

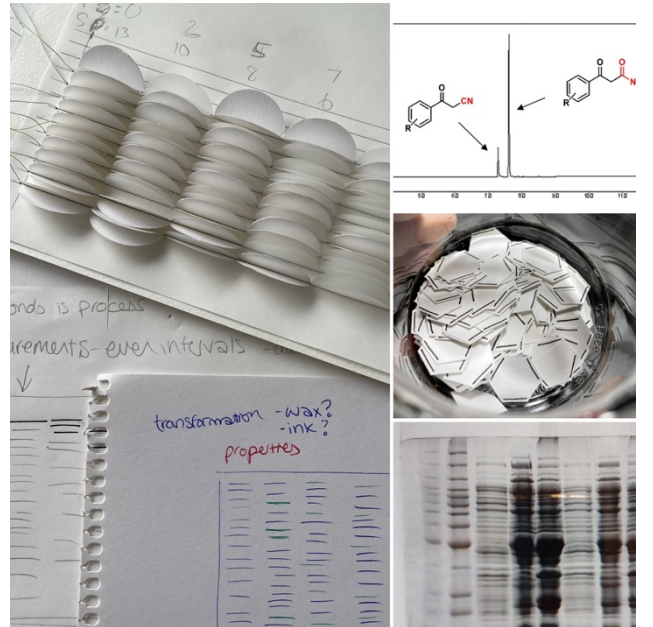
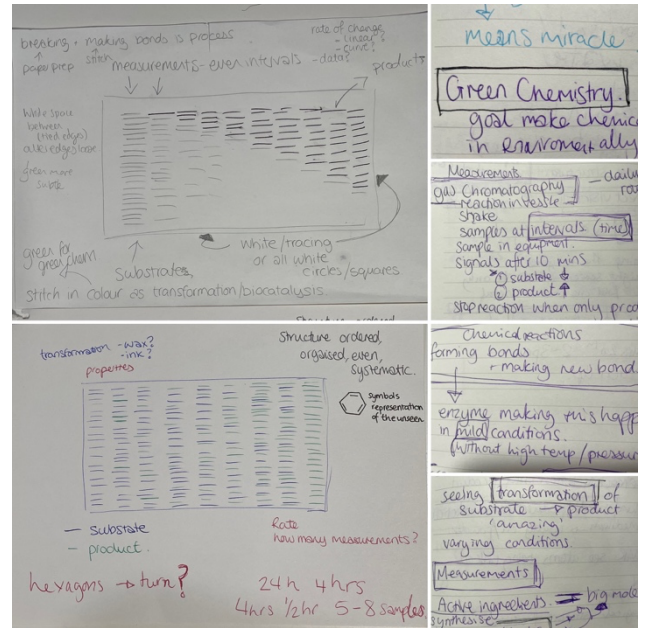
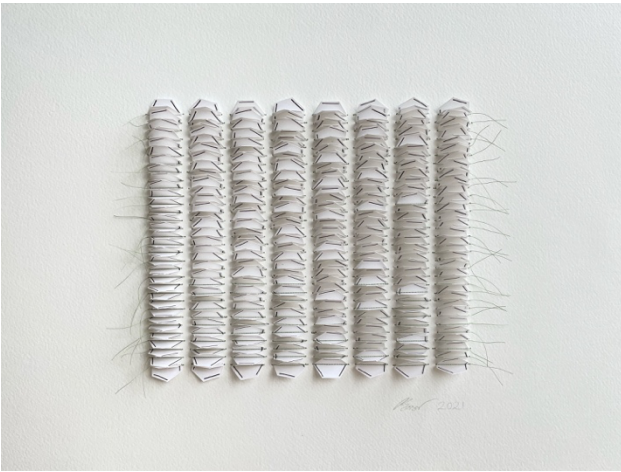
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Química

Biocatálise: a escolha por uma estratégia mais sustentável

Cíntia Duarte de Freitas Milagre

Texto apresentado ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista *Júlio de Mesquita Filho* – Campus de Araraquara, como parte dos requisitos para o concurso de Livre Docência em Química Orgânica.

Araraquara
Fevereiro/2023



Artista: Amy Bonsor

Nome da obra: Biocatalysis

Técnica: Papel costurado e têxteis

Descrição: Participando individualmente da 1ª edição do Creative Reactions Brasil, 2022, a artista britânica Amy Bonsor teve a colaboração da pesquisadora Cintia Milagre, do IQ-Unesp. Inclusive, o trabalho resultante da parceria foi denominado Biocatalysis – sendo a Biocatálise área de interesse da cientista. “Meu objetivo foi capturar o fascínio de Cintia com a transformação do substrato em produto por meio de reação química”, conta Bonsor, que não somente conversou sobre os objetivos e processos da pesquisa, mas realizou passeios virtuais ao laboratório.

Fonte: <https://pintofscience.com.br/creativebr/>

Dedico este trabalho ao **povo brasileiro**, não sonegador de impostos, em especial àqueles que dificilmente chegarão aos bancos da universidade e que, ainda assim, ao pagar os seus impostos com dificuldade propiciam a existência e manutenção das Universidades Brasileiras Públicas, Gratuitas e de Qualidade.

OU ISTO OU AQUILO

(Cecília Meireles)

Ou se tem chuva e não se tem sol,
ou se tem sol e não se tem chuva!

Ou se calça a luva e não se põe o anel,
ou se põe o anel e não se calça a luva!

Quem sobe nos ares não fica no chão,
quem fica no chão não sobe nos ares.

É uma grande pena que não se possa
estar ao mesmo tempo nos dois lugares!

Ou guardo o dinheiro e não compro o doce,
ou compro o doce e gasto o dinheiro.

Ou isto ou aquilo: ou isto ou aquilo...
e vivo escolhendo o dia inteiro!

Não sei se brinco, não sei se estudo,
se saio correndo ou fico tranquilo.

Mas não consegui entender ainda
qual é melhor: se é isto ou aquilo.

“Entre a vida e a morte, há uma biblioteca. E, dentro dessa biblioteca, as prateleiras não tem fim. Cada livro oferece uma **oportunidade** de experimentar outra vida que você poderia ter vivido. De ver como as coisas seriam se tivesse feito outras **escolhas**. Você teria feito algo diferente, se houvesse a **chance** de desfazer tudo do que se arrepende?”

“Há vidas em que você toma diferentes **decisões**. E essas decisões levam a **resultados distintos**. Se tivesse feito apenas uma coisa de maneira diferente, você teria uma história de vida diferente.”

Matt Haig em *A Biblioteca da Meia-Noite*.

A escolha é possível, em certo sentido, porém o que não é possível é não escolher. Eu posso sempre escolher, mas devo estar ciente de que, se não escolher, assim mesmo estarei escolhendo.

Jean-Paul Sartre

Agradecimentos

À minha *alma mater* Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas e Instituto de Ciências Exatas, em especial ao Departamento de Química) e à Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (Instituto de Química), Universidade Tecnológica de Delft - TUDelft (Holanda) e Universidade Estadual Paulista -UNESP (Instituto de Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica e Microbiologia – Campus de Rio Claro e Instituto de Química – Campus de Araraquara) pela infraestrutura, recursos humanos e o ambiente acadêmico, técnico e científico que permitiu minha chegada até aqui;

Às agências de fomento FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelas bolsas, auxílios financeiros e oportunidades concedidas;

Aos membros da banca de minha contratação docente no IQ-UNESP, Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi, Prof. Dr. Angelo da Cunha Pinto (*in memoriam*) e Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes por enxergarem o meu potencial;

Aos meus professores, mentores, orientadores e supervisores, desde o ensino fundamental até o pós-doutorado por compartilharem seus saberes e experiências de vida;

Aos alunos de graduação e pós-graduação com quem tive a oportunidade de conviver. Obrigada por retroalimentarem o meu constante aprendizado;

À comunidade do Instituto de Química – UNESP, aos amigos e colegas funcionários técnico-administrativos, docentes, equipe do serviço terceirizado de limpeza e segurança e equipe da cantina da Vanda e Gerhard obrigada por tornarem o meu ambiente de trabalho um segundo lar;

Aos membros do Milagre Lab por escolherem fazer parte deste time e literalmente biocatalisarem tantas transformações profissionais e pessoais. Vocês são os reais fazedores de milagres;

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo e apoio incondicional. Não vou citar nomes por motivos manutenção da paz mundial (risos), mas vocês sabem dentre todos amigos e familiares quem são vocês!

Aos profissionais que cuidam do bem estar da minha família, Marisilvia Barros Borges e Alessandra Munhoz Lazdan (psicólogas), Rosangela L. Bacurau (ajudante de limpeza), Mairon Kaju (personal trainer), Fausto Crespolini (veterinário), a todos os podólogos que passaram em minha vida e mais recentemente à Juliana Schiefer (instrutora de ioga), que privilégio poder contar com vocês e viver a minha vida bem vivida! Muito obrigada de corpo e alma.

Aos meus filhotes caninos Kika e Brenda (*in memorian*), e é claro aos meus filhotes felinos *in memorian* Dafne, Abel, Bruce e Tila e aos que ainda estão conosco fisicamente - Leo, Fredy, Mia, Luli, Zeca e Cissa por me propiciarem a maternidade com todos os seus amores, sabores e desafios;

Acharam que eu não agradeceria o Humberto? Acharam errado (risos). Eu sou dessas que deixa por último no prato a parte mais gostosa da comida. Então aqui por último vai o meu pedacinho mais gostoso, o Humberto, com quem escolhi compartilhar a minha vida pessoal e profissional, obrigada por também me escolher para esta caminhada. Eu te amo.

Sumário

O desenvolvimento sustentável e a Química	10
Biocatálise	17
Contribuições para a área	22
Prospecção e produção de enzimas	23
Uso de biocatalisadores como ferramenta para a biodegradação de compostos orgânicos	32
Uso de biocatalisadores como ferramenta para a síntese orgânica	35
Considerações finais	40
Referências	42

Desenvolvimento sustentável e a Química

Sustentabilidade, um termo que se tornou corriqueiro na sociedade em geral, no meio empresarial, acadêmico e industrial. Quando um termo se torna tão popular ele corre o risco de evoluir para um clichê e perder o seu verdadeiro peso conceitual, levando inclusive a distorções sérias como o Green Washing (“Lavagem Verde”, “Maquiagem Verde”, “Pintado de Verde”).* Mas afinal, o que é sustentabilidade e desenvolvimento sustentável? Segundo a Comissão Mundial da ONU (Organização das Nações Unidas) sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, “o desenvolvimento sustentável é o desenvolvimento que atende às necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras de atender às suas próprias necessidades.”¹ Ou seja, a sustentabilidade pressupõe que os recursos são finitos e devem ser usados de forma conservadora e sensata, tendo em vista as prioridades de longo prazo e as consequências das formas como os recursos são usados.² Quando falamos em sustentabilidade estamos falando sobre os nossos filhos, sobrinhos e netos, e o mundo que deixaremos para eles.

Se hoje a sustentabilidade é uma preocupação da maioria, ou pelo menos deveria ser, não foi sempre assim. Anteriormente à década de 1950 não havia preocupação alguma com as questões ambientais, seja por parte da indústria, dos órgãos reguladores e mesmo da maior parte da sociedade civil ao redor do mundo. A indústria química, uma das principais beneficiárias da tecnologia do pós-guerra crescia em ritmo acelerado e com ela a poluição ambiental. Foi só a partir da primeira metade do século XX que começaram a surgir as primeiras ações sobre sustentabilidade, com foco nos efeitos nocivos dos compostos químicos - em especial dos pesticidas - a longo prazo sobre o meio ambiente. Um marco histórico é a publicação do livro Primavera Silenciosa, em 1962, resultado de anos de pesquisa da bióloga, ecologista, cientista, escritora e ativista - Rachel Carson - que descreve a devastação que determinados produtos químicos teriam sobre os ecossistemas locais.³ Rachel Carson lutou contra o *lobby* da indústria química no senado e congresso norte-americanos e, a despeito de ser uma mulher quando a

* *Greenwashing* (do inglês, "lavagem verde", "maquiagem verde", "pintado de verde") consiste no ato de divulgação falsa sobre sustentabilidade e representa a tentativa de disfarçar a posição de uma empresa ou organização em relação à sustentabilidade de seus produtos e/ou práticas, seja usando publicidade, colocando informações indevidas nos rótulos ou gerando selos, propagandas e discurso de falsa sustentabilidade.

igualdade de gênero não estava na pauta do dia, conseguiu despertar a opinião pública sobre a necessidade de maior proteção ambiental, criação e implementação de leis que assegurassem isso. Este livro serviu como um alerta para a sociedade, e inspirou movimentos ambientalistas modernos, um verdadeiro exemplo de divulgação e comunicação científica de sucesso. Foi apenas em 1969, que o Congresso norte-americano reconheceu a importância da questão ambiental e aprovou a Lei Nacional de Política Ambiental (National Environmental Policy Act - NEPA) que foi assinada em 1º de janeiro de 1970.⁴ O objetivo desta lei foi criar e manter condições sob as quais o homem e a Natureza pudessem existir em harmonia produtiva. Ainda em 1970, o presidente americano Richard Nixon criou a Agência de Proteção Ambiental (Environmental Protection Agency - EPA), uma agência reguladora dedicada exclusivamente à proteção da saúde humana e do meio ambiente.⁵ A primeira grande decisão da EPA foi proibir o uso de DDT (*diclorodifeniltricloroetano*) e outros pesticidas químicos nos EUA. A partir de então, os estatutos e regulamentos ambientais se disseminaram a um ritmo exponencial. Em 1972, aconteceu a primeira sessão plenária da Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente Humano, em Estocolmo-Suécia.⁶ Esta conferência teve como resultado mais importante o de alertar o mundo para os prejuízos que a destruição do ecossistema poderia causar para a humanidade.⁷

A Química ocupa um papel central no desenvolvimento da humanidade e fornece as ferramentas essenciais para atender às demandas da sociedade moderna como, por exemplo, soluções no âmbito das ciências médicas e farmacêuticas, sistemas de telecomunicações e informática, produção agroindustrial compatível com o aumento da população mundial, dentre outros. Isto é possível porque a Química transita intimamente entre a Física e a Biologia, fornecendo o conhecimento molecular tanto das propriedades físicas da matéria e dos materiais quanto dos sistemas vivos. Entretanto, em inúmeras situações, para se produzir uma determinada substância são necessários materiais de partida, reagentes, solventes e auxiliares intrinsecamente tóxicos e que quando produzidos em larga escala podem causar danos ao meio ambiente e aos indivíduos que lidam com tais substâncias, seja na cadeia produtiva ou no uso das mesmas. Para reduzir o risco ambiental e ocupacional associado à produção e aplicação de compostos químicos, marcos regulatórios têm sido estabelecidos, incluindo punições jurídicas, especialmente para o setor industrial.^{8,9}

Entre os anos 1980 e 1990, vários termos foram introduzidos no cenário da Química como, química limpa, química ambiental, química verde, química benigna e química sustentável. A expressão “Química Verde” foi usada pela primeira vez em 1991 por Paul Anastas e John Warner em um programa especial lançado pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA para implementar o desenvolvimento sustentável em química pela indústria, academia e governo.¹⁰ A Figura 1 mostra marcos históricos importantes para o desenvolvimento da Química Sustentável.

