

RAQUEL SABARÁ DA CRUZ

**Síntese enantiosseletiva de β -aminoésteres quirais através de
sistemas enzimáticos envolvendo transaminases**

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

Orientadora: Prof. Dra. Cintia Duarte Freitas Milagre

ARARAQUARA

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

C955s Cruz, Raquel Sabará da
Síntese enantiosseletiva de beta-aminoésteres quirais
através de sistemas enzimáticos envolvendo transaminases /
Raquel Sabará da Cruz – Araraquara : [s.n], 2016
108 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Cintia Duarte de Freitas Milagre

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

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

RAQUEL SABARÁ DA CRUZ

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

Araraquara, 04 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. Cintia Duarte de Freitas Milagre (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Profª. Drª. Maysa Furlan
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Leandro Helgueira Andrade
Instituto de Química / USP / São Paulo - SP

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Raquel Sabará da Cruz

Filiação: Darli Rodrigues Sabará
Renilda Rodrigues da Cruz Sabará

Data de Nascimento: 24 de Abril de 1987

Naturalidade: Ubatuba/SP

Nacionalidade: Brasileira

Estado Civil: Solteira

Formação Acadêmica

Ensino Médio

Escola Estadual Idalina do Amaral Graça. 2002-2004

Ensino Superior

Graduada em Farmácia-Bioquímica pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2006- 2013.

Pós-graduação

Instituto de Química, UNESP - Araraquara, Brasil

Mestrado em química

Título: Síntese enantiosseletiva de β -aminoácidos quirais através de sistemas enzimáticos envolvendo transaminases

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Atuação Profissional

Mestrado em química, área de concentração: Química orgânica, no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, no período de 2014 a 2016 com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Estagiária no setor de Validação Analítica e Estabilidade da empresa ABL – Antibióticos do Brasil. Período: 2012-2013.

Bolsista FAPESP de iniciação científica no NuBBE - Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais do Instituto de Química da UNESP. Período: 2010 – 2011.

Estagiária responsável pelo setor de controle de qualidade na empresa FARMACOTÉCNICA - Farmácia de Manipulação e Homeopatia. Período: 2008 – 2010.

Projeto de extensão “Atenção Farmacêutica em Análises Clínicas”, realizado no Núcleo de Apoio à Comunidade – NAC sob a orientação do professor Dr. Amauri Antiquera Leite. Período: 2008 – 2008.

Participação em Eventos e Congressos

- 16th Brazilian Meeting on Organic Synthesis - Búzios, 2015.
- UNESP NMR Symposium: Recent Advances in NMR Spectroscopy, 2014.
- 5º Simpósio Brasileiro em Química Medicinal, BrazMedChem – Ouro Preto, 2010.
- 56ª e 57ª Jornada Farmacêutica da UNESP – Araraquara, 2009 e 2010.
- 40ª Semana da Química – Instituto de Química, UNESP – Araraquara, 2010.
- I International Meeting of Pharmaceutical Care ,UNESP – Araraquara, 2010.
- IV Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia , UNESP – Araraquara, 2008.

Apresentação de trabalhos em congressos

CRUZ, R. S.; SOUZA, R. O. M. A.; BORNSCHEUER, U.; MILAGRE, C. D. F. Enantioselective synthesis of β -aminoesters employing (*R*) and (*S*)-selective ω -transaminases. 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – RASBQ. Goiânia/GO, 30 de maio a 2 de junho de 2016. **(Trabalho submetido)**

CRUZ, R. S., MILAGRE, C. D. F., SOUZA, R. O. M. A., BORNSCHEUER, U. Comparison of ω -transaminase activity profile in the asymmetric synthesis of β -amino acids employing alkyl and aryl β -keto esters substrates. 16th Brazilian Meeting on Organic Synthesis. Búzios/RJ, 15 a 18 de novembro de 2015.

CRUZ, R. S., COSTA, M. S., CICARELLI, R. M. B., BOLZANI, V. S., REGASINI, L. O. Novel Synthesis of Trypanocidal Nitro and Aminochalcones via Cannizzaro like Dismutation. 5th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry. Ouro Preto/MG, 06 a 09 de novembro de 2010.

CRUZ, R. S., REGASINI, L. O. Síntese de Aminochalconas e Avaliação de sua Atividade Antioxidante. 57ª Jornada Farmacêutica da UNESP, 2010 Araraquara.

Dedico este trabalho integralmente ao Deus único, invisível, imortal, soberano, absoluto que habita na luz inacessível a quem homem algum jamais viu, nem é capaz de ver. Àquele que nunca foi gerado, mas sempre existiu e reina de eternidade a eternidade. A Ele honra, glória e poder eterno, porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas e Nele todas as coisas subsistem.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida, pela força que Ele mesmo gera em mim a cada novo dia e por me ajudar a concluir mais uma etapa importante da minha carreira. Sem Ele eu não teria chegado até aqui. Não foram poucos os obstáculos no caminho, mas enfrentei cada um com a convicção de que não estava só.

Aos meus pais Darli e Renilda, pela confiança e expectativa depositados, por todo o apoio e incentivo, pela educação, cuidado, amor e conselhos ao longo de todos esses anos. Vocês fizeram de mim a pessoa que sou hoje e eu só tenho a agradecer.

Ao meu irmão Tiago e ao meu tio Edivanildo (Té), pelo apoio, carinho, amor e preocupação que sempre tiveram comigo.

À minha orientadora, Dra. Cíntia, pela oportunidade e confiança em mim depositada, por toda a paciência e pela orientação ao longo desse trabalho.

Às minhas queridas amigas e irmãs Rozi, Lucimara e Keila. Vocês marcaram minha vida em Araraquara de uma maneira muito especial, e tornaram minha estadia nessa cidade muito mais agradável. Agradeço imensamente pela amizade, carinho e paciência comigo. Amo vocês.

À todos os meus amigos, de perto e de longe, aos mais novos e aos não tão novos assim (Adriano, Samira e Abilene). Na amizade de vocês eu vi motivos pra sorrir mesmo com todas as dificuldades ao meu redor.

À professora Maria Célia que gentilmente abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar uma parte dos trabalhos, e ao mestrando Pablo que me acompanhou e auxiliou em todas as análises.

Aos colegas de laboratório do Grupo Milagre (Luna, Carol, Maraylla, João, Milena, Bruno e Karina) em especial à doutoranda Beatriz que esteve conosco em intercambio e me auxiliou em uma parte crucial deste trabalho.

Ao professor Dr. Humberto Milagre pelas contribuições com este trabalho.

Aos meus colegas vizinhos de laboratório (Felipe, Alana, Rafael e Afif) pela amizade e por todos os cafés, risadas e companhia nos estudos.

Aos funcionários do IQ Marquinhos, Nivaldo e Lucinéia por todo o suporte técnico.

Aos funcionários da biblioteca e da pós-graduação, pelo profissionalismo, dedicação e rapidez sempre que solicitados.

Às agências de fomento CAPES, FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

“Posso todas as coisas Naquele que me fortalece.”
(Filipenses 4:3)

RESUMO

β -aminoésteres/ácidos quirais enantiomericamente puros são blocos construtores quirais economicamente importantes para a indústria farmacêutica, de química fina, e agroquímica. As transaminases, também conhecidas como aminotransferases têm emergido como uma importante classe de enzimas com grande potencial na síntese enantiosseletiva desses compostos. Neste trabalho foi avaliada a reatividade de ω -transaminases frente a β -cetoésteres arílicos (benzoilacetato de etila) e alquílicos (acetoacetato de etila) visando à síntese enantiosseletiva de β -aminoésteres/ácidos. As enzimas utilizadas neste trabalho foram produzidas no laboratório a partir de plasmídeos contendo genes que codificam ω -transaminases (*R*) e (*S*)-seletivas provenientes de diferentes micro-organismos. Essas enzimas juntamente com uma enzima comercial (*S*)-seletiva foram empregadas em reações de aminação assimétrica utilizando substratos β -cetoésteres, e na resolução cinética da (*R,S*)-feniletilamina. Parâmetros como concentração de enzima:substrato, compostos doadores de grupo amino, temperatura e pH foram avaliados visando à otimização dos rendimentos e enantiosseletividade. As enzimas produzidas apresentaram excelentes conversões (> 99 %) nas reações de síntese assimétrica e elevados excessos enantioméricos (> 99 %) em praticamente todas as reações de resolução cinética nas quais o acetoacetato de etila foi empregado como substrato. Por outro lado, nas reações onde o benzoilacetato de etila foi empregado como aceptor de amina, não se observou a formação do produto de interesse.

Palavras-chave: ω -transaminase, β -aminoéster, biocatálise.

ABSTRACT

Optically pure β -amino esters/ acids constitute economically important chiral building blocks for the pharmaceutical, fine chemical and agrochemical industries. Transaminases, also known as aminotransferases have emerged as an important class of enzymes with great potential in the enantioselective synthesis of these compounds. In this work, was evaluated the reactivity of ω -transaminase against aryl (ethyl benzoylacetate) and alkyl (ethyl acetoacetate) β -keto esters for the enantioselective synthesis of β -amino esters/acids. The enzymes used in this work were produced in the laboratory from plasmids containing genes encoding (*R*) and (*S*)-selective ω -transaminases from different micro-organisms. These enzymes along with a (*S*)-selective commercial enzyme were employed in the asymmetric amination reactions using β -keto esters substrates and kinetic resolution of (*R,S*)-phenylethylamine. Parameters such as concentration of enzyme:substrate, amino group donors, temperature and pH were evaluated aiming to optimize yields and enantioselectivity. The enzymes produced showed excellent conversion (> 99%) in the asymmetric synthesis reactions and high enantiomeric excess (> 99%) in practically all kinetic resolution reactions in which ethyl acetoacetate was used as substrate. On the other hand, in reactions where the ethyl benzoylacetate was used as amino acceptor, was not observed the formation of the product of interest.

Keywords: ω -transaminase, β -amino ester, biocatalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral de um α e um β -aminoácido.	21
Figura 2 - Isômeros de posição em β -aminoácidos.	21
Figura 3 - β -aminoácidos cíclicos.	22
Figura 4 - Fármacos contendo β -aminoácidos em sua estrutura.....	22
Figura 5 - Estrutura tridimensional de uma ω -transaminase de <i>Aspergillus fumigatus</i> . A: Visão geral do dímero (subunidade A em verde e subunidade B em azul), B: Domínios de cada subunidade (domínio maior em rosa, domínio menor em verde).27	27
Figura 6 - Ilustração esquemática do sítio catalítico de uma ω -transaminase.....	28
Figura 7 - Vetores pET pGASTON utilizados na construção dos plasmídeos recombinantes.....	41
Figura 8 - Sistema de eletrotransferência para membrana de nitrocelulose.	49
Figura 9 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para os padrões acetofenona, isopropilamina e feniletilamina.....	61
Figura 10 - Cromatograma obtido por CG-FID para o controle microbiano do micro- organismo MLH 45.	62
Figura 11 - Cromatograma obtido por CG-FID (Método 1) para o controle de substratos do ensaio 1.	63
Figura 12 - Cromatograma obtido por CG-FID (Método 1) para o ensaio 2 com o micro-organismo MLH 51.	63
Figura 13 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para o ensaio 1 com o micro-organismo MLH 51.	64
Figura 14 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para o ensaio 1 com o micro-organismo MLH 15.	64
Figura 15 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para o ensaio 1 com o micro-organismo MLH 51 utilizando (R)-FEA.....	65
Figura 16 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para o ensaio 1 com o micro-organismo MLH 51 utilizando (S)-FEA.	66
Figura 17 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para o ensaio 1 com o micro-organismo MLH 15 utilizando (R)-FEA.....	66
Figura 18 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para o ensaio 1 com o micro- organismo MLH 15 utilizando (S)-FEA.	67
Figura 19 - Curva de calibração para a acetofenona.....	67

Figura 20 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para o ensaio 1 com o micro-organismo MLH 51: (S)-FEA (50mM); Piruvato (25 mM).....	68
Figura 21 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) do extrato de <i>E. coli</i> transformada com plasmídeos contendo genes sintéticos de ω -transaminases antes da indução (N/I) e após indução (I).	70
Figura 22 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) do extrato de <i>E. coli</i> transformada com plasmídeos contendo genes sintéticos de ω -transaminases antes da indução (N/I) e após indução (I).	71
Figura 23 - Western blot de extratos de <i>E. coli</i> transformados com plasmídeos contendo genes de ω -transaminases	72
Figura 24 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 2) para a reação de síntese assimétrica utilizando ω -TA comercial: (S)-FEA (100 mM); acetoacetato de etila (30 mM), PLP (1 mM).	75
Figura 25 - Perfil cromatográfico obtido após a resolução cinética da (<i>rac</i>)-FEA mediada por ω -TA (Cromatograma A), perfil cromatográfico obtido em fase estacionária quiral da (<i>rac</i>)-FEA (Cromatograma B), produto (<i>R</i>)-FEA com 88 % de ee (Cromatograma C).	77
Figura 26 - Perfil cromatográfico obtido por GC-FID (método 3) para a reação controle utilizando extrato de <i>E. coli</i> sem plasmídeo: (<i>rac</i>)-FEA (100 mM); piruvato (25 mM), PLP (1mM).	79
Figura 27 - Perfil cromatográfico obtido por GC- FID (Método 3) após o ensaio de atividade enzimática empregando extrato contendo ω -TA oriunda de <i>Asp. terreus</i> . .	80
Figura 28 - Perfil cromatográfico obtido por GC-FID (Método 3) após o ensaio de atividade enzimática do extrato contendo ω -TA oriunda de <i>Asp. terreus</i> empregando somente a feniletilamina como substrato.	81
Figura 29 - Uso da diálise na separação de moléculas grandes e pequenas.	82
Figura 30 - Perfil cromatográfico obtido por GC- FID (Método 3) após a reação controle de diálise.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Programação do método 1 - GC-FID.....	39
Tabela 2 - Programação do Método 2 - GC-FID.....	39
Tabela 3 - Programação do método 3 - GC-FID.....	39
Tabela 4 - Método utilizado para determinação dos ee por GC-FID.....	40
Tabela 5 - Condições de expressão das ω -transaminases.....	48
Tabela 6 - Seletividade das enzimas de cada extrato.....	54
Tabela 7 - Dados da conversão da feniletilamina (FEA) em acetofenona.	68
Tabela 8 - Massa molecular e especificidade das enzimas expressadas em <i>E. coli</i>	70
Tabela 9 - Valores de conversão (%) obtidos nas reações de síntese assimétrica mediadas por ω -TAs presentes nos extratos enzimáticos utilizando o acetoacetato de etila como substrato.	84
Tabela 10 - Valores de conversão (%) e ee (%) obtidos nas reações de resolução cinética da (<i>rac</i>)-FEA mediadas por ω -TAs presentes nos extratos enzimáticos utilizando o acetoacetato de etila como substrato.....	85

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Etapa biocatalítica na síntese da sitagliptina.....	18
Esquema 2 - Aminoação assimétrica de cetonas empregando ω -transaminases.....	25
Esquema 3 - Classificação das ω -transaminases.....	26
Esquema 4 - Mecanismo de reação catalisado por ω -transaminases.	29
Esquema 5 - Síntese assimétrica empregando ω -transaminases.....	30
Esquema 6 - Deslocamento do equilíbrio da reação catalisada por ω –TA via lactato desidrogenase, alanina desidrogenase, piruvato descarboxilase e acetolactato sintase.....	31
Esquema 7 - Resolução cinética de aminas quirais empregando ω -transaminases.	32
Esquema 8 - Desracemização empregando ω -transaminases.	33
Esquema 9 - Desracemização da <i>rac</i> -Mexiletina via síntese <i>one-pot</i> em duas etapas empregando ω -transaminase.	34
Esquema 10 - Rota sintética para obtenção do β -aminoéster 3-amino-3-fenilpropanoato de etila.	55
Esquema 11 - Reação de transaminação utilizando (<i>rac</i>)-feniletilamina.	59
Esquema 12 - Reação de transaminação utilizando a isopropilamina.	61
Esquema 13 - Rota sintética para obtenção do β -aminoéster 3-amino-3-fenilpropanoato de etila.	73
Esquema 14 - Aminoação assimétrica dos substratos acetoacetato de etila e benzoilacetato de etila.....	74
Esquema 15 - Resolução cinética da (<i>rac</i>)-Feniletilamina empregando enzima comercial.....	76
Esquema 16 - Resolução cinética da (<i>rac</i>)-FEA mediada por ω -TA dos extratos enzimáticos empregando acetoacetato de etila como acceptor de amina.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AlaDH – Alanina desidrogenase

Amp – Ampicilina

BCIP – 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato de *p*-toluidina

Can – Canamicina

CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa

D.O – Densidade ótica

Da – Dalton

DMF – *N,N*-dimetilformamida

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ee – Excesso enantiomérico

FEA – Feniletilamina

GC-FID – Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IPTG – Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranosídeo

LB – Luria Broth

LDH – Lactato desidrogenase

NA – Nutrient ágar

NB – Nutrient Broth

NBT – Nitroazul de tetrazólico

PLP – Piridoxal 5-fosfato

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

rac – racêmico

RMN de ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono treze

RMN de ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio um

RPM – Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TBST – Tampão tris salino com tween

TEMED – Tetrametiletilenodiamina

TEOS – Ortosilicato de tetraetila

ω -TA – ω -transaminase

SUMÁRIO

1.0	Introdução	17
1.1	Biocatálise	17
1.2	Enzimas: propriedades e aplicações na biocatálise	19
1.3	β - aminoácidos: Função e síntese	21
1.4	ω -Transaminases	24
2.0	Objetivos	37
2.1	Objetivos gerais	37
2.2	Objetivos específicos	37
3.0	Parte Experimental	38
3.1	Reagentes e Solventes	38
3.2	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de ^1H e ^{13}C)	38
3.3	Cromatografia Gasosa Acoplada a um Detector de Ionização em Chamas (GC-FID)	38
3.4	Cromatografia Gasosa com Fase Estacionária Quiral	39
3.5	Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-MS)	40
3.6	Micro-organismos e enzimas	40
3.7	Plasmídeos e linhagem de <i>E. coli</i>	41
3.8	Meios de cultura, preparo e condições de crescimento	42
3.9	Preparo de Tampões, géis e soluções	43
3.10	Preparo de <i>E. coli</i> quimicamente competente	46
3.11	Transformação utilizando <i>E. coli</i> quimicamente competente	46
3.12	Expressão das ω -transaminases	47
3.13	Lise celular	48
3.14	Pré-purificação dos extratos enzimáticos	48
3.15	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	49

3.16 <i>Western Blot</i>	49
3.17 Triagem de micro-organismos	50
3.18 Reações com ω -transaminase comercial e extratos enzimáticos	51
3.18.1 Atividade enzimática da ω -transaminase comercial e controle de substratos.....	51
3.18.2 Síntese assimétrica com ω -transaminase comercial	52
3.18.3 Resolução cinética com ω -transaminase comercial.....	52
3.18.4 Reações controle com extratos enzimáticos	53
3.18.5 Síntese assimétrica com extratos enzimáticos	54
3.18.6 Resolução cinética com extratos enzimáticos	55
3.19 Procedimento experimental e dados espectroscópicos dos compostos sintetizados.....	55
3.19.1 Síntese e purificação do composto 3-amino-3-fenilacrilato de etila	55
3.19.2 Síntese e purificação do composto 3-amino-3-fenilpropanoato de etila	56
3.20 Procedimento geral para determinação dos excessos enantioméricos (ee) ..	57
4.0 Resultados e Discussão	59
4.1 Triagem enzimática de micro-organismos para ω -transaminase	59
4.2 Análise da expressão de ω -transaminases (<i>R</i>) e (<i>S</i>)-seletivas	69
4.3 Síntese e purificação do padrão 3-amino-3-fenilpropanoato de etila.....	72
4.4 Perfil das reações com ω -transaminase comercial	74
4.5 Perfil das reações empregando extratos enzimáticos	78
5.0 Conclusões	87
Referências	89

1.0 Introdução

1.1 Biocatálise

A química verde ou química sustentável é definida como “a criação, o desenvolvimento e a aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias tóxicas” (ANASTAS; EGHBALI, 2010). É um campo emergente que nas últimas décadas tem influenciado indústrias químicas e farmacêuticas devido à sua capacidade de associar a inovação química aos objetivos ambientais e econômicos promovendo o desenvolvimento sustentável. A necessidade global por tecnologias de manufatura ambientalmente compatíveis, matérias-primas renováveis, solventes mais seguros e catalisadores mais “verdes” que sejam ao mesmo tempo eficientes, seletivos e não poluentes, inserem a biocatálise no contexto da química verde (WOHLGEMUTH, 2010).

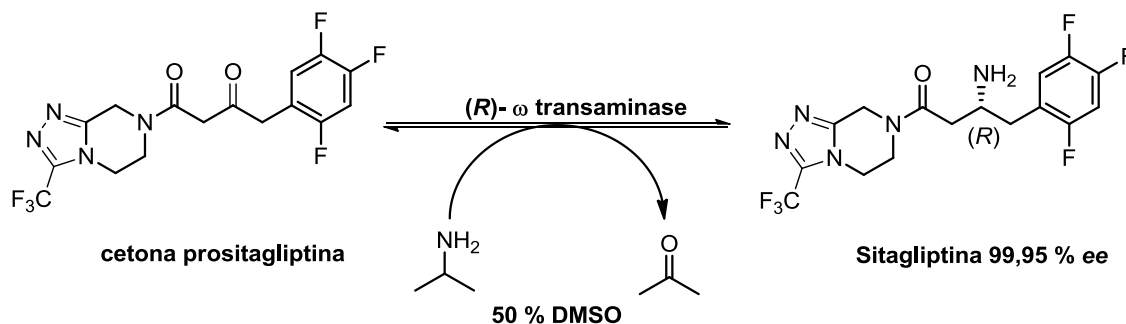
A biocatálise é um campo que envolve ciências como a biologia, a química, a enzimologia e a biotecnologia com o intuito de promover o melhoramento e a utilização de catalizadores biológicos em síntese química. Os termos biocatálise e/ou biotransformação estão relacionados aos processos envolvendo catalisadores biológicos na conversão de um substrato (em geral compostos orgânicos) em um número limitado de etapas enzimáticas. Diferente da biotransformação que demanda uma série de reações, a biocatálise envolve transformações em uma única etapa utilizando enzimas isoladas ou imobilizadas, células íntegras ou extratos enzimáticos (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009; FERNANDES; AIRES-BARROS; CABRAL, 2003).

As vantagens da biocatálise em relação à catálise química estão relacionadas à estereo, regio e quimiosseletividade apresentada por alguns biocatalisadores, que proporcionam uma estratégia sintética efetiva para a obtenção de moléculas opticamente puras, bem como à grande versatilidade de reações que podem ser catalisadas em condições brandas de temperatura, pH e pressão, minimizando a geração de resíduos e o consumo de energia (CARVALHO et al, 2005; ZHENG; XU, 2011; GONÇALVES; MARSAIOLI, 2013).

No contexto atual, a biocatálise é um dos processos mais promissores na produção de compostos nobres e de alto valor agregado, sendo crescente a utilização dessa tecnologia na indústria farmacêutica e de química fina para a obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas

ativas com elevada pureza ótica (CARVALHO et al, 2005). Entre os exemplos que podem ser citados podemos incluir a síntese dos fármacos boceprevir, sitagliptina (Esquema 1), e atorvastatina que empregam a biocatálise em pelo menos uma etapa de síntese (CHOI; HAN; KIM, 2015).

