GONG, J. S. *et al.* Nitrile-converting enzymes as a tool to improve biocatalysis in organic synthesis: recent insights and promises. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 69–81, 2017.
- GUMATAOTAO, N. *et al.* Identification of an Active Site-bound Nitrile Hydratase Intermediate through Single Turnover Stopped-flow. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 288, n. 22, p. 15532–15536, 2013.
- HAMMER, S. C.; KNIGHT, A. M.; ARNOLD, F. H. Design and evolution of enzymes for non-natural chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 7, p. 23–30, 2017.
- HANEFELD, U.; HOLLMANN, F.; PAUL, C. E. Biocatalysis making waves in organic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 51, p. 594–627, 2022.
- HECKMANN, C. M.; PARADISI, F. Looking Back: A Short History of the Discovery of Enzymes and How They Became Powerful Chemical Tools. **ChemCatChem**, v. 12, n. 24, p. 6082–6102, 2020.
- 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.

- HOPMANN, K. H.; GUO, J. D.; HIMO, F. Theoretical investigation of the first-shell mechanism of nitrile hydratase. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 4850–4856, 2007.
- HOPMANN, K. H.; HIMO, F. On the role of tyrosine as catalytic base in nitrile hydratase. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 22, p. 3452–3459, 2008.
- IMM, S. *et al.* An efficient and general synthesis of primary amines by ruthenium-catalyzed amination of secondary alcohols with ammonia. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 44, p. 8126–8129, 2010.
- JENNIFER KAN, S. B. *et al.* Genetically programmed chiral organoborane synthesis. **Nature**, v. 552, n. 7683, p. 132–136, 2017.
- JIAO, S. *et al.* Advances in acrylamide bioproduction catalyzed with *Rhodococcus* cells harboring nitrile hydratase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 3, p. 1001–1012, 2020.
- KAMBLE, A.; BANERJEE, U. C. Optimization of crucial reaction conditions for the production of nicotinamide by nitrile hydratase using response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 2–3, p. 143–150, 2008.
- KAN, S. B. J. *et al.* Directed evolution of cytochrome c for carbon-silicon bond formation: Bringing silicon to life. **Science**, v. 354, n. 6315, p. 1048–1051, 2016.
- KAYANUMA, M. *et al.* A QM/MM study of the initial steps of catalytic mechanism of nitrile hydratase. **Chemical Physics Letters**, v. 623, p. 8–13, 2015.
- KOBAYASHI, M.; NAGASAWA, T.; YAMADA, H. Enzymatic-Synthesis of Acrylamide - a Success Story Not Yet Over. **Trends in Biotechnology**, v. 10, n. 11, p. 402–408, 1992.
- KOSZELEWSKI, D. *et al.* ω -Transaminases for the synthesis of non-racemic α -chiral primary amines. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 324–332, 2010.
- KURTZ, S. *et al.* Versatile and open software for comparing large genomes. **Genome Biology**, v. 5, n. 2, p. R12, 2004.
- LAGESEN, K. *et al.* RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 9, p. 3100–3108, 2007.
- LI, L.; JR, C. J. S.; ROOS, D. S. OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. **Genome Research**, v. 13, n. 9, p. 2178–2189, 2003.
- 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, Y. *et al.* Enhancement of thermo-stability and product tolerance of *Pseudomonas putida* nitrile hydratase by fusing with self-assembling peptide. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 3, p. 249–252, 2014a.
- LIU, Y. *et al.* Effect of flexibility and positive charge of the C-terminal domain on the activator P14K function for nitrile hydratase in *Pseudomonas putida*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 352, p. 38-44, 2014b.
- ŁYSKOWSKI, A. *et al.* Crystal Structure of an (*R*)-Selective ω -Transaminase from *Aspergillus terreus*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87350, 2014.
- MA, S. K. *et al.* A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate. **Green Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 81–86, 2010.
- MALIK, M. S.; PARK, E. S.; SHIN, J. S. Features and technical applications of ω -transaminases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 5, p. 1163–1171, 2012.
- MALLIN, H.; HÖHNE, M.; BORNSCHEUER, U. T. Immobilization of (*R*)- and (*S*)-amine transaminases on chitosan support and their application for amine synthesis using isopropylamine as donor. **Journal of Biotechnology**, v. 191, p. 32–37, 2014.
- MARTÍNEZ, R.; SCHWANEBERG, U. A roadmap to directed enzyme evolution and screening systems for biotechnological applications. **Biological Research**, v. 46, n. 4, p. 395–405, 2013.
- MASHWEU, A. R. *et al.* Substrate Profiling of the Cobalt Nitrile Hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* ATCC BAA 870. **Molecules**, v. 25, n. 1, 2020.
- MATHEW, S.; YUN, H. ω -Transaminases for the production of optically pure amines and unnatural amino acids. **ACS Catalysis**, v. 2, n. 6, p. 993–1001, 2012.
- MITRA, S.; HOLZ, R. C. Unraveling the catalytic mechanism of nitrile hydratases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7397–7404, 2007.
- MORAES, M. I. **Hidratação enzimática de nitrilas pela enzima Nitrila Hidratase (NHase) para a obtenção de amidas**. 2019. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual Paulista, 2019.
- NAGASAWA, T. *et al.* Nitrile Hydratase-Catalyzed Production of Nicotinamide from 3-Cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous* J1. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1766-1769, 1988.
- NELP, M. T. *et al.* A protein-derived oxygen is the source of the amide oxygen of nitrile hydratases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 15, p. 7822–7829, 2016.

