

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 10/10/2023.

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 Gênômica 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 Mafra de Paula Dias no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, em 2016.
- Estágio em Iniciação Científica “Estrógenos em sedimento e material particulado em ambiente marinho: estudo analítico”, sob a orientação da Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi, de 01/02/2014 a 01/01/2015, com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2013/20877-4).

## 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 Lara, 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  $\alpha$ - $\beta$ -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  $\alpha$ - $\beta$ -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

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

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

## LISTA DE TABELAS

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



## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Reação catalisada pela enzima hidroxinitrila liase.....	26
<b>Esquema 2.</b> Tipos de reações catalisadas pelas transaminases.....	34
<b>Esquema 3.</b> Proposta mecanística de atuação de transaminases.....	35
<b>Esquema 4.</b> Reação de aminação redutiva da acetofenona e furilmetilcetona catalisada por ATAs e empregando IPA como doador de amina.....	39
<b>Esquema 5.</b> Reação de aminação redutiva da 1-fenil-3-butanona catalisada por ATAs e empregando IPA como doador de amina.....	41
<b>Esquema 6.</b> Reação de aminação redutiva da 4-fenilbut-3-en-2-ona catalisada por ATAs e empregando IPA como doador de amina.....	42
<b>Esquema 7.</b> Reação catalisada pela NHase.....	48
<b>Esquema 8.</b> Vias metabólicas para degradação de nitrilas.....	48
<b>Esquema 9.</b> Reação de obtenção da acrilamida para síntese da poliacrilamida.....	49
<b>Esquema 10.</b> As três possibilidades de mecanismo inicialmente propostos para as NHases.....	52
<b>Esquema 11.</b> 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 Alignment 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 – Dithiothietol  
EC Number – *Enzyme Commission Number*  
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético  
Ee – excesso enantiomérico  
epPCR – *error-prone* PCR  
GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrometro de Massas  
GC-FID – Cromatografia Gasosa Acoplada A Detector De Ionização Em Chama  
GDH – glicose desidrogenase  
GO – *Gene Ontology*  
HHDH – halodrina desalogenase  
HNL – hidroxinitrila liase  
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
IFA – Ingrediente Farmacêutico Ativo  
IPTG – Isopropil- $\beta$ -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-redundant* 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 – Phenylmethylsulfonyl 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

<b>1. Introdução geral</b> .....	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
<b>2. Introdução -Capítulo 1</b> .....	33
2.1. Transaminases (ATAs) .....	33
<b>3. Objetivos</b> .....	37
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	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
<b>5. Conclusões</b> .....	45
<b>6. Introdução – Capítulo 2</b> .....	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
<b>7. Objetivos</b> .....	55
<b>8. Resultados e discussão</b> .....	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. <i>Dockings</i> com as enzimas mutantes e difenilacetoneitrila .....	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
<b>9.</b>	<b>Conclusões</b>	<b>85</b>
<b>10.</b>	<b>Procedimentos gerais</b>	<b>87</b>
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
<b>11.</b>	<b>Primeiro capítulo: Reações com transaminases</b>	<b>93</b>
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 reductiva 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
<b>12.</b>	<b>Segundo Capítulo</b>	<b>97</b>
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 $\beta$ 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*

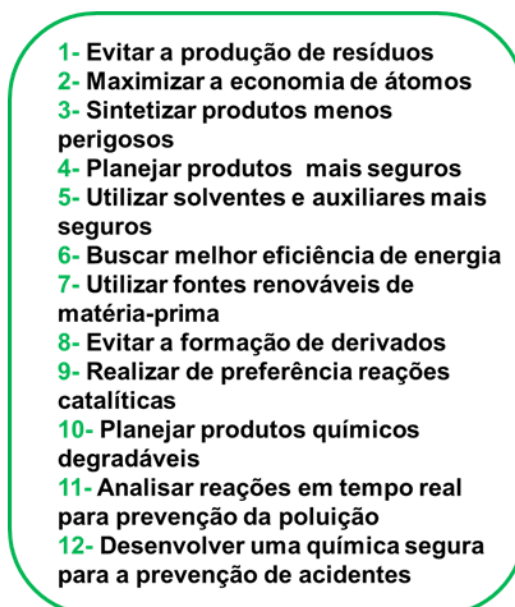


## 1. Introdução geral

### 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.

<b>Princípio</b>	<b>Relação com a biocatálise</b>
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.