Esquema 1 - Etapa biocatalítica na síntese da sitagliptina.



Fonte: CHOI; HAN; KIM, 2015

Embora seja crescente a demanda por novos processos biocatalíticos em áreas como química fina e farmacêutica, o emprego da biocatálise como alternativa à síntese clássica é ainda restrito. Estima-se que em 2008, cerca de 150 processos eram aplicados na indústria (mais de 2/3 envolvendo moléculas quirais), estando a grande maioria concentrada no setor farmacêutico (WOODLEY; 2008; ABARZÚA; ANDRADE; VILLELA FILHO, 2008). As versões biocatalíticas de reações que são pouco prováveis via síntese clássica em função de átomos ou posições desativadas, são de grande interesse e estimulam trabalhos de pesquisa e desenvolvimento no âmbito industrial (WOHLGEMUTH, 2010).

Os avanços científicos e tecnológicos têm estabelecido a biocatálise como uma alternativa prática e ecológica à tradicional metalocatálise e organocatálise em síntese química. A biotecnologia e o advento da engenharia molecular são ferramentas cruciais para o desenvolvimento de biocatalisadores mais eficientes e robustos através da manipulação de sistemas enzimáticos *in vivo*, ou *in vitro*, garantindo níveis de atividade e estabilidade adequados para aplicação em escala industrial (MOORE; BORNSCHEUER, 2014; FERNANDES; AIRES-BARROS; CABRAL, 2003).

1.2 Enzimas: propriedades e aplicações na biocatálise

As enzimas são catalisadores biológicos que têm sido utilizadas pelo homem há vários séculos. São de natureza principalmente proteica e participam de várias reações bioquímicas, catalisando a conversão de um conjunto de substratos em produtos específicos, tendo como papel fundamental o controle metabólico (REETZ, 2013; COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2009).

A utilização de enzimas como catalisadores em síntese orgânica ganhou importância a partir da segunda metade do século XX, quando as técnicas de isolamento e purificação enzimáticas foram otimizadas (REETZ, 2013). Em 1980 e 1990, enzimas microbianas substituíram muitas daquelas provenientes de plantas e animais, recebendo diversas aplicações em áreas da indústria como alimentícia, de detergente, têxtil, couro, papel entre outras (ILLANES et al, 2012). O maior número de processos que utilizam esses biocatalisadores está concentrado na área de síntese de fármacos, aditivos e peptídeos miméticos (ABARZÚA; ANDRADE; VILLELA FILHO; 2008).

Centenas de enzimas são utilizadas industrialmente, sendo que quase metade delas são provenientes de fungos, aproximadamente 1/3 de bactérias e o restante é de origem animal (8%) e vegetal (4%) (ILLANES et al, 2012). Enzimas provenientes de micro-organismos apresentam vantagens como a grande variedade de atividades catalíticas, a facilidade de purificação quando são extracelulares e a independência da sazonalidade (ABARZÚA; ANDRADE; VILLELA FILHO; 2008).

O mercado mundial de enzimas industriais representa cerca de 60% do mercado de enzimas. Em 1998 esse mercado movimentou cerca de 1,6 bilhões de dólares atingindo a marca de 5,1 bilhões de dólares em 2009 (ILLANES et al, 2012). Uma série de fatores contribui para essa crescente aceitação dos biocatalisadores em síntese orgânica, tanto na pesquisa quanto na produção industrial. Reações específicas que podem ser substituídas pela biocatálise têm sido exploradas na síntese de fármacos, incluindo a síntese de amins quirais, hidroxilação estereo e régio- específica de moléculas complexas e outras reações redox (CHOI; HAN; KIM, 2015).

As enzimas apresentam características notáveis em relação aos catalisadores químicos devido à sua quimio, régio e estereosseletividade que conduzem à formação de produtos enantiomericamente puros e em conformidade com as

normas reguladoras para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e para fins agrícolas (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2009). Por essa razão, dentre as diversas aplicações dos biocatalisadores, sua utilização na síntese de blocos construtores quirais, visando à produção de substâncias bioativas, desperta muito interesse (ABARZÚA; ANDRADE; VILLELA FILHO; 2008). Diante desse fato, a pesquisa de novas enzimas e o melhoramento do desempenho de catálise de enzimas já conhecidas se faz necessário.

Apesar das vantagens existentes na utilização de enzimas em síntese orgânica, existem ainda algumas limitações associadas particularmente à sua estabilidade operacional, essencial para uso por longos períodos, à sua difícil recuperação e reutilização e em muitos casos à pouca solubilidade dos analitos em meio aquoso (LIMA; ANGNES, 1999). Além disso, muitas enzimas são cataliticamente promíscuas uma vez que são capazes de catalisar uma série de reações e transformar diversos substratos em adição àqueles para os quais são fisiologicamente especializadas (ILLANES et al, 2012).

Embora a utilização de enzimas em síntese orgânica apresente algumas restrições, diversas estratégias complementares estão sendo desenvolvidas com o objetivo de descobrir novos biocatalisadores e melhorar o desempenho daqueles já existentes. A triagem de micro-organismos é uma ferramenta simples e de frequente utilização na busca por novos biocatalizadores com propriedades desejáveis. Atualmente, a triagem de alta eficiência (*high-throughput-screening*) aliada à análise metagenômica de micro-organismos não cultiváveis é utilizada para garantir o máximo de vantagens que a diversidade microbológica possa proporcionar, bem como produzir novas enzimas com excelentes propriedades (ILLANES et al, 2012).

Os avanços da biologia molecular e engenharia genética têm possibilitado também a clonagem e expressão de genes de interesse em um hospedeiro apropriado permitindo o acesso em maiores quantidades de enzimas produzidas normalmente em baixas concentrações nos micro-organismos. Aliada a todas essas metodologias, desde meados de 1990, técnicas de Evolução Dirigida têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de enzimas com grande potencial biotecnológico (CHOI; HAN; KIM, 2015).

A Evolução Dirigida mimetiza *in vitro* o processo da evolução Darwiniana, no qual uma classe de determinadas biomoléculas é originada, produzindo uma biblioteca de cópias parcialmente semelhantes denominada de diversidade gênica.

Ciclos interativos de mutagênese randômica, seguidos pela triagem da biblioteca genômica possibilita uma rápida e extensiva melhoria de várias propriedades enzimáticas tais como a estabilidade, especificidade por um determinado substrato e enantiosseletividade. Dessa maneira, a evolução dirigida se apresenta como um progresso notável no que tange a aplicação industrial da biocatálise (CHOI; HAN; KIM, 2015).

1.3 β - aminoácidos: Função e síntese

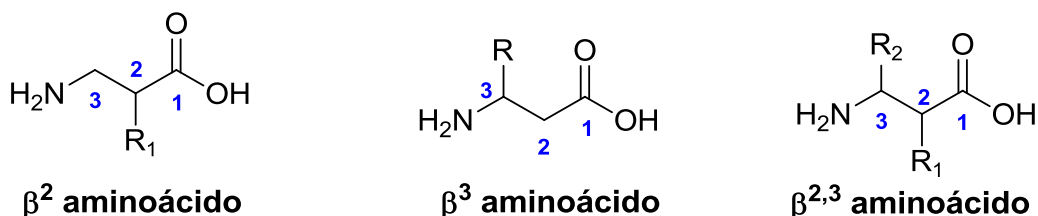
Com exceção da β -alanina e do ácido β -aminoisobutírico que constituem intermediários chave em diversas vias metabólicas, os β -aminoácidos (Figura 1) são menos abundantes na natureza que seus análogos α . No entanto, estão presentes em peptídeos e outros produtos naturais, e na forma livre apresentam propriedades biológicas e farmacológicas importantes, sendo crescente o interesse por essa classe de compostos nas últimas décadas (JUARISTI; SOLOSHONOK, 2005).

Figura 1 - Estrutura geral de um α e um β -aminoácido.



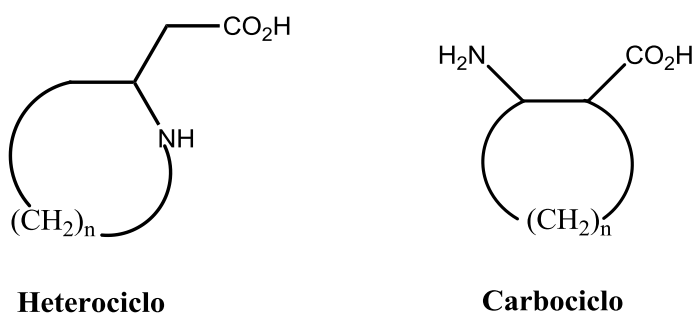
Dependendo da posição ocupada pela cadeia lateral no núcleo do ácido 3-aminopropiônico, os β -aminoácidos podem ser subdivididos em β^2 -, β^3 - e $\beta^{2,3}$ aminoácidos (Figura 2). Estes termos foram introduzidos por Seebach e colaboradores (1997) com o intuito de distinguir isômeros de posição em β -aminoácidos.

Figura 2 - Isômeros de posição em β -aminoácidos.



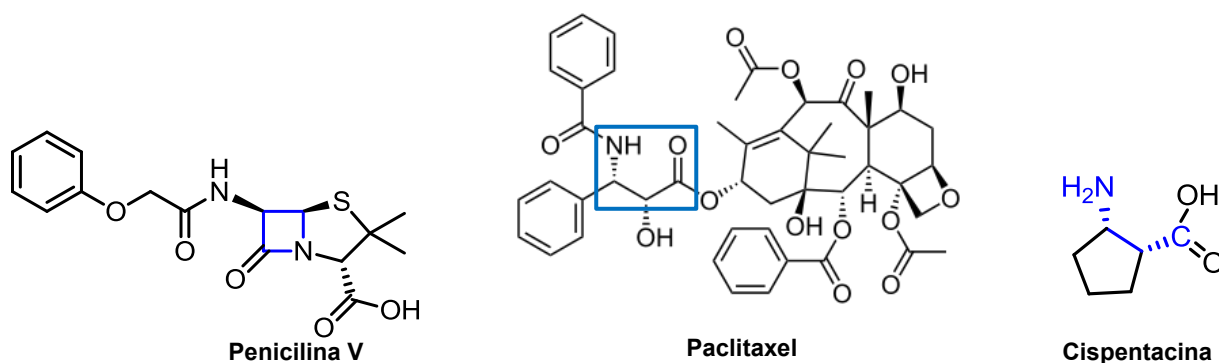
Além disso, β -aminoácidos cíclicos podem apresentar os grupos amino e carboxílico como substituintes de um anel carbocíclico, ou ainda fazendo parte de um anel resultando em um heterocíclico (Figura 3) (JUARISTI; SOLOSHONOK, 2005).

Figura 3 - β -aminoácidos cíclicos.



Entre a família de β -aminoácidos, as isoserinas (α -hidroxi- β -aminoácidos) são provavelmente os membros mais importantes dessa classe de compostos, uma vez que muitas delas atuam como potentes inibidores de enzimas, podendo também funcionar como blocos de construção de moléculas importantes do ponto de vista biológico e medicinal, tais como o paclitaxel. Além do paclitaxel, β -aminoácidos enantiopuros podem ser utilizados como precursores na síntese de fármacos como a cispentacina, antibióticos β -lactâmicos, entre outros (Figura 4) (MATHEW et al, 2015; OJIMA; LIN; WANG, 1999).

Figura 4 - Fármacos contendo β -aminoácidos em sua estrutura.



A síntese de peptídeos bioativos usando padrões de sequência contendo β -aminoácidos tem se mostrado uma estratégia promissora na obtenção de análogos peptídicos exibindo propriedades de grande interesse na química medicinal. O grande avanço no estudo dessa classe de compostos se explica uma vez que essas substâncias mimetizam os α -peptídeos sob determinados aspectos como, por exemplo, estrutura tridimensional, ao passo que conferem propriedades únicas tais como maior estabilidade frente a proteases. A maioria das proteases presentes no corpo não atua sobre ligações β -peptídicas, levando à maior estabilidade desses compostos *in vivo*. Além disso, tem sido observado que a substituição de apenas alguns α -aminoácidos em um peptídeo pelo correspondente β -aminoácido diminui consideravelmente a susceptibilidade proteolítica dessas moléculas sem que haja perda da atividade biológica (GRYGORENKO 2015; RUDAT; BRUCHER; SYLDATK, 2012).

Diversas abordagens são descritas para a obtenção de β -aminoácidos racêmicos e enantiopuros. Tradicionalmente, β -aminoácidos são sintetizados utilizando catalizadores metálicos por meio de diferentes metodologias tais como hidrogenação assimétrica catalítica, adição de Michael a ligações duplas, e reações de Mannich. Além desses métodos, outras estratégias podem ser empregadas na preparação de β -aminoácidos, dentre as quais podemos citar a hidrólise de β -amino nitrilas, homologação de α -aminoácidos, oxidação de amino álcoois e abertura de anéis β -lactâmicos (MATHEW et al, 2015; LILJEBLAD; KANERVA, 2006).

Apesar da vasta quantidade de metodologias sintéticas aplicáveis à síntese de β -aminoácidos, estas rotas catalíticas muitas vezes requerem materiais tóxicos ou explosivos, condições de processamento complexas, e quantidades elevadas de catalisadores, que não são consideradas ambientalmente compatíveis (MATHEW et al, 2015).

As principais rotas quimioenzimáticas para a obtenção de β -aminoácidos enantiopuros são baseadas na resolução cinética de β -aminoácidos racêmicos utilizando enzimas hidrolíticas, no entanto, essa estratégia é limitada a um rendimento máximo de 50% (RUDAT; BRUCHER; SYLDATK, 2012).

Apesar da diversidade de rotas químicas e enzimáticas que podem ser aplicadas à síntese de β -aminoácidos, ainda não foi estabelecida uma rota padrão-ouro para a obtenção desses compostos enantiomericamente puros. Logo, a síntese

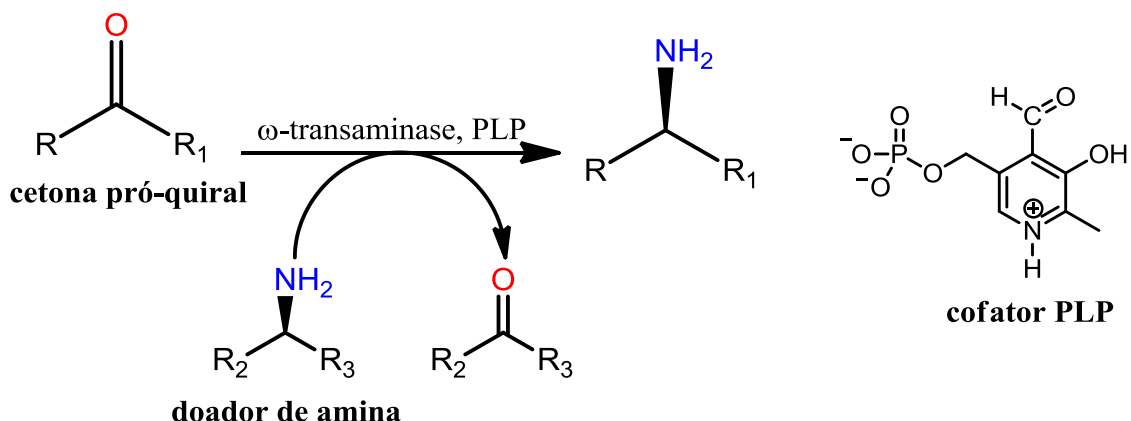
assimétrica dessa classe de substâncias tornou-se alvo de intensa pesquisa na atualidade (RUDAT; BRUCHER; SYLDATK, 2012).

1.4 ω -Transaminases

Aminas quirais são moléculas funcionalizadas com alto valor agregado possuindo uma vasta gama de aplicações que inclui (i) intermediários para a síntese de ingredientes ativos de compostos farmacêuticos e agroquímicos, (ii) agentes de resolução quiral para a separação de enantiômeros através da formação de sais diastereoisoméricos, (iii) ligantes em catalisadores organometálicos ou metálicos usados em sínteses assimétricas (TURNER; TRUPPO, 2010).

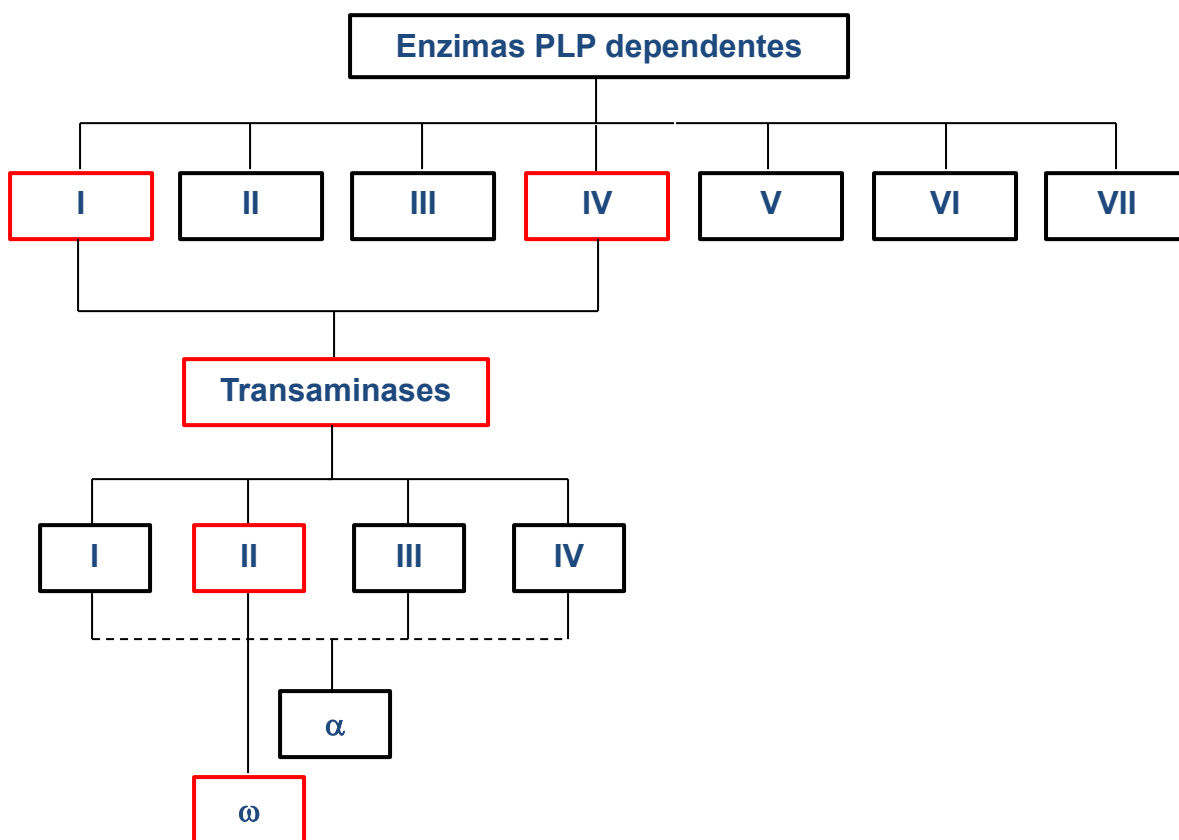
Uma vez que a atividade dessas moléculas está diretamente relacionada a uma configuração absoluta específica, metodologias eficientes de síntese assimétrica são requeridas, em particular, aquelas ambientalmente compatíveis (REIS et al, 2013). Em função dessas exigências, é crescente o interesse pelas reações de transaminação biocatalíticas devido à possibilidade de se obter produtos com elevados níveis de enantiosseletividade em condições brandas de reação. Dentro deste contexto, as ω -transaminases se apresentam como catalisadores promissores atraindo atenção considerável devido ao seu grande potencial de produção de aminas quirais com alta estereosseletividade (MALIK; PARK, 2012).

Desde a descoberta da reação de transaminação em sistemas biológicos, a importância das transaminases no metabolismo de aminoácidos tem sido objeto de intensas pesquisas, sendo que nos últimos 15 anos é crescente o interesse por essa classe de enzimas (RUDAT; BRUCHER; SYLDATK, 2012). As ω -Transaminases são enzimas pertencentes à classe das transferases recebendo a denominação EC 2.6.1.X de acordo com a classificação definida pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB). Essas enzimas são dependentes do cofator piridoxal-5-fosfato (PLP) sendo até o momento, as únicas enzimas capazes de catalisar a transferência reversível de um grupo amino de um doador amino para a carbonila de um aceptor amino (Esquema 2).

Esquema 2 - Aminoação assimétrica de cetonas empregando ω -transaminases.

Fonte: KROUTIL, 2013.

As enzimas PLP dependentes são divididas em 7 classes de acordo com as similaridades em sua estrutura tridimensional. Dentre essas 7 classes, as transaminases aparecem somente nas classes I e IV. As transaminases por sua vez, se subdividem em 4 subclasses baseadas no alinhamento múltiplo de sequências de 51 transaminases. As enzimas pertencentes aos subgrupos I, III e IV transferem grupos amino ligados exclusivamente a um carbono α , e são portanto denominadas α -transaminases. Por outro lado, as transaminases alocadas no grupo II são capazes de realizar a transferência de um grupo amino ligado a um carbono distal recebendo assim a denominação ω -transaminase (Esquema 3) (RUDAT; BRUCHER; SYLDATK, 2012; MALIK; PARK; SHIN, J.-S, 2012). A letra grega “ ω ” não é relevante no que diz respeito à posição ocupada pelo grupo amino no átomo de carbono ligado ao grupo carboxila, mas apenas representativa de todas as posições que não sejam “ α ”. Assim sendo, a nomenclatura “ ω -transaminase” é um nome trivial designando todas as transaminases pertencentes à subclasse II (MALIK; PARK; SHIN, J.-S, 2012).

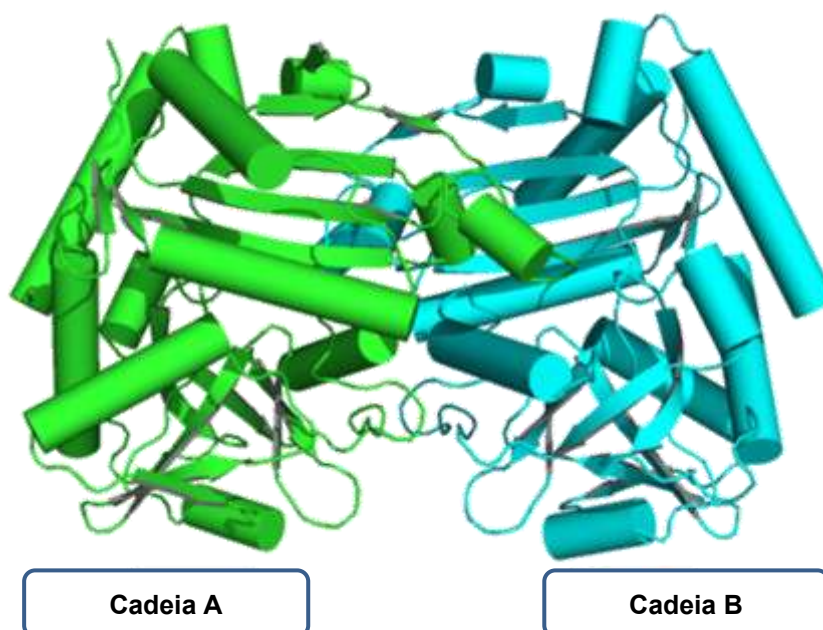
Esquema 3 - Classificação das ω -transaminases.