- OTTEN, L. G.; HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E. Enzyme engineering for enantioselectivity: from trial-and-error to rational design? **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 46–54, 2010.
- PEI, X. *et al.* 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. *et al.* Identification and functional analysis of the activator gene involved in the biosynthesis of Co-type nitrile hydratase from *Aurantimonas manganoxydans*. **Journal of Biotechnology**, v. 251, p. 38–46, 2017.
- PELLIS, A. *et al.* Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. **New Biotechnology**, v. 40, p. 154–169, 2018.
- PITZER, J.; STEINER, K. Amides in Nature and Biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 235, p. 32–46, 2016.
- PORTER, J. L.; RUSLI, R. A.; OLLIS, D. L. Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. v. 2601, p. 197–203, 2016.
- POTTER, S. C. *et al.* InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D351–D360, 2018.
- 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.
- PRECIGOU, S.; GOULAS, P.; DURAN, R. Rapid and specific identification of nitrile hydratase (NHase)-encoding genes in soil samples by polymerase chain reaction. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 1, p. 155–161, 2001.
- PREJANÒ, M. *et al.* Reaction Mechanism of Low-Spin Iron(III)- and Cobalt(III)-Containing Nitrile Hydratases: A Quantum Mechanics Investigation. **Inorganic Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 13390–13400, 2017.
- PRIER, C. K. *et al.* Enantioselective, intermolecular benzylic C-H amination catalysed by an engineered iron-haem enzyme. **Nature Chemistry**, v. 9, n. 7, p. 629–634, 2017.
- RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 95–99, 1963.
- 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.

- REETZ, M. T.; KREBS, G. P. L. Challenges in the directed evolution of stereoselective enzymes for use in organic chemistry. **Comptes Rendus Chimie**, v. 14, n. 9, p. 811–818, 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.
- ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, p. 779–815, 1993.
- SAVILE, C. K. *et al.* Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. **Science**, v. 329, n. 5989, p. 305–309, 2010.
- SCHNEIDER, N. *et al.* Big Data from Pharmaceutical Patents: A Computational Analysis of Medicinal Chemists Bread and Butter. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4385–4402, 2016.
- SHELDON, R. A. Green chemistry and resource efficiency: towards a green economy. **Green Chem.**, v. 18, n. 11, p. 3180–3183, 2016a.
- SHELDON, R. A. Engineering a more sustainable world through catalysis and green chemistry. **The Royal Society**, v. 1, n. February, p. 1–7, 2016b.
- SHELDON, R. A. The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. **Green Chem.**, v. 19, n. 1, p. 18–43, 2017.
- SHELDON, R. A.; BRADY, D. Green Chemistry, Biocatalysis, and the Chemical Industry of the Future. **ChemSusChem**, v. 15, e202102628, 2022.
- SHELDON, R. A.; PEREIRA, P. C. Biocatalysis engineering: The big picture. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 10, p. 2678–2691, 2017.
- SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 2, p. 801–838, 2018.
- SILOTO, R. M. P.; WESELAKE, R. J. Site saturation mutagenesis: Methods and applications in protein engineering. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 181–189, 2012.
- SIMON, R. C. *et al.* Recent developments of cascade reactions involving ω -transaminases. **ACS Catalysis**, v. 4, n. 1, p. 129–143, 2014.
- SOLOVYEV, V.; SALAMOV, A. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In: LI, R. W. **Metagenomics and its Applications in Agriculture**, 2010, v1, cap. 4, p. 61–78.
- SONG, L. *et al.* High resolution X-ray molecular structure of the nitrile hydratase from *Rhodococcus erythropolis* AJ270 reveals posttranslational oxidation of two cysteines

into sulfinic acids and a novel biocatalytic nitrile hydration mechanism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, n. 2, p. 319–324, 2007.

SONG, L. *et al.* Efficient expression in *E. coli* of an enantioselective nitrile hydratase from *Rhodococcus erythropolis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 4, p. 755–762, 2008.

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

TALON, M. *et al.* High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 10, p. 3420–3435, 2008.

TEIXEIRA, I.S. **Síntese enzimática de amins quirais via aminação redutiva**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

TEIXEIRA, I. S. *et al.* Computer Modeling Explains the Structural Reasons for the Difference in Reactivity of Amine Transaminases Regarding Prochiral Methylketones. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p.77, 2022.

TEIXEIRA, I. S., *et al.* The role of biocatalysis in green and sustainable chemistry. In. BENVENUTO, M. A.; KOSMAS, S. **Green Chemistry: and UN Sustainability Development Goals**, Berlin, Boston: De Gruyter, 2022, v. 1, cap. 7, pp. 159-174.

TEIXEIRA, I. S.; MILAGRE, C. D. F. Evolução dirigida de enzimas: pequenas modificações, melhores biocatalisadores. **Quimica Nova**, v. 43,p.773-786, 2020.

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.

VERMA, P. K. *et al.* Transition metal-free sodium borohydride promoted controlled hydration of nitriles to amides. **Synthetic Communications**, v. 43, n. 21, p. 2867–2875, 2013.

WANG, Z. *et al.* Establishment of Bioprocess for Synthesis of Nicotinamide by Recombinant *Escherichia coli* Expressing High-Molecular-Mass Nitrile Hydratase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 4, p. 1458–1466, 1 ago. 2017.