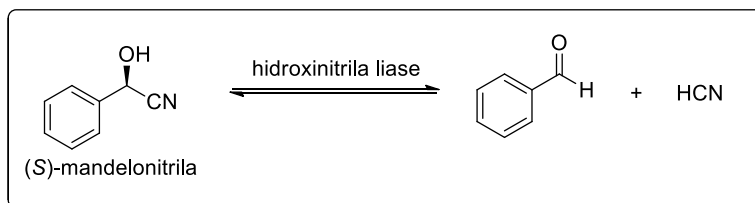
Fonte: Adaptado de (TEIXEIRA; MILAGRE, 2020b)

### 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).

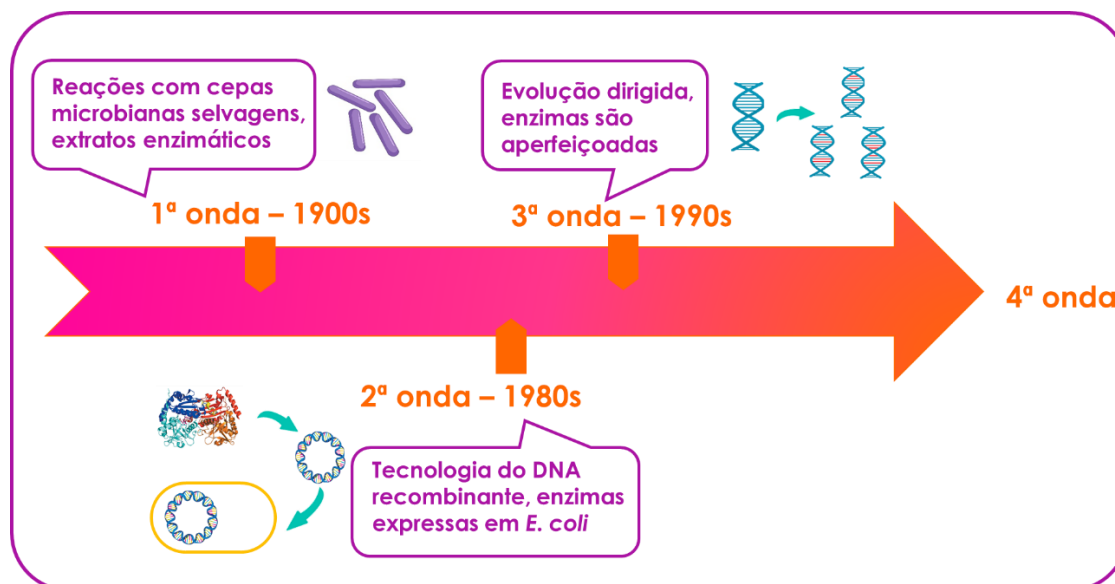
Com o advento da tecnologia do DNA recombinante no final dos anos 80, a biocatálise passou por um grande crescimento, no que foi então chamada de segunda onda da biocatálise (BORNSCHEUER et al., 2012). Enzimas foram clonadas em vetores e assim expressas em células de organismos procaríotos ou eucaríotos 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 pro-sitagliptina 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<sup>-1</sup>) (TEIXEIRA, MILAGRE, 2020).

**Figura 2.** Ondas da biocatálise.

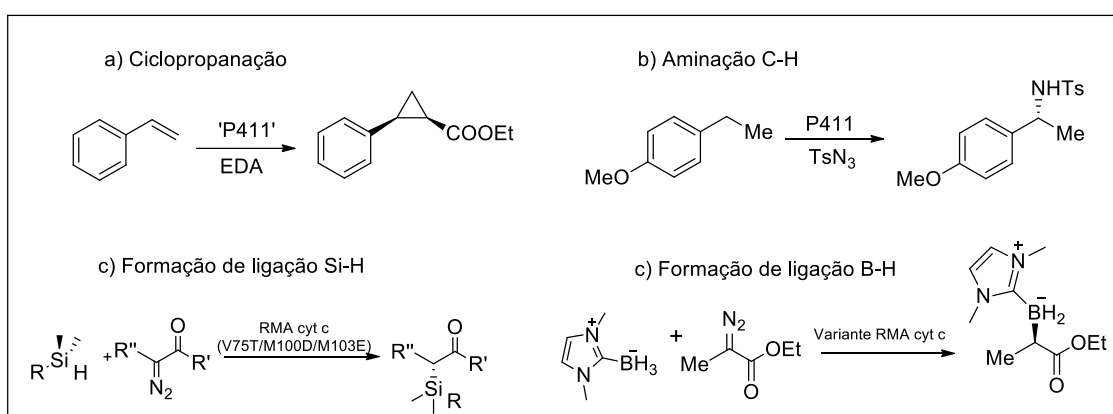


Fonte: elaborada pela autora.

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.