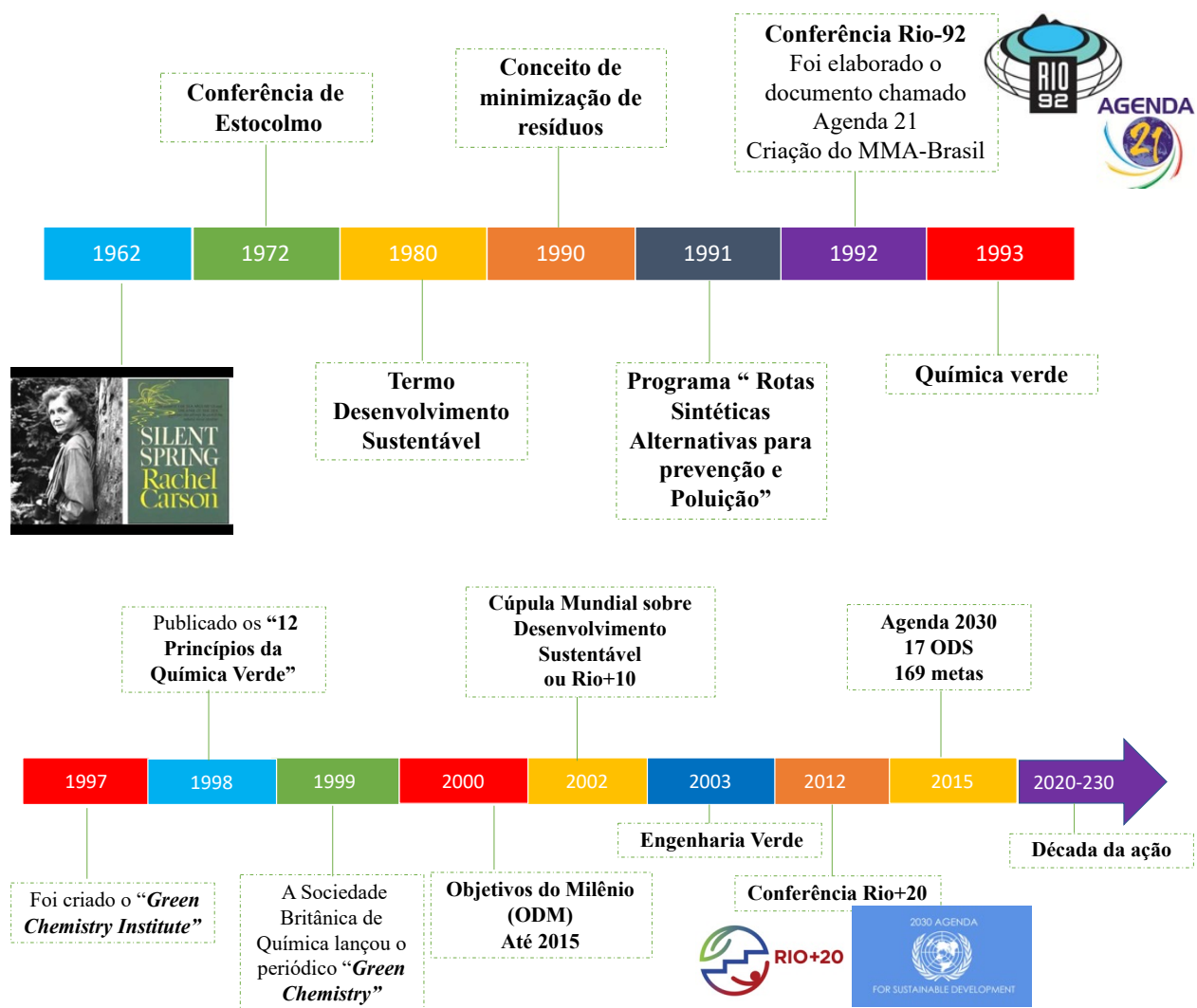


Figura 1. Aspectos históricos do desenvolvimento da Química Sustentável

A Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (United Nations Conference on Environment on Development - UNCED), realizada em 1992 no Rio de Janeiro, ficou conhecida como “Cúpula da Terra”, “Eco-92” e “Rio-92”. Esta Conferência chamou a atenção do mundo sobre os perigos que ameaçam a vida no Planeta e a necessidade de alianças mundiais a favor de uma sociedade sustentável. Nessa reunião foi elaborado um documento de 40 capítulos denominado Agenda 21, que constituiu uma tentativa de promover, em escala mundial o desenvolvimento sustentável.¹¹ Foi também em 1992 que se criou no Brasil o Ministério do Meio Ambiente que tem como missão “promover a adoção de princípios e estratégias para o conhecimento, a proteção e a recuperação do meio ambiente, o uso sustentável dos recursos naturais, a valorização dos serviços ambientais e a inserção do desenvolvimento sustentável na formulação e na implementação de políticas públicas, de forma transversal e compartilhada, participativa e democrática, em todos os níveis e instâncias de governo e sociedade”.¹² No Brasil, a partir de meados dos anos 90 várias atividades relacionadas ao tema Química Verde tiveram início e vem aumentando exponencialmente desde então.^{13,14,15}

Em 1997, foi criado o "Green Chemistry Institute" uma organização sem fins lucrativos que visa a incorporação e difusão dos princípios de química verde.¹⁶ O instituto foi fundado por várias organizações participantes como, por exemplo, EPA-EUA, Universidade da Carolina do Norte e organizações industriais. Em 2001, o Instituto de Química Verde tornou-se parte da Sociedade Americana de Química (American Chemical Society, ACS), a maior sociedade científica profissional e organização associativa para os químicos do mundo.

Em 1998, os 12 Princípios da Química Verde foram propostos por Paul Anastas e John C. Warner no livro, Química Verde: Teoria e Prática.¹⁷ Estes princípios são diretrizes para o desenvolvimento sustentável em química e devem ser considerados, quando se pretende implementar processo químicos em uma indústria ou instituição de ensino e investigar a aceitabilidade ambiental dos mesmos para a fabricação de produtos químico. Em 2001, o Prof. Niel Winterton propôs um segundo conjunto de doze princípios da Química Verde que sugere que os químicos acadêmicos realizem planejamentos na pesquisa laboratorial a fim de avaliar a sustentabilidade dos processos, principalmente no que concerne ao aumento de escala.^{18,19,20,21} Quando se pensa em aumento de escala e processos químicos industriais não há como separar a

Química da Engenharia Química e assim, em 2003, Paul Anastas e Julie Zimmerman formulam os 12 Princípios da Engenharia Verde.²²

Em 2012, foi realizada no Rio de Janeiro a conferência Rio +20, que marcou 20º aniversário da UNCED. O objetivo desta conferência foi renovar o compromisso político com o desenvolvimento sustentável e avaliar o progresso feito até o momento, além de abordar novos desafios emergentes.²³ Deste encontro surge o documento Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável.²⁴ A Química tem um papel fundamental para alcançarmos a sustentabilidade em seus aspectos ambientais, econômicos e sociais e colaborar para que os 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) e suas 169 metas associadas, propostos pela Agenda 2030 da ONU sejam colocados em prática, principalmente no momento em que estamos vivendo, já que 2020-2030 foi definida como a década da ação.^{25,26}

Durante algum tempo houve uma confusão conceitual entre Química Sustentável e Química Verde. Para muitos, ainda hoje, os dois termos são usados como sinônimos. Entretanto, segundo John Warner - um dos pais fundadores da Química Verde - a Química Sustentável é mais ampla e transversal, um guarda-chuva que abriga diversas áreas, dentre elas a Química Verde, como pode ser ilustrado na Figura 2.

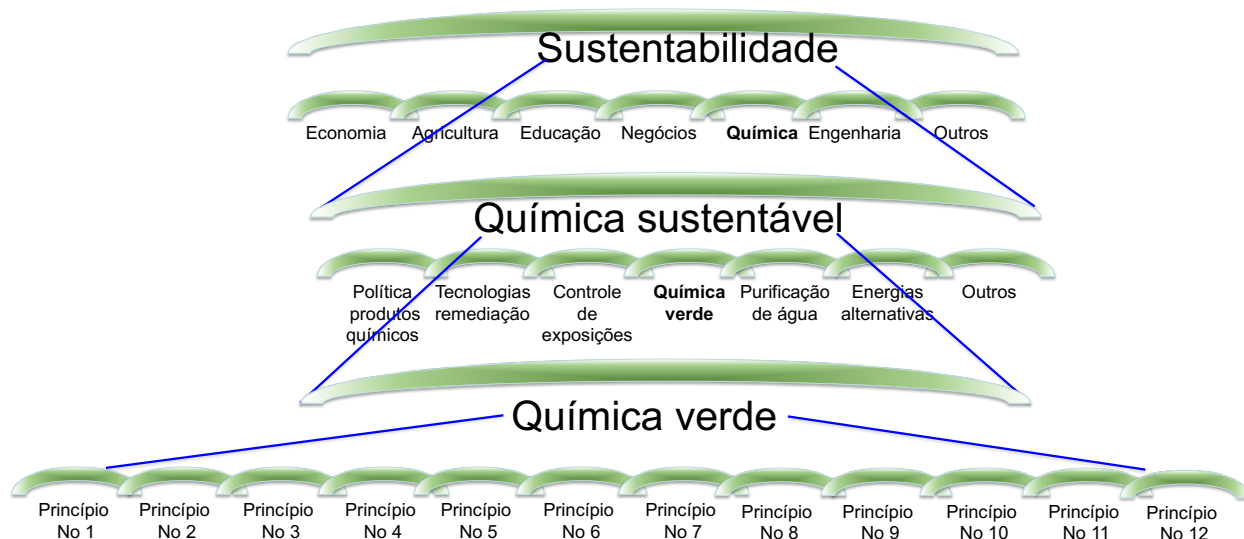


Figura 2. Aspectos da sustentabilidade, Química Sustentável e Química Verde (adaptado de slide cedido por John Warner)

A Química Verde é definida pela IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry) como “a invenção e a aplicação de produtos e processos químicos que são desenvolvidos de forma a reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas”.²⁷ Por invenção, entendemos “concepção”, e não é à toa que este seja o conceito mais importante dentro desta definição, uma vez que a concepção envolve reflexões para o planejamento dos produtos, processos e sistemas almejados. Planejar e implementar reações e processos químicos sustentáveis compreende uma mudança de paradigma para químicos e engenheiros, uma nova maneira de encarar a forma como a química deve ser desenvolvida. Os químicos e engenheiros devem estar unidos, pois é simplesmente impensável e improvável que haja o desenvolvimento sustentável da química e áreas afins sem que estes dois profissionais trabalhem juntos, de forma colaborativa e complementar. As diretrizes que norteiam as ações para o desenvolvimento de processos químicos sustentáveis são apresentadas nos Quadros 1 e 2 que contém os 12 Princípios da Química Verde e os 12 Princípios da Engenharia Verde, respectivamente.