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

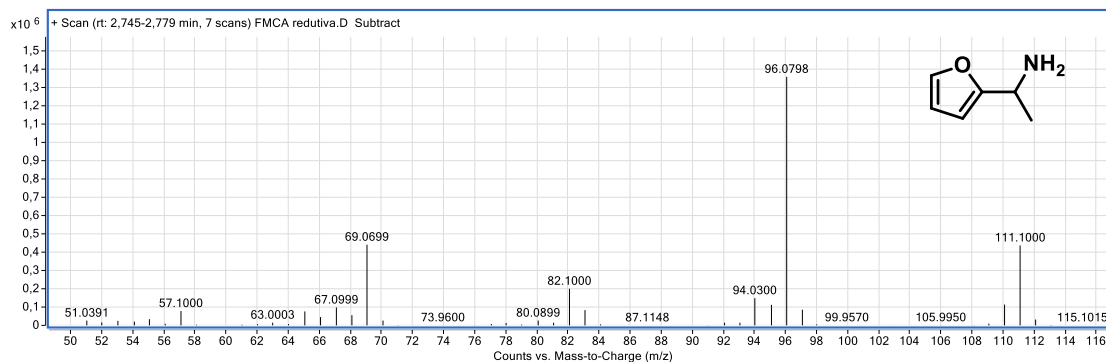
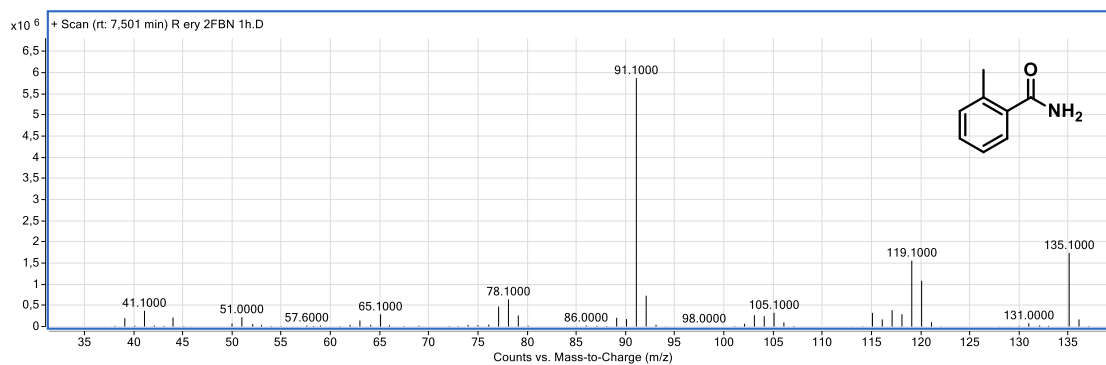
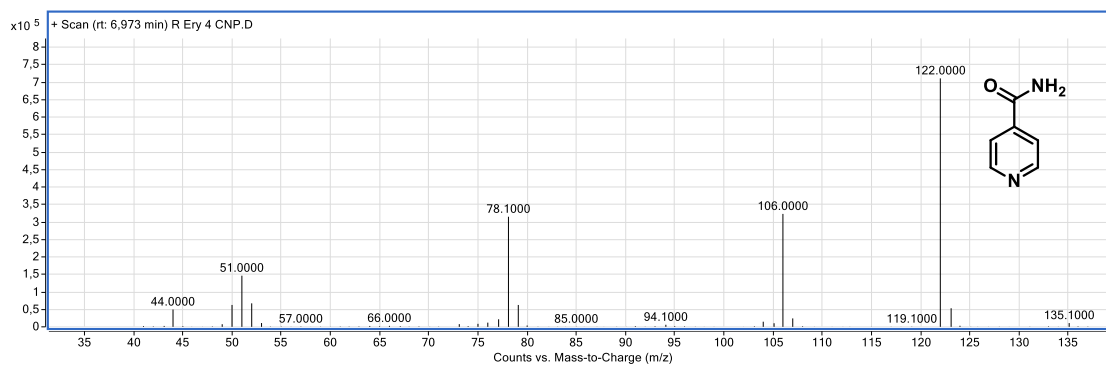
XIA, Y. *et al.* New insights into the QuikChange™ process guide the use of Phusion DNA polymerase for site-directed mutagenesis. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 2, p. e12, 2015.