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

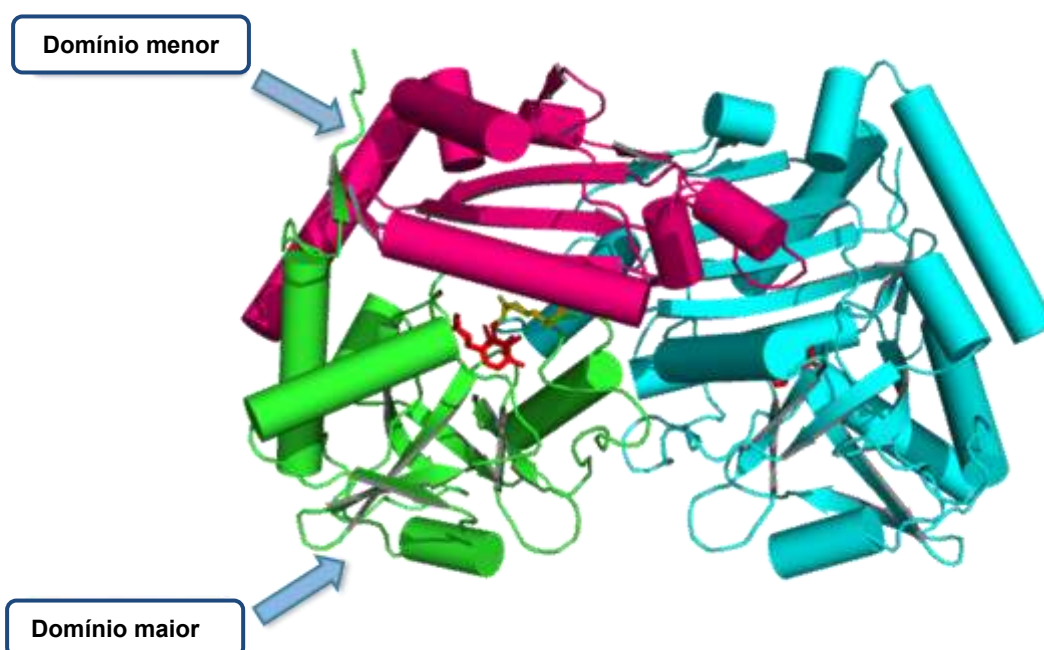
As ω -transaminases podem apresentar diferentes enantiopreferências, podendo ser (*R*) ou (*S*)-seletivas. As (*S*)-seletivas pertencem à classe I das enzimas PLP dependentes enquanto as (*R*)-seletivas pertencem à classe IV (THOMSEN et al, 2014). A maioria das ω -transaminases encontradas na natureza são (*S*)-seletivas, no entanto, graças aos métodos computacionais aliados aos processos de mutagênese, ambas as transaminases (*R*) e (*S*)-seletivas encontram-se comercialmente disponíveis (PÄIVIÖ; KÄNERVA, 2013).

Todas as transaminases conhecidas são ativas como dímeros constituídos por duas subunidades idênticas. Cada subunidade é dividida em dois domínios, um grande e um pequeno. Os resíduos de aminoácidos de ambas as subunidades contribuem para a formação do sítio catalítico da enzima que se localiza na interface das duas subunidades (Figura 5) (ŁYSKOWSKI et al, 2014).

Figura 5 - Estrutura tridimensional de uma ω -transaminase de *Aspergillus fumigatus*. **A:** Visão geral do dímero (subunidade A em verde e subunidade B em azul), **B:** Domínios de cada subunidade (domínio maior em rosa, domínio menor em verde).



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software Pymol, 2015.

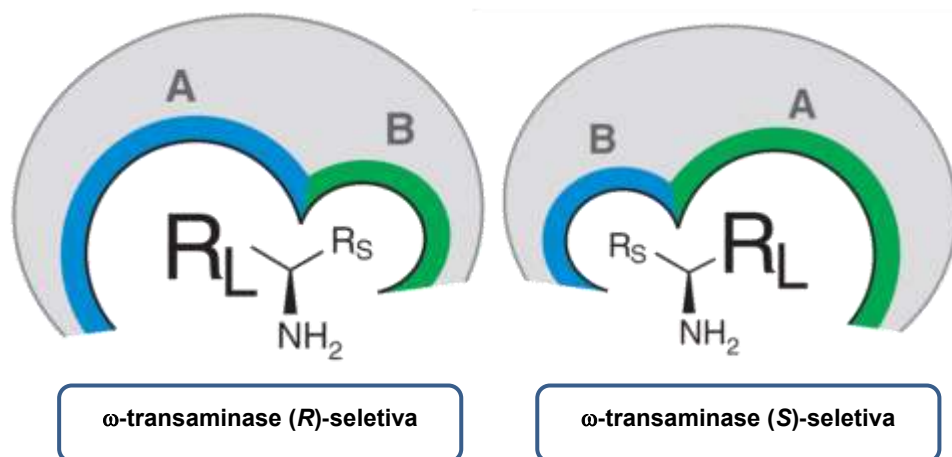


Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software Pymol, 2015.

O sítio catalítico das ω -transaminases é constituído por dois bolsões, um maior e outro menor (Figura 6), fato que explica tanto a especificidade quanto a estereosseletividade dessas enzimas. Os substratos são reconhecidos no sítio catalítico de forma que grupos hidrofóbicos e carboxilato se acomodam no bolsão

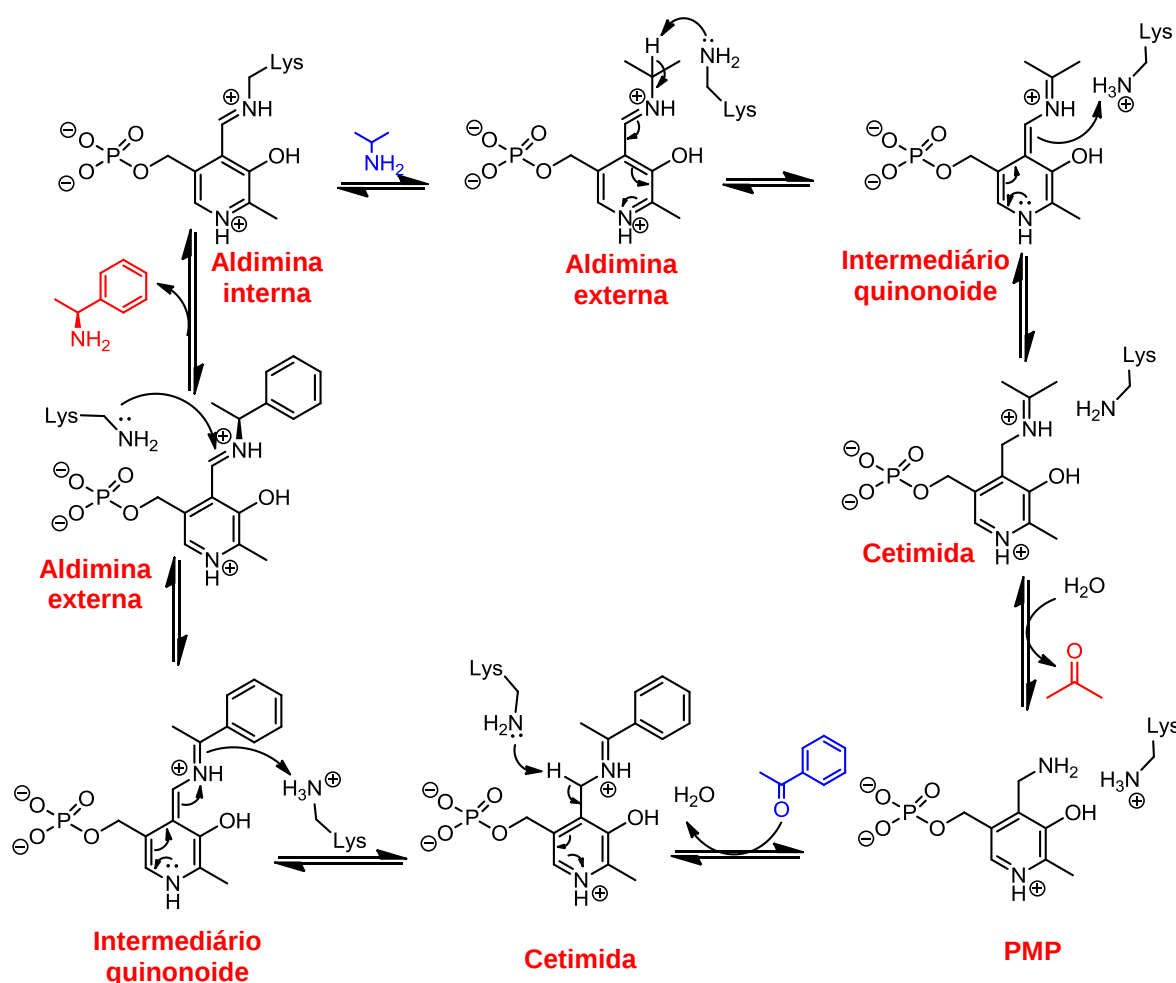
maior, enquanto no bolsão menor o grupo carboxilato sofre uma forte repulsão. O impedimento estérico que ocorre no bolsão menor é vital para o reconhecimento do substrato, impedindo a entrada de um substituinte maior do que um grupo etila (MALIK; PARK; SHIN, J.-S, 2012).

Figura 6 - Ilustração esquemática do sítio catalítico de uma ω -transaminase.



Fonte: HÖHNE et al, 2010.

A reação catalisada por ω -transaminases pode ser considerada uma reação redox dividida em duas meias reações: desaminação oxidativa do doador amino e a aminação redutiva do aceptor amino (Esquema 4). Na ausência do substrato, o cofator PLP encontra-se ligado covalentemente a um grupo ϵ -amino de lisina no sítio ativo da enzima formando uma aldimina interna. Quando em contato com o substrato, a ligação entre o cofator e a enzima é desfeita, e o PLP assume o lugar da lisina formando uma base de Schiff com o substrato (aldimina externa). O grupo ϵ -amino de lisina livre atua então como catalisador desprotonando a aldimina externa formando uma cetimina. Em seguida, a cetimina é hidrolisada, e a lisina livre, o produto ceto e piridoxamina-5'-fosfato (PMP) são formados. Na etapa subsequente, o PMP reage com o substrato aceptor de amino sofrendo aaminação redutiva levando à formação de uma amina, e à regeneração da aldimina interna (Enzima-PLP) para dar início a outro ciclo de reação (MALIK; PARK; SHIN, J.-S, 2012; RUDAT; BRUCHER; SYLDATK, 2012; BERGLUND; HUMBLE; BRANNEBY, 2012).

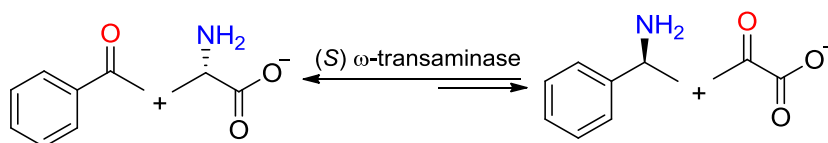
Esquema 4 - Mecanismo de reação catalisado por ω -transaminases.

Fonte: Adaptado de BERGLUND; HUMBLE; BRANNEY, 2012.

Para a obtenção de amins enantiopuras, as ω -transaminases podem atuar de três maneiras: catalisando a síntese assimétrica a partir de cetonas pró-quirais, via resolução cinética de amins racêmicas de baixo custo, ou pela desracemização de misturas racêmicas (MATHEW; YUN, 2012).

A princípio, ambos os enantiômeros de uma dada amina podem ser obtidos com apenas uma ω -transaminase enantiosseletiva. Por exemplo, uma ω -transaminase (*S*)-seletiva pode produzir o enantiômero (*R*) a partir da resolução cinética de uma mistura racêmica de amins, mas também é capaz de produzir o enantiômero (*S*) via síntese assimétrica a partir da cetona pró-quiral correspondente (SHIN, G.; MATHEW; YUN, 2015).

Dentre as reações passíveis de serem realizadas por transaminases, a síntese assimétrica (Esquema 5) se mostra uma das estratégias mais importantes.

Esquema 5 - Síntese assimétrica empregando ω -transaminases.

O processo consiste na conversão direta de uma cetona pró-quiral à sua amina correspondente. É uma técnica de grande interesse entre pesquisadores uma vez que, teoricamente, seria possível obter um rendimento duas vezes maior quando comparado àquele obtido via resolução cinética. Apesar dessa vantagem, nem sempre é possível alcançar o rendimento ideal de 100% em uma síntese assimétrica, em virtude de problemas de equilíbrio termodinâmico, e à inibição enzimática provocada pelos substratos e produtos (BERGLUND; HUMBLE; BRANNEYBY, 2012; MATHEW; YUN, 2012).

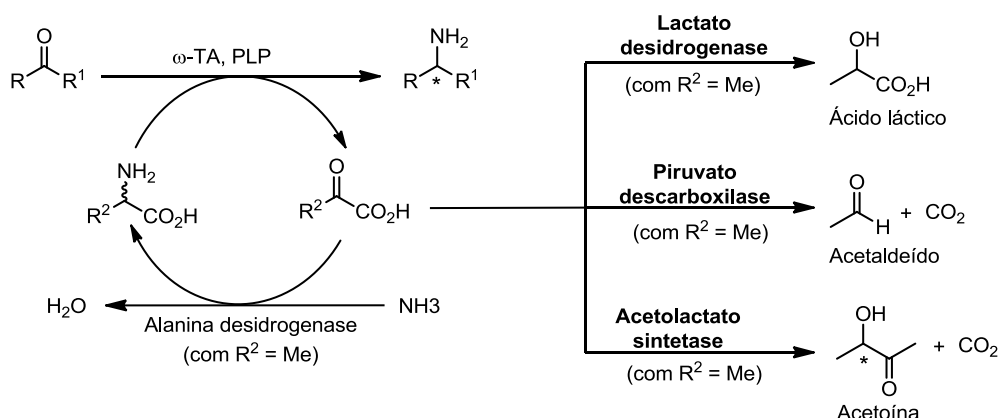
Nos últimos anos, muitos artigos têm sido publicados relatando a utilização de várias estratégias em síntese assimétrica a fim de promover o deslocamento do equilíbrio para a formação do produto, possibilitando assim, maiores rendimentos. Estudos recentes da reação de transaminação utilizando complexos PLP-Enzima e PMP-Enzima purificados de *V. fluvialis*, demonstraram que um par ideal de substratos é capaz de impedir a inibição provocada pelo produto. De acordo com os estudos, tanto o doador quanto o aceptor do grupo amino devem possuir maior reatividade frente à enzima quando comparados com seus produtos cetona e amina correspondentes, de modo a promover uma síntese assimétrica ideal (MATHEW; YUN, 2012).

De modo geral, a maneira mais fácil e comumente utilizada para deslocar o equilíbrio da reação a favor dos produtos é adicionando uma quantidade em excesso do doador amino. A maioria dos compostos doadores de amina são quirais, assim, somente um dos enantiômeros irá funcionar como doador amino, o que significa que ele precisa ser adicionado na sua forma enantiopura ou em uma concentração muito maior quando na forma de racemato. Esses fatores tornam a isopropilamina uma alternativa atrativa em reações de transaminação, uma vez que não é uma molécula quiral, é barata, e de fácil obtenção. Além disso, a acetona formada durante a reação é bastante volátil podendo ser removida do meio reacional com facilidade (MATHEW; YUN, 2012; BERGLUND; HUMBLE; BRANNEYBY, 2012).

Outra metodologia que tem sido adotada para melhorar a eficiência das

reações de síntese assimétrica é a utilização de sistemas enzimáticos acoplados. Essa estratégia consiste no acoplamento de uma reação de transaminação a uma segunda reação enzimática, onde o subproduto gerado na transaminação é consumido, deslocando o equilíbrio a favor da síntese da amina de interesse (SIMON et al, 2014). Entre os métodos mais comumente utilizados, a degradação do piruvato empregando a lactato desidrogenase, e a reciclagem do doador amino a partir de uma aminoácido desidrogenase são formas convenientes de gerar um equilíbrio favorável. Além dessas enzimas, a piruvato descarboxilase e a acetolactato sintase também podem ser empregadas a fim de degradar o piruvato (Esquema 6). A remoção do piruvato do meio reacional contempla o duplo propósito de levar a reação a se completar, e eliminar a inibição provocada por esse subproduto na transaminase (FESKO et al, 2013; TRUPPO et al, 2009).

Esquema 6 - Deslocamento do equilíbrio da reação catalisada por ω -TA via lactato desidrogenase, alanina desidrogenase, piruvato descarboxilase e acetolactato sintase.



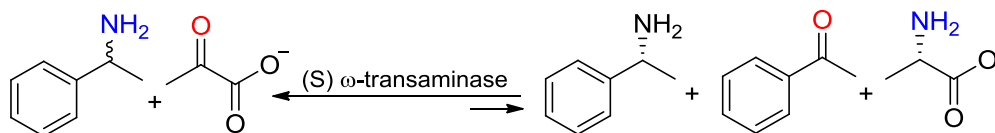
Fonte: Adaptado de SIMON et al., 2014.

Embora a utilização de sistemas enzimáticos acoplados se mostre uma alternativa a fim de promover uma síntese assimétrica com maiores rendimentos, sua principal desvantagem está no custo gerado durante o processo. Essas reações requerem a presença de cofatores caros como o NADH, e de etapas adicionais para regenerá-lo, como por exemplo, a adição de enzimas como a glicose desidrogenase. Essas etapas adicionais tornam o processo muito oneroso, o que não é desejável em se tratando de aplicações industriais (FESKO et al, 2013; SIMON et al, 2014).

Diferente da síntese assimétrica, na resolução cinética (Esquema 7) um enantiômero de interesse é enriquecido a partir de uma mistura racêmica de aminas

de acordo com a estereosseletividade da ω -transaminase empregada na reação, sendo que o rendimento máximo que pode ser obtido é de 50%.

Esquema 7 - Resolução cinética de aminas quirais empregando ω -transaminases.



Essa reação é muito útil nos casos em que o substrato ceto é difícil de sintetizar ou a mistura racêmica de aminas é barata ou de fácil obtenção (MALIK; PARK; SHIN, J.-S, 2012; BERGLUND; HUMBLE; BRANNEBY, 2012).

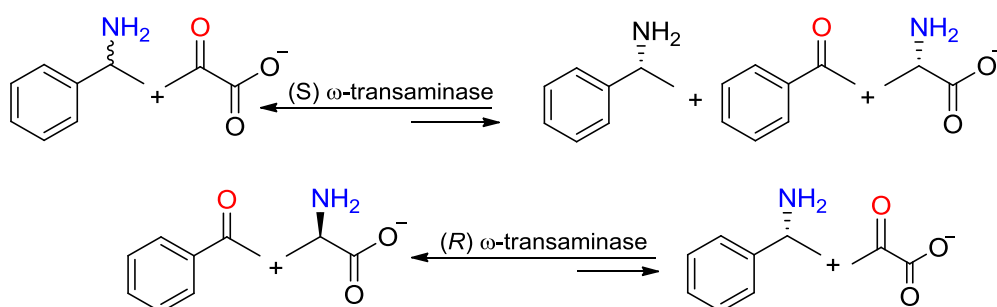
Em termos de equilíbrio termodinâmico, ao contrário do que ocorre na síntese assimétrica, em uma resolução cinética a formação dos produtos é favorecida. A maior taxa de reação comparada à síntese assimétrica torna a resolução cinética uma abordagem mais adequada em escala industrial. No entanto, a principal desvantagem dessa técnica reside na inibição provocada pelo produto da reação, o que a torna inviável em concentrações elevadas, configurando o principal obstáculo para o desenvolvimento bem sucedido do processo (MALIK; PARK; SHIN, J.-S, 2012; KOSZELEWSKI et al, 2010).

Uma série de metodologias voltadas à otimização da resolução cinética via ω -transaminases vêm sendo desenvolvidas. Uma vez que o principal gargalo dessas reações consiste na inibição provocada pelo produto ceto, a remoção desses compostos do meio reacional, e o desenvolvimento de variantes de transaminases tolerantes a concentrações elevadas desses subprodutos, são estratégias que já vêm sendo adotadas. A remoção do subproduto do meio reacional pode ser realizada pela aplicação de pressão reduzida quando o produto ceto formado é volátil, ou por extração utilizando sistemas reacionais bifásicos. A redução enzimática do subproduto ou a regeneração do doador amino também são estratégias úteis a fim de otimizar as reações de resolução cinética, no entanto, apresentam como limitação o custo adicional gerado uma vez que requerem a presença de enzimas e cofatores adicionais (BERGLUND; HUMBLE; BRANNEBY, 2012).

Além das reações de síntese assimétrica e resolução cinética, as ω -transaminases também podem ser empregadas na produção de aminas

enantiopuras via desracemização (Esquema 8). Essa reação é utilizada para converter um racemato em um único enantiômero com 100% de rendimento. Trata-se de uma técnica ainda pouco explorada, e vem sendo desenvolvida partir de diferentes abordagens como a resolução cinética dinâmica e reações *one pot* em duas etapas (MATHEW; YUN, 2012; SHIN, G. et al, 2013).

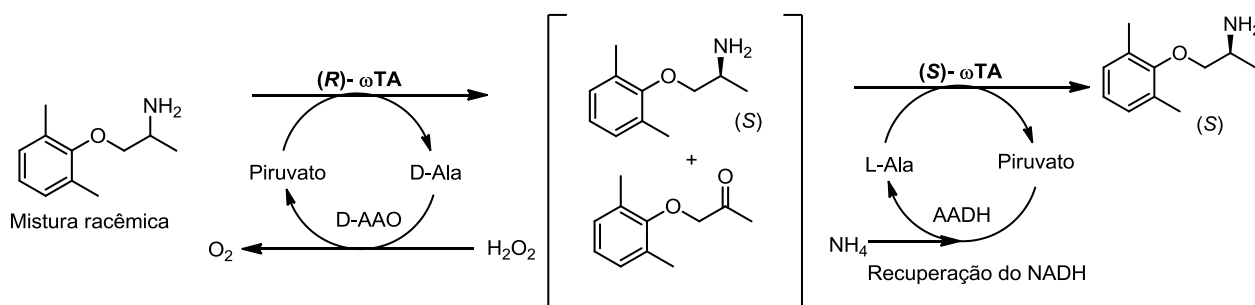
Esquema 8 - Desracemização empregando ω -transaminases.



A desracemização envolvendo ω -transaminases foi primeiramente desenvolvida por Kroutil e colaboradores para a produção de aminas enantiomericamente enriquecidas a partir da 4-fenilpirrolidin-2-ona, aplicando-se resolução cinética dinâmica. Uma ω -transaminase de *Vibrio fluvialis* e outras 3 enzimas obtidas comercialmente foram testadas na reação, e L- ou D- alanina foram utilizadas como doador amino (MATHEW; YUN, 2012).

Dominik Koszelewski e colaboradores (2009) desenvolveram um protocolo de desracemização baseado no processo de reação *one pot* em duas etapas utilizando ω -transaminases para a síntese de ambos os enantiômeros da mexiletina, um antiarrítmico bloqueador de canais de sódio. Na primeira etapa de reação, uma ω -transaminase é responsável pela resolução cinética do racemato, e em seguida, uma aminação estereosseletiva é efetuada empregando-se uma ω -transaminase com enantioseletividade oposta à da primeira etapa (Esquema 9) (KOSZELEWSKI et al, 2009).