Quadro 1. 12 Princípios da Química Verde²⁸

- 1** Prevenção
- 2** Economia de átomos
- 3** Reações com compostos de menor toxicidade
- 4** Desenvolvimento de compostos seguros
- 5** Diminuição do uso de solventes e auxiliares
- 6** Eficiência energética
- 7** Uso de substâncias renováveis
- 8** Evitar a formação de derivados
- 9** Catálise
- 10** Desenvolvimento de compostos degradáveis
- 11** Análise em tempo real para a prevenção da poluição
- 12** Química segura para a prevenção de acidentes

Quadro 2. 12 Princípios da Engenharia Verde²³

- 1** Deve-se avaliar as entradas e saídas e também o ciclo de vida dos produtos, processos e sistemas
- 2** Prevenir poluentes é mais vantajoso que tratá-los
- 3** Processos de separação e purificação devem ser desenvolvidos para minimizar o consumo de energia e materiais
- 4** Produtos, processos e sistemas devem ser desenvolvidos para abranger o máximo de eficiência em relação tempo, energia, massa e espaço
- 5** Produtos, processos e sistemas devem ser puxados para a saída em vez de ser puxado para a entrada
- 6** Entropia e complexidade embutida devem ser vistas como um investimento quando se escolhe o desenho para reciclagem, reuso ou descarte benéfico
- 7** Durabilidade em vez de imortalidade
- 8** Atender às necessidades, evitar os excessos
- 9** Minimizar a diversidade de materiais
- 10** Integrar os fluxos de matéria e energia
- 11** Projeto para “vida após a morte” comercial
- 12** A entrada de materiais e energia deve ser renovável em vez de esgotável

Ao longo dos últimos anos, os esforços em desenvolver uma química mais verde e sustentável vem sendo reconhecido através de diferentes premiações, inclusive nos Prêmios Nobel de Química. Dentre eles, várias premiações relacionadas ao 9º Princípio da Química Verde – Catálise: utilizar catalisadores que ajudem a aumentar a seletividade das reações, diminuir a geração de resíduos, reduzir os tempos reacionais e demandas de energia – e que foi definida por Paul Anastas como o “ pilar fundamental” da Química Verde.²⁹ Em 2001, os pesquisadores Knowles, Noyori e Sharpless foram laureados com o Prêmio Nobel de Química pelo desenvolvimento da catálise assimétrica usando catalisadores metálicos. Quatro anos depois, em 2005, Chauvin, Grubbs e Schrock foram laureados com o Nobel de Química pelo desenvolvimento do método de metátese em síntese orgânica que também utiliza catalisadores metálicos. Já em 2018 foi a vez da catálise enzimática (ou biocatálise) ser reconhecida e a profa. Frances Arnold foi laureada com o Prêmio Nobel de Química por seu pioneirismo no desenvolvimento da evolução dirigida de enzimas enquanto, em 2021, List e MacMillan foram laureados pelos desenvolvimentos na área de organocatálise assimétrica.³⁰ Estes prêmios ajudaram a solidificar a importância da

pesquisa em Química Verde e a criar uma consciência entre pesquisadores de que o futuro da química deve contemplar o desenvolvimento sustentável.

“...green chemistry is not just a catchphrase. It is an indispensable principle of chemical research that will sustain our civilized society in the twenty-first century and further to the future.”

R. Noyori, Synthesizing our future, *Nature Chemistry*, **2009**, *1*, 5-6.

R. Noyori, Nobel de Química em 2001

Biocatálise

Atualmente, os químicos orgânicos sintéticos possuem um arsenal de catalisadores - catalisadores metálicos, organometálicos, organocatalisadores, catalisadores de transferência de fase e os biocatalisadores - disponíveis para serem utilizados nas mais variadas reações química, de forma mais verde, cada um deles com suas vantagens e desvantagens.

Os biocatalisadores são macromoléculas biológicas com função catalítica como, por exemplo, as proteínas (enzimas) e alguns ácidos nucleicos (RNA, ribozimas e DNAs). Dentre esses, as enzimas são os biocatalisadores mais amplamente empregados no contexto da Química Orgânica Sintética e, para fins de clareza, daqui para frente o termo biocatalisador se referirá exclusivamente à enzimas. Na biocatálise ou catálise enzimática acontece a transformação de um substrato não-natural, em um número limitado de etapas, catalisadas por células íntegras que contêm enzimas ou por enzimas isoladas (puras, parcialmente purificadas ou na forma de extrato enzimático bruto) oriundas de micro-organismos (bactérias, leveduras, archeas), fungos filamentosos, plantas, animais e vegetais. Enquanto a nomenclatura dos compostos químicos é definida pela IUPAC, a nomenclatura e classificação das enzimas é regulamentada pela IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology).³¹ As enzimas são classificadas em 7 (sete) categorias baseado no tipo de transformação química que elas catalisam: EC 1- oxidorredutases; EC 2 – transferases; EC 3 – hidrolases; EC 4- liases; EC 5 – isomerases; EC 6 – ligases e EC 7 – translocases.

Se desejamos utilizar a biocatálise para uma ou mais etapas de reação precisamos realizar o planejamento retrossintético e verificar se existe(m) enzima(s) disponível(is) para a(s) reação(ões) de interesse.^{32,33,34,35} Em geral um processo biocatalítico passa pelas etapas apresentadas na Figura 3.

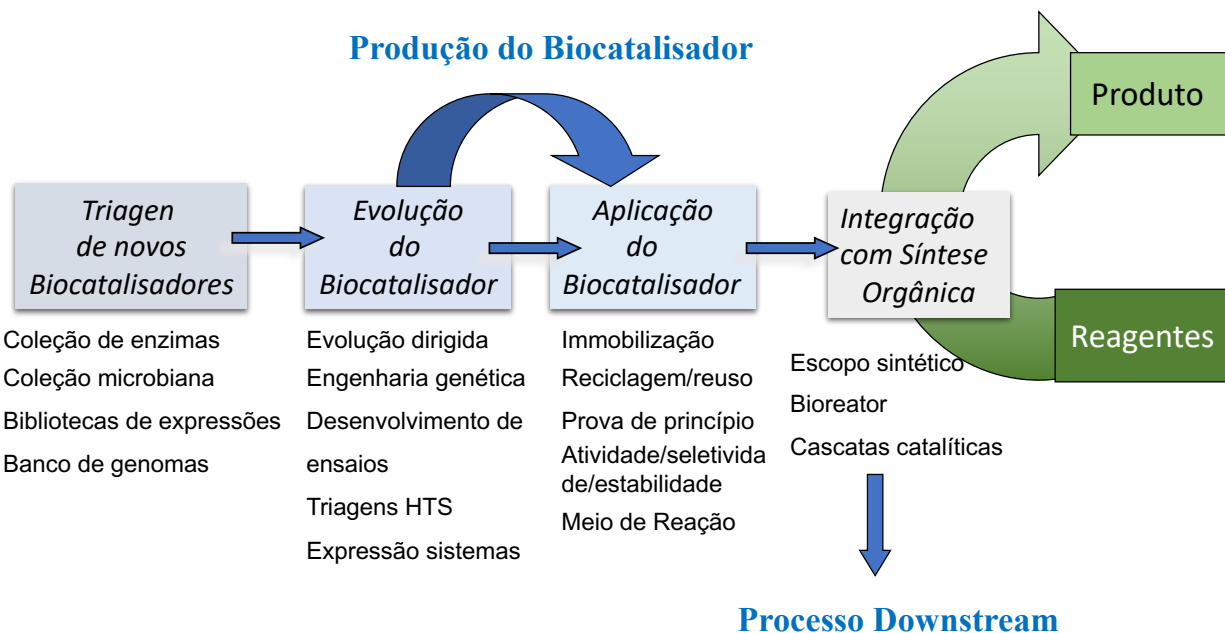


Figura 3. Etapas de um processo biocatalítico

Uma vez que a reação química alvo tenha sido definida e exista uma enzima capaz de catalisar tal reação inicia-se pela seleção do biocatalisador onde metodologias de triagens enzimáticas (experimentais ou *in silico*) são realizadas. Na sequência é definido se o biocatalisador será utilizado na forma de célula íntegra ou enzima isolada, a depender de parâmetros como estabilidade da enzima fora do meio celular e requerimento de cofatores, dentre outros. A caracterização do biocatalisador - determinação das condições reacionais (pH, temperatura, solvente etc) e cinética enzimática - é fundamental para conhecermos as condições ideais de operacionalização deste catalisador para fins das reações químicas de interesse em pequena e em larga escala. As informações estruturais serão imprescindíveis para a etapa de evolução do biocatalisador, ou seja, modificações estruturais da enzima visando aumentar sua estabilidade, aceitação de substratos, seletividade e até mesmo a criação de novas enzimas para catalisar

reações não naturais (não existentes na Natureza). Uma vez que estas etapas tenham sido superadas segue-se para os estudos envolvendo a otimização visando a aplicação do biocatalisador nas reações orgânicas, como por exemplo, se os biocatalisadores serão imobilizados para fins de reuso, utilizados em sistemas multifásicos para facilitar a extração do produto, como será realizada a regeneração dos cofatores (quando necessário). Por fim, é necessário definir os parâmetros do processo, se a reação acontecerá em batelada ou em regime de fluxo contínuo, qual o tipo de reator será o mais adequado, se será uma única reação ou reações em cascatas (enzimáticas ou quimioenzimáticas) e com será realizada a etapa de extração, isolamento e caracterização do(s) produto(s) desejado(s). Ao longo de todo este processo, é desejável que as questões relacionadas à sustentabilidade ambiental e econômica sejam mantidas em mente e alinhadas com os aspectos da Química Sustentável e os Princípios da Química Verde.

A escolha dos biocatalisadores dentre os outros tipos de catalisadores disponíveis oferece algumas vantagens intrínsecas, como por exemplo, as enzimas são originadas de fontes renováveis, são biodegradáveis e apresentam baixa ou nenhuma toxicidade. Em geral requerem condições brandas de reação trabalhando em faixas de pH e temperatura não extremas e pressão atmosférica. Podem ainda apresentar uma elevada quimio-, regio- e estereosseletividade o que resultará em menor formação de subprodutos e resíduos tornando o consumo energético menor.³⁶ Entretanto, não devemos nos contentar com análises qualitativas simplistas. Será que realmente a água ou meios aquosos tamponados, os mais utilizados nas reações enzimáticas, são solventes “verdes” para as reações orgânicas quando grande parte dos compostos orgânicos (materiais de partida e produtos) apresentam baixa solubilidade nestes solventes?^{37,38,39} No ambiente acadêmico ainda precisamos cultivar o hábito de calcularmos as métricas de sustentabilidade para todos os processos e reações, independente do tipo de catalisador utilizado, para que diante de análises quantitativas possamos tomar as melhores decisões possíveis.⁴⁰

Durante muitos anos a maioria dos químicos orgânicos sintéticos resistiram à biocatálise. Não pela baixa eficiência dos biocatalisadores, muito pelo contrário, mas pela pouca ou nenhuma familiaridade dos Químicos com o manuseio de micro-organismos, graças às grades curriculares pouco abrangentes dos cursos de Química. Aliado a isso, ainda existe a necessidade de infraestrutura de equipamentos para se trabalhar com microbiologia e biologia molecular,

diferentes daquelas existentes nos laboratórios convencionais de química orgânica. E, para desestimular ainda mais os químicos orgânicos sintéticos clássicos a se aventurarem pela biocatálise, a oferta de enzimas comerciais era bastante limitada em termos de variedade de classes de enzimas e atividade enzimática relativamente baixas. Provavelmente, estes e outros fatores levaram à criação de alguns mitos relacionados à biocatálise como:

1. As enzimas são muito caras;
2. As enzimas são (termicamente) instáveis;
3. As enzimas são ativas apenas em meio aquoso e temperatura ambiente;
4. As enzimas apresentam elevada especificidade de substrato (conceito chave-fechadura de Fischer e o paradigma de uma enzima-um substrato-uma reação);
5. Os processos enzimáticos apresentam baixa produtividade volumétrica (processos com taxas de diluição elevadas e operações unitárias downstream complicadas);

Felizmente, a comunidade acadêmica constatou o que o setor industrial já havia percebido há bastante tempo, todos esses apontamentos não passam de equívocos que podem ser discutidos e derrotados caso a caso, com exemplos de sucesso sendo executados em escala industrial por indústrias farmacêuticas, de química de especialidades e da química de commodities.^{41,42} No passado, o processo biocatalítico era idealizado em torno das limitações da enzima, como por exemplo: baixa estabilidade, baixa seletividade ou seletividade "errada", atividade insuficiente ou margem estreita de aceitação de substratos, inibição pelo produto ou substrato e robustez insuficiente nas condições operacionais e, nestas condições o processo podia ser considerado quase como um pesadelo.^{43,44} Atualmente, o acesso ao sequenciamento de genomas (há mais de 20.000 genomas microbianos depositados em bancos de dados públicos) permite a identificação de inúmeras enzimas e, com o desenvolvimento da bioinformática houve uma facilidade no acesso a um número cada vez maior de enzimas que poderão ser utilizadas como os pontos de partida para a evolução das enzimas. Através de técnicas como a evolução dirigida, enzimas conhecidas podem ser melhoradas e novas enzimas podem ser criadas enquanto a tecnologia do DNA recombinante propicia a melhoria na produção das enzimas, tornando-as economicamente viáveis para aplicações industriais.⁴⁵ Por fim, tecnologias de imobilização de

biocatalisadores (células e enzimas) propiciam que melhores formulações das enzimas sejam desenvolvidas, aumento assim o seu tempo de prateleira e possibilidade de reuso. Todos estes fatores juntos são responsáveis para que as enzimas sejam projetadas para atender às especificações do processo e, o que era um pesadelo passou a ser um sonho, como ilustrado na Figura 4.⁴⁶

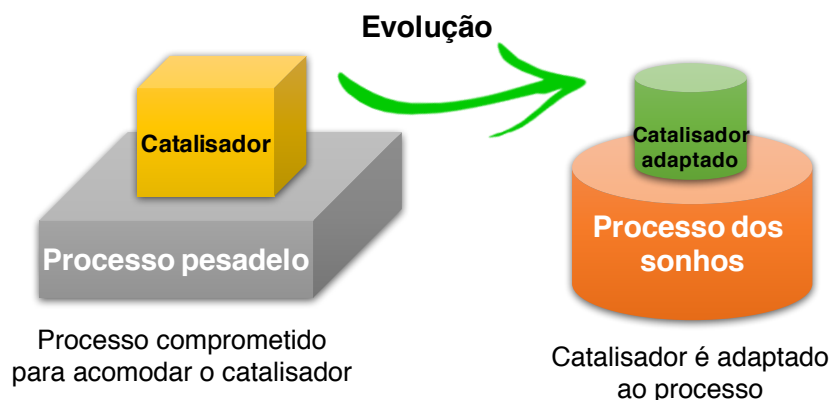


Figura 4. Evolução da relação entre o processo e o biocatalisador

O desenvolvimento na área da biocatálise para melhorar as propriedades intrínsecas dos biocatalisadores e que possibilitaram sua aplicação em processos industriais, atendendo às restrições operacionais exigidas pelos mesmos, tem permitido que uma grande variedade de enzimas robustas sejam produzidas e comercializadas a preços razoáveis.⁴⁷ Atualmente há praticamente uma enzima para cada tipo de reação de química orgânica conhecida do ponto de vista retrossintético, tais como clivagem e formação de novas ligações C-C, C-heteroátomo, oxidações e reduções, dentre outras.^{48,49,50} E para os casos onde não existe um biocatalisador existente na Natureza capaz de substituir os catalisadores químicos, como por exemplo, para catalisar as reações de ciclopropanação, reação de inserção N-H, reação de sulfimidação, reação de aziridinação, reação de aminação C-H, reações para formação de ligação C-Si já é possível desenvolver enzimas “in-house” para tais reações.^{51,52,53,54,55,56,57,58}

As perspectivas para o desenvolvimento e obtenção de (novos) biocatalisadores recaem na engenharia de proteínas baseada nos requisitos do processo; na melhoria nas ferramentas de

análise de bioinformática; nos ensaios enzimáticos de ultra alto desempenho e no melhor planejamento das rotas enzimáticas através de análises retróssintéticas. Provavelmente, os químicos orgânicos sintéticos capazes de usar o potencial que os biocatalisadores oferecem terão uma clara vantagem sobre aqueles limitados ao uso de métodos catalíticos não biológicos. Isto se deve ao fato de que as habilidades de lidar com a resolução de novos problemas na interface entre a química e a biologia como, por exemplo, aqueles decorrentes da necessidade de usar matérias-primas renováveis, exigirão conhecimentos mínimos nas áreas de Química e Biologia.