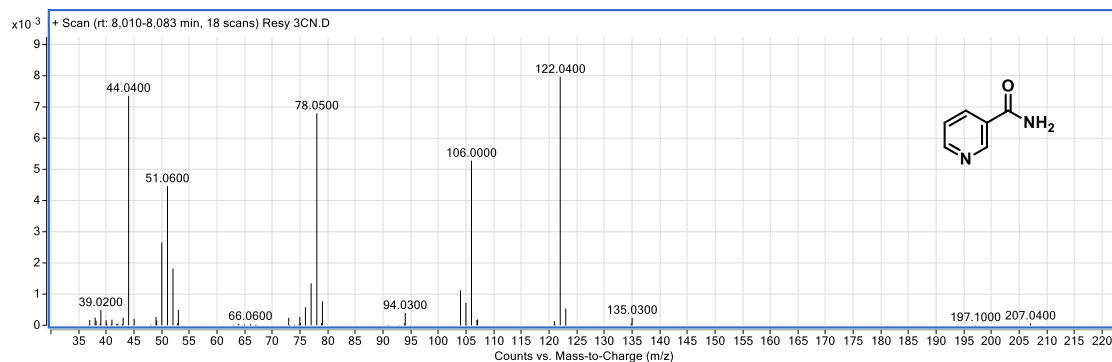
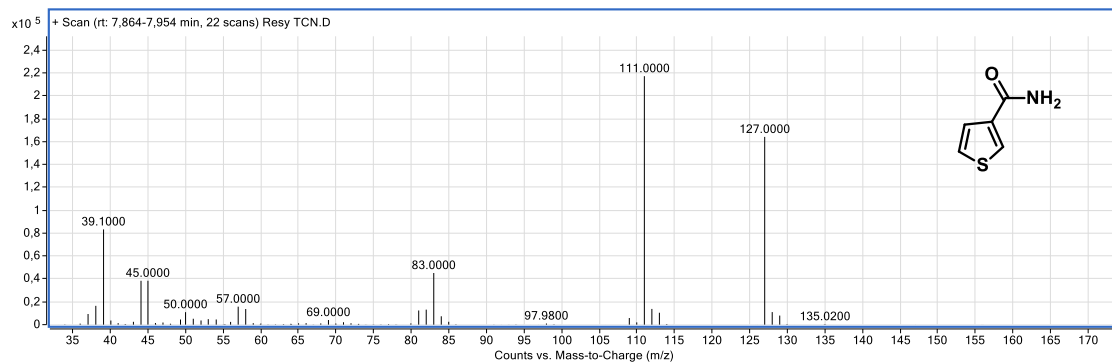
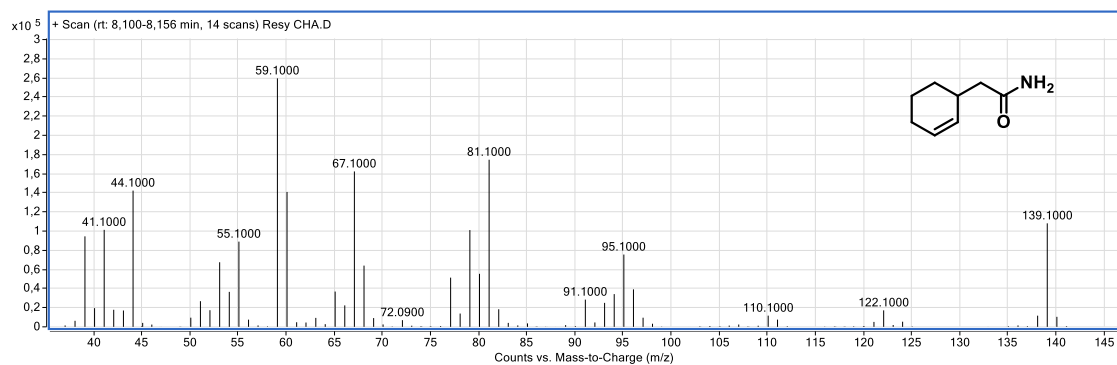
YAMANAKA, Y. *et al.* Kinetic and structural studies on roles of the serine ligand and a strictly conserved tyrosine residue in nitrile hydratase. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 655–665, 2010.