Esquema 9 - Desracemização da *rac*-Mexiletina via síntese *one-pot* em duas etapas empregando ω -transaminase.



Fonte: KOSZELEWSKI et al., 2009.

Um dos problemas apresentados por essa metodologia é a necessidade de inativação da ω -transaminase utilizada na resolução cinética, antes de dar início à síntese assimétrica. A fim de otimizar o processo, ω -transaminases imobilizadas têm sido empregadas na primeira etapa de reação, podendo ser facilmente removidas por filtração ou centrifugação logo após o término da resolução cinética (SHIN, G. et al, 2013).

A imobilização enzimática é uma ferramenta que tem sido bastante explorada em reações envolvendo ω -transaminases, uma vez que essa técnica permite a reutilização dos biocatalisadores muitas vezes por longos períodos, bem como maior facilidade nas etapas de purificação. Recentemente, em trabalho publicado por Andrade e colaboradores (2014), uma ω -transaminase (R) -seletiva imobilizada foi empregada na síntese de aminas quirais em sistema de fluxo contínuo utilizando solventes orgânicos. Essa abordagem possibilitou a produção em fluxo de aminas quirais a partir de substratos não naturais com excelentes enantiosseletividades e em um curto período de tempo (entre 30 e 60 minutos).

A habilidade de uma ω -transaminase produzir compostos enantiomericamente puros depende principalmente de sua atividade e enantiosseletividade com relação ao substrato de interesse. Assim, a triagem apropriada de enzimas é de suma importância para a produção eficiente de aminas enantiopuras. As triagens de ω -transaminase podem ser classificadas em métodos de triagem clássica e triagem computacional. O método clássico utiliza a triagem de micro-organismos para a identificação de novas ω -TA, enquanto a abordagem computacional se baseia em análises de banco de dados biológicos utilizando algoritmos (MATHEW; YUN, 2012).

Atualmente, extensivas pesquisas na busca por novas ω -transaminases estão

sendo realizadas através da triagem de micro-organismos, todavia, a quantidade de enzimas aplicáveis com uma sequência genética conhecida ainda é pequena. Alguns exemplos são ω -transaminases provenientes de *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium*, *Alcaligenes denitrificans* Y2k-2, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter mutants* e *Vibrio fluvialis*, sendo estas últimas, as mais amplamente utilizadas no momento (CLAY et al, 2010).

É sabido que a eficiência de uma reação enzimática é dependente da disponibilidade de uma enzima que reúna características como elevada atividade, boa termoestabilidade, seletividade adequada para o substrato de interesse e alta enantiosseletividade. Todavia, a maioria das ω -transaminases identificadas até o momento nem sempre apresentam bons rendimentos para uma gama de substratos em função de sua baixa reatividade e enantiosseletividade, o que por vezes limita sua utilização em escala industrial (MATHEW; YUN, 2012).

A engenharia enzimática é uma importante ferramenta que tem sido aplicada na melhoria das características de ω -transaminases por meio de mutações em genes que codificam enzimas selvagens. As duas principais técnicas utilizadas na produção dessas enzimas são a mutagênese randômica e a mutagênese sítio-específica. Essas enzimas engenheiradas tornam-se candidatas ideais para aplicações industriais uma vez que apresentam não somente melhorias quanto à sua atividade enzimática como também melhor estabilidade e enantiosseletividade (MATHEW; YUN, 2012).

Recentemente, a companhia Codexis fazendo uso da engenharia de proteínas desenvolveu uma variante de ω -transaminase para ser empregada na produção industrial da sitagliptina (Esquema 1, p. 17), um fármaco utilizado no tratamento do diabetes tipo 2. O trabalho implicou em processos de remodelagem dos bolsões enzimáticos de uma ω -transaminase (*R*)-seletiva de *Arthrobacter sp.* explorando a combinação de técnicas como modelagem *in silico*, mutagênese sítio-dirigida e evolução dirigida. Ao final de 27 mutações, foi criada uma variante de transaminase capaz de converter a cetona prositagliptina em (*R*)-sitagliptina utilizando isopropilamina como doador amino sob altas concentrações de solvente (MALIK; PARK; SHIN, J.-S, 2012; BERGLUND; HUMBLE; BRANNEBY, 2012).

O crescente interesse e avanço em pesquisas envolvendo ω -transaminases demonstra a importância dessa classe de enzimas na produção de aminas

enantiomericamente puras. A era pós genômica abriu novos caminhos para a produção de enzimas com melhores propriedades, permitindo alcançar maiores rendimentos e consequentemente possibilitando seu uso em escala industrial. Os desafios ainda existentes quanto à utilização dessas enzimas têm sido pouco a pouco suplantados, e já não configuram obstáculo para seu uso como ferramenta de síntese (MATHEW; YUN, 2012; BERGLUND; HUMBLE; BRANNEYBY, 2012).

2.0 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Realizar a triagem de micro-organismos para identificar a presença de enzimas da classe das ω -transaminases, e estudar a reação de transferência de grupos amino para β -cetoésteres pró-quirais arílicos e alquílicos empregando enzimas com diferentes enantiosseletividades produzidas em laboratório, e enzimas comerciais.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a triagem de atividade enzimática para ω -transaminase em uma biblioteca de 80 micro-organismos;
- Expressar ω -transaminases (*R*) e (*S*)-seletivas a partir de plasmídeos contendo genes de linhagens selvagens dessas enzimas;
- Avaliar a reatividade das enzimas produzidas em laboratório e enzimas comerciais, frente aos substratos benzoilacetato de etila e acetoacetato de etila em reações de síntese assimétrica e resolução cinética;
- Otimizar as condições das reações supracitadas visando à melhoria dos rendimentos e excessos enantioméricos.

3.0 Parte Experimental

3.1 Reagentes e Solventes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich® sendo eles: acetofenona; (*rac*), (*R*) e (*S*)-feniletilamina (FEA); piruvato de sódio; piridoxal-5-fosfato (PLP); isopropilamina; acetoacetato de etila; benzoilacetato de etila; ampicilina e canamicina.

O acetato de etila, solvente utilizado na extração e preparo de amostras para análises por GC-FID foi adquirido da marca Panreac, grau HPLC.

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

O β -enaminoéster (**2**) (Esquema 10, p. 53) teve sua estrutura molecular determinada por meio das análises dos espectros de RMN Mono dimensionais de ^1H e ^{13}C . Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker – Fourier 300 ($B_0 = 7,05\text{ T}$) operando a 300,19 MHz para os núcleos de ^1H e 75,48 MHz para os núcleos de ^{13}C . Os deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio e carbono foram registrados em ppm utilizando como referência externa CDCl_3 ($\delta = 7,27$).

As constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz) e os sinais foram caracterizados como: multiplete (m), quarteto (q), simpleto (s), simpleto largo (sl) e tripleto (t).

3.3 Cromatografia Gasosa Acoplada a um Detector de Ionização em Chamas (GC-FID)

As análises por GC-FID foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo Shimadzu GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i e acoplado a um detector de ionização em chamas. Utilizou-se coluna capilar de sílica fundida Restek Rtx®-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano). O cromatógrafo operou a um fluxo constante de gás H_2 de 1,22 mL min^{-1} , temperatura do injetor igual a 260 °C, temperatura do detector igual a

300 °C. As programações do forno utilizadas são apresentadas abaixo.

Tabela 1 - Programação do método 1 - GC-FID.

Taxa de Aquecimento	Temperatura	Tempo de espera
-	40 °C	1 min
10 °C / min	80 °C	1 min
1 °C / min	85 °C	1 min
70 °C / min	280 °C	5 min

Fonte: Elaborado pela autora, 2015. ¹

Tabela 2 - Programação do Método 2 - GC-FID.

Taxa de Aquecimento	Temperatura	Tempo de espera
-	80 °C	3 min
30 °C / min	280 °C	5 min

Tabela 3 - Programação do método 3 - GC-FID.

Taxa de Aquecimento	Temperatura	Tempo de espera
-	40 °C	1 min
15 °C / min	80 °C	1 min
1 °C / min	85 °C	1 min
95 °C / min	280 °C	4 min

O volume de injeção das amostras foi de 1 µL na concentração de 0,5 – 1 mg mL⁻¹ no modo *splitless*.

3.4 Cromatografia Gasosa com Fase Estacionária Quiral

As análises por GC-FID com fase estacionária quiral foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo Shimadzu GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i e acoplado a um detector de ionização em chamas. Utilizou-se coluna de fase estacionária quiral Hydrodex[®] β-3P (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Macherey-Nagel). O cromatógrafo operou a um fluxo constante de gás H₂ de 1,22 mL min⁻¹, temperatura do injetor igual a 200 °C, temperatura do detector igual a 250 °C. A programação utilizada é apresentada na tabela 4.

¹ Todas as tabelas apresentadas foram elaboradas pela autora.

Tabela 4 - Método utilizado para determinação dos ee por GC-FID.

Taxa de Aquecimento	Temperatura	Tempo de espera
-	100 °C	3 min
30 °C / min	280 °C	5 min
1 °C / min	115 °C	2 min
10 °C / min	170 °C	1 min

O volume de injeção das amostras foi de 1 µL na concentração de 0,5 – 1 mg mL⁻¹ no modo *splitless*.

3.5 Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-MS)

As análises por GC-MS foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo Shimadzu GC-2010 equipado com um injetor automático AOC-5000 e acoplado a um detector de massas Shimadzu MS2010 plus com impacto de elétrons (IE, 70 eV) no Instituto de Biociências da UNESP - Rio Claro. O cromatógrafo operou a um fluxo constante de gás He de 40 mL min⁻¹, temperatura do injetor igual a 260 °C. Utilizou-se coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano). A programação utilizada foi 80 °C por 3 minutos, 80 – 280 °C com rampa de aquecimento à 30 °C / min, e mantidas a 280 °C por 5 minutos.

3.6 Micro-organismos e enzimas

Dos 80 micro-organismos utilizados na triagem de atividade enzimática, 57 são provenientes da Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Biocatálise do IQ-UNESP (Milagre Research Group), e 23 da Coleção de Micro-organismos do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), fornecidos pelo Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca do Instituto de Biociências da UNESP - Rio Claro.

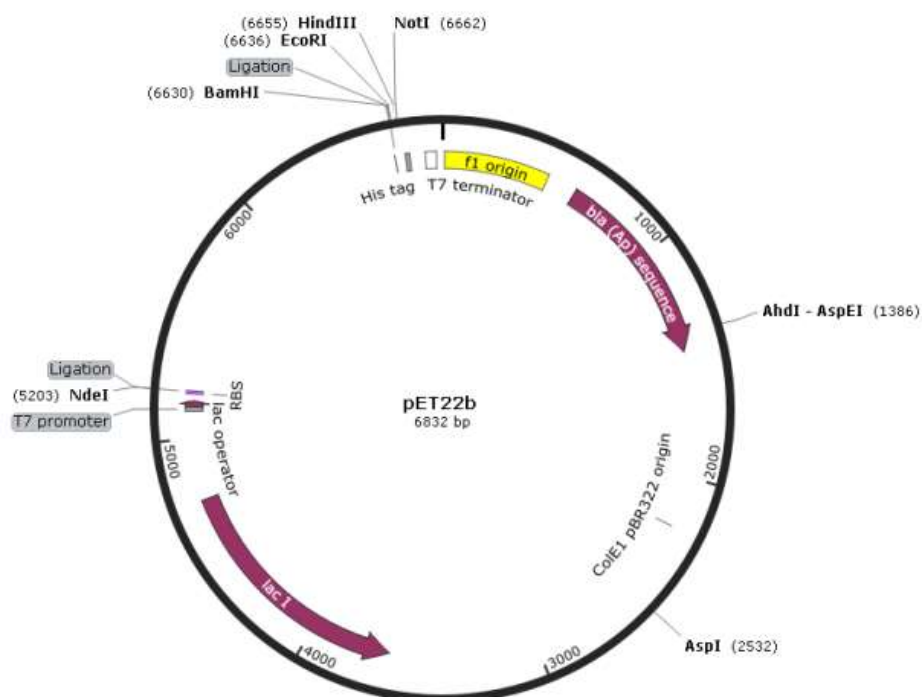
A ω-transaminase comercial (S)-seletiva utilizada nos ensaios foi adquirida junto à empresa Sigma- Aldrich®.

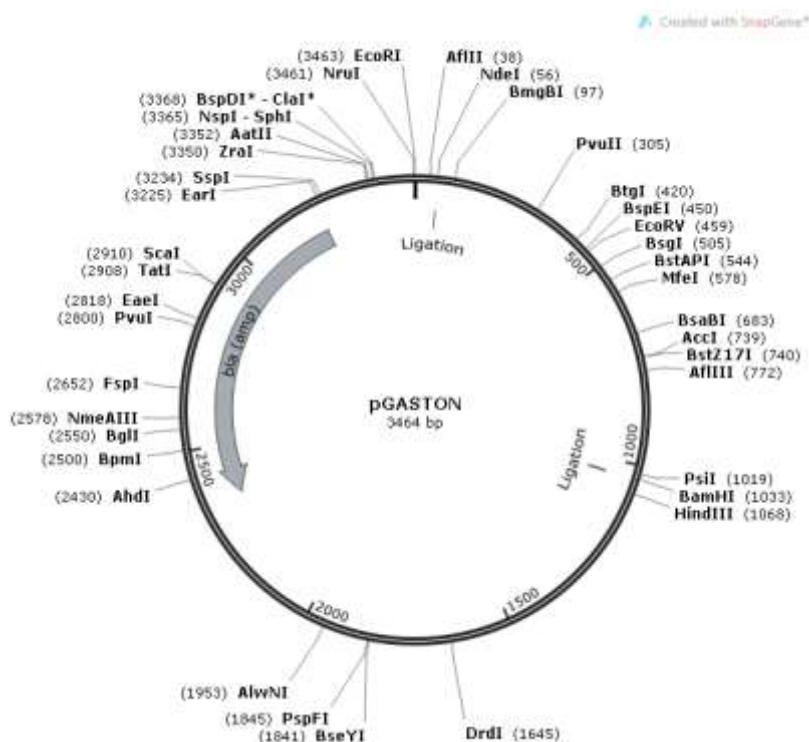
3.7 Plasmídeos e linhagem de *Escherichia coli* (*E. coli*)

Linhagens de *E. coli* Rosetta (DE3) pLys foram empregadas no processo de transformação e expressão enzimática. As células foram fornecidas pela professora Dra. Maria Célia Bertolini responsável pelo laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Química da UNESP. Os plasmídeos contendo genes sintéticos de linhagens selvagens de ω -transaminases foram fornecidos pelo professor Dr. Uwe Bornscheuer do Instituto de Bioquímica (Departamento de Biotecnologia e Catálise Enzimática) da Universidade de Greifswald – Alemanha.

Foram fornecidos ao todo 8 plasmídeos, sendo 4 contendo genes que codificam ω -transaminases (*R*)-seletivas provenientes dos micro-organismos *Aspergillus fumigatus* Af293; *Aspergillus terreus*; *Gibberella zeae*; *Mycobacterium vanbaalenii*; e 4 que codificam ω -transaminases (*S*)-seletivas provenientes dos micro-organismos *Ruegeria pomeroyi*; *Rhodobacter sphaeroides*; *Vibrio fluvialis* JS17 e *Chromobacterium violaceum*. Vetores da série pET e pGASTON foram utilizados para a construção dos plasmídeos recombinantes (Figura 7).

Figura 7 - Vetores pET pGASTON utilizados na construção dos plasmídeos recombinantes.





Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software SnapGene, 2015.

3.8 Meios de cultura, preparo e condições de crescimento

Os meios de cultura Nutrient Broth (NB), Sabouraud Dextrose Broth, SOC Broth e os substratos empregados no preparo do meio Gypm (glicose, malte, extrato de levedura e ágar) foram adquiridos de diferentes fornecedores, entre eles a Sigma-Aldrich®, BD e Kasvi.

- **Meio Gypm:** glicose (2 %), extrato de malte (1 %), extrato de levedura (0,5%), NaH_2PO_4 (0,2 %), ágar (2 %, se o meio for sólido).
- **Meio Difco™ Sabouraud Dextrose Broth:** 30 g de meio, água destilada q.s.p 1000 mL.
- **Meio Difco™ Sabouraud Dextrose Ágar:** 65 g de meio, água destilada q.s.p 1000 mL.
- **Meio NB (Nutrient Broth):** 8 g de meio NB, água destilada q.s.p 1000 mL.
- **Meio NA (Nutrient Agar):** 8 g de meio NB, 15 g de ágar, água destilada q.s.p 1000 mL.

Após o preparo, os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 120 °C e 1 Kgf/cm², por 15 minutos.

- **LB (Luria-Broth) com ampicilina (LBamp):** 20 g de meio LB, 15 g de ágar (se o meio for sólido), água destilada q.s.p 1000 mL. Após a autoclavagem e resfriamento do meio de cultura a uma temperatura entre 50 °C – 60 °C, adicionou-se ampicilina 100 mg/mL para atingir a concentração final 100 µg/mL.
- **LB com canamicina (LBkan):** 20 g de meio LB, 15 g de ágar (se o meio for sólido), água destilada q.s.p 1000 mL. Após a autoclavagem e resfriamento do meio de cultura a uma temperatura entre 50 °C – 60 °C, adicionou-se canamicina 50 mg/mL para atingir a concentração final 50 µg/mL.

Os micro-organismos provenientes do Centro de Estudos de Insetos Sociais foram repicados de placas de petri para tubos de ensaio com ágar inclinado e armazenados a 4 °C. Aqueles provenientes do Laboratório de Biocatálise foram primeiramente reativados em meio líquido (Nutrient Broth) e em seguida transferidos para tubos de ensaio com ágar inclinado e armazenados a 4 °C.

Os micro-organismos da coleção do grupo CEIS foram cultivados em 50 mL de meio Gymp e incubados a 28 °C durante 24 horas sob agitação orbital a 156 rpm. Os micro-organismos da coleção do Laboratório de Biocatálise foram cultivados em 15 mL de meio Nutrient Broth durante 72 horas nas condições de agitação supracitadas.

3.9 Preparo de Tampões, géis e soluções

Tampão Fosfato de Sódio pH 7,5; 50 mM

- 4 mL de solução 0,2 M de NaH_2PO_4
- 21 mL de solução 0,2 M de Na_2HPO_4
- Água destilada q.s.p 100 mL

Tampão de Laemmli 5x

- 375 mM Tris-HCl pH 6,8
- 60 % glicerol
- 5 % SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)
- 15 % β -mercaptoetanol
- Traços de azul de bromofenol sal sódico

Tampão de Corrida 10x

- 250 mM Tris base
- 1,92 M glicina
- 1 % SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)

Tampão de Transferência para *Western Blot*

- 2,4 g Tris base
- 11,16 g glicina
- 200 mL metanol
- Água destilada q.s.p 1L

TBS 10x (*Tris buffered saline*)

- 500 mM Tris
- 1,5 M NaCl
- Acertar o pH em 7,4 com HCl. Para preparar 1L de tampão TBST, misturar 100 mL de TBS 10x a 10 mL de uma solução 10 % Tween-20 e completar com água q.s.p

Tampão de Revelação AP (*Fosfatase Alcalina*)

- 100 mM NaHCO₃
- 1 mM MgCl₂
- Acertar o pH em 9,8. Para a revelação, usar 10 mL da solução reveladora e acrescentar 100 µL de cada solução estoque BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato de *p*-toluidina; 15 mg/mL em 100 % DMF) e NBT (cloreto de *p*-nitro azul de tetrazólico; 30 mg/mL em 70 % DMF)

Tampão de Resolução 5x

- 1,875 M Tris base
- 1 % SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)
- Acertar o pH em 8,8 com HCl

Tampão de lise (MATHEW et al., 2015)

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

Tampão de diálise (SHIN, G.; KIM, 2001)

- 20 μ M de PLP
- Tampão fosfato pH 7,5; 50 mM q.s.p 1000 mL

Stacking Buffer 5x

- 1,875 M Tris base
 - 1 % SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)
- Acertar o pH em 6,8 com HCl

Gel de Resolução 12 % (pH 8,8; 10 mL)

- 2 mL Tampão de Resolução 5x
- 4 mL Solução de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)
- 4 mL água
- 100 μ L APS 10 % (Persulfato de amônio)
- 10 μ L TEMED (N, N, N',N'-Tetrametiletilenodiamina)

Gel de Empacotamento 12 % (pH 6,8; 5mL)

- 1 mL Stacking buffer 5x
- 900 μ L solução acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)
- 3,2 mL água
- 50 μ L APS 10 %
- 5 μ L TEMED

Solução Corante

- 50 % metanol
- 40 % água
- 10 % ácido acético glacial
- 0,05 % *Coomassie Blue Brilliant R-250*

Solução Descorante

- 30 % metanol
- 63 % água
- 7 % ácido acético glacial

Solução de Hibridização para *Western Blot*

- 1x TBST
- 3 % leite em pó desnatado

Ponceau-S

- 0,5 % Ponceau-S corante (m/v) em 1 % de ácido acético glacial (v/v)

Blotto 6 %

- Leite em pó 6 % em 20 mL de TBST

3.10 Preparo de *E. coli* quimicamente competente

Células da linhagem *E. coli* Rosetta (DE3) pLys foram plaqueadas em meio LB-ágar e incubadas a 37 °C *overnight*. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB e este incubado a 37 °C *overnight* sob agitação orbital a 156 rpm. Uma alíquota de 3 mL da cultura *overnight* foi transferida para 100 mL de meio LB e essa suspensão foi incubada a 37 °C sob agitação orbital a 156 rpm até atingir uma densidade ótica ($D.O_{600nm}$) entre 0,6 e 0,8. Quando a densidade ótica foi atingida, as células foram transferidas para frascos estéreis e incubadas em gelo para estacionar a divisão celular. Os cultivos foram então centrifugados a 4300 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os pellets celulares ressuspensos em 15 mL de $CaCl_2$ gelado estéril (100 mM). A suspensão foi incubada em gelo por 15 minutos e em seguida centrifugada novamente nas mesmas condições citadas anteriormente. Os pellets foram ressuspensos em 8 mL de $CaCl_2$ gelado estéril (100 mM) contendo 2 mL de glicerol puro estéril. Alíquotas de 300 μ L da suspensão de células competentes foram armazenadas a - 80 °C em tubos tipo Eppendorf estéreis.

3.11 Transformação utilizando *E. coli* quimicamente competente

Uma alíquota de 300 μ L de células competentes foi descongelada em banho de gelo e em seguida, aproximadamente 50 ng de plasmídeos recombinantes foram adicionados a 100 μ L das células e homogeneizados com movimentos circulares utilizando a ponta da micropipeta. As células foram mantidas em gelo durante 30 minutos e posteriormente submetidas a um choque térmico em banho seco à 42 °C por 2 minutos, e novamente incubadas em gelo por 2 minutos. Em seguida, 1 mL de meio SOC foi adicionado às células, e estas foram incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação orbital a 350 rpm. Ao fim de 1 hora de incubação, cerca de 200 μ L da suspensão celular foram pipetados e espalhados em placa de LB suplementado com ampicilina ou canamicina, e incubada a 37 °C *overnight* (12 a 16 horas). Após o

crescimento das colônias transformadas, uma colônia foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico de resistência e o inóculo foi incubado a 37 °C por 12 horas. Duas alíquotas de 1,5 mL da suspensão celular foram retiradas e armazenadas em tubos tipo Eppendorf estéreis contendo 0,5 mL de glicerol puro. As amostras foram armazenadas em freezer a – 80 °C.