A biocatálise é uma estratégia importante e se tornará uma das principais tecnologias para a fabricação de produtos químicos. O próximo grande desafio dependerá do conhecimento, visão e inspiração dos químicos para criar reações que nem a biologia e nem a química sintética conquistaram, e desta forma a evolução dirigida nos levará aonde a biologia nunca foi. No Brasil existem vários grupos de pesquisa consolidados na área de biocatálise, entretanto ainda é necessário um grande avanço na área de engenharia de proteínas, em especial utilizando técnicas de evolução dirigida de enzimas e na formação de recursos humanos especializados para atuarem na área quimioenzimática.⁵⁹ Adicionalmente, as agências de fomento, nacionais e internacionais, começam a desempenhar um papel importante como força motriz para que os pesquisadores submetam propostas minimamente alinhadas à Química Verde e, desta forma, a Química passará a contribuir de forma mais expressiva com os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável.

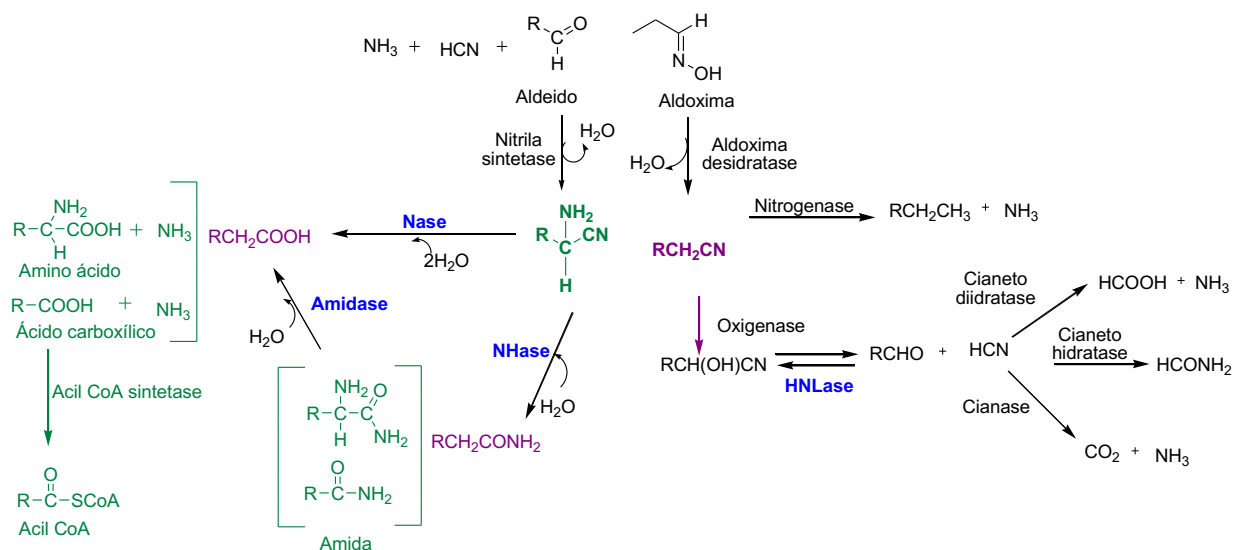
Contribuições para a área

As enzimas possuem inúmeras aplicações dentro da Química Orgânica. As minhas contribuições para a área, a partir da minha contratação na UNESP, estão direcionadas para três aspectos: (i) prospecção e produção de enzimas; (ii) uso de biocatalisadores como ferramenta para a degradação de compostos orgânicos e (iii) uso de biocatalisadores como ferramentas para a síntese orgânica. Estas contribuições serão apresentadas de forma resumida e crítica, sem entrar nos detalhes de cada uma delas, já que os resultados e dados experimentais estão publicados e disponíveis na literatura científica citada ao longo do texto a seguir.

Prospecção e produção de enzimas

A prospecção de enzimas pode ser realizada experimentalmente ou *in silico*. Inicialmente trabalhamos com o desenvolvimento de métodos de seleção e triagens enzimáticas de alta eficiência para realizar a bioprospecção de linhagens de micro-organismos selvagens da biodiversidade brasileira quanto a presença das enzimas nitrila hidratases (NHases, EC 4.2.1.84). As nitrila hidratases são enzimas que catalisam a hidratação de nitrilas nas respectivas amidas de forma seletiva, sem passar pelo intermediário ácido carboxílico.⁶⁰ Elas apresentam um enorme potencial biotecnológico e têm sido usadas em processos industriais na síntese de compostos com valor agregado como a acrilamida, uma importante commodity química que conta com produção atual de > 100.000 toneladas/ano, através de processos biotecnológicos empregados por grandes companhias como a BASF.⁶¹ Elas também são usadas na síntese de insumos para a indústria farmacêutica, como no processo biotecnológico usado pela companhia Lonza, para a produção de duas formas da Vitamina B3, a nicotinamida ou niacinamida e o ácido nicotínico ou niacina, a partir da 3-cianopiridina. Mundialmente são produzidas aproximadamente 35.000 a 40.000 toneladas/ano dessas formas de Vitamina B3 e a demanda por nicotinatos está aumentando.^{62,63} Além das aplicações em síntese, as nitrilas hidratases também podem ser aplicadas em processos de biodegradação.⁶⁴

Entretanto, as nitrilas hidratases são enzimas que fazem parte do metabolismo de aminoácidos e, na maioria dos casos, estão associadas às enzimas amidases (EC 3.5.1.4) – responsáveis pela hidrólise de amidas em ácidos carboxílicos – em uma cascata enzimática. Alternativamente ao metabolismo de nitrilas através do caminho nitrilas hidratases/amidases há o caminho das nitrilases (Nase, EC 3.5.5.1), enzimas que catalisam a hidrólise direta das nitrilas em ácidos carboxílicos, sem gerar a amida intermediária, como apresentado no Esquema 1.



Esquema 1. Metabolismo de nitrilas na Natureza

As duas primeiras etapas utilizadas em nossa estratégia para a bioprospecção de nitrilas hidratases foram: (i) buscar por novas enzimas através do isolamento de micro-organismos de solos brasileiros e (ii) desenvolver um método de triagem enzimática de alta eficiência capaz de distinguir entre as enzimas nitrila hidratases e nitrilases.

A nossa coleção de culturas microbianas foi construída a partir do isolamento de bactérias de solos impactados com compostos nitrilados a fim de usar a própria pressão de seleção natural, ou seja, se os micro-organismos vivem em áreas ricas em compostos nitrilados eles provavelmente produzem enzimas capazes de metabolizar esses compostos. Paralelamente, isolamos micro-organismos de áreas de proteção ambiental para compararmos o perfil da microbiota dos dois tipos de áreas selecionadas. As áreas impactadas com nitrilas escolhidas para a coleta de solo foram o solo do entorno um reservatório de água de manipueira (água da lavagem da mandioca), rica em glicosídeos cianogênicos, e o solo de plantações de cebola cuja principal erva daninha é combatida com o uso do agrotóxico ioxinil, um herbicida benzonitrilado. A coleta dos solos das fazendas de cebolas foi realizada em colaboração do Engenheiro Agrônomo David Moreira. Para a coleta de solos não impactados, escolhemos a divisa da UNESP campus Rio Claro com a área de proteção ambiental Floresta Estadual Edmundo de Andrade Navarro, conforme ilustrado na Figura 5.

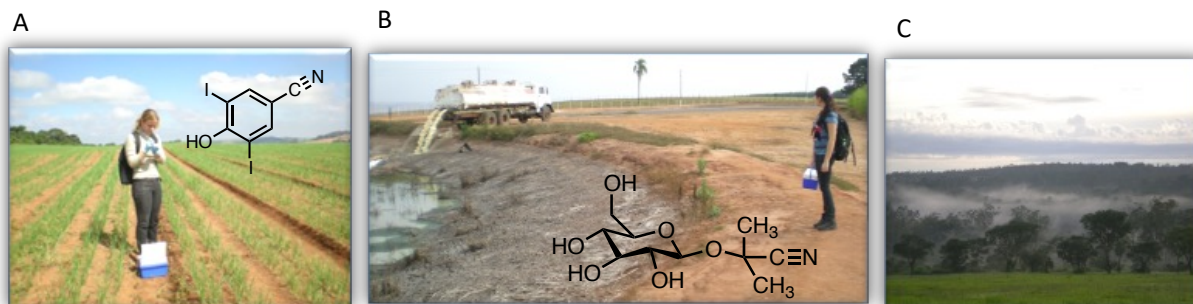


Figura 5. Coleta de solos para o isolamento de bactérias. A) Solo impactado com herbicida benzonitrilado ioxinil em fazendas de cebolas em São José do Rio Pardo –SP; B) Solo e água impactado com glicosídeos cianogênicos em reservatório de descarte de água de manipueira em Santa Maria da Serra – SP; C) Solo não impactado com nitrilas na divisa entre o campus da UNESP Rio Claro e a Floresta Estadual Edmundo de Andrade Navarro em Rio Claro – SP.

A partir desses solos construídos uma coleção microbiana com 130 bactérias. No isolamento dos micro-organismos utilizamos métodos de seleção bacteriana para excluir fungos pois o nosso interesse futuro envolveria a imobilização das células visando o reuso dos biocatalisadores em diferentes processos. Na sequência desenvolvemos um método de triagem enzimática inédito para a distinção das enzimas nitrila hidratases e nitrilases.⁶⁵ Este ensaio colorimétrico miniaturizado em placas de 96 poços é baseado na detecção de diferença de pH combinado com a adição de inibidores de amidase. Utilizando esta metodologia em nossa coleção bacteriana recém construída obtivemos 19 (dezenove) hits positivos para bactérias isolada em áreas impactadas e nenhum hit positivo para as bactérias isoladas da área não impactada. Dos 19 (dezenove) hits, 03 (três) apresentaram atividade de nitrila hidratases, 12 (doze) apresentaram atividade de nitrilases e 05 (cinco) apresentaram atividades para as duas enzimas. O ensaio enzimático está ilustrado na Figura 6.

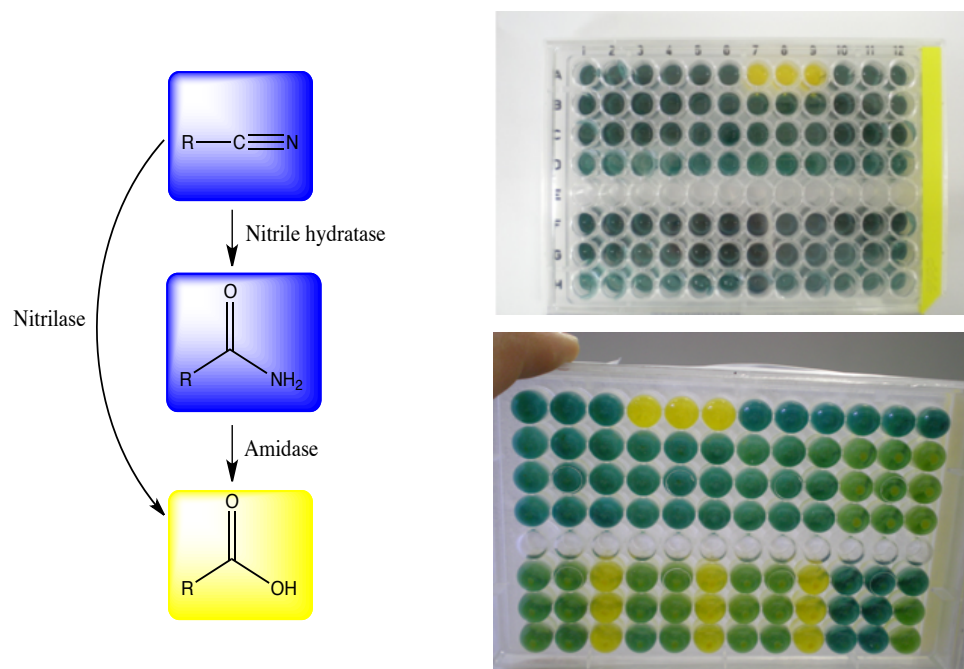


Figura 6. Triagem de linhagens bacterianas produtoras de nitrila hidratase e nitrilase usando mandelonitrila como substrato em uma microplaca de 96 poços. Linha A: experimentos de controle: A1-A3 mandelonitrila, A4-A6: mandelamida, A7-A9: ácido mandélico; A10-A12: DEPA. A: tempo zero; B: tempo = 36 h. * A foto foi tirada de baixo para cima. Linhas B, C, D, F, G e H: diferentes microrganismos isolados foram verificados quanto à sua capacidade de hidrolisar mandelonitrila.