Anexos

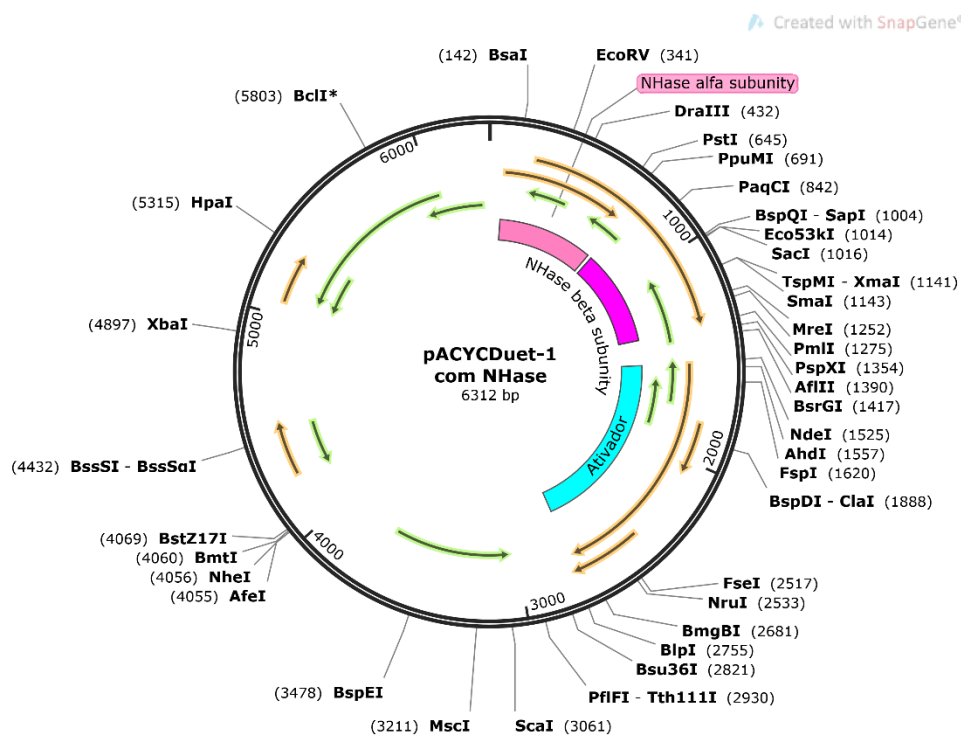
LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. GC-MS (EI, 70 eV) da 1-(furan-2-il)etanamina	129
Anexo 2. GC-MS (EI, 70 eV) o-toluamida	129
Anexo 3. GC-MS (EI, 70 eV) isonicotinamida	129
Anexo 4. GC-MS (EI, 70 eV) nicotinamida.....	130
Anexo 5. GC-MS (EI, 70 eV) tiofeno-3-carboxamida	130
Anexo 6. GC-MS (EI, 70 eV) 2-(ciclohex-2-en-1-il)acetamida	130
Anexo 7. Vetor pACYCDuet com nitrila hidratase de <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277.....	131
Anexo 8. Valores de RMSD para as variantes.....	132
Anexo 9. Gráfico de Ramachandran da enzima selvagem	133
Anexo 10. Gráfico de Ramachandran da variante W118A	134
Anexo 11. Gráfico de Ramachandran da variante W118D	135
Anexo 12. Gráfico de Ramachandran da variante W118H	136
Anexo 13. Gráfico de Ramachandran da variante W118S	137
Anexo 14. Sequenciamento W118A-1	138
Anexo 15. Sequenciamento W118A-2	138
Anexo 16. Sequenciamento W118D-1	138
Anexo 17. Sequenciamento W118H-1	139

Anexo 1. GC-MS (EI, 70 eV) da 1-(furan-2-il)etanamina**Anexo 2. GC-MS (EI, 70 eV) o-toluamida****Anexo 3. GC-MS (EI, 70 eV) isonicotinamida**