3.12 Expressão das ω -transaminases

A expressão das ω -transaminases em *E. coli Rosetta* (DE3) pLys foi realizada em 1 litro de meio LB suplementado com ampicilina ou canamicina, dependendo do gene de resistência a antibióticos presente em cada plasmídeo. Para tanto, foram utilizados erlenmeyers de 1 e 2 litros, respeitando-se o volume ideal que pode ser ocupado pelo meio de cultura, que corresponde a 20 % do volume total do erlenmeyer .

Um pré-inóculo contendo 100 mL de meio LB com o antibiótico de resistência e 300 μ L de uma suspensão de células transformadas foi preparado e mantido a 37 °C sob agitação orbital *overnight*. A partir do pré-inóculo, foram feitas diluições obedecendo a proporção de 1:20 v/v (pré-inóculo : meio de cultura). Assim, alíquotas de 10 e 20 mL foram retiradas e adicionadas a 200 e 400 mL de meio suplementado com antibiótico, respectivamente.

Após a diluição, os meios de cultura foram incubados a 37 °C sob agitação orbital a 110 rpm, até atingir uma DO_{600} entre 0,6 - 0,8. Atingida a densidade ótica necessária, procedeu-se à indução celular utilizando IPTG (concentração final de 0,1 mM) ou ramnose (concentração final de 0,2 %) dependendo do tipo de plasmídeo incorporado a cada célula. O tempo e a temperatura de indução variou entre 6 e 16 horas, e 30 e 20 °C dependendo do gene a ser expresso como apresentado na Tabela 5. Após a expressão, os cultivos celulares foram centrifugados a uma temperatura de 20 °C por 30 minutos a 4200 rpm. O sobrenadante foi desprezado e os pellets celulares recolhidos e armazenados em frascos à - 20 °C.

Tabela 5 - Condições de expressão das ω -transaminases.

Espécie	Antibiótico	Indutor	Expressão
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	Amp	IPTG	20 °C // Overnight
<i>Aspergillus terreus</i>	Amp	Ramnose	20 °C // Overnight
<i>Gibberella zeae</i>	Amp	IPTG	20 °C // Overnight
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	Amp	Ramnose	20 °C // Overnight
<i>Ruegeria pomeroyi</i>	Amp	IPTG	30 °C // 6 h
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Amp	IPTG	30 °C // 6 h
<i>Vibrio fluvialis</i> JS17	Can	IPTG	30 °C // Overnight
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Can	IPTG	30 °C // Overnight

3.13 Lise celular

Os pellets de bactéria obtidos após a centrifugação dos cultivos celulares foram descongelados e ressuspensos em tampão de lise pH 7,0. As células foram lisadas por sonicador (Sonics vibra cell TM) durante 4,5 minutos divididos em 9 ciclos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto. Todo procedimento foi realizado mantendo-se a temperatura constante em banho de gelo.

A suspensão formada após a lise foi centrifugada a 14000 rpm durante 20 minutos a 4 °C para remover os restos celulares. O sobrenadante contendo as enzimas solúveis foi então coletado, e após adição de glicerol 20 % os extratos foram armazenados a – 20 °C.

3.14 Pré-purificação dos extratos enzimáticos

Os extratos enzimáticos foram submetidos à uma pré-purificação por diálise em tubos de celulose semipermeável com tamanho de poro equivalente a 14000 Da. Cada 8 mL de extrato enzimático foi dialisado contra 1 litro de tampão de diálise durante 24 horas, à uma temperatura de 4 °C com agitação constante do tampão. Ao término do processo, os extratos foram aliquotados em tubos tipo Eppendorf de 2 mL e armazenados a - 20 °C.

3.15 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

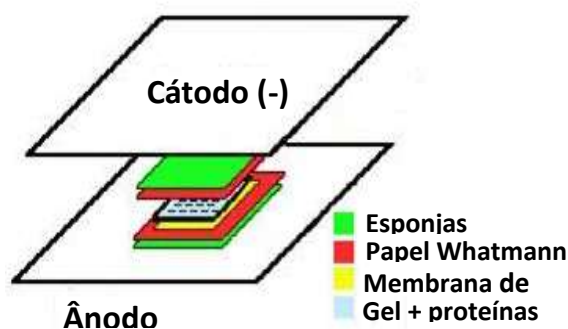
Para analisar a expressão das enzimas, uma alíquota de 1 mL de cada cultura de *E. coli* transformada com os vetores de expressão foi colhida separadamente antes e depois da indução, e centrifugada a 70 rpm por 15 minutos para posterior análise por eletroforese em gel de poliacrilamida, *SDS-PAGE*. Foram adicionados aos pellets das amostras dos cultivos induzidos e não induzidos 20 μ L de água e 5 μ L de tampão de Laemmli 6x. As amostras foram homogeneizadas e fervidas em banho-maria por 5 minutos. Em seguida, uma alíquota de 10 μ L de cada uma das amostras foi retirada e aplicada no gel de poliacrilamida desnaturante. As amostras foram separadas em tampão de corrida TRIS-Glicina 1x a 200 V no sistema de eletroforese de proteínas vertical "MINI-PROTEAN® II". Após o fim da corrida, o géis foram removidos cuidadosamente e corados com solução corante Azul de Coomassie durante 20 minutos sob suave agitação, e por fim, descorados em solução descorante até a visualização das bandas de proteínas.

3.16 Western Blot

Após a separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida elas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose hidratada em tampão de transferência. O sistema de transferência foi montado como apresentado na Figura 8. Foram colocadas duas folhas de papel whatmann pré-umedecidas em tampão de transferência e em seguida, do pólo positivo para o pólo negativo, a membrana de nitrocelulose pré-umedecida e o gel contendo as proteínas.

O processo de transferência foi realizado a 40 V, *overnight* com agitação constante do tampão a uma temperatura de aproximadamente 4 °C.

Figura 8 - Sistema de eletrotransferência para membrana de nitrocelulose.



Fonte: Diagnóstico... 2010.

Após a transferência, a membrana foi corada com o corante Ponceau-S para detectar a presença das proteínas transferidas e do padrão de massa molecular. Em seguida, a membrana foi lavada com tampão TBST 1x até a total remoção do corante e então, bloqueada com Blotto 6 % durante 2 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST 1x durante 5 minutos.

O anticorpo primário conjugado com fosfatase alcalina foi diluído em solução de hibridização na proporção de 1:10.000, e a membrana foi hibridizada com essa solução durante 2 horas à temperatura ambiente. Após a hibridização, a solução foi removida e a membrana lavada 3 vezes com tampão TBST 1x durante 5 minutos. A revelação foi feita com solução reveladora contendo NBT/BCIP, e em seguida a membrana foi lavada com água para interromper o processo de revelação.

3.17 Triagem de micro-organismos

Após o período de incubação, (vide tópico 3.8, p. 42) os cultivos celulares foram centrifugados por 15 minutos a 3200 rpm e 70 rpm/s² de aceleração. O sobrenadante foi desprezado e a biomassa lavada com tampão fosfato de sódio (50 mM) pH 7,5 e centrifugada novamente. O sobrenadante foi desprezado e a biomassa ressuspensa em tampão fosfato contendo PLP (Piridoxal 5'fosfato) na concentração final de 0,4 mM em quantidade suficiente para atingir a concentração celular de 60 mg/mL.

Foram realizados 2 ensaios utilizando diferentes doadores amino para cada micro-organismo avaliado como segue:

- **Ensaio 1:** Em um tubo tipo Eppendorf de 2 mL adicionou-se (*rac*)-feniletilamina (460 mM; 59 µL) e piruvato (46 mM; 5 mg). Em seguida, o pH do meio foi ajustado para 7,5 com ácido clorídrico 2 M, e 1 mL de suspensão celular 60 mg/mL foi adicionado.
- **Ensaio 2:** Em um tubo tipo Eppendorf de 2 mL adicionou-se isopropilamina (1 M; 86 µL) e acetofenona (20 mM; 2,3 µL). O pH do meio foi ajustado para 7,5 com ácido clorídrico 2 M, e 1 mL de suspensão celular 60 mg/mL foi adicionado.

O controle microbiano e o controle negativo foram realizados da seguinte maneira:

- **Controle microbiano:** 1 mL de suspensão celular 60 mg/mL sem a adição de substratos;
- **Controle de substratos do ensaio 1:** 460 mM de (*rac*)-feniletilamina e 46 mM de piruvato em 1mL de tampão fosfato;
- **Controle de substratos do ensaio 2:** 1M de isopropilamina e 20 mM de acetofenona em 1 mL de tampão fosfato.

As reações foram mantidas à 30 °C sob agitação constante (850 rpm) durante 24 horas. Após esse período, o meio reacional foi centrifugado, o sobrenadante recolhido e a biomassa esterilizada para posterior descarte. Ao sobrenadante adicionou-se 800 µL de acetato de etila para realizar a extração. A fase orgânica foi recolhida e seca com sulfato de sódio anidro e posteriormente analisada por GC-FID.

3.18 Reações com ω -transaminase comercial e extratos enzimáticos

3.18.1 Atividade enzimática da ω -transaminase comercial e controle de substratos

Antes de proceder aos ensaios de aminação assimétrica e resolução cinética, a atividade enzimática da ω -transaminase comercial foi avaliada. Para tanto, utilizou-se 10 mM de piruvato de sódio 10 mM de (*S*)-feniletilamina (20 µL de uma solução 0,5 M de FEA, pH 7,5), 0,4 mM de PLP e 1 mg da enzima em tampão fosfato (100 mM, pH 7,5) q.s.p 1 mL. A reação foi mantida sob agitação (850 rpm) durante 10 minutos a 25 °C, e interrompida pela adição de 1 mL de acetato de etila. Após a extração, a fase orgânica foi recolhida e seca com sulfato de sódio anidro e posteriormente analisada por GC-FID.

Também foram realizados ensaios controle a fim de avaliar a reatividade dos substratos na ausência da enzima. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato (100 mM, pH 7,5) q.s.p 1,5 mL como segue: 30 mM de acetoacetato de etila (5,7 µL) ou 10 mM de benzoilacetato de etila (2,6 µL); 100 mM de (*rac*)-FEA (300 µL de uma solução 0,5 M de FEA racêmica, pH 7,5) e 1 mM de PLP. A reação foi mantida sob agitação constante (850 rpm) a 30 °C durante 24 horas, e interrompida pela adição de 3 mL de acetato de etila (em 2 porções de 1,5 mL). Após a extração, as fases

orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de sódio anidro para posterior análise por GC-FID.

3.18.2 Síntese assimétrica com ω -transaminase comercial

A ω -transaminase comercial (S)-seletiva foi primeiramente avaliada quanto ao potencial em promover a síntese assimétrica de aminas empregando-se os seguintes substratos carbonilados: acetoacetato de etila e benzoilacetato de etila. Em todas as reações, utilizou-se a feniletilamina como doador de amina. As reações foram realizadas em tampão fosfato (100 mM, pH 7,5) q.s.p 1,5 mL, contendo 100 mM de (S)-feniletilamina (300 μ L de uma solução 0,5 M de FEA, pH 7,5), 1 mM de PLP (15 μ L de uma solução 0,1 M), 10 mg de enzima e um dos seguintes substratos: 30 mM de acetoacetato de etila (5,7 μ L) ou 10 mM de benzoilacetato de etila (2,6 μ L).

As reações foram mantidas sob agitação (850 rpm) a 25 °C por 24 horas, e ao término, interrompidas pela adição de 50 μ L de NaOH 10 M. Em seguida, realizou-se a extração com 3 mL de acetato de etila (2 porções de 1,5 mL) e as fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de sódio anidro para posterior analisada por GC-FID.

3.18.3 Resolução cinética com ω -transaminase comercial

Tendo em vista os resultados obtidos na aminação assimétrica, a resolução cinética foi realizada empregando-se apenas o acetoacetato de etila como aceptor amino. A reação foi realizada em tampão fosfato (100 mM, pH 7,5) q.s.p 1,5 mL, contendo 30 mM de (*rac*)-feniletilamina (112,5 μ L de uma solução 0,4 M de FEA racêmica, pH 7,5), 1 mM de PLP (15 μ L de uma solução 0,1 M), 30 mM de acetoacetato de etila (5,7 μ L) e 10 mg de enzima.

A reação foi mantida sob agitação (850 rpm) a 25 °C por 24 horas, e ao término, interrompida pela adição de 50 μ L de NaOH 10 M. Em seguida, realizou-se a extração com 3 mL de acetato de etila (2 porções de 1,5 mL), e as fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de sódio anidro para posterior analisada por GC-FID.

3.18.4 Reações controle com extratos enzimáticos

Antes de proceder aos ensaios de aminação assimétrica e resolução cinética, realizou-se um ensaio controle para averiguar se o extrato de *E. coli* sem o plasmídeo recombinante era capaz de converter os substratos nos produtos de interesse. Além disso, para cada um dos 8 extratos enzimáticos estudados, foi realizado um ensaio controle para avaliar a eficiência da diálise, e um ensaio controle da atividade enzimática após a diálise. As condições reacionais são descritas a seguir.

- **Controle do extrato de *E. coli*:**

100 µL de uma suspensão de *E. coli* não transformada foram inoculadas em 30 mL de meio LB sem antibiótico de resistência. O inóculo foi então incubado a 37 °C sob agitação orbital a 110 rpm durante 16 horas. Após esse período, o meio de cultura foi centrifugado a 4200 rpm por 30 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi desprezado e os pellets lavados com tampão fosfato pH 7,5 (50 mM) e centrifugados novamente. Em seguida, as células foram ressuspensas em tampão e lisadas por sonicator (vide tópico 3.13, p. 48). A suspensão formada foi centrifugada a 14000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, os restos celulares descartados e o sobrenadante (extrato) recolhido.

A reação controle foi feita utilizando-se 25 mM de piruvato de sódio (100 µL de uma solução a 0,25 M de piruvato de sódio), 100 mM de (*rac*)-feniletilamina (200 µL de uma solução 0,5 M de FEA, pH 7,5), 1 mM de PLP e extrato de *E. coli* q.s.p 1 mL. A reação foi realizada em duplicata.

- **Controle de diálise:**

Após a diálise dos extratos enzimáticos, uma alíquota de 1 mL foi recolhida em um tubo tipo Eppendorf de 2 mL onde foram adicionados 100 mM de (*rac*)-feniletilamina (200 µL de uma solução 0,5 M de FEA, pH 7,5) e 1 mM de PLP. Esse procedimento foi realizado para cada um dos extratos estudados.

- **Controle de atividade enzimática:**

Para averiguar a atividade enzimática após a diálise dos extratos, uma reação

controle foi realizada utilizando-se 25 mM de piruvato de sódio (100 µL de uma solução a 0,25 M de piruvato de sódio), 100 mM de (*rac*)-feniletilamina (200 µL de uma solução 0,5 M de FEA, pH 7,5), 1 mM de PLP e o extrato dialisado q.s.p 1 mL.

Todas as reações controle mencionadas acima foram mantidas sob agitação constante (850 rpm) a 30 °C durante 24 horas, e interrompidas pela adição de 2 mL de acetato de etila (2 porções de 1 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de sódio anidro para posterior análise por GC-FID.

3.18.5 Síntese assimétrica com extratos enzimáticos

As reações de síntese assimétrica foram realizadas empregando-se os substratos carbonilados acetoacetato de etila e benzoilacetato de etila. Em todas as reações a (*R*) ou (*S*)-feniletilamina foi utilizada como doador de amina dependendo da seletividade da enzima presente no extrato (Tabela 6). As reações foram realizadas em tubos tipo Eppendorf de 2 mL, contendo 100 mM de (*R*) ou (*S*)-feniletilamina (300 µL de uma solução 0,5 M de FEA, pH 7,5), 1 mM de PLP (15 µL de uma solução 0,1 M), 30 mM de acetoacetato de etila (5,7 µL) ou 10 mM de benzoilacetato de etila (2,6 µL) e extrato enzimático q.s.p 1,5 mL.

Tabela 6 - Seletividade das enzimas de cada extrato.

Espécie	Seletividade
<i>Aspergillus fumigatus Af293</i>	(<i>R</i>)-seletiva
<i>Aspergillus terreus</i>	(<i>R</i>)-seletiva
<i>Gibberella zeae</i>	(<i>R</i>)-seletiva
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	(<i>R</i>)-seletiva
<i>Ruegeria pomeroyi</i>	(<i>S</i>)-seletiva
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	(<i>S</i>)-seletiva
<i>Vibrio fluvialis JS17</i>	(<i>S</i>)-seletiva
<i>Chromobacterium violaceum</i>	(<i>S</i>)-seletiva

As reações foram mantidas sob agitação (850 rpm) a 30 °C por 24 horas, e ao término, interrompidas pela adição de 50 µL de NaOH 10 M. Em seguida, realizou-se a extração com 3 mL de acetato de etila (2 porções de 1,5 mL), e as fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de sódio anidro para posterior

análise por GC-FID.

3.18.6 Resolução cinética com extratos enzimáticos

Com base nos resultados obtidos na aminação assimétrica, a resolução cinética foi realizada empregando-se apenas o acetoacetato de etila como aceptor amino. As reações foram realizadas em tubos tipo Eppendorf de 2 mL, contendo 30 mM de (*rac*)-feniletilamina (112,5 μ L de uma solução 0,4 M de FEA racêmica, pH 7,5), 1 mM de PLP (15 μ L de uma solução 0,1 M), 30 mM de acetoacetato de etila (5,7 μ L) e extrato enzimático q.s.p 1,5 mL.

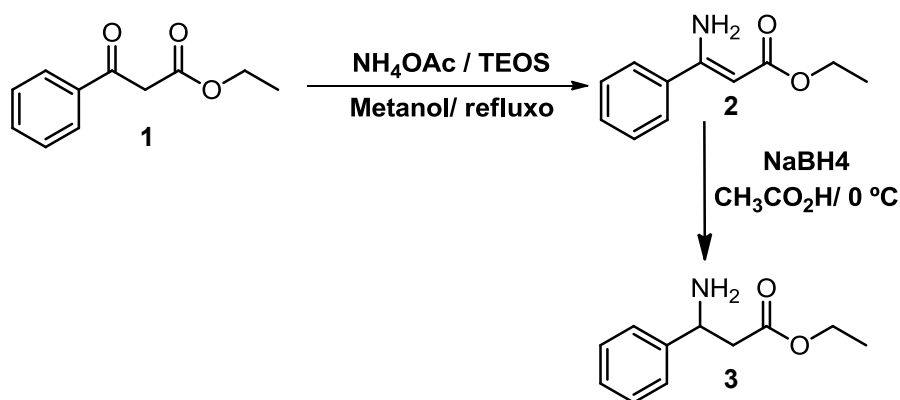
As reações foram mantidas sob agitação (850 rpm) a 30 °C por 24 horas, e ao término, interrompidas pela adição de 50 μ L de NaOH 10 M. Em seguida, realizou-se a extração com 3 mL de acetato de etila (2 porções de 1,5 mL), e as fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de sódio anidro para posterior análise por GC-FID.

3.19 Procedimento experimental e dados espectroscópicos dos compostos sintetizados

3.19.1 Síntese e purificação do composto 3-amino-3-fenilacrilato de etila

Visando à obtenção do padrão racêmico 3-amino-3-fenilpropanoato de etila (**3**), foi proposta a rota sintética apresentada no Esquema 10.

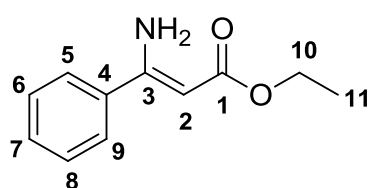
Esquema 10 - Rota sintética para obtenção do β -aminoéster 3-amino-3-fenilpropanoato de etila.



A síntese do β -enaminoéster (**2**) foi realizada em um balão de 50 mL acoplado

a um condensador de refluxo. A uma solução de benzoilacetato de etila (30 mmol; 5 mL) e ortosilicato de tetraetila - TEOS (35 mmol; 7,8 mL) em 35 mL de metanol, adicionou-se acetato de amônio (0,1 mol; 7,7 g). A mistura resultante foi submetida à agitação em agitador magnético e mantida sob refluxo a 65 °C em atmosfera de nitrogênio por 36 horas. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada em sistema eluente Hex:AcOEt na proporção de 9:1 (ZHAO, 2005). Ao fim da reação obteve-se um líquido viscoso amarelado o qual foi submetido a uma extração com 30 mL de acetato de etila (2 porções de 15 mL) e 15 mL de água destilada. Após a extração, a fase orgânica foi rotaevaporada e o produto obtido submetido à purificação.

A purificação do produto foi realizada por cromatografia em coluna de sílica sob pressão ("dry-flash chromatography") utilizando sistema eluente Hex:AcOEt nas proporções 95:5; 9:1; e 85:15. Para tanto, uma coluna de vidro (30 mm diâmetro, 45 mm comprimento) empacotada com 15 gramas de sílica gel 60 (0,04 - 0,063 mm, 230 - 400 mesh ASTM) foi utilizada.



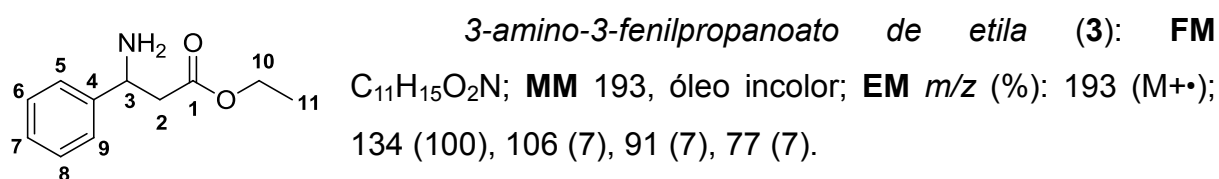
3-amino-3-fenilacrilato (2): **FM** C₁₁H₁₃O₂N; **MM** 191, óleo amarelo; **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ: 7,58 – 7,54 (m, 2H, H-5 e H-9); 7,46 – 7,39 (m, 3H, H-6, H-7 e H-8); 4,98 (s, 1H, H-2); 4,20 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, H-10); 1,60 (sl, 2H, NH₂); 1,32 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, H-11); **RMN de ¹³C** (75,48 MHz, CDCl₃) δ: 170,45 (C₀, C-1); 58,94 (CH₂, C-10); 84,57 (CH, C-2); 14,59 (CH₃, C-11); 160,53 (C₀, C-3); 137,66 (C₀, C-4); 126,16 (CH, C-5 e C-9); 128,84 (CH, C-6 e C-8); 130,24 (CH, C-7).