Os 03 (três) micro-organismos que apresentaram resultados promissores para atividade nitrila hidratase foram identificados pela amplificação da sequência 16S rDNA (gene 16S rRNA) na PCR (Polymrease Chain Reaction) através do sequenciamento Sanger sendo um deles identificado como *Lysinibacillus boronitolerans* e os outros dois como *Bacillus cereus*. Além da coleção de culturas microbianas construída *in-house* adquirimos diferentes linhagens de bactérias da Coleção de Culturas Tropical Fundação André Tosello, reconhecidamente produtoras das enzimas do nosso interesse, e que foram utilizadas como controle positivos e como biocatalisadores nos processos que desenvolvemos *a posteriori*.

Para fins de aplicação biotecnológica dificilmente se utiliza a linhagem microbiana selvagem pois a expressão e produção enzimática são baixas. Para contornar esta limitação, uma das alternativas é o isolamento do gene da enzima de interesse seguida da super expressão heteróloga em outro hospedeiro, geralmente em células de *E. coli* (procarioto) ou *Pichia sp.* (eucarioto). Em parceria com a profa. Sonia Rodriguez Giordano, da Universidad de la Republica – UDELAR em Montevideo – Uruguai, empregamos a metodologia de clonagem livre de restrição (RF, do inglês Restriction Free) para o desenvolvimento de um método de clonagem e expressão da enzima nitrila hidratase.⁶⁶ As metodologias de clonagens clássicas são dependentes de ligação (Ligation-Dependent Cloning, LDC) e têm sido gradualmente substituída por técnicas de clonagem independente de ligação (Ligation-Independent Cloning, LIC). Uma delas, a clonagem livre de restrição (RF) foi originalmente desenvolvida para a introdução de um DNA alvo em um plasmídeo em qualquer posição desejada. Ela é uma abordagem mais simples e baseada na realização de duas reações em cadeia da polimerase (PCR) para inserir qualquer fragmento de DNA em qualquer posição de um vetor, independentemente dos sítios de restrição e ligações. O método de clonagem RF apresenta vantagens técnicas, como, por exemplo, permitir uma inserção precisa e perfeita do inserto de DNA sem quaisquer sequências adicionais desnecessárias, de forma eficiente e adequada para clonagem de alta produtividade. Do ponto de vista prático a técnica de clonagem RF evita o gasto com kits de biologia molecular caros e com prazos de validade mais curtos. O grande desafio durante este trabalho foi adequar esta metodologia para a nossa enzima de interesse, a nitrila hidratase, que é dimérica, possuindo um gene que codifica a subunidade α , outro gene que codifica a subunidade β e ainda necessita de um gene ativador. Um dos vetores por nós planejado e que foi utilizado para a construção do plasmídeo recombinante por RF está apresentado na Figura 7.

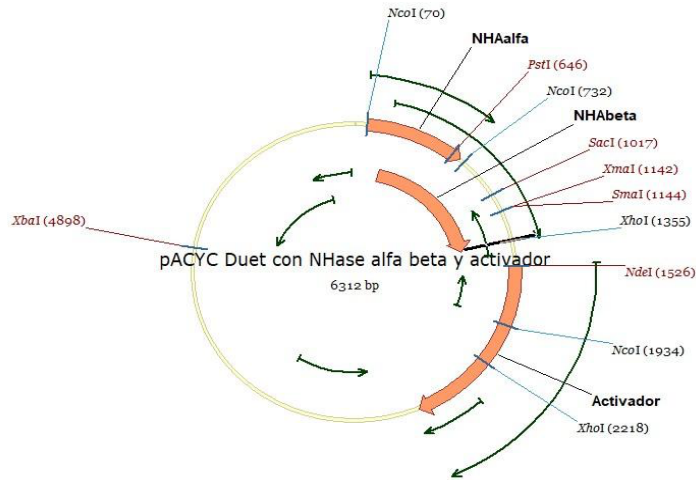


Figura 7. Esquema do vetor recombinante pACYCDuet-1-NHase

O método de clonagem RF foi efetivo na clonagem do gene NHase de *R. erythropolis* ATCC 4277, independente dos sítios de restrição, e a co-expressão dos genes (subunidades α e β e gene ativador) produziu uma NHase ativa. Estes estudos geraram um bom método de produção desta nitrila hidratase no Milagre Lab, fato que nos dá uma vantagem competitiva aos nos tornarmos independentes da aquisição comercial desta enzima, em geral via processos de importação demorados, para as nossas pesquisas.

Apesar das enzimas NHases serem bastante versáteis e empregadas amplamente em processos industriais, como mencionado anteriormente, a maioria das NHases reportadas na literatura apresentam algumas limitações como a baixa estabilidade térmica (temperatura ótima 20-35 °C), baixa estereosseletividade e apresentam escopo de substrato reduzido.⁶⁰ 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 ilustrado na Figura 8.

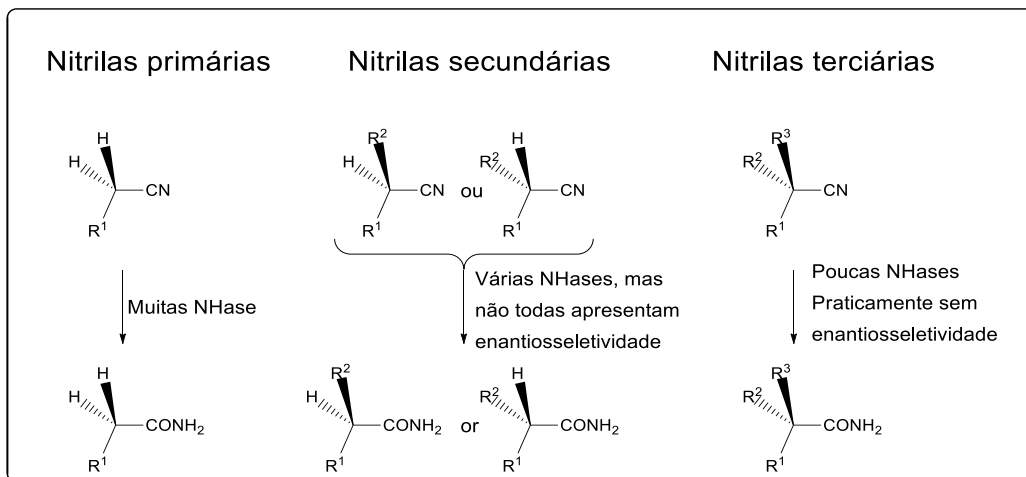


Figura 8. Perfil de substratos das enzimas nitrila hidratases (NHase)

A NHase de *R. erythropolis* ATCC 4277 recém clonada no Milagre Lab é uma dessas enzimas que não aceita substratos volumosos e apresentou baixa estereosseletividade. Com o objetivo de melhorar estas propriedades realizamos mutações sítio dirigidas, uma estratégia baseada no design racional (Figura 9).⁶⁷

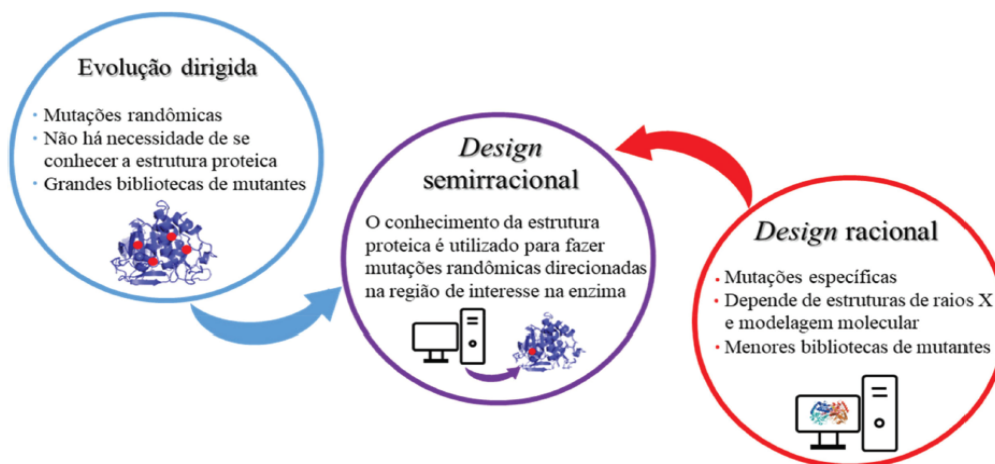


Figura 9. Estratégias para obtenção das modificações nas enzimas

Na mutagênese sítio dirigida mutações pontuais são inseridas nas enzimas de interesse em uma PCR usando primers contendo as mutações. O foco de inserção das mutações foi no sítio ativo da enzima, de modo a aumentar o espaço ali disponível, permitindo assim que compostos

mais volumosos, entre eles nitrilas secundárias e terciárias, pudessem ser usados como substrato pela NHase. A primeira etapa deste trabalho consistiu na realização de estudos de ancoragem molecular com a enzima nitrila hidratase recombinante de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 para a determinação dos resíduos de aminoácidos próximos ao sítio ativo que contribuem para gerar impedimento estérico no local e, portanto, seriam os alvos das mutações. A Figura 10 exemplifica um desses dockings. Nessa fase inicial foram identificados quatro resíduos volumosos no sítio ativo que acarretaram em interações negativas com os substratos: três tirosinas (Y7, Y72 e Y76) pertencentes à subunidade beta da enzima, e um resíduo de triptofano (W118) pertencente à subunidade alfa. Desses resíduos foram então selecionados como opções para a construção dos mutantes. Optamos iniciar as mutações com o resíduo de W118, já que este é o aminoácido que possui maior cadeia lateral e, em todas as variantes avaliadas apresentou resultados positivos na ancoragem do substrato difenilnitrila, uma nitrila impedida estericamente.

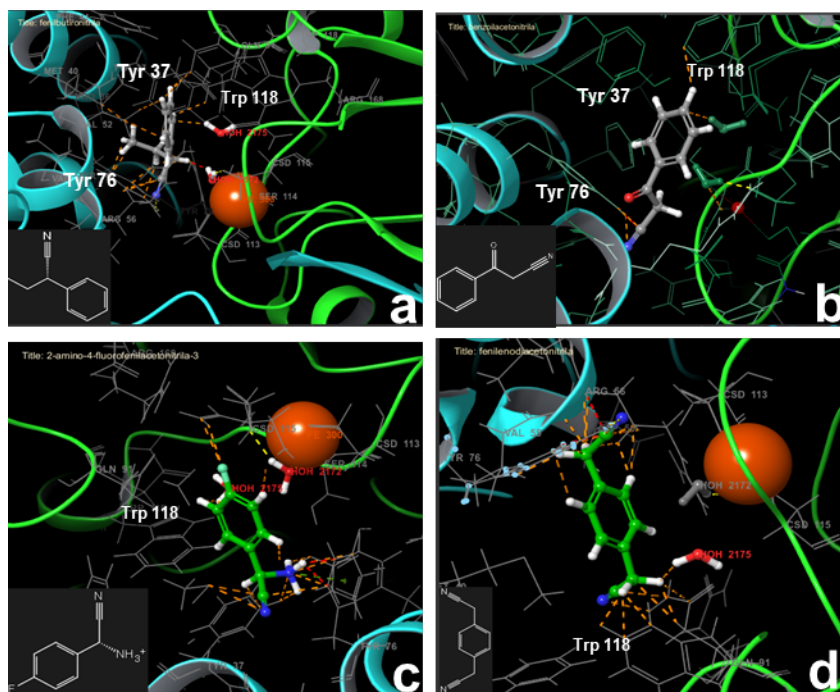


Figura 10. Dockings com a NHase selvagem de *Rhodococcus erythropolis*

Em seguida foram construídos os modelos para as variantes W118A, W118S, W118H e W118D e realizados os procedimentos clássicos para obtenção dos mutantes pelo método de

mutagênese sítio dirigida começando pelo desenho dos primers, seguido da obtenção das variantes enzimáticas via PCR e avaliação dos mutantes W118A-1, W118D-1, W118H. A Figura 11 ilustra parte deste processo e apresenta um dos geis de SDS-page obtidos para alguns dos mutantes gerados.

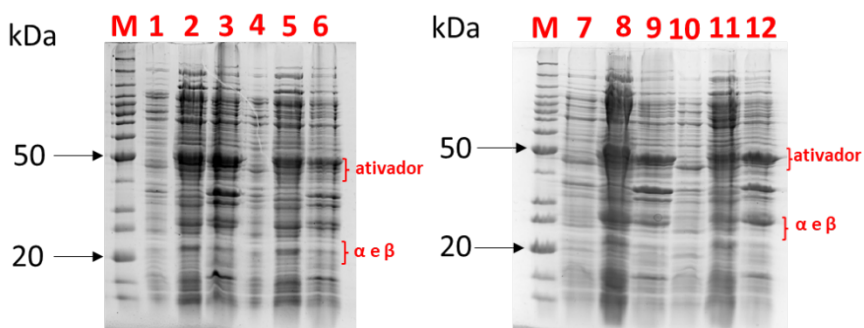


Figura 11. Gel SDS-page para os mutantes W118A-1, W118A-2, W118H-1, W118D-1

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.