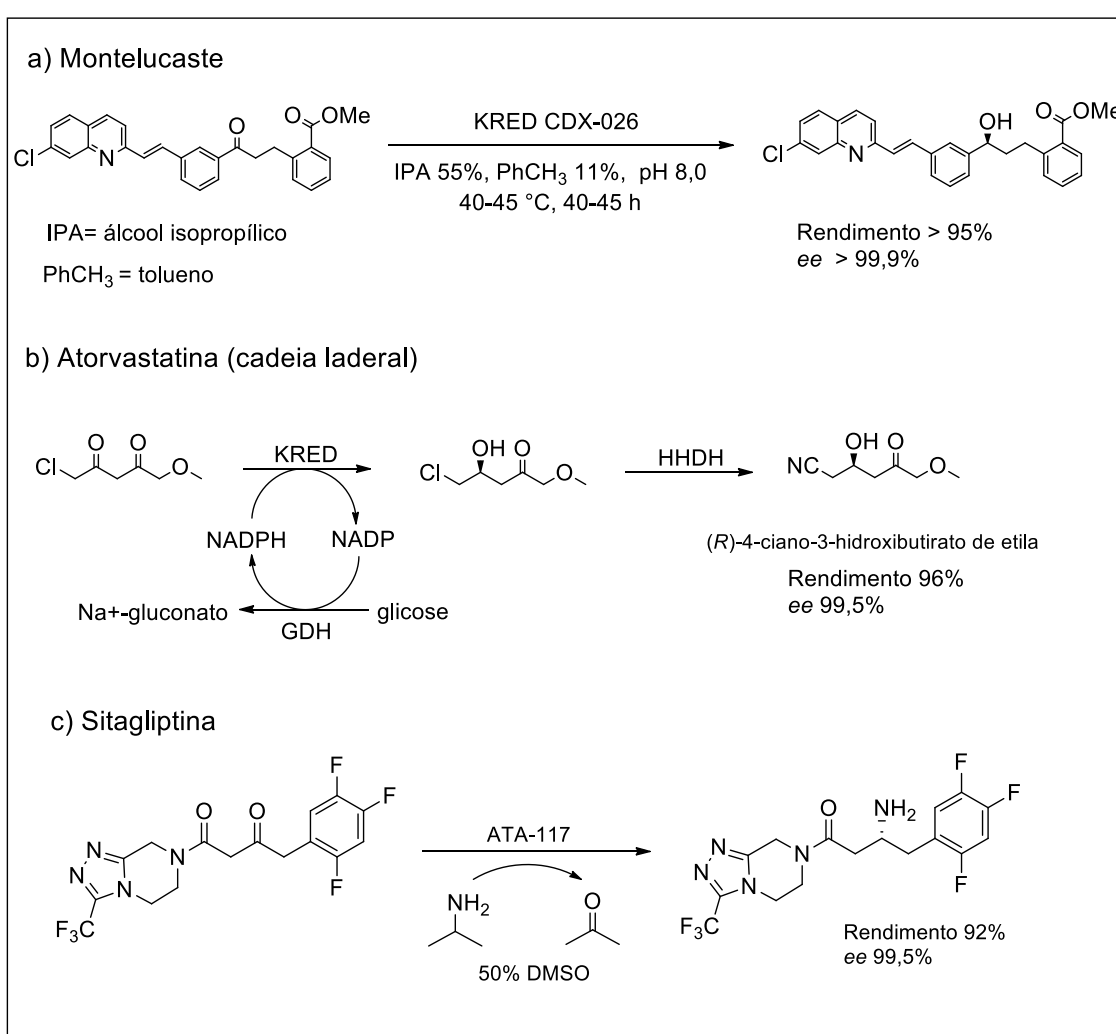
A relevância da contribuição das pesquisas do *The Arnold Group* para a sociedade foi evidenciada pelo Prêmio Nobel de Química 2018, que laureou Frances H. Arnold com metade do prêmio pelas suas contribuições na área de “*Evolução Dirigida de Enzimas*” e a outra metade foi dividida entre George P. Smith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

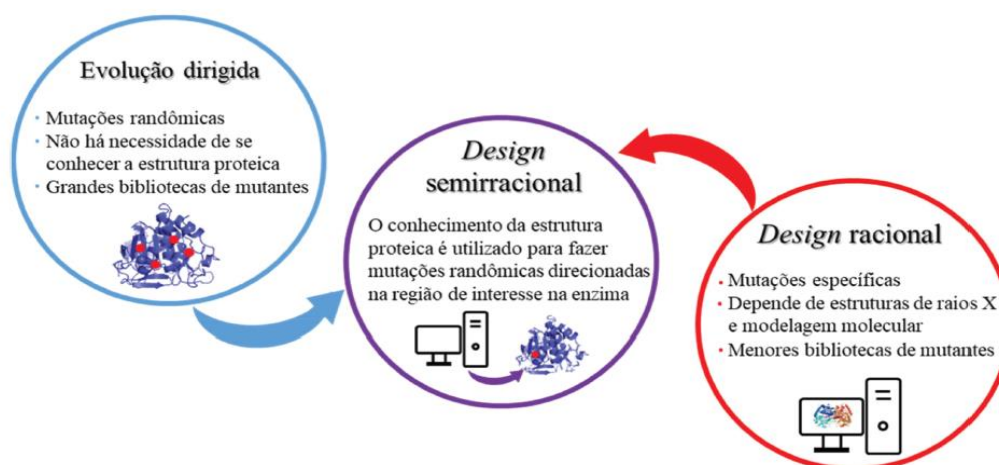
Apesar da biocatálise estar evoluindo para uma quarta onda no setor global, no Brasil as pesquisas ainda não se encontram nesse nível. Em artigo de revisão publicado em 2015, Birolli e colaboradores realizaram uma revisão do estado da biocatálise no Brasil e, apesar do crescimento na área, no país as 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 (BIROLLI 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).

## *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.
- BIROLLI, 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.*  $\omega$ -Transaminases for the synthesis of non-racemic  $\alpha$ -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-CI-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  $\omega$ -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  $\omega$ -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.  $\omega$ -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  $\omega$ -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  $\omega$ -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.