3.19.2 Síntese e purificação do composto 3-amino-3-fenilpropanoato de etila

Após a síntese do β-enaminoéster (2), procedeu-se à segunda etapa para a obtenção do composto 3-amino-3-fenilpropanoato de etila (3). Em um balão de 25 mL contendo 5 mL de ácido acético glacial, NaBH₄ (9 mmol, 0,34 g) foi lentamente adicionado mantendo-se a temperatura entre 10 e 20 °C. Após o término da evolução de hidrogênio, 5 mL de acetonitrila grau HPLC foram adicionados e a solução resultante foi resfriada a 0 °C em banho de gelo. Em seguida, o β-

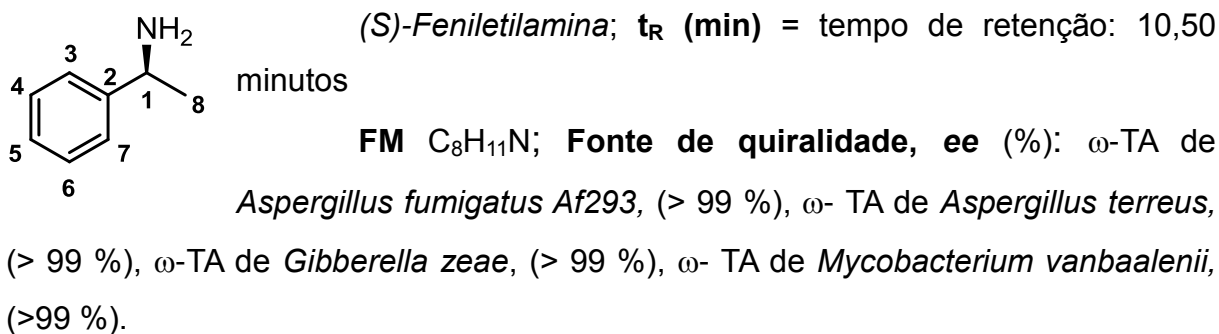
enaminoéster (3 mmol; 0,573 g) foi adicionado e a reação submetida a agitação vigorosa durante 16 horas a 0 °C. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada em sistema eluente AcOEt:Hex:MeOH na proporção de 6:3:1 v/v. Após o fim da reação, o ácido acético e a acetonitrila foram rotaevaporados e o resíduo restante foi dissolvido com 10 mL de uma solução saturada de K₂CO₃ e extraído com 30 mL de acetato de etila (2 porções de 15 mL). Ao fim da extração, as fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de sódio anidro. Após evaporação da fase orgânica o produto obtido foi submetido à purificação.

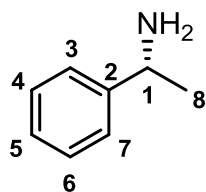
A purificação do produto foi realizada por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), em placas de vidro (20 x 20 cm) com sílica gel 60 (400 mesh) com indicador de fluorescência. O sistema de eluição utilizado na CCD foi AcOEt:Hex:MeOH na proporção 57:33,5:9,5 v/v. Após a eluição e análise sob luz UV de (λ) 254 nm e 365 nm, a faixa de interesse (R_f = 0,48) foi marcada e separada.



3.20 Procedimento geral para determinação dos excessos enantioméricos (ee)

Os ee das reações de resolução cinética foram determinados via cromatografia gasosa com fase estacionária quiral (vide tópico 3.4, p. 39). Os picos foram identificados pela coinjeção dos compostos de referência (*R*) e (*S*)-feniletilamina adquiridos comercialmente da Sigma- Aldrich®.





(*R*)-Feniletilamina; $t_R = 10,04$ minutos

FM $C_8H_{11}N$; **Fonte de quiralidade, ee (%)**: ω- TA de *Ruegeria pomeroyi*, (> 99 %), ω- TA de *Rhodobacter sphaeroides*, ω-TA de (52 %), ω-TA de *Vibrio fluvialis JS17*, (> 99 %), ω-TA de *Chromobacterium violaceum*, (>99 %), ω-TA comercial, (88 %).

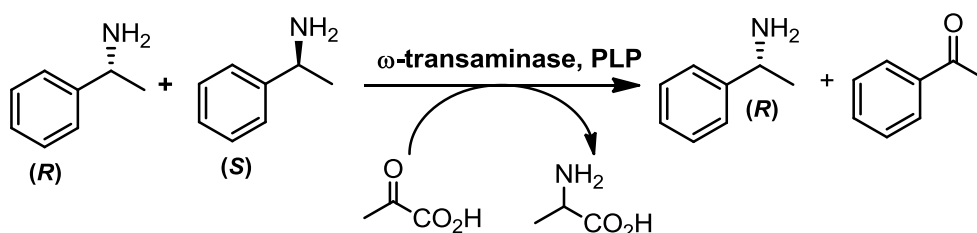
4.0 Resultados e Discussão

4.1 Triagem enzimática de micro-organismos para atividade ω -transaminase

Ao todo foram testados 80 micro-organismos quanto à capacidade de produção de ω -transaminases. O ensaio para detecção de atividade ω -transaminase foi realizado baseado na conversão da (*rac*)-feniletilamina em acetofenona empregando-se o piruvato de sódio como acceptor de amina. Assim como o piruvato, a (*rac*)-feniletilamina é um substrato comumente utilizado em reações de transaminação. Embora as ω -transaminases sejam conhecidas pela capacidade de realizar a transferência de um grupo amino que não esteja ligado diretamente à um carbono α carbonílico, essas enzimas também podem atuar sobre α -aminoácidos como, por exemplo, a alanina.

Conforme a seletividade da enzima, ela atua transformando um dos enantiômeros da amina na cetona correspondente, enquanto o enantiômero para o qual não apresenta seletividade permanece intacto no meio reacional (Esquema 11).

Esquema 11 - Reação de transaminação utilizando (*rac*)-feniletilamina.



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.²

Neste ensaio, a acetofenona formada na reação pode ser monitorada via GC-FID ou por ensaios espectrofotométricos a 245 nm, uma vez que neste comprimento de onda a acetofenona apresenta um valor elevado de absorbância quando comparado aos demais reagentes (α -feniletilamina, piruvato ou alanina). Este último ensaio é o mais comumente utilizado em virtude da maior facilidade em se obter os resultados, já que o formato miniaturizado (placas de 96 poços) exige quantidades

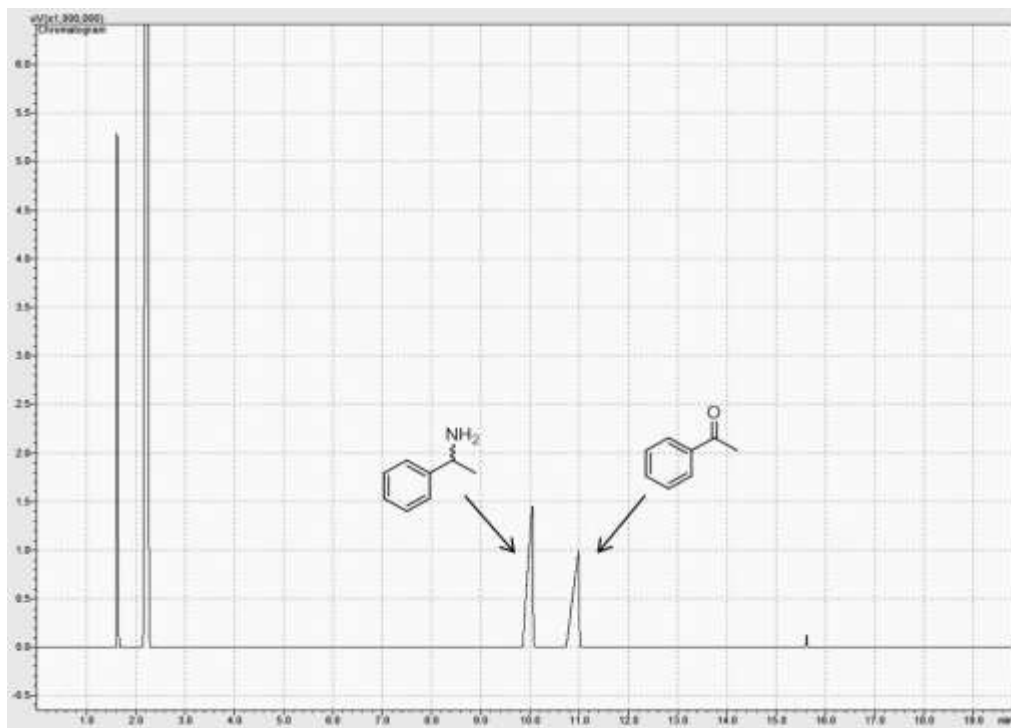
² Todos os esquemas apresentados foram elaborados pela autora

de reagente significativamente menor, e permite o acompanhamento simultâneo de mais de uma reação culminando na redução do tempo total de ensaio. Além disso, a elevada sensibilidade do método, e a possibilidade de se avaliar rapidamente propriedades enzimáticas tais como pH e temperatura ótimos e estabilidade, tornam os ensaios espectrofotométricos a ferramenta de escolha nesse tipo de análise. A atividade enzimática pode ser determinada em aproximadamente 10 minutos. Para tanto, uma curva de calibração é construída e a inclinação da reta pode ser usada para calcular a atividade enzimática. Embora o substrato padrão utilizado neste ensaio seja o piruvato, todas as cetonas, aldeídos, ou cetoácidos apresentando baixa absorbância no comprimento de onda estabelecido para a análise podem ser empregados como co-substratos. Assim, a especificidade de diferentes aceptores de amina pode ser obtida rapidamente para uma dada ω -transaminase.

Apesar de todas as vantagens apresentadas pelo ensaio espectrofotométrico para avaliar a atividade enzimática, todas as triagens foram monitoradas por GC-FID, uma vez que não havia nenhum espectrofotômetro disponível capaz de realizar a leitura no comprimento de onda necessário (245 nm). Embora as triagens monitoradas por GC-FID demandem um maior tempo de análise, diferente do ensaio espectrofotométrico, a técnica permite a identificação de todos os produtos formados durante a reação de acordo com o tempo de retenção apresentado no cromatograma.

A Figura 9 apresenta o perfil cromatográfico obtido por GC-FID dos substratos acetofenona, isopropilamina e feniletilamina utilizados nos ensaios de transaminação.

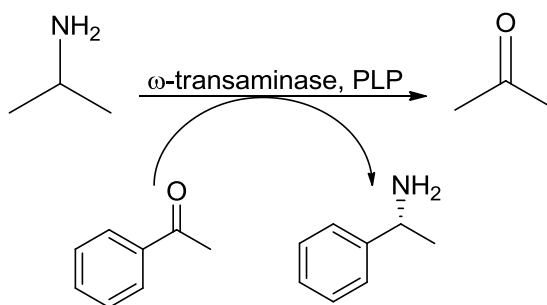
Figura 9 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para os padrões acetofenona, isopropilamina e feniletilamina.



Fonte: Elaborado pela autora, 2015.³

Paralelamente ao ensaio utilizando a feniletilamina como doador de amina, a isopropilamina também foi testada para esta finalidade, utilizando-se a acetofenona como acceptor do grupamento amino. Diferente do ensaio utilizando como substrato a feniletilamina em que o produto formado e monitorado é a acetofenona, no ensaio com a isopropilamina monitora-se a formação da feniletilamina como apresentado no Esquema 12.

Esquema 12 - Reação de transaminação utilizando a isopropilamina.

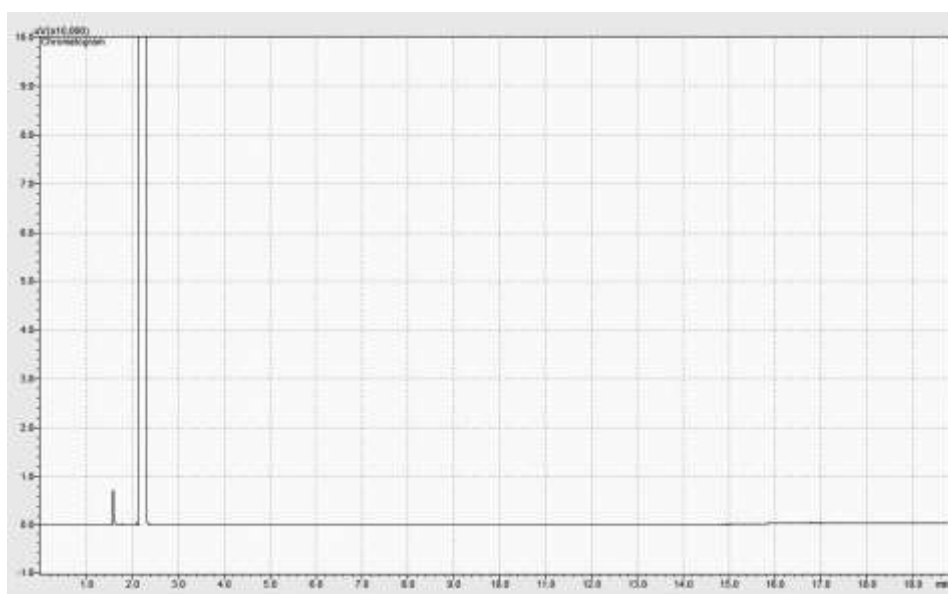


As análises realizadas para o controle microbiano (vide tópico 3.17, p. 50) não

³ Todos os cromatogramas apresentados são dados obtidos pela autora.

apresentaram nenhum sinal característico no GC-FID indicando que os micro-organismos avaliados não são capazes de sintetizar o produto de interesse ou quaisquer dos substratos utilizados no ensaio. A Figura 10 apresenta o cromatograma do controle de um dos micro-organismos avaliados.

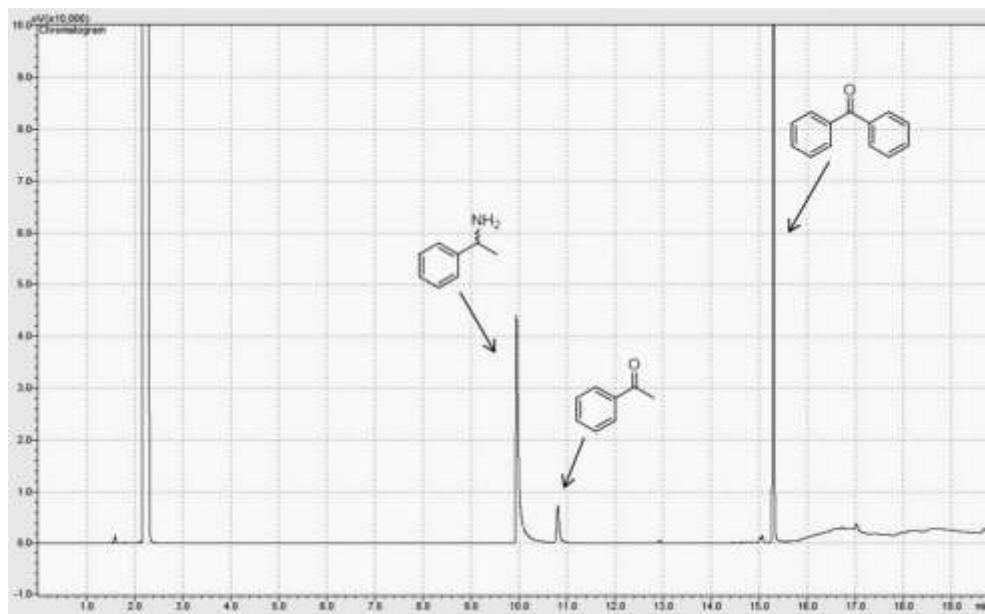
Figura 10 - Cromatograma obtido por CG-FID para o controle microbiano do micro-organismo MLH 45.



Em contrapartida, o controle de substratos do ensaio 1 apresentou no espectro o sinal referente à acetofenona, indicando que o meio reacional sem a presença de enzimas foi capaz de produzir essa substância, interferindo assim na análise dos resultados da triagem, uma vez que neste ensaio a acetofenona é o produto da reação.

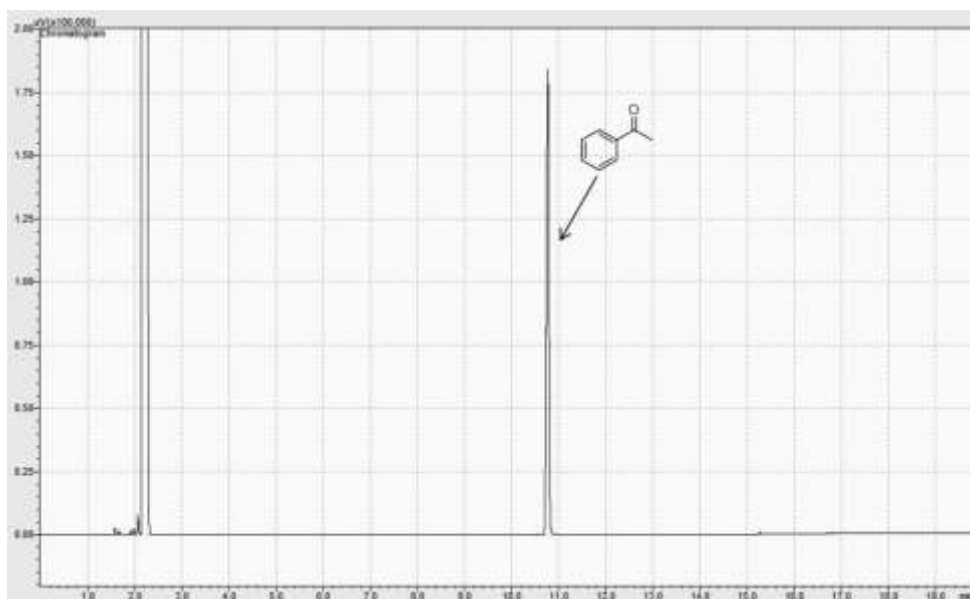
Para solucionar o problema, a benzofenona foi utilizada como padrão interno na concentração final de 40 mM. O controle de substratos do ensaio 1 foi realizado em triplicata e após a extração com acetato de etila, a benzofenona foi adicionada e procedeu-se à análise por GC-FID. A partir da razão entre a área do padrão interno (benzofenona) e a área da acetofenona produzida na reação controle, foi possível distinguir a acetofenona que estava sendo produzida espontaneamente pela reação, daquela produzida por ω -transaminases dos micro-organismos testados. A Figura 11 apresenta o cromatograma da reação controle do ensaio 1. O pico que aparece com um tempo de retenção de aproximadamente 15,2 minutos corresponde à benzofenona.

Figura 11 - Cromatograma obtido por CG-FID (Método 1) para o controle de substratos do ensaio 1.



Os ensaios nos quais a isopropilamina foi empregada como doador de amina não apresentaram resultados positivos para nenhum dos micro-organismos avaliados. A Figura 12 apresenta o perfil cromatográfico de um dos micro-organismos avaliados pelo ensaio 2. Os demais micro-organismos exibiram o mesmo perfil cromatográfico.

Figura 12 - Cromatograma obtido por CG-FID (Método 1) para o ensaio 2 com o micro-organismo MLH 51.



Os dados da triagem para o ensaio utilizando a (*rac*)-feniletilamina como doador de amina revelaram 2 *hits* positivos; sendo eles os micro-organismos MLH 51

e MLH 15 (Figuras 13 e 14 respectivamente) cuja relação entre a área do padrão interno e a área da acetofenona (0,125 e 0,127, respectivamente) foi maior do que a relação obtida no controle de substratos (0,026).

Figura 13 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para o ensaio 1 com o micro-organismo MLH 51.

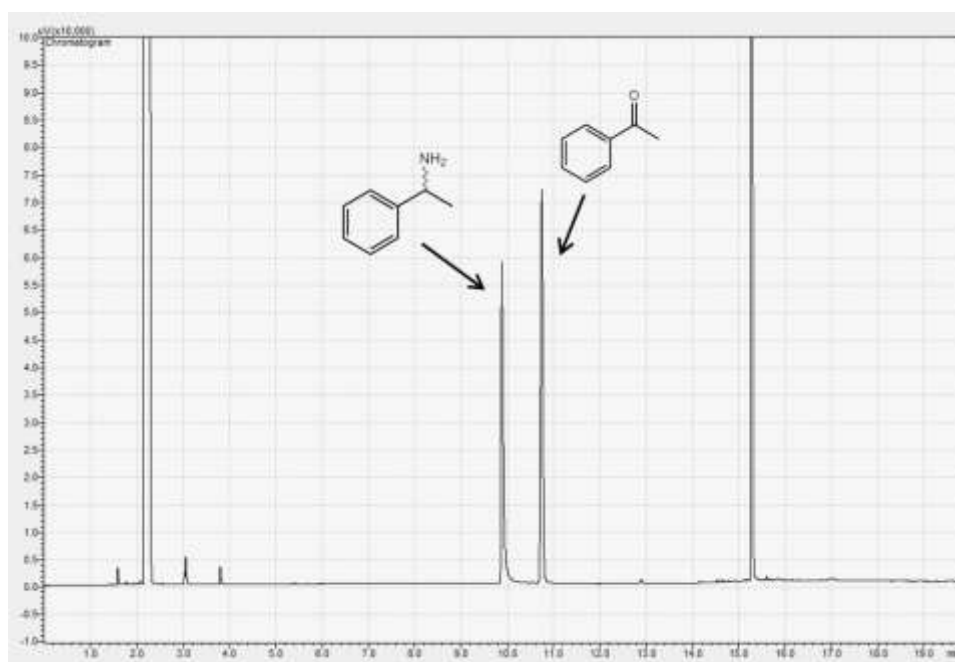
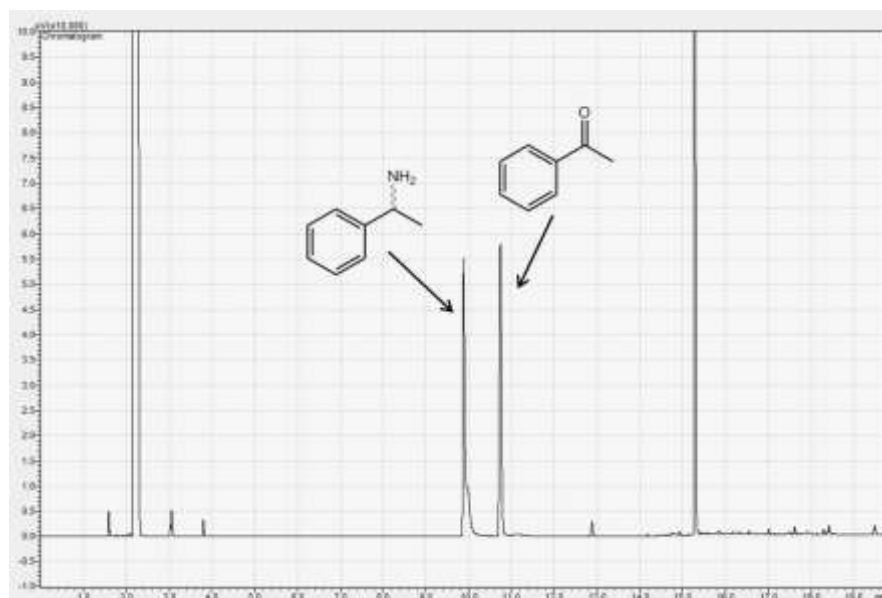


Figura 14 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para o ensaio 1 com o micro-organismo MLH 15.



Após a triagem preliminar, os micro-organismos MLH 15 e MLH 51 foram testados frente a α -feniletilamina enantiopura para averiguar a enantiopreferência da

enzima produzida por esses micro-organismos. Os ensaios revelaram que ambos os micro-organismos produzem enzimas (S)-seletivas, o que é condizente com os dados da literatura que indicam a maior abundância de ω -transaminases (S)-seletivas. As Figuras 15 e 17 correspondem aos cromatogramas obtidos para o ensaio 1 com os micro-organismos MLH15 e MLH51 utilizando a (R)-feniletilamina, enquanto as Figuras 16 e 18 são relativas aos cromatogramas obtidos para o ensaio utilizando a (S)-feniletilamina. Observa-se que nos ensaios utilizando o enantiômero (R), não houve a formação de acetofenona, ao passo que os ensaios com o o enantiômero (S) exibiram um pico proeminente referente à acetofenona, sugerindo a preferência das enzimas por esse enantiômero.

Figura 15 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para o ensaio 1 com o micro-organismo MLH 51 utilizando (R)-FEA.