Quando os mutantes produzidos foram avaliados experimentalmente frente aos substratos volumosos infelizmente não foi observada atividade para nenhuma das variantes obtidas. Esta foi a nossa primeira tentativa de realizar a engenharia do biocatalisador. Os dados apresentados na literatura para este tipo de trabalho envolvem a construção e avaliação de centenas e milhares de mutantes, muitas vezes usando sistemas robotizados.^{68,69} Apesar dos resultados insatisfatórios obtidos nesta primeira tentativa estamos confiantes de que este é o caminho a seguir na busca por melhores biocatalisadores.

Adicionalmente, temos produzido outras enzimas no Milagre Lab, como as ω -transaminases (ω -TA, EC 2.6.1.x) e as álcool desidrogenases (ADH, EC 1.1.1.x). Entretanto nesses dois casos não trabalhos no desenvolvimento e construção dos plasmídeos, eles foram obtidos já prontos para serem transformados em células de *E. coli*, em colaborações internacionais com os

prof. Uwe Bornscheuer e prof. Frank Hollmann que nos forneceram os plasmídeos de ω -transaminases de álcool desidrogenases, respectivamente.

Durante este anos iniciais estive, de certa forma, refém das enzimas disponíveis comercialmente e daquelas para as quais tive acesso aos plasmídeos o que limitou as possibilidades de reações e investigações que pretendia realizar. Com a experiência, o know-how e a infraestrutura conquistada, estamos iniciando no Milagre Lab uma nova estratégia, a aquisição de genes sintéticos personalizados, sob encomenda comercial, o que garantirá maior agilidade e independência na escolha das perguntas que pretendemos buscar por respostas.

Uso de biocatalisadores como ferramenta para a biodegradação de compostos orgânicos

O Brasil é um país de base agrícola que faz uso exagerado de agrotóxicos em suas plantações em pequena e larga escala. Adicionalmente, para nossa triste surpresa, durante os 4 (quatro) anos do governo Bolsonaro, foram liberados 2.184 agrotóxicos, número recorde registrado desde o início da série histórica, segundo os dados divulgados pela Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins (CGAA), ligada ao Ministério da Agricultura.^{70,71} Dentre as diferentes classes de agrotóxicos, estão os herbicidas. Apesar da importância do uso de herbicidas para o controle de ervas daninhas na agricultura, estes pesticidas oferecem riscos ao meio ambiente, uma vez que causam a poluição do solo e conseqüentemente a poluição da água nos lençóis freáticos. Além disso, em função de sua toxicidade, oferecem riscos ocupacionais à saúde humana e riscos à saúde animal.

No Brasil, os herbicidas benzonitrilados Bromoxinil (Buctril®), Diclobenil (Casoron 67) e Ioxinil (Totril®) são ou foram amplamente utilizados nas culturas de cana-de-açúcar, macieira e cebola/ alho, respectivamente. O Bromoxinil possui registro exclusivo para exportação, o Totril® (octanoato de ioxinila e o ioxinil) é comercializado pela empresa alemã Bayer (Crop Science Division), enquanto o Diclobenil, por sua vez, teve sua monografia excluída em 2002 (Resolução RDC nº 347 de 16 de dezembro de 2002) sendo proibida sua utilização desde então.⁷² Entre os

herbicidas citados acima, somente o Totril® tem autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para comercialização e utilização em plantações de cebola e alho.⁷³

De posse de uma coleção microbiana isolada de solos impactados com herbicidas benzonitrilados, começamos a estudar as rotas enzimáticas da biodegradação do herbicida octanoato de ioxinila/ioxinil, regulamentado no Brasil pela ANVISA para uso em lavouras de cebola e alho. A elevada solubilidade do herbicida e seus produtos de degradação em água e, conseqüente dificuldade de extração dos mesmos para solventes orgânicos, impossibilitaram que as análises foram realizadas através de cromatografia gasosa, equipamento que dispomos em no Milagre Lab para análises de rotina. Assim, a identificação e monitoramento dos produtos de biodegradação foram realizados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas - HPLC-MS/MS utilizando o HPLC-MS/MS do laboratório multiusuário sob a responsabilidade do grupo de Eletroquímica do IQ-UNESP.

O estudo das rotas enzimáticas para a biodegradação do octanoato de ioxinila foi realizado com as diferentes bactérias isoladas por membros do Milagre Lab e presentes em nossa Coleção de Culturas Microbiana.⁷⁴ Ao longo de 7 dias de monitoramento, foi possível detectar 5 (cinco) produtos de biodegradação (ácido-3,5-di-iodo-4-hidroxibenzoico, ácido-3-iodo-4-hidroxibenzoico, 2,6-di-iodo fenol, 3,5-di-iodo-4-hidroxibenzonitrila e 3,5-di-iodo-4-hidroxibenzamida), que foram identificados e caracterizados por HPLC-MS/MS. Dentre esses verificou-se que os produtos 2,6-di-iodo fenol e ácido-3-iodo-4-hidroxibenzoico ainda não haviam sido relatados na literatura. As enzimas envolvidas na formação destes produtos de biodegradação foram identificadas como sendo: nitrilase, nitrila hidratase, desalogenase e hidrolase, conforme apresentado na Figura 12. Segundo os dados da literatura, os produtos de biodegradação supracitados são menos tóxicos quando comparados ao herbicida Totril®. Além disso, os resultados sobre o tempo necessário para a biodegradação e as taxas de biodegradação observados neste estudo foram melhores que os descritos na literatura.⁷⁵

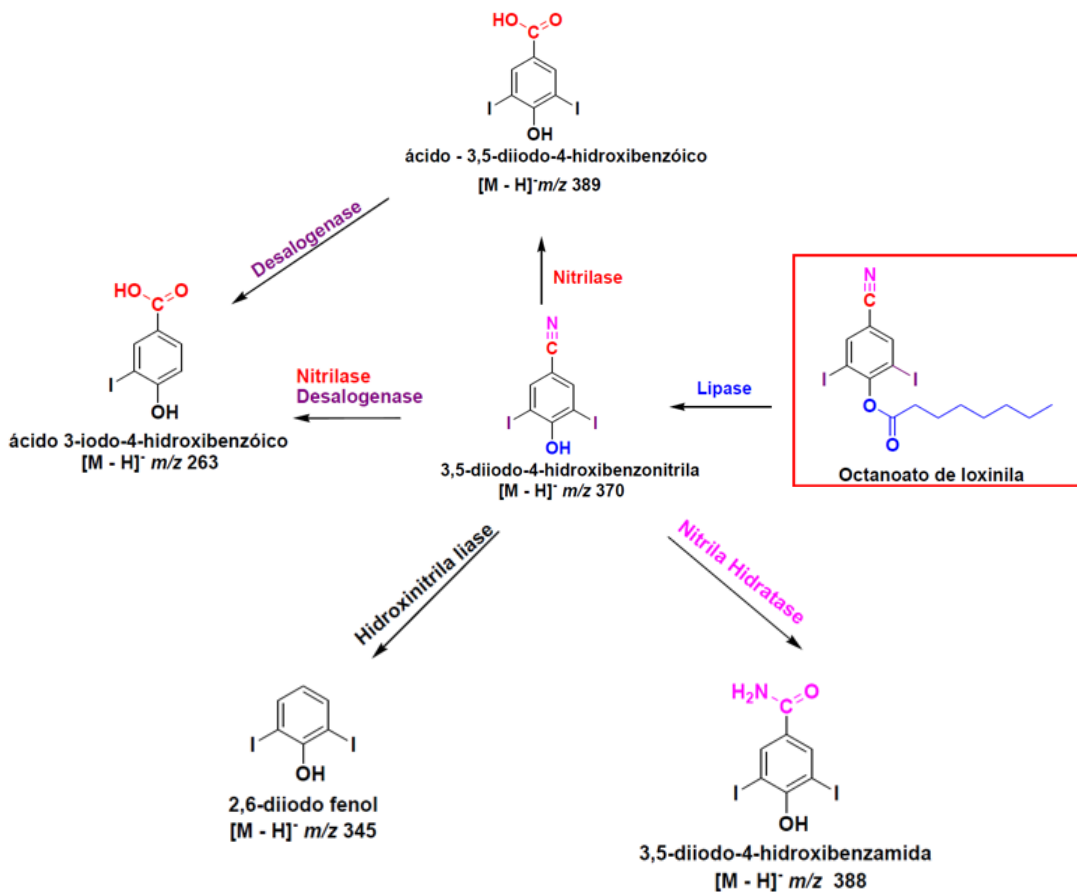


Figura 12. Produtos de biodegradação do octanoato de ioxinila/ioxinil e as respectivas enzimas sugeridas envolvidas neste catabolismo.

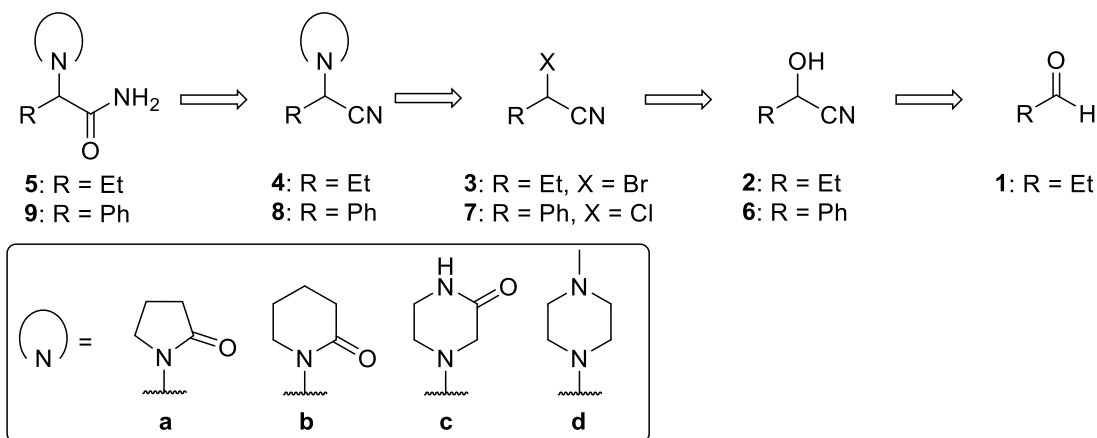
Apesar desses resultados promissores, durante os anos subsequentes não foi possível dar continuidade a outros estudos envolvendo biodegradações de compostos orgânicos devido ao acesso limitado aos equipamentos necessários para os experimentos de monitoramento de rotina dos produtos de biodegradação e dependência de outros outros laboratórios de pesquisa. Com a aposentadoria da profa. Lourdes Campaner dos Santos o Milagre Lab passou a ser o responsável por um dos HPLCs que ficavam anteriormente sob sua responsabilidade. Este equipamento associado à aprovação dos itens solicitados na Chamada CNPq/MCTI-FNDCT CT-Petro No 43/2022 - Combate à poluição no mar e ambientes marinhos causada pelo plástico e seus subprodutos permitirá que os estudos de biodegradação do grupo sejam retomados, a começar por aqueles envolvendo a intensificação do processo biocatalítico de degradação de polietileno tereftalato

(PET) presente em oceanos, através da utilização de diferentes plataformas enzimáticas, começando pelas poliéster hidrolases (cutinases), lipases e PETases.⁷⁵

Uso de biocatalisadores como ferramenta para a síntese orgânica

As enzimas nitrila hidratase foram o primeiro carro chefe no laboratório tanto para os estudos envolvendo a biodegradação de compostos orgânicos como para o desenvolvimento de metodologias para a síntese de amidas a partir de nitrilas. Alguns estudos envolveram o uso de nitrilas obtidas comercialmente em função de, naquela época, ainda não termos condições de produzir as enzimas no Milagre Lab.

A síntese quimioenzimática racêmica do levetiracetam, o ingrediente farmacêutico ativo de medicamento Keppra® utilizado no tratamento de epilepsia, e de análogos foi realizada com sucesso e é apresentada no Esquema 2.⁷⁶



Esquema 2. Rota retróssintética utilizada para a síntese de amidas *N*-heterocíclicas α -substituídas

Em comparação com outras rotas sintéticas descritas na literatura, a nossa rota foi realizada em um menor número de etapas e utilizou reagentes e solventes mais verde, sempre que possível, melhorando o rendimento global e o caráter de sustentabilidade. Esta síntese foi realizada de forma racêmica porque as nitrilas hidratases comerciais disponíveis apresentaram

baixa enantiosseletividade. Vários parâmetros foram avaliados na tentativa de contornar esta limitação tais como temperatura, uso de líquidos iônicos como solventes não convencionais, triagens de 22 (vinte e duas) enzimas comerciais - imobilizadas e livres -, dentre outros. Neste estudo ficou evidente a necessidade de engenheiramento das NHases, a fim de se obter melhores conversões e enantiosseletividade. Apesar dos resultados insatisfatórios em relação à enantiosseletividade, este trabalho permitiu a determinação da configuração absoluta dos compostos inéditos sintetizados durante este estudo, através da técnica de espectroscopia de dicroísmo circular eletrônico (ECD, do inglês Electronic Circular Dichroism), em parceria com o prof. João Marcos Batista Junior, agregando dados experimentais valiosos para a comunidade científica.