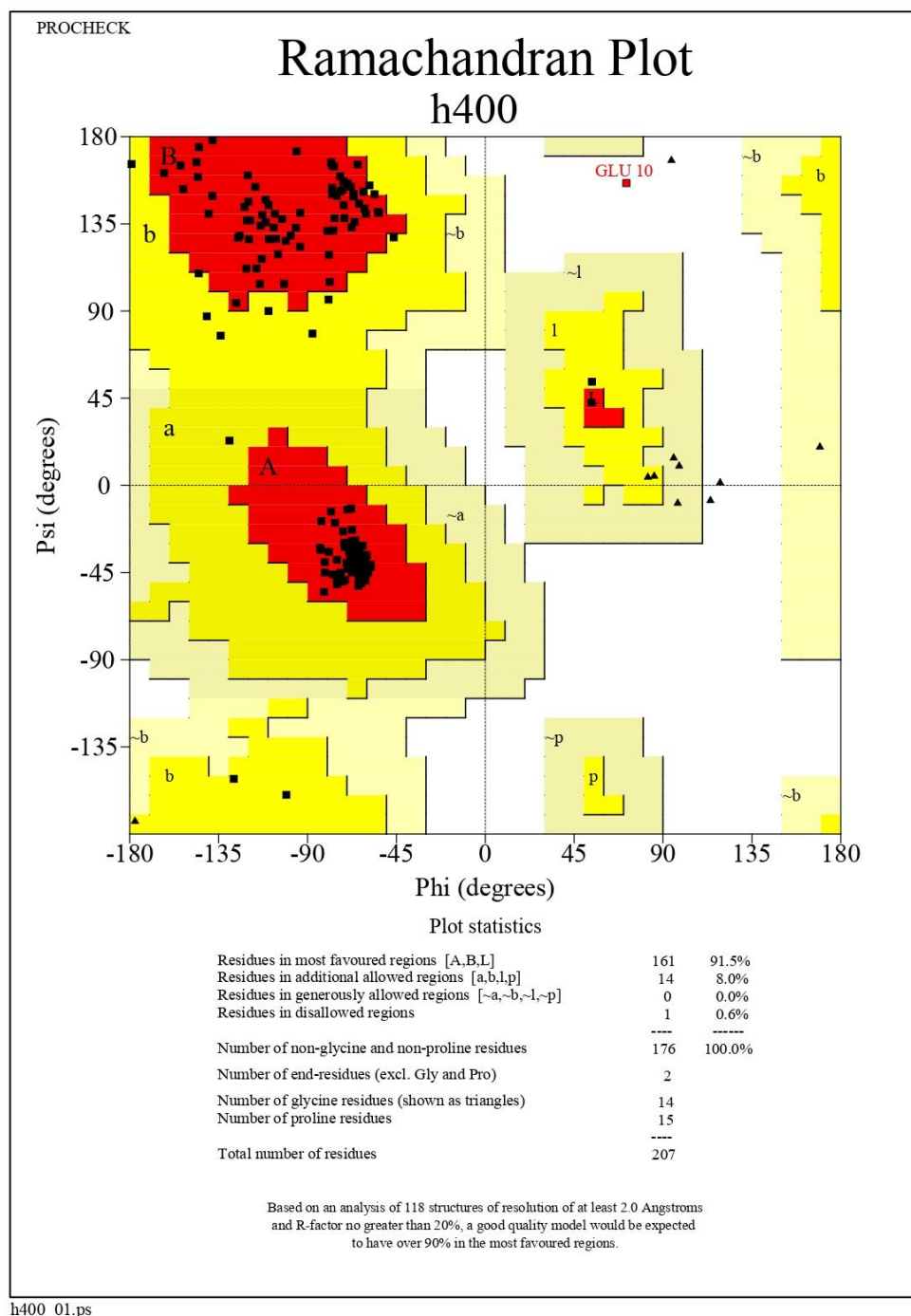
Anexo 4. GC-MS (EI, 70 eV) nicotinamida**Anexo 5. GC-MS (EI, 70 eV) tiofeno-3-carboxamida****Anexo 6. GC-MS (EI, 70 eV) 2-(ciclohex-2-en-1-il)acetamida**

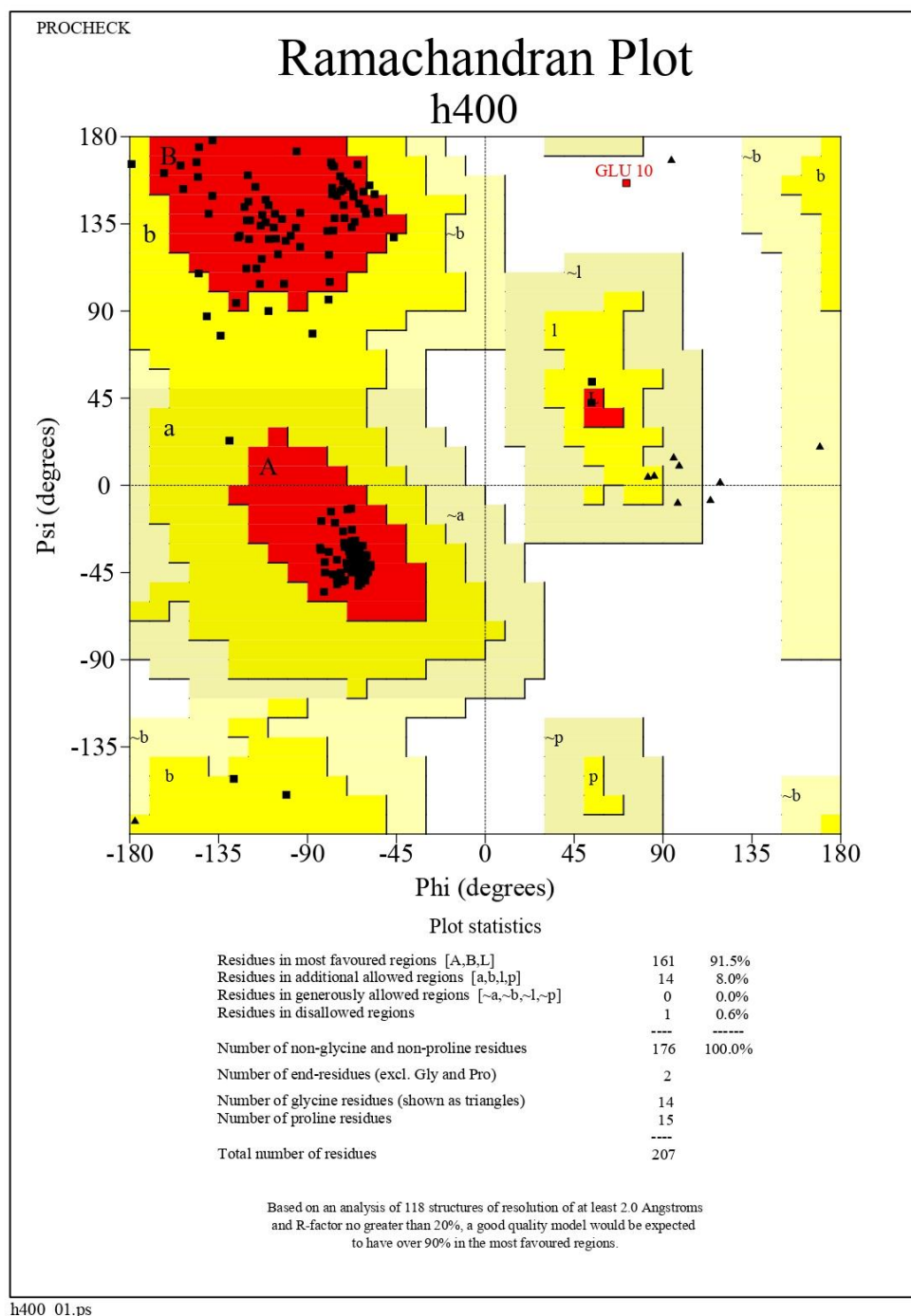
Anexo 7. Vetor pACYCDuet com nitrila hidratase de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