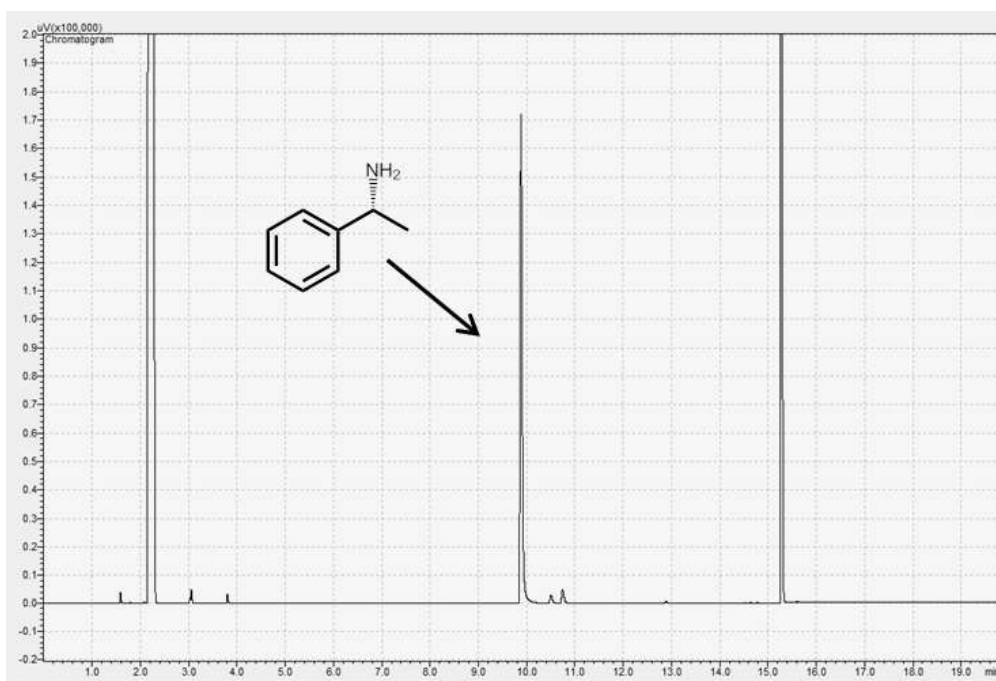


Figura 16 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para o ensaio 1 com o micro-organismo MLH 51 utilizando (S)-FEA.

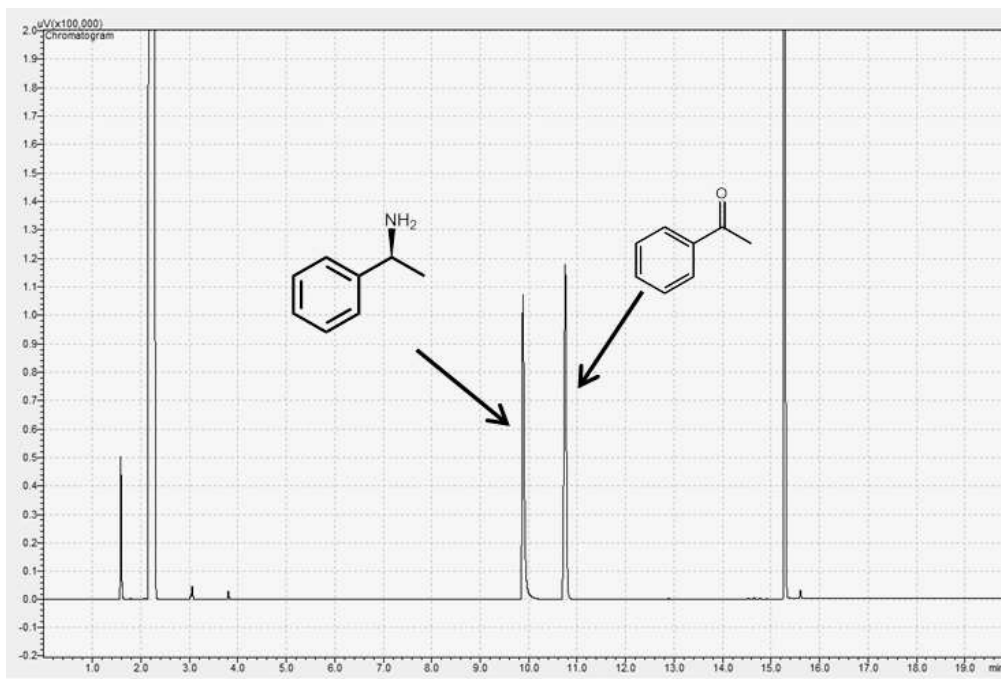


Figura 17 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para o ensaio 1 com o micro-organismo MLH 15 utilizando (R)-FEA.

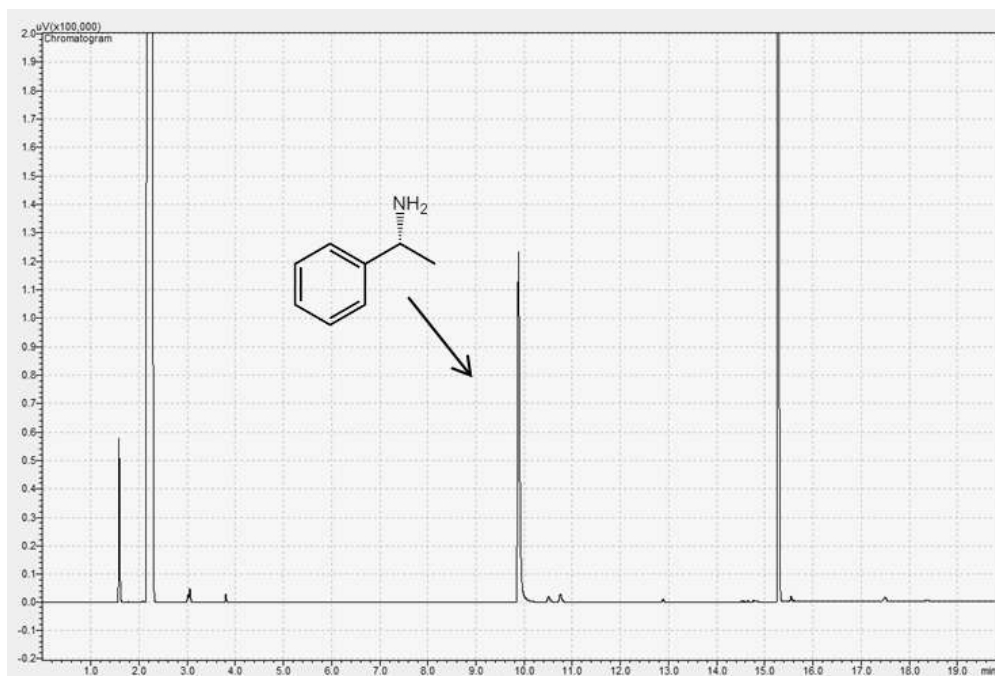
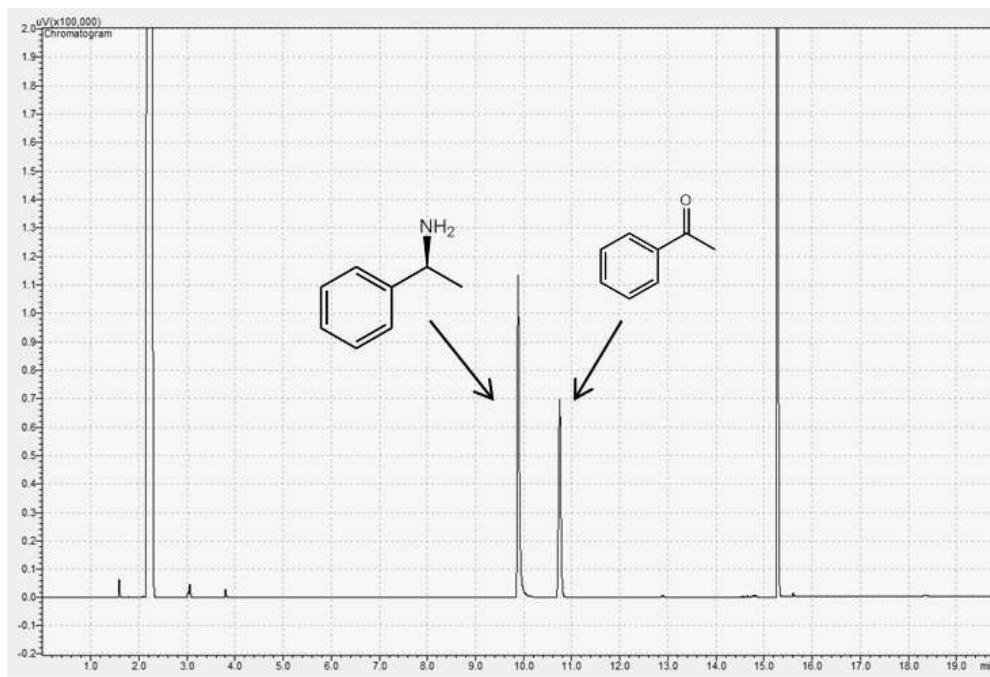


Figura 18 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para o ensaio 1 com o micro-organismo MLH 15 utilizando (S)-FEA.



Uma vez que a enantiopreferência das enzimas produzidas pelos micro-organismos MLH 15 e MLH 51 foi confirmada, a conversão da α -feniletilamina em acetofenona foi calculada. Para tanto, uma curva de calibração (Figura 19) relacionando a razão entre a área da acetofenona e do padrão interno com a concentração de acetofenona foi construída. Os dados da conversão são apresentados na Tabela 7.

Figura 19 - Curva de calibração para a acetofenona.

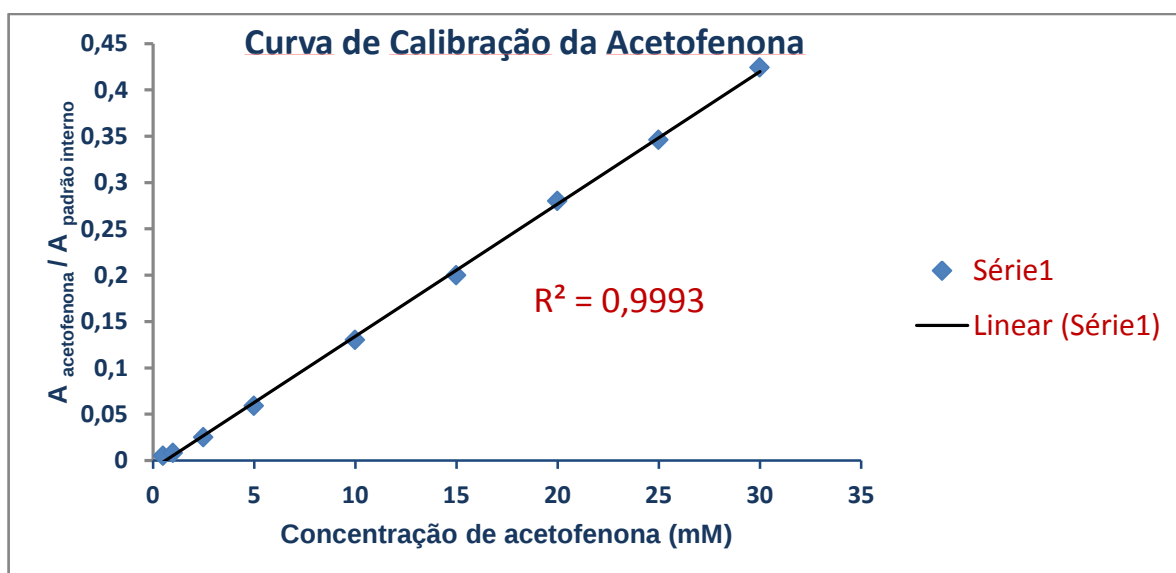


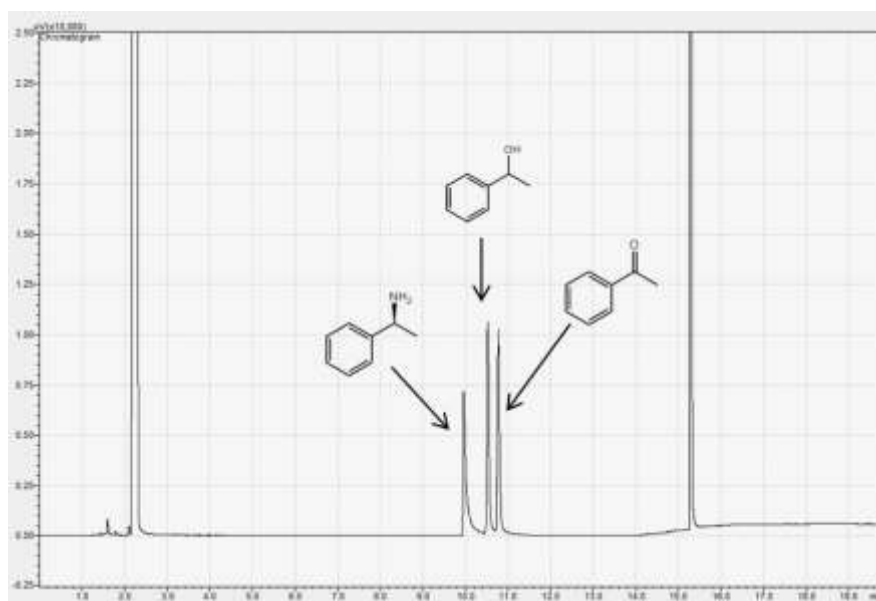
Tabela 7 - Dados da conversão da feniletilamina (FEA) em acetofenona.

Micro-organismo	(rac)-FEA	(R)-FEA	(S)-FEA
MLH 15	11,4 %	N.D	16,5 %
MLH 51	16,3 %	N.D	29,5 %

As enzimas produzidas pelos micro-organismos MLH15 e MLH 51 também foram avaliadas quanto ao potencial de promover a aminação assimétrica dos substratos acetoacetato de etila e benzoilacetato de etila, todavia, nenhum dos substratos foi aceito pelas enzimas.

É sabido que reações enzimáticas envolvendo ω -transaminases são diretamente afetadas pela quantidade de substratos presente no meio reacional, uma vez que o uso de quantidades muito elevadas pode provocar a inibição enzimática. Assim sendo, um novo ensaio foi realizado a partir dos micro-organismos MLH 15 e MLH 51, utilizando uma quantidade menor de substratos para verificar o impacto causado na atividade enzimática.

O novo ensaio foi realizado em tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,5) contendo (S)-feniletilamina (50 mM); piruvato de sódio (25 mM) e PLP (0,4 mM). Interessantemente, o controle de substratos deste ensaio não apresentou o pico referente à acetofenona, assim, não foi necessário usar o padrão interno. O perfil cromatográfico da reação com o micro-organismo MLH 51 é apresentado na Figura 20.

Figura 20 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 1) para o ensaio 1 com o micro-organismo MLH 51: (S)-FEA (50mM); Piruvato (25 mM).

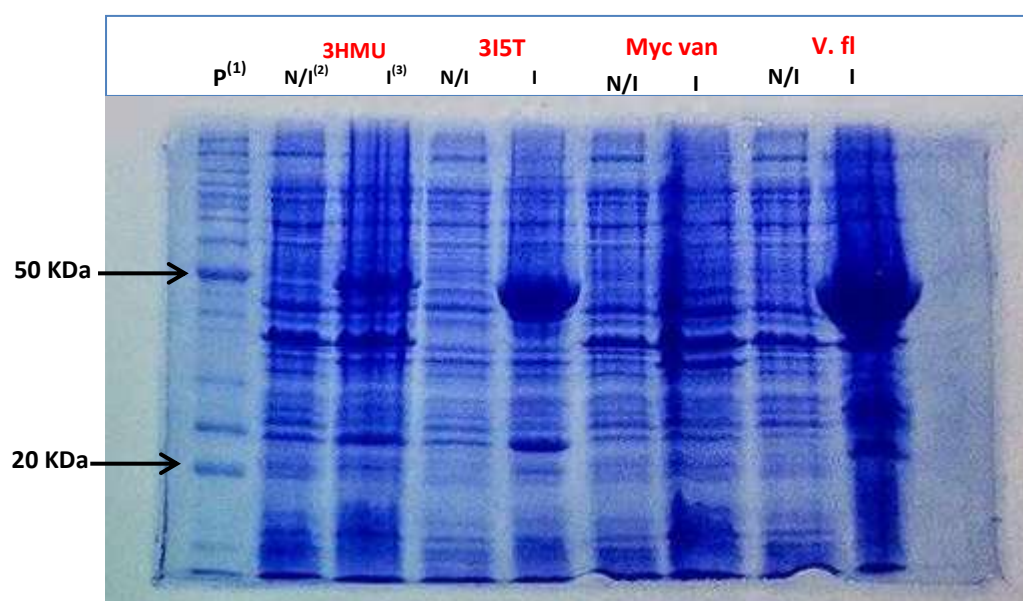
Curiosamente, o cromatograma da reação revelou que além da atividade ω -transaminase, os micro-organismos se mostraram capazes de reduzir a acetofenona formada na reação de transaminação no álcool correspondente, o 1-feniletanol, que aparece no cromatograma com um tempo de retenção de 10,5 minutos. Uma hipótese para justificar a formação do 1-feniletanol seria a presença de enzimas álcool desidrogenases catalisando a redução da acetofenona. Isso não pôde ser observado nas reações anteriores provavelmente em função da elevada concentração de substratos que foi empregada, o que provavelmente causou a inibição dessas enzimas. A redução da acetofenona ao seu álcool correspondente é interessante uma vez que promove sua remoção do meio reacional, reduzindo assim, a inibição provocada por essa substância nas ω -transaminases, e ao mesmo tempo contribui para o deslocamento do equilíbrio da reação, já que um dos produtos formados, no caso a acetofenona, está sendo consumido. A conversão da (S)-feniletilamina em acetofenona pelos micro-organismos MLH 15 e MLH 51 nessas novas condições de reação foi de 8,25 % e 8,56 % respectivamente. Os valores de conversão são mais baixos comparados àqueles encontrados anteriormente para as reações empregando uma razão molar piruvato de sódio:(S)-feniletilamina 1:10. Essa diferença nos valores de conversão se explica pela redução da acetofenona a 1-feniletanol.

4.2 Análise da expressão de ω -transaminases (R) e (S)-seletivas

A expressão das enzimas ω -transaminase em células de *E. coli* foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e posteriormente por *Western blot*. As Figuras 21 e 22 apresentam o perfil eletroforético das proteínas do extrato total. Os extratos celulares foram submetidos à análise em gel de poliacrilamida antes da indução (N/I), e após a indução (I). A Tabela 8 contém informações a respeito do peso molecular e especificidade das enzimas que foram expressas.

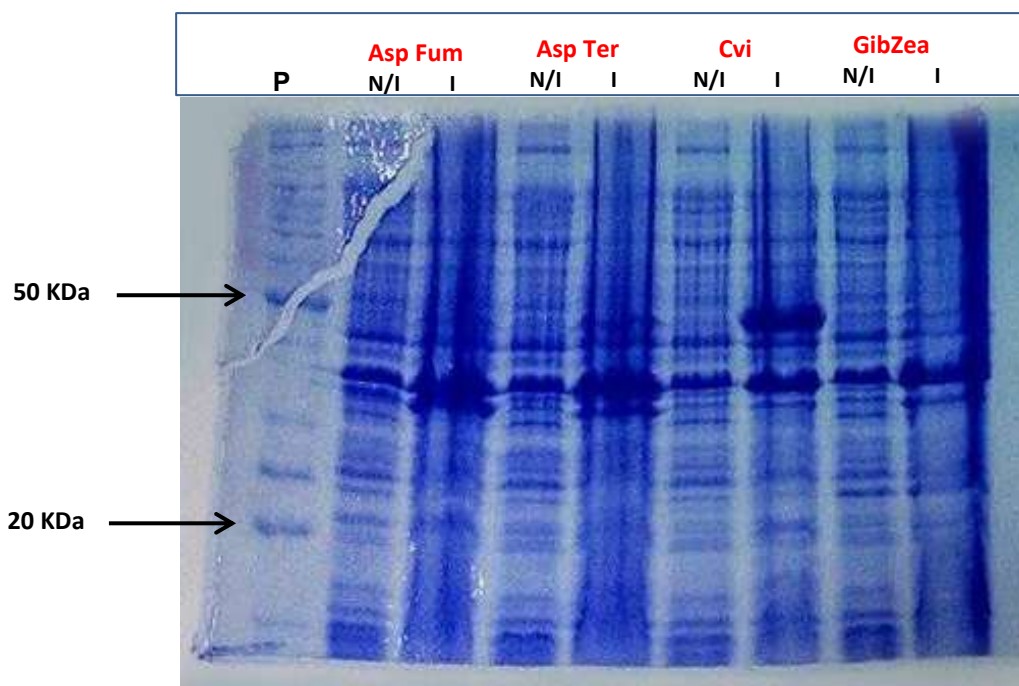
Tabela 8 - Massa molecular e especificidade das enzimas expressadas em *E. coli*.

Seletividade	Nome	Espécie	Massa Molecular (kDa)
(R)-Seletiva	AspFum	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	37,1
	AspTer	<i>Aspergillus terreus</i>	37,1
	GibZea	<i>Gibberella zeae</i>	37,9
	MycVan	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	37,7
(S)-Seletiva	3HMU	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	51,8
	3I5T	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	51,4
	Vfl	<i>Vibrio fluvialis</i> JS17	52,7
	Cvi	<i>Chromobacterium violaceum</i>	53,5

Figura 21 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) do extrato de *E. coli* transformada com plasmídeos contendo genes sintéticos de ω -transaminases antes da indução (N/I) e após indução (I).

- (1) P: Padrão de massa molecular
 (2) N/I: Não Induzido
 (3) I: Induzido

Figura 22 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) do extrato de *E. coli* transformada com plasmídeos contendo genes sintéticos de ω -transaminases antes da indução (N/I) e após indução (I).