Ainda fazendo uso de enzimas comerciais e com o início da produção da nitrilas hidratase de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 no Milagre Lab realizamos uma avaliação do escopo de substrato, buscando identificar condições ideais para aplicação desta metodologia em síntese orgânica.⁶⁶ Pudemos constatar, como era esperado, a importância da solubilidade dos compostos de partida para o sucesso da catálise enzimática. Como muitas nitrilas são pouco solúveis nos meios aquosos tamponados foi necessário o uso de cossolventes orgânicos capazes de auxiliar na solubilização do substrato mas que não interferissem negativamente na atividade enzimática. Foram avaliados compostos aromáticos heterocíclicos, compostos alifáticos e compostos aromáticos contendo o anel benzênico substituído com grupos doadores e retiradores de elétrons para se estudar os efeitos estereoeletrônicos nesses bezenos substituídos. Apesar da alta semelhança na sequência de aminoácidos com as NHases relatadas na literatura, a NHase *R. erythropolis* ATCC 4277, depende de Fe, produzida no Milagre Lab mostrou especificidade de substrato diferente quando comparada às relatadas anteriormente, indicando que um número limitado de substituições em resíduos de aminoácidos específicos nas subunidades α e β pode explicar as diferenças na especificidade do substrato. Além disso, este novo biocatalisador apresentou estereosseletividade moderada com um dos substratos testado, diferindo em estereoquímica dos relatados anteriormente. Esta descoberta pode estabelecer as bases para análises experimentos de engenharia de proteínas futuros.⁶⁶

Além dos estudos para o desenvolvimento de metodologias sintéticas com as nitrilas hidratases temos trabalhado com outras classes de enzimas, como as ω -transaminases (ω -TA, EC

2.6.1.x) . Estas enzimas catalizam a reação de aminação redutiva entre uma cetona e um composto doador de amino. Um dos exemplos de aplicação industrial de ω -transaminases é na reação de aminação redutiva de um intermediário sintético na rota quimioenzimática da síntese do ingrediente farmacêutico ativo, a sitagliptina (Januvia® e Janumet®, utilizada para o tratamento de diabetes.⁷⁷ As ω -transaminases são geralmente estereosseletivas e possuem dois bolsões de volumes diferentes próximo ao seu sítio ativo, conforme representado na Figura 13.

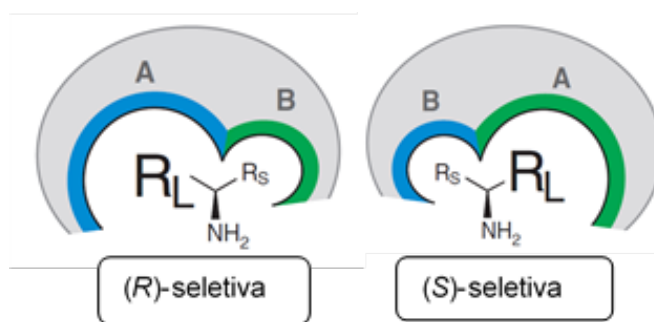


Figura 13. Representação esquemática do sítio catalítico das ω -transaminases.

No Milagre Lab dispomos de ω -transaminases comerciais e também as produzimos através de expressão heteróloga em *E. coli*, tanto as (R)- como as (S)-seletivas. Elas têm sido utilizadas nas investigações da reação de aminação redutiva enzimática de cetonas pró-quirais, visando a síntese de blocos construtores quirais de interesse comercial.

Em um dos trabalhos, investigamos a influência da presença de um sistema α,β -insaturado em um substrato modelo metilcetona, utilizando um conjunto de cinco ATAs do tipo selvagem, duas com seletividade (R) e três com seletividade (S) e uma variante de *V. fluvialis* modificada geneticamente (ATA -256 do Codexis). Nas avaliações de escopo de substrato das ω -transaminases a modelagem computacional se mostrou importante para auxiliar na racionalização dos resultados.⁷⁸ Observamos uma alta taxa de conversão (80 a 99%) e pureza óptica (78 a 99% ee) para ambas enzimas (R)- e (S)-ATAs seletivas para o substrato 1-fenil-3-butanona, usando isopropilamina (IPA) como um doador de amino. No entanto, a ligação dupla na posição α,β do análogo 4-fenilbut-3-en-2-ona reduziu drasticamente a reatividade do ATA de tipo selvagem, levando a conversões de <10% (sem afetar a enantiosseletividade). Em contraste, a variante de *V.*

fluvialis desenvolvida comercialmente, ATA-256, ainda permitiu uma conversão de 87%, produzindo uma amina correspondente com >99% ee. Simulações computacionais de docking mostraram que as diferenças de orientação e interações intermoleculares nos sítios ativos, foram os responsáveis para as alterações de atividade enzimática observadas experimentalmente.

Uma ferramenta que tem se mostrado muito promissora para o desenvolvimento de rotas sintéticas mais ambientalmente amigáveis para sínteses com múltiplas etapas de transformação são as reações em cascata, inspirado nas cascatas enzimáticas dos processos de biossíntese nos seres vivos.⁷⁹ Não importa se serão cascatas multienzimáticas ou quimioenzimáticas, o desafio em todas elas é otimizar a compatibilidade das condições do meio reacional para que mais de uma reação aconteça em um único frasco de reação. Uma das grandes vantagens de se optar pelas reações em cascata para a produção de um determinado composto é que os intermediários de síntese não precisarão ser isolados e purificados, assim, há uma redução significativa na geração de resíduos e custos relacionados ao seu tratamento e, conseqüentemente, o consumo de recursos como solventes, energia, espaço e tempo.

Os primeiros trabalhos realizados pelo grupo para o desenvolvimento de reações em cascatas envolveram três enzimas – as nitrila hidratases (NHase) que convertem uma nitrila em amida; as ω -transaminases (ω -TA) que catalisam a conversão de cetonas em aminas e, nestes estudos as álcool desidrogenases (ADH) foram utilizadas para reduzir cetonas em álcoois quirais.⁸⁰ Após a triagem enzimática, e otimização das condições reacionais com cada enzima individualmente, foi possível desenvolver dois sistemas de reações em cascata - cascatas enzimáticas sequenciais e cascatas enzimáticas simultâneas. Os dois sistemas de reações em cascata forneceram resultados bastante positivos, nos quais foram obtidas elevadas taxas de conversão e excessos enantioméricos para os produtos de interesse. Com estes resultados em mãos, os efeitos estereoeletrônicos do substituinte no anel aromático do substrato modelo deste estudo, a benzoilacetonitrila, foram avaliados e pudemos assim, desenvolver uma metodologia mais verde para síntese assimétrica de β -hidroxiamidas com elevada pureza enantiomérica (> 99%). A Figura 14 exemplifica as etapas principais do fluxo de trabalho para o desenvolvimento de reações em cascata enzimática, no caso deste exemplo, utilizando as enzimas nitrila hidratase (NHase) e cetorreductase (KRED).

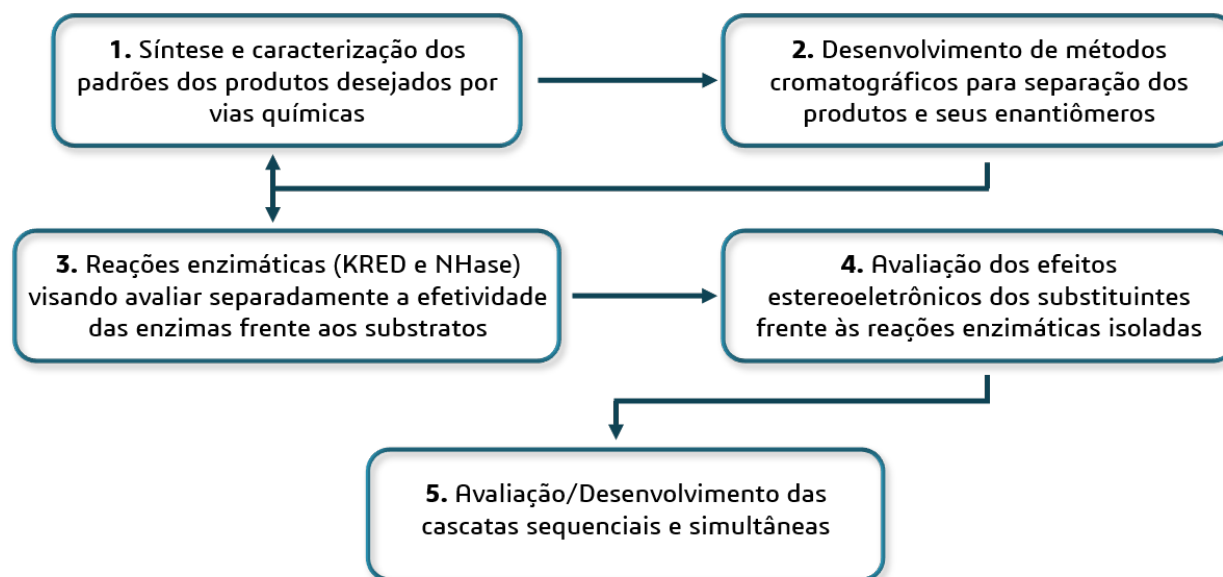


Figura 14. Fluxo de trabalho para o desenvolvimento de reações em cascata enzimática utilizando as enzimas nitrile hidratase (NHase) e cetorredutase (KRED)

Outras reações em cascatas enzimáticas têm sido estudadas pelo grupo, empregando as enzimas as ω -transaminases combinadas com as álcool desidrogenases, mas desta vez as álcool desidrogenases têm sido utilizadas para catalisar a reação de oxidação de álcoois a cetonas e não a reação inversa de redução descrita anteriormente.⁸¹ Estes estudos são muito importante porque as metodologias tradicionais para a oxidação de álcoois, em geral, requerem condições drásticas de reação e por vezes agentes oxidantes muito tóxicos. Nos últimos anos temos observado os esforços dos químicos orgânicos sintéticos para desenvolver metodologias de oxidação de álcoois mais sustentáveis e pretendemos também contribuir com esta área do conhecimento, utilizando os biocatalisadores como ferramenta chave.

Considerações finais

Nesta primeira década de trabalho foram utilizadas diferentes fontes de biocatalisadores nos trabalhos desenvolvidos pelo grupo, sob minha liderança. Começamos pela construção de uma Coleção de Culturas Microbianas a partir do isolamento de bactérias de solo brasileiro, aquisição de micro-organismos junto a Coleção de Cultura Tropical Fundação André Tosello, obtenção de enzimas isoladas disponíveis comercialmente a até a produção *in-house* de nossas próprias enzimas selvagens e estamos iniciando os esforços no sentido da modificação das enzimas utilizando técnicas de mutação sítio dirigidas para produzirmos biocatalisadores mais adequados aos nossos processos, em quantidades suficientes e que não limitem o trabalho.

Estes biocalisadores foram empregados em estudos de biodegradação de pesticidas, para a síntese total de compostos de interesse farmacológico como o levetiracetam e análogos, na otimização de metodologias visando compreender e aumentar o escopo de substrato nas reações de biocatálise e no desenvolvimento de processos, em batelada, de cascatas enzimáticas.

Os resultados obtidos nestes trabalhos foram o fruto do esforço de um grupo dedicado de alunos de graduação e pós-graduação que receberam uma formação multidisciplinar, desenvolvendo e aprimorando habilidades nas áreas de Microbiologia, Biologia Molecular, e Química, é claro, com ênfase em síntese orgânica, extração, isolamento, purificação e caracterização espectroscópicas e espectrométricas de substâncias orgânicas, princípios básicos de engenharia e estudos computacionais de ancoragem e docking molecular. Nossa equipe também contou com a colaboração de professores, nacionais e internacionais, experts em áreas específicas cuja troca e compartilhamento mútuo de saberes impulsionou a todos em direção a gerar mais conhecimento científico. Também tivemos a oportunidade de contribuir com o desenvolvimento de pesquisas de outros grupos, agora nós na função de colaboradores, como as investigações das interações enzima-ligante para as quais tivemos que instalar a sequencia de pulsos STD no espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear do IQ-UNESP,⁸² e tantos outros trabalhos que não foram descritos aqui.

A tarefa de ser “verde” ou “se tornar mais verde” não é fácil. Mas ensinar, cobrar atitudes e análise crítica dos futuros profissionais da área da química com quem tenho tido o privilégio de

trabalhar no Milagre Lab já tem gerado frutos quando eles se tornam multiplicadores deste novo paradigma nos postos que ocupam no mercado de trabalho.

*"Você não pode passar um único dia sem causar um impacto no mundo ao seu redor.
O que você faz, faz diferença e você tem que escolher que tipo de diferença quer fazer. "*
- Jane Goodall

Escolhas mais verdes começam por você.