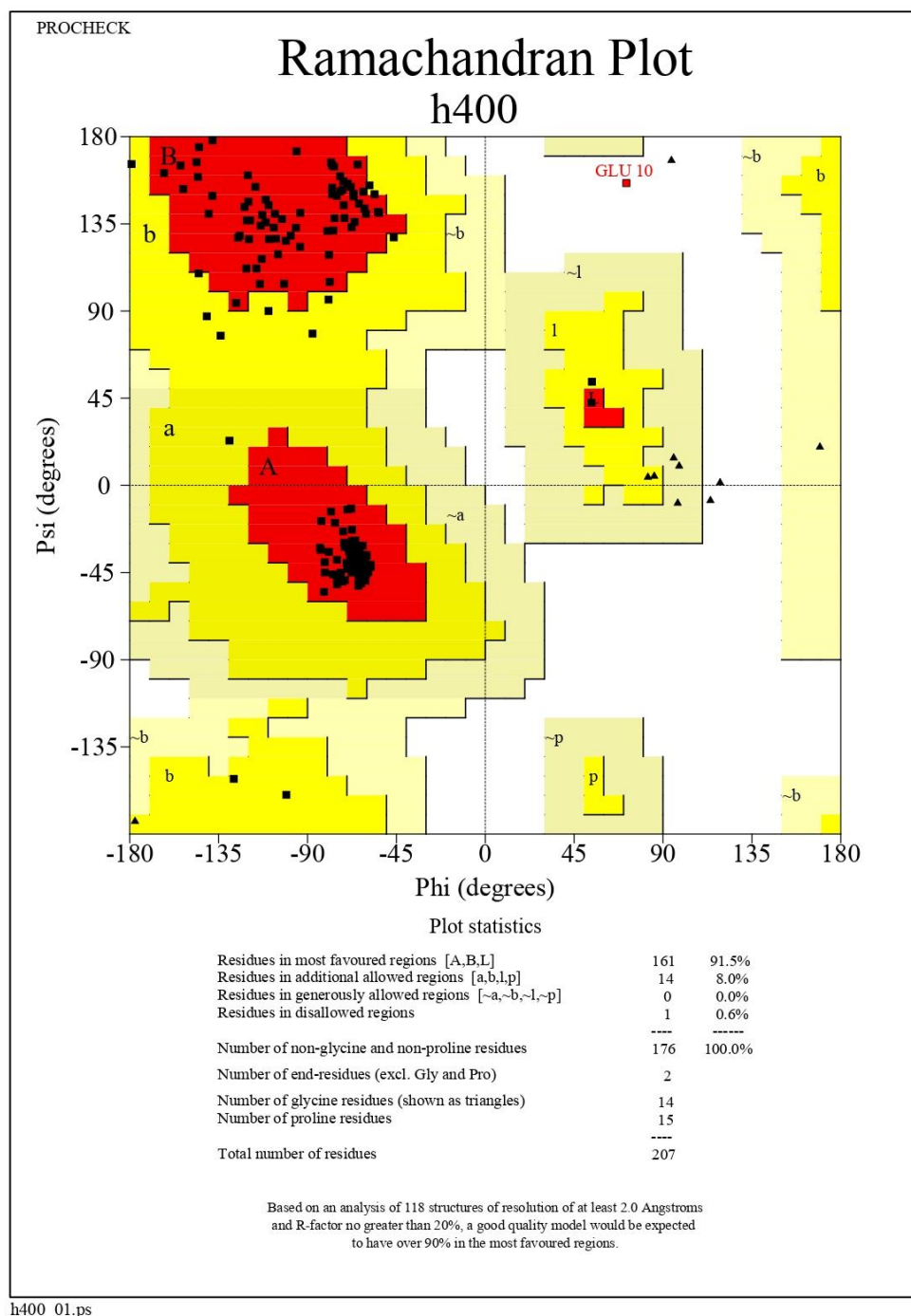


Anexo 8. Valores de RMSD para as variantes

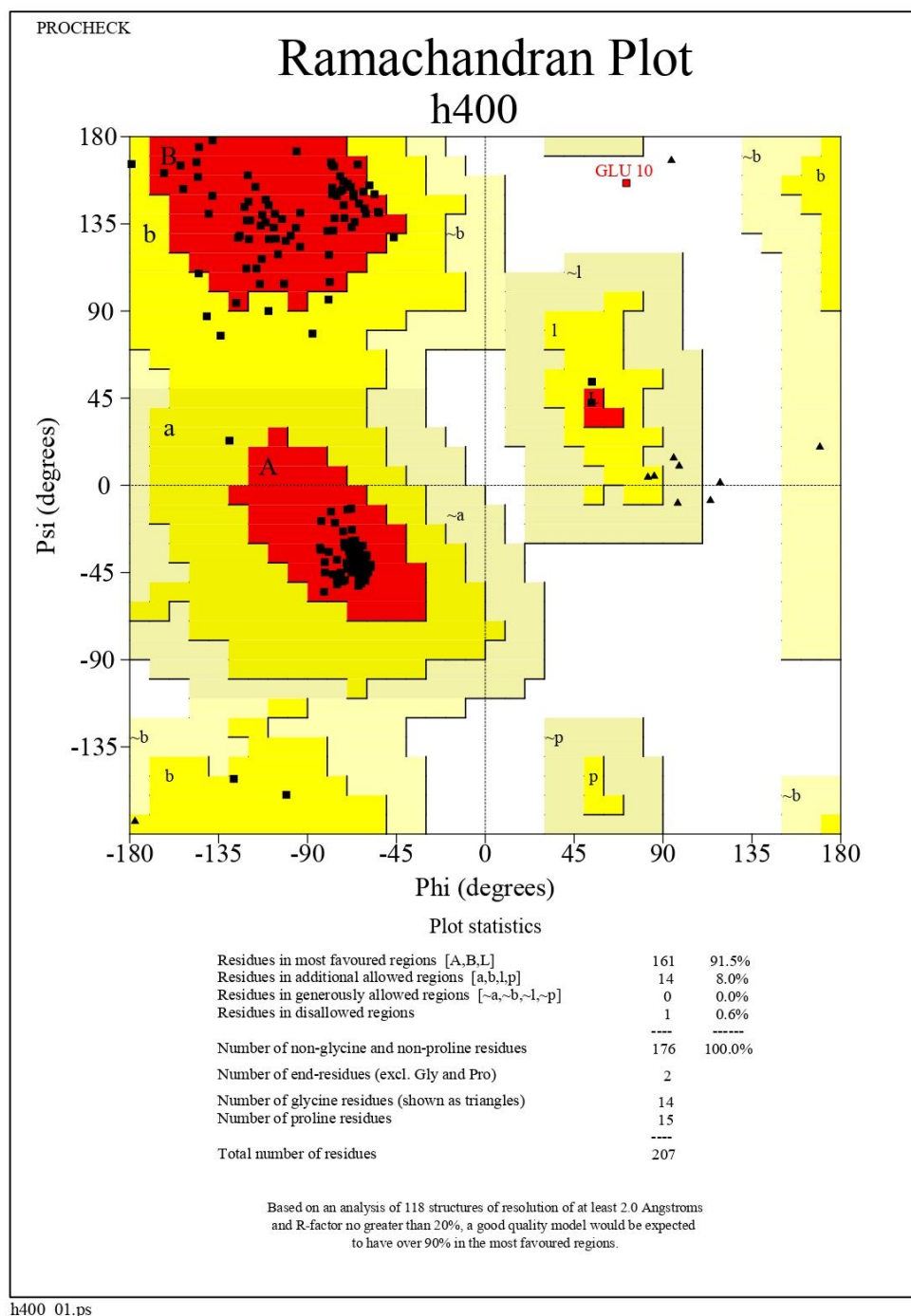
Proteína	RMSD
wild	1,353
W118A	5.851
W118D	1.043
W118H	2.013
W118S	5.776
Y76A	3.196
Y76D	2.397
Y76H	2.270
Y76S	2.075
Y72A	2.820
Y72D	0.888
Y72H	0.928
Y72S	0.762
Y37A	5.051
Y37D	3.531
Y37H	0.561
Y37S	5.249

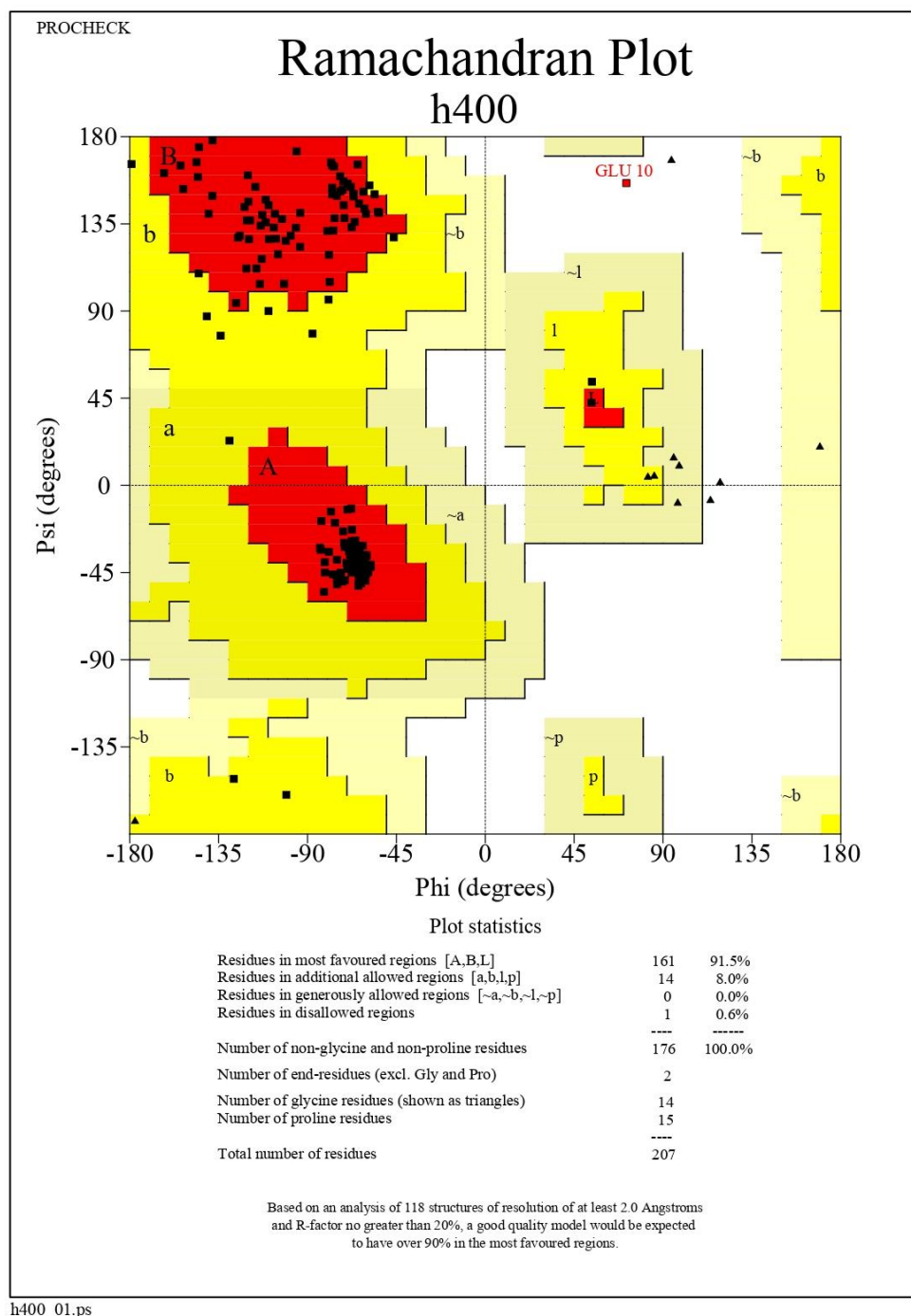
Anexo 9. Gráfico de Ramachandran da enzima selvagem


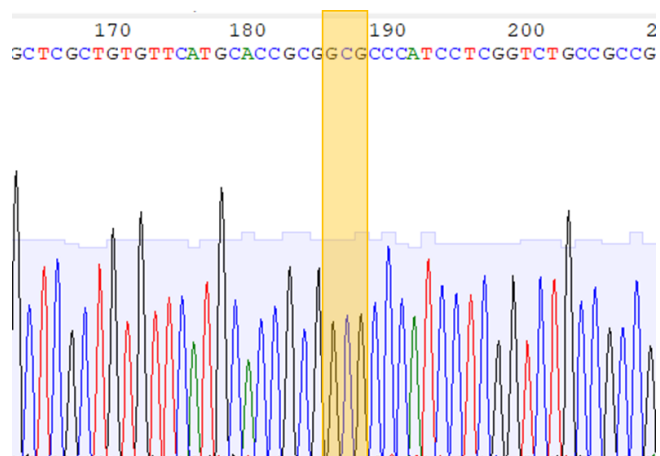
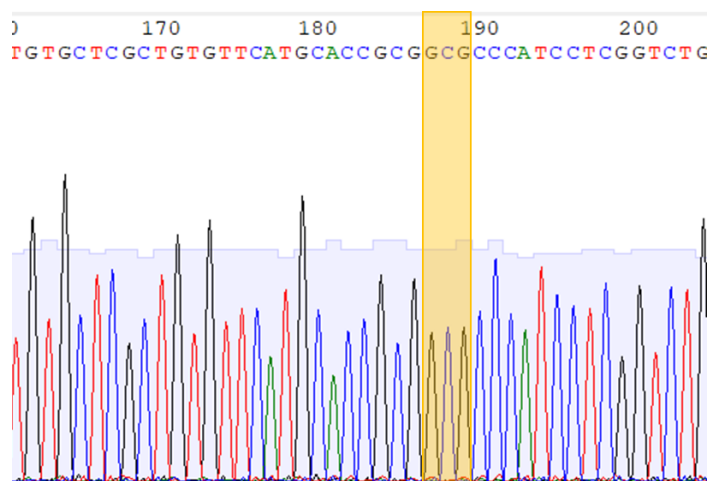
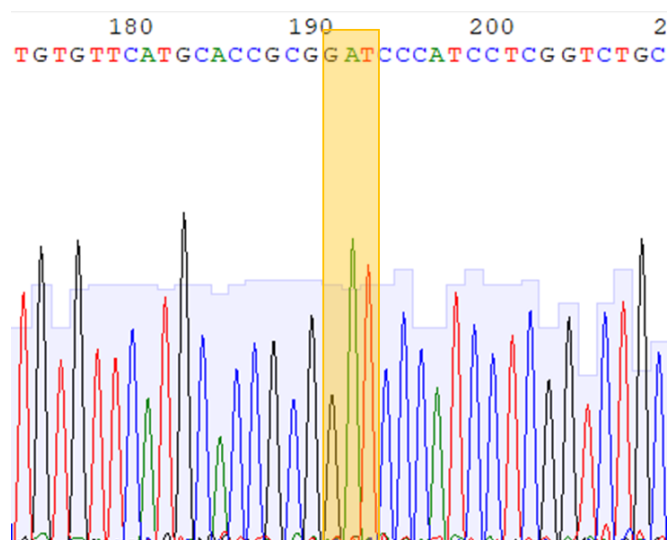
Anexo 10. Gráfico de Ramachandran da variante W118A

Anexo 11. Gráfico de Ramachandran da variante W118D

Anexo 12. Gráfico de Ramachandran da variante W118H



Anexo 13. Gráfico de Ramachandran da variante W118S

Anexo 14. Sequenciamento W118A-1**Anexo 15. Sequenciamento W118A-2****Anexo 16. Sequenciamento W118D-1**

Anexo 17. Sequenciamento W118H-1