Referências

- ¹ <https://brasil.un.org/pt-br/91223-onu-e-o-meio-ambiente>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ² <https://sustainabledevelopment.un.org/content/documents/5987our-common-future.pdf>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ³ Carson, R.; *Primavera Silenciosa*, 1ª ed., Gaia Editora: São Paulo, 2010.
- ⁴ <https://www.epa.gov/nepa>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ⁵ <https://www.epa.gov/archive/epa/aboutepa/birth-epa.html>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ⁶ <https://www.un.org/en/conferences/environment/stockholm1972>, acessado em Fevereiro de 2023.
- ⁷ Linthorst, J.A.; An overview: origins and development of green chemistry. *Found Chem.* **2010**, *12*, 55.
- ⁸ Farias, L.; Fávaro, D. I. T.; Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1089.
- ⁹ Sousa-Aguiar, E. F.; de Almeida, J. M. A.; Romano, P. N.; Fernandes, R. P.; Carvalho, Y.; Química verde: a evolução de um conceito. *Quim. Nova* **2014**, *37*, 1257.
- ¹⁰ Wardencki, W.; Curylo, J.; Namiésnik, J.; Green Chemistry - Current and Future Issues. *Pol. J. Environ. Stud.* **2005**, *14*, 389.
- ¹¹ <https://antigo.mma.gov.br/responsabilidade-socioambiental/agenda-21/agenda-21-global.html>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ¹² <http://www.mma.gov.br/o-ministerio/apresentacao>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ¹³ Corrêa, A. G.; Zuin, V. G.; Ferreira, V. F.; Vazquez, P. G.; Green Chemistry in Brazil, *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 1643.
- ¹⁴ <http://www2.ufpel.edu.br/iqg/wwverde/index.htm>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ¹⁵ Lenardão, E. J.; Freitag, R. A.; Dabdoub, M.; Batista, A. C. F.; Silveira, C. C.; "Green chemistry" - Os 12 Princípios da Química Verde e sua Inserção nas Atividades de Ensino e Pesquisa. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 123.
- ¹⁶ <https://www.acs.org/greenchemistry.html>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ¹⁷ Anastas, P. T.; Warner, J. C.; *Green Chemistry: theory and practice*, 1st ed., Oxford University Press: New York, 1998.
- ¹⁸ Anastas, P. T.; Eghbali, N.; Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301.
- ¹⁹ Winterton, N.; Twelve more green chemistry principles. *Green Chem.* **2001**, *3*, G73.
- ²⁰ Machado, A. A. S. C.; Dos primeiros aos segundos doze princípios da Química Verde. *Quim. Nova* **2012**, *35*, 1250.
- ²¹ Winterton, N.; Green chemistry: deliverance or distraction? *Clean Technol. Environm. Pol.* **2016**, *18*, 991–1001.

-
- ²² Anastas, P.T., Zimmerman, J.B., Design through the Twelve Principles of Green Engineering, *Env. Sci. Tech.* **2003**, *37*, 94A.
- ²³ <http://www.onu.org.br/>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ²⁴ <https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ²⁵ Anastas, P.; Nolasco, M.; Kerton, F.; Kirchhoff, M.; Licence, P.; Pradeep, T.; Subramaniam, B.; Moores, A.; The Power of the United Nations Sustainable Development Goals in Sustainable Chemistry and Engineering Research. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2021**, *9*, 8015.
- ²⁶ Anastas, P. T.; Zimmerman, J. B.; The United Nations sustainability goals: How can sustainable chemistry contribute? *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2018**, *13*, 150.
- ²⁷ Tundo, P.; Anastas, P.; Black, D. S.; Breen, J.; Collins, T.; Memoli, S.; Miyamoto, J.; Polyakoff, M.; Tumas, W.; Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview. *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1207.
- ²⁸ Anastas, P. T.; Warner, J. C.; *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York, 1998, p.30.
- ²⁹ Anastas, P. T.; Kirchhoff, M.M.; Williamson, T. C.; Catalysis as a foundational pillar of green chemistry. *Appl. Catal. A: Gen.* **2001**, *221*, 3-13.
- ³⁰ <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-prizes-in-chemistry/>, acessada em Março de 2023.
- ³¹ <https://iubmb.qmul.ac.uk/>, acessada em Março de 2023.
- ³² O'Reilly, E., N. J. Turner. Biocatalytic retrosynthesis. *Nature Chem. Biol.* **2013**, *9*, 285.
- ³³ Souza, R. O. M. A., Miranda, L. S. M., Bornscheuer, U. T.; A Retrosynthesis Approach for Biocatalysis in Organic Synthesis. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 12040.
- ³⁴ Honig, M., Sondermann, P., N. J. Turner, E. M. Carreira; Enantioselective Chemo- and Biocatalysis: Partners in Retrosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 8942–8973.
- ³⁵ N. J. Turner and L. Humphreys (Authors). Biocatalysis in Organic Synthesis: The retrosynthetic approach. RSC. 2018. ISBN: 978-1-78801-342-0
- ³⁶ Sheldon, R. A.; Brady, D.; Green Chemistry, Biocatalysis, and the Chemical Industry of the Future. *ChemSusChem* **2022**, e202102628.
- ³⁷ Ni, Y.; Holtmann, D.; Hollmann, F.; How Green is Biocatalysis? To Calculate is To Know. *ChemCatChem* **2014**, *6*, 930-943.
- ³⁸ De Maria, P. D.; Hollmann, F.; On the (Un)greenness of Biocatalysis: Some Challenging Figures and Some Promising Options. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1257.
- ³⁹ Woodley, J. M.; Ensuring the Sustainability of Biocatalysis. *ChemSusChem* **2022**, e202102683.
- ⁴⁰ Sheldon, R. A.; Metrics of Green Chemistry and Sustainability: Past, Present, and Future. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2018**, *6*, 1, 32–48.
- ⁴¹ Alcantara, A. R.; de Maria, P. D.; Littlechild, J. A.; Schürmann, M.; Sheldon, R. A.; Wohlgemuth, R.; Biocatalysis as Key to Sustainable Industrial Chemistry. *ChemSusChem* **2022**, e202200709.

-
- ⁴² Woodley, J. M.; Accelerating the implementation of biocatalysis in industry. *App. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 4733.
- ⁴³ Sheldon, R. A.; Woodley, J. M.; Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801–838.
- ⁴⁴ Ringborg, R. H.; Woodley, J. M.; The application of reaction engineering to biocatalysis. *React. Chem. Eng.*, **2016**, *1*, 10.
- ⁴⁵ G. Li, J-B Wang, M. T. Reetz.; Biocatalysts for the pharmaceutical industry created by structure-guided directed evolution of stereoselective enzymes. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 1241.
- ⁴⁶ J. M. Woodley. Integrating protein engineering with process design for biocatalysis. *Phil. Trans. R. Soc. A.* **2017**, *376*, 20170062.
- ⁴⁷ Gomes, F. D.; Woodley, J. M.; Considerations when Measuring Biocatalyst Performance. *Molecules* **2019**, *24*, 3573.
- ⁴⁸ Souza, R. O. M. A.; Miranda, L. S. M.; Bornscheuer, U. T.; A Retrosynthesis Approach for Biocatalysis in Organic Synthesis. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 12040.
- ⁴⁹ Honig, M.; Sondermann, P.; Turner, N. J.; Carreira, E. M.; *Enantioselective Chemo- and Biocatalysis: Partners in Retrosynthesis. Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 8942.
- ⁵⁰ Turner, N. J.; O'Reilly, E.; Biocatalytic retrosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 285.
- ⁵¹ Renata, H.; Wang, Z. J.; Arnold, F. H.; Expanding the enzyme universe: accessing non-natural reactions by mechanism-guided directed evolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3351.
- ⁵² Bartlett, G. J.; Borkakoti, N.; Thronton, J. M.; Catalysing new reactions during evolution: economy of residues and mechanism. *J. Mol. Biol.* **2003**, *331*, 829.
- ⁵³ Arnold, F. H.; *Q.; The nature of chemical innovation: new enzymes by evolution. Rev. Biophys.* **2015**, *48*, 404.
- ⁵⁴ Farwell, C. C.; McIntosh, J. A.; Arnold, F. H.; Enantioselective Imidation of Sulfides via Enzyme-Catalyzed Intermolecular Nitrogen-Atom Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *136*, 8766.
- ⁵⁵ Wang, Z. J.; Peck, N. E.; Renata, H.; Arnold, F. H.; Cytochrome P450-catalyzed insertion of carbenoids into N–H bonds. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 598.
- ⁵⁶ Arnold, F. H.; Innovation by Evolution: Bringing New Chemistry to Life (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 14420.
- ⁵⁷ Coelho, P. S.; Wang, Z. J.; Ener, M. E.; Baril, S. A.; Kannan, A.; Arnold, F. H.; A serine-substituted P450 catalyzes highly efficient carbene transfer to olefins in vivo. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 485.
- ⁵⁸ Coelho, P. S.; Brustad, E. M.; Kannan, A.; Arnold, F. H.; Olefin cyclopropanation via carbene transfer catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes. *Science* **2013**, *339*, 307.
- ⁵⁹ Birolli, W. G.; Ferreira, I. M.; Alvarenga, N.; Matos, I. L.; Comasseto, J. V.; Porto, A. L. M.; Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. *Biotech. Adv.* **2015**, *33*, 481.
- ⁶⁰ Cheng, Z.; Xia, Y.; Zhou, Z.; Recent Advances and Promises in Nitrile Hydratase: From Mechanism to Industrial Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **2020**, *8*, 352.

-
- ⁶¹ <https://www.basf.com/global/en/media/news-releases/2017/10/p-17-351.html>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ⁶² Shaw, N. M.; Robins, K. T.; Kiener, A.; Lonza: 20 years of biotransformations. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 425.
- ⁶³ <https://www.pharmaceutical-technology.com/projects/lonza-niacinamide-production-guangzhou/>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ⁶⁴ Supreetha, K.; Rao, S. N.; Srividya, D.; Anil, H. S.; Kiran, S.; Advances in cloning, structural and bioremediation aspects of nitrile hydratases. *Mol. Biol. Rep.* **2019**, *46*, 4661.
- ⁶⁵ Angelini, L. M. L.; Silva, A. R. M.; Rocco, L. F. C.; Milagre, C. D. F. A high-throughput screening assay for distinguishing nitrile hydratases from nitrilases Braz. *J. Microbiol.* **2015**, *46*, 113.
- ⁶⁶ Moraes, M. I.; Iglesias, C.; Teixeira, I. S.; Milagre, H. M. S.; Giordano, S. R.; Milagre, C. D. F.; Biotransformations of nitriles mediated by in vivo nitrile hydratase of *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 heterologously expressed in *E. coli*. *Results Chem.* **2023**, *5*, 100760.
- ⁶⁷ Teixeira, I. S.; Milagre, C. D. F.; Evolução dirigida de enzimas: pequenas mudanças, melhores biocatalisadores. *Quim. Nova* **2020**, *43*, 773.
- ⁶⁸ Dörr, M.; Fibinger, M. P. C.; Last, D.; Schmidt, S.; Santos-Aberturas, J.; Böttcher, D.; Hummel, A.; Vickers, C.; Voss, M.; Bornscheur, U. T.; Fully automatized high-throughput enzyme library screening using a robotic platform. *Biotechnol. Bioeng.* **2016**, *113*, 1421.
- ⁶⁹ Yi, D.; Bayer, T.; Badenhorst, C. P. S.; Wu, S.; Doerr, M.; Höhne, M.; Bornscheuer, U. T.; Recent trends in biocatalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 8003.
- ⁷⁰ <https://www.andes.org.br/conteudos/noticia/quase-metade-dos-agrotoxicos-liberados-por-bolsonaro-sao-proibidos-na-uniao-europeia1>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ⁷¹ <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2023/02/04/bolsonaro-liberou-2182-agrotoxicos-em-4-anos-recorde-para-um-governo-desde-2003.ghtml>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ⁷² Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice monográfico do bromoxinil. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d42ca40047458afb9485d43fbc4c6735/b15.pdf?MOD=AJPERES>, acessada em Fevereiro de 2023.
- ⁷³ BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Brasília, DF, 2003. http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons, acessada em Fevereiro de 2023.
- ⁷⁴ Oliveira, K. O.; Silva, A. R. M.; Da Silva, B. F.; Milagre, H. M. S.; Milagre, C. D. F.; Insights into the microbial degradation pathways of the ioxynil octanoate herbicide. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2018**, *13*, 258.
- ⁷⁵ Song, R.; Murphy, M.; Li, C.; Ting, K.; Soo, C.; Zheng, Z.; Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *New Biotechnol.*, **2018**, *40*, p. 154.
- ⁷⁶ Amaral, B. S.; Batista Junior, J. M.; Vilela, A. F. L.; Cardoso, C. L.; Milagre, H. M. S.; Milagre, C. D.

F.; Levetiracetam derivatives: chemoenzymatic synthesis, absolute configuration assignment and evaluation of cholinesterase inhibitory activities. *Eclética Quim. J.* **2022**, *47*, 17.

⁷⁷ Savile, C. K.; Janey, J. M.; Mundorff, E. C.; Moore, J. C.; Tam, S.; Jarvis, W. R.; Colbeck, J. C.; Krebber, A.; Fleitz, F. J.; Brands, J.; Devine, P. N.; Huisman, G. W.; Hughes, G. J.; Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. *Science* **2010**, *329*, 305.

⁷⁸ Teixeira, I. S.; Farias, A. B.; Horta, B. A. C.; Milagre, H. M. S.; Horta, A. B.; Souza, R. O. M. A.; Bornscheuer, U. T.; Milagre, C. D. F.; Computer modelling explains structural reasons for the difference in reactivity of amine transaminases towards prochiral methylketones. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 777.

⁷⁹ Castilho, S. A.; Milagre, H. M. S.; Milagre, C. D. F.; Reações em cascata enzimática, quimioenzimática e fotoenzimática: perspectivas para uma síntese orgânica mais sustentável. *Quim. Nova* **2022**, *45*, 304.

⁸⁰ Miranda, A. S.; Hollmann.; Milagre, C. D. F.; Alcohol Dehydrogenases as Catalysts in Organic Synthesis. *Front. Catal.* **2022**, *2*, 900554.

⁸¹ Milagre, H. M. S.; Milagre, C. D. F.; Alcohol dehydrogenase-catalyzed oxidation. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2022**, *38*, 100694.

⁸² Lazaro, B.; Villa, J. A.; Santin O.; Cabezas, M.; Milagre, C. D. F.; de la Cruz, F.; Moncalia, G.; Heterologous expression of a thermophilic diacylglycerol acyltransferase triggers triglyceride accumulation in *Escherichia coli*. *PLoS One* **2017**, *12*, e0176520.