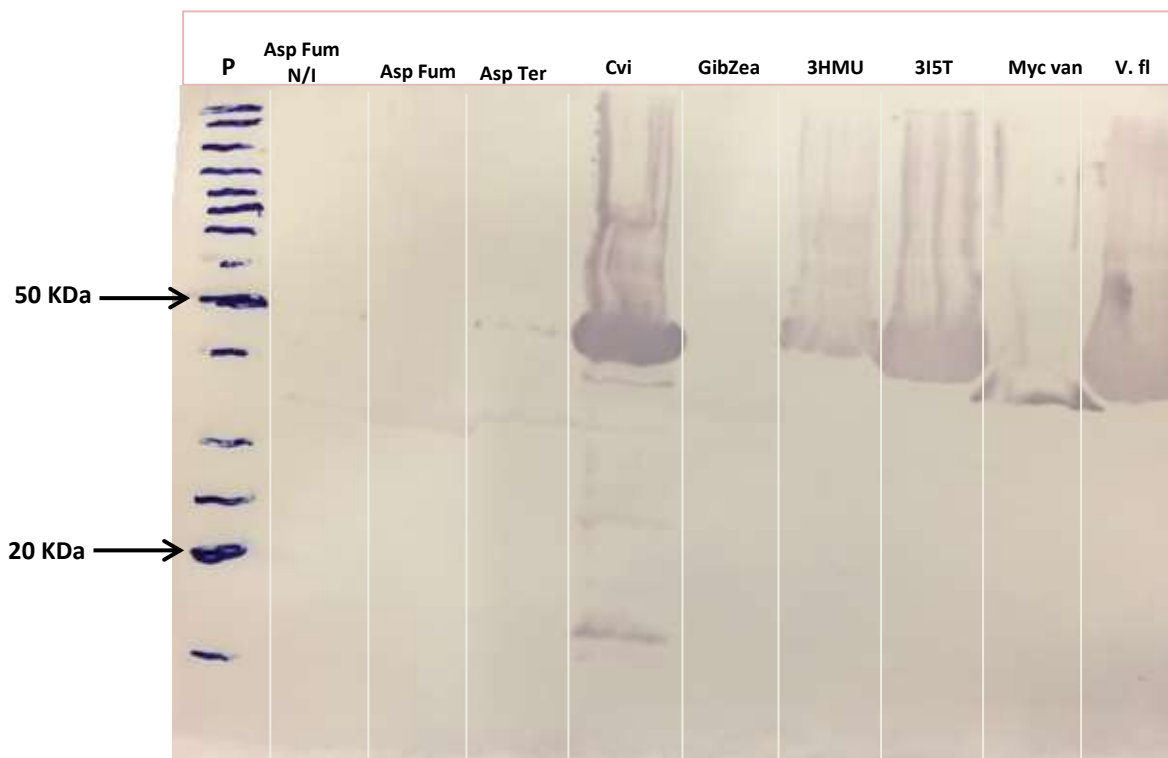
Analisando o perfil eletroforético do extrato celular induzido e não induzido, é possível visualizar as bandas referentes às ω -transaminases na região de 50 KDa e 30 KDa. As enzimas provenientes dos micro-organismos *Rhodobacter sphaeroides*, *Vibrio fluvialis JS17*, *Ruegeria pomeroyi* e *Chromobacterium violaceum*, apresentaram bandas mais proeminentes quando comparadas às ω -transaminases dos demais micro-organismos.

Para a confirmação da expressão das enzimas de interesse, as frações proteicas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e o *Western Blot* foi realizado na tentativa de detectar a ω -transaminase pela ligação do anticorpo anti-His à cauda de poli histidina da enzima.

A análise por *western blot* permite visualizar somente as enzimas que possuem uma cauda de histidina. O anticorpo anti-histidina se liga à proteína que se pretende detectar, neste caso a ω -transaminase, formando um complexo anticorpo-proteína que pode ser visualizado pela adição de um substrato cromogênico. Assim, a identidade das ω -transaminases pôde ser confirmada utilizando o anticorpo anti-His.

A análise dos extratos celulares por *western blot* é apresentada na Figura 23.

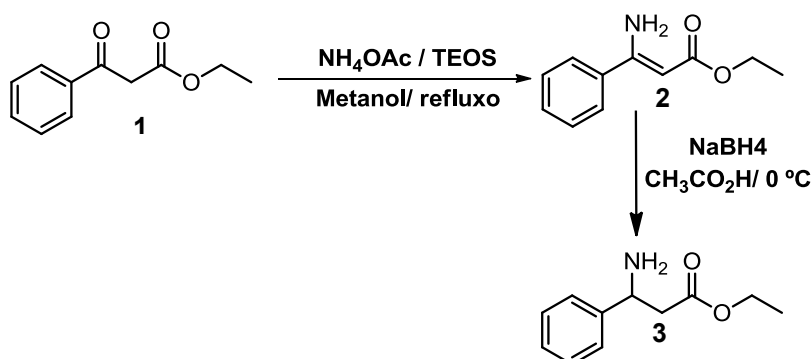
Figura 23 - Western blot de extratos de *E. coli* transformados com plasmídeos contendo genes de ω -transaminases .



O resultado da análise por *western blot* foi condizente com o observado na eletroforese em *SDS-PAGE* confirmando que supostamente houve uma produção mais acentuada das enzimas provenientes dos micro-organismos *Rhodobacter sphaeroides*, *Vibrio fluvialis* JS17, *Ruegeria pomeroyi* e *Chromobacterium violaceum*. Por outro lado, as células transformadas contendo o gene das (*R*)- ω -transaminases oriundas dos micro-organismos *Aspergillus fumigatus* Af293, *Aspergillus terreus* e *Gibberella zeae* aparentemente não exibiu expressão significativa.

4.3 Síntese e purificação do padrão 3-amino-3-fenilpropanoato de etila

A síntese do padrão racêmico 3-amino-3-fenilpropanoato de etila foi planejada a partir do benzoilacetato de etila.

Esquema 13 - Rota sintética para obtenção do β -aminoéster 3-amino-3-fenilpropanoato de etila.

O composto **2**, precursor do 3-amino-3-fenilpropanoato de etila (**3**) foi obtido com 70 % de rendimento após a etapa de purificação e caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C monodimensionais (Apêndices A e B, p. 93).

O espectro de RMN de ^1H apresentou um simpleto largo em δ_{H} 1,60 indicativo de hidrogênio ligado a nitrogênio, e um simpleto em δ_{H} 4,98 integrando para 1 hidrogênio (H-2) ligado ao carbono sp^2 C-2. Esses 2 sinais evidenciam a formação do β -enaminoéster 3-amino-3-fenilacrilato de etila a partir do benzoilacetato de etila. O espectro de ^1H apresentou ainda um quadrupeto em δ_{H} 4,20, $J = 7,1$ Hz e um tripleto em δ_{H} 1,32, $J = 7,1$ Hz referentes aos hidrogênios H-10 e H-11 respectivamente. Os multipletos centrados em δ_{H} 7,56 e 7,42 são referentes aos hidrogênios aromáticos H-5/H-9, H-6, H-7 e H-8.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 9 sinais, sendo que os sinais de maior amplitude em δ_{C} 126,16 e δ_{C} 128,84 foram atribuídos aos pares de carbonos C-5/C-9 e C-6/C-8 do anel aromático. Em δ_{C} 170,45 verifica-se o sinal referente ao carbono carboxílico C-1.

Esses dados espectroscópicos em conjunto permitiram concluir que o 3-amino-3-fenilacrilato de etila foi obtido com sucesso. Assim, prosseguimos para a segunda etapa de síntese na qual a ligação dupla do β -enaminoéster (**2**) seria submetida à redução na presença de borohidreto de sódio em ácido acético glacial.

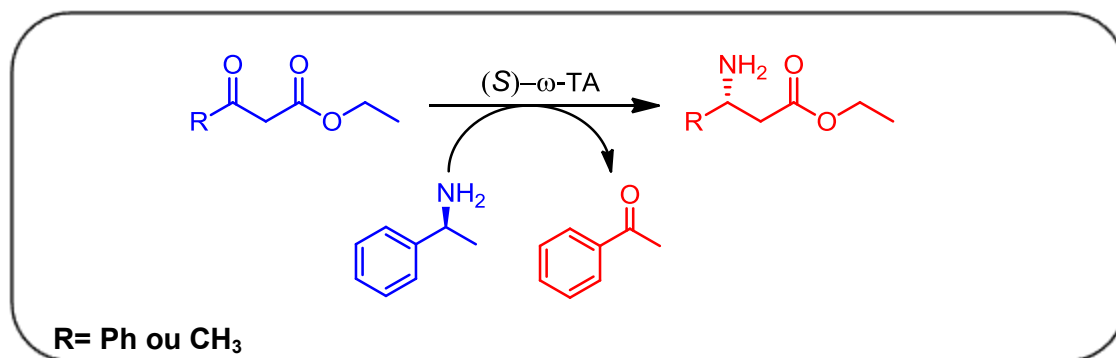
Ao término da reação, o produto 3-amino-3-fenilpropanoato de etila foi obtido com 64 % de rendimento bruto. A etapa de purificação por CCD não foi suficiente para garantir um alto grau de pureza, assim, o produto foi caracterizado somente por GC-MS. O espectro de massas confirmou a formação do produto pela presença de seu íon molecular m/z 193 e dos fragmentos característicos m/z 134, 106, 91 e 77. (Apêndice C, p. 94).

4.4 Perfil das reações com ω -transaminase comercial

A ω -transaminase comercial foi empregada como modelo com a finalidade de otimizar as condições reacionais antes de proceder às reações com os extratos enzimáticos. A enzima comercial foi primeiramente submetida a um ensaio para averiguar a medida de sua atividade enzimática. Para tanto, considerou-se que 1 unidade de atividade corresponde à quantidade de enzima que produz 1 μmol de acetofenona por minuto em 100 mM de tampão fosfato (pH 7,5) contendo 10 mM de (R) ou (S)-feniletilamina, 10 mM de piruvato, 0,4 mM de PLP e 1 mg de ω -transaminase. A enzima em questão apresentou atividade equivalente a 0,4 U/mg.

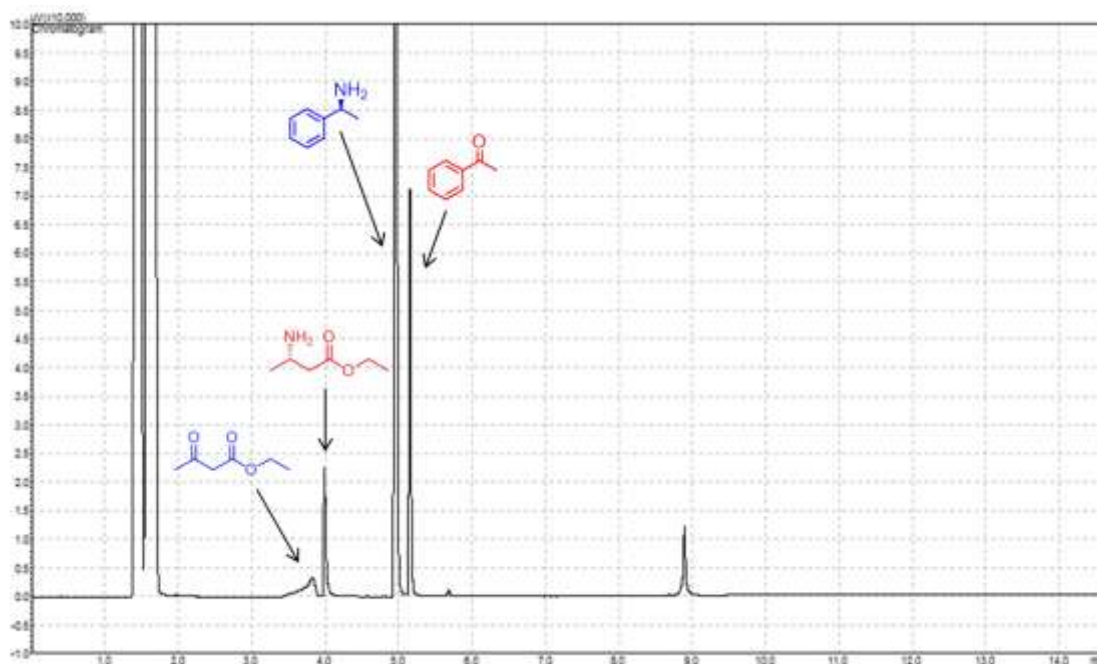
Ensaio controle para averiguar a reatividade dos substratos acetoacetato de etila e benzoilacetato de etila na ausência da enzima também foram realizados conforme descrito no tópico 3.18.1, p. 51. Todavia, em nenhum dos ensaios detectou-se a formação dos produtos de interesse, assim, após a otimização das condições reacionais prosseguimos para as reações de aminação assimétrica utilizando a enzima comercial (Esquema 13).

Esquema 14 - Aminoação assimétrica dos substratos acetoacetato de etila e benzoilacetato de etila.



A análise do cromatograma da reação empregando o acetoacetato de etila como aceptor de amina revelou a formação de um produto que aparece em um tempo de retenção de aproximadamente 3,97 minutos (Figura 24). Uma análise realizada por GC-MS (Apêndice E, p. 95) confirmou a formação do β -aminoéster 3-aminobutanoato de etila dada a presença de seu íon molecular m/z 131 e de fragmentos característicos dessa molécula.

Figura 24 - Cromatograma obtido por GC-FID (Método 2) para a reação de síntese assimétrica utilizando ω -TA comercial: (S)-FEA (100 mM); acetoacetato de etila (30 mM), PLP (1 mM).



A reação com o acetoacetato de etila se mostrou promissora apresentando uma conversão de 86 %, ao passo que na reação empregando o benzoilacetato de etila não se observou a formação do produto de interesse.

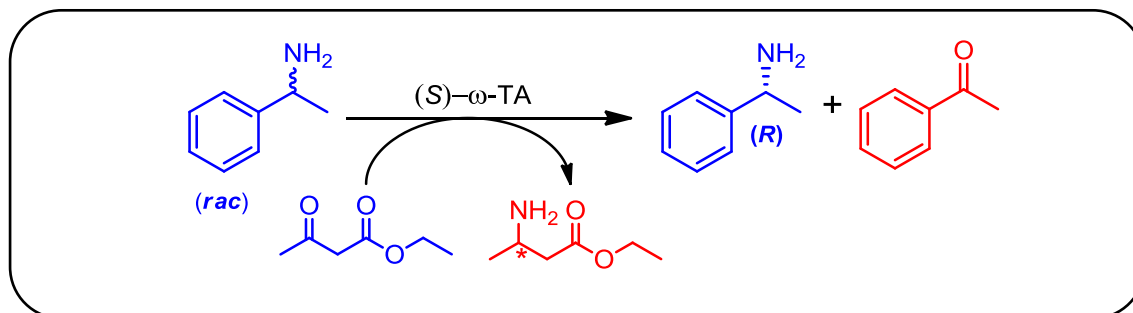
A diferença de reatividade observada entre os β -cetoésteres testados pode ser explicada com base no postulado de Shin, G. e Kim (2002) que propõe um modelo de sítio catalítico para ω -transaminases contendo 2 sítios ligantes. Esses sítios ligantes são constituídos por 2 bolsões (Figura 6, p. 28), um grande e um pequeno, sendo que o bolsão menor não é capaz de acomodar uma cadeia lateral maior do que um grupo etila, enquanto o bolsão maior, é responsável por acomodar o grupo carbonílico da molécula, que, em se tratando dos β -cetoésteres corresponde ao grupo éster. O modelo apresentado por Shin, G. e Kim, explica a elevada atividade enzimática observada quando o acetoacetato de etila é empregado, uma vez que este substrato possui uma cadeia lateral pequena. Por outro lado, a ausência de atividade observada quando o benzoilacetato de etila é utilizado, está relacionada à sua cadeia lateral, um anel aromático, que é muito grande para ser acomodado no bolsão menor da enzima.

Infelizmente não foi possível determinar o excesso enantiomérico do β -aminoéster formado uma vez que a coluna quiral disponível não se mostrou eficiente

para a separação dos enantiômeros relativos a essa substância.

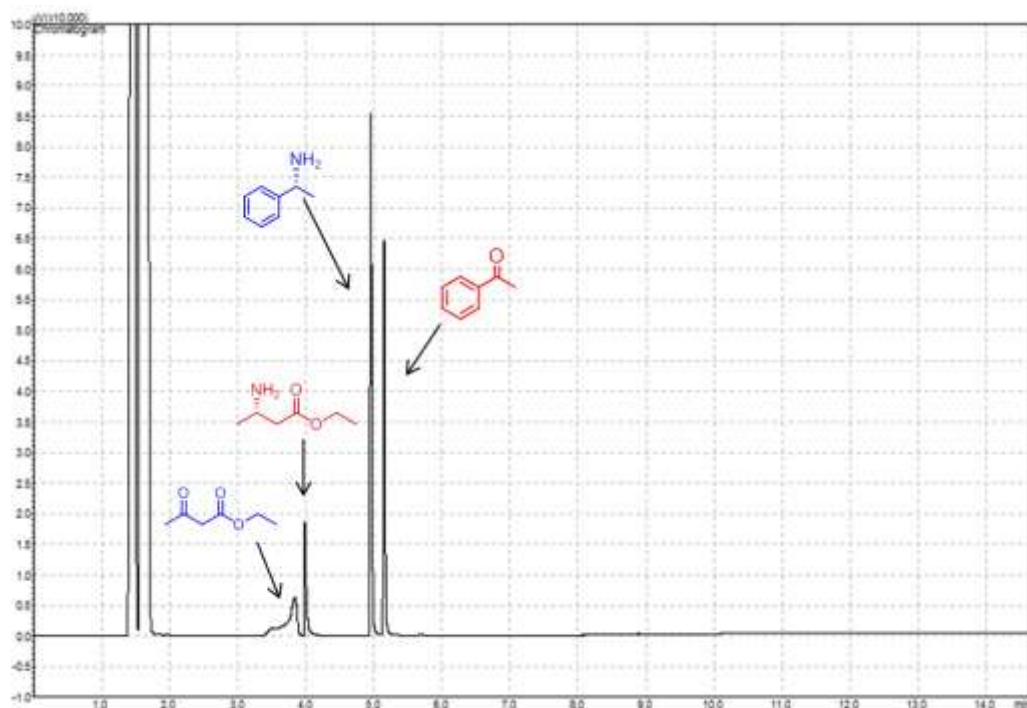
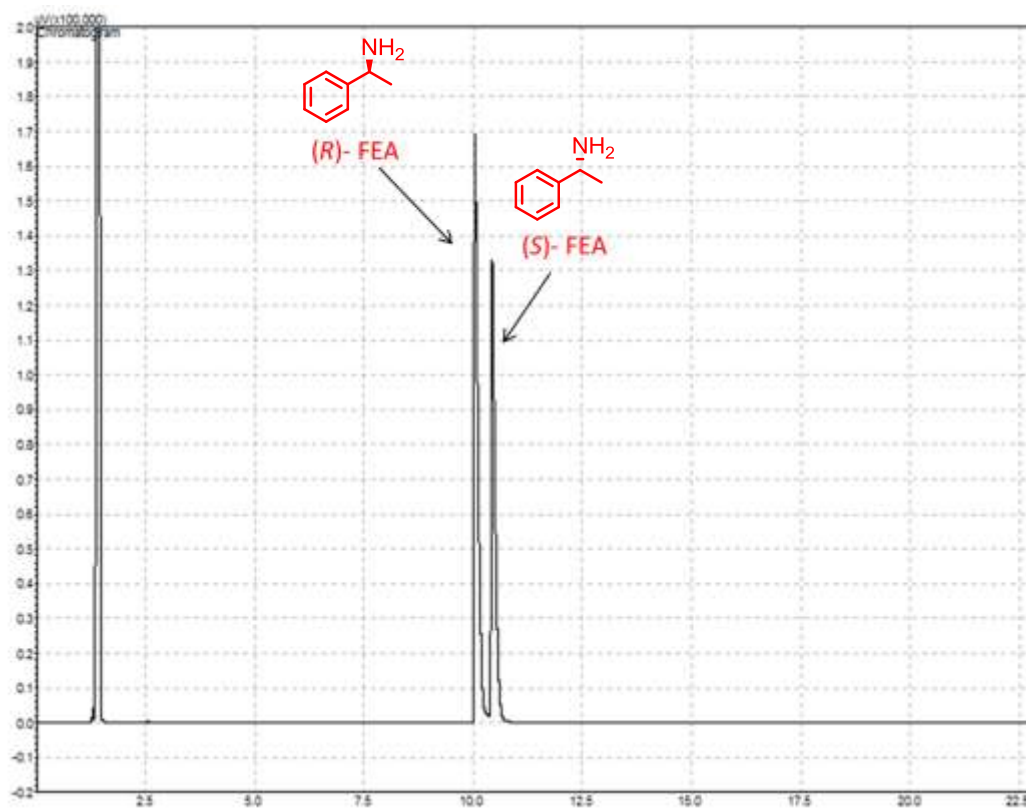
Tendo em vista os resultados preliminares obtidos nas reações de síntese assimétrica, a resolução cinética da (*rac*)-feniletilamina foi realizada utilizando-se apenas o acetoacetato de etila como aceptor de amina (Esquema 14).

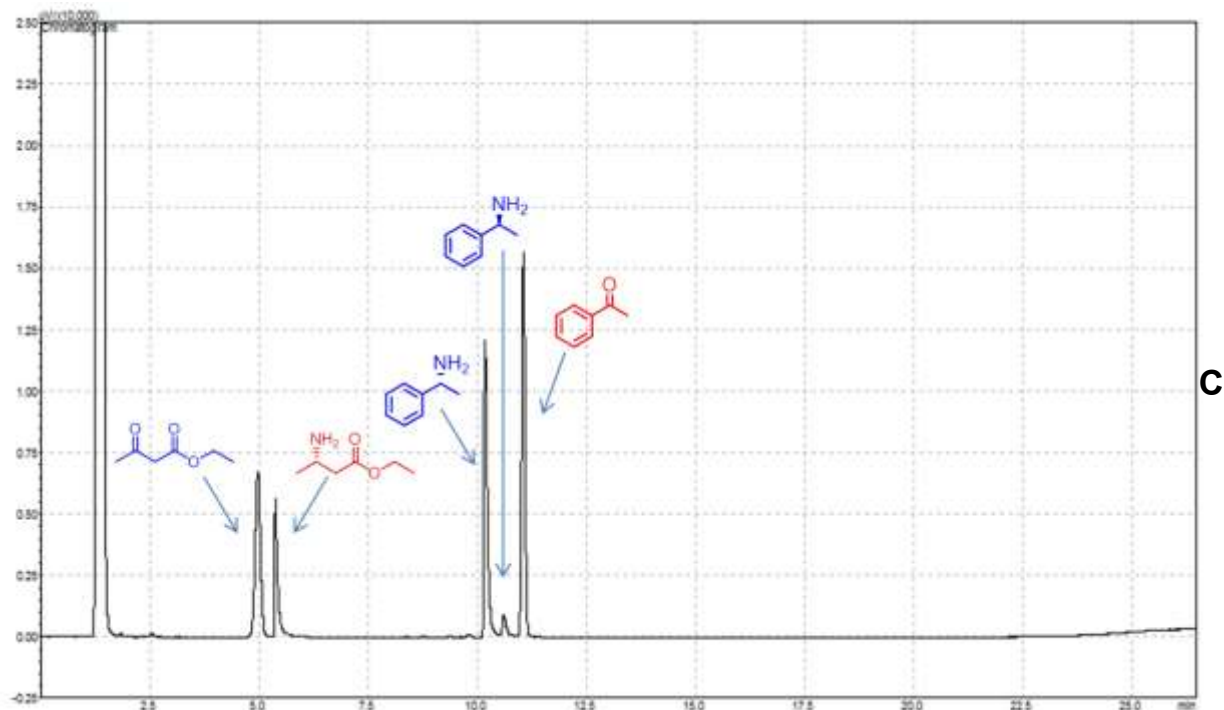
Esquema 15 - Resolução cinética da (*rac*)-Feniletilamina empregando enzima comercial.



O cromatograma A (Figura 25) apresenta o perfil obtido após a resolução cinética da (*rac*)-feniletilamina empregando a enzima comercial, onde foi possível alcançar a conversão máxima (50 %). A medida do excesso enantiomérico da feniletilamina foi determinada por cromatografia quiral. O cromatograma B (Figura 25) apresenta o perfil obtido para a separação dos enantiômeros desse composto, enquanto o cromatograma C (Figura 25) mostra a enantiosseletividade da ω -transaminase comercial na obtenção da (*R*)-feniletilamina com 88 % de ee.

Figura 25 - Perfil cromatográfico obtido após a resolução cinética da (*rac*)-FEA mediada por ω -TA (Cromatograma A), perfil cromatográfico obtido em fase estacionária quiral da (*rac*)-FEA (Cromatograma B), produto (*R*)-FEA com 88 % de ee (Cromatograma C).

**A****B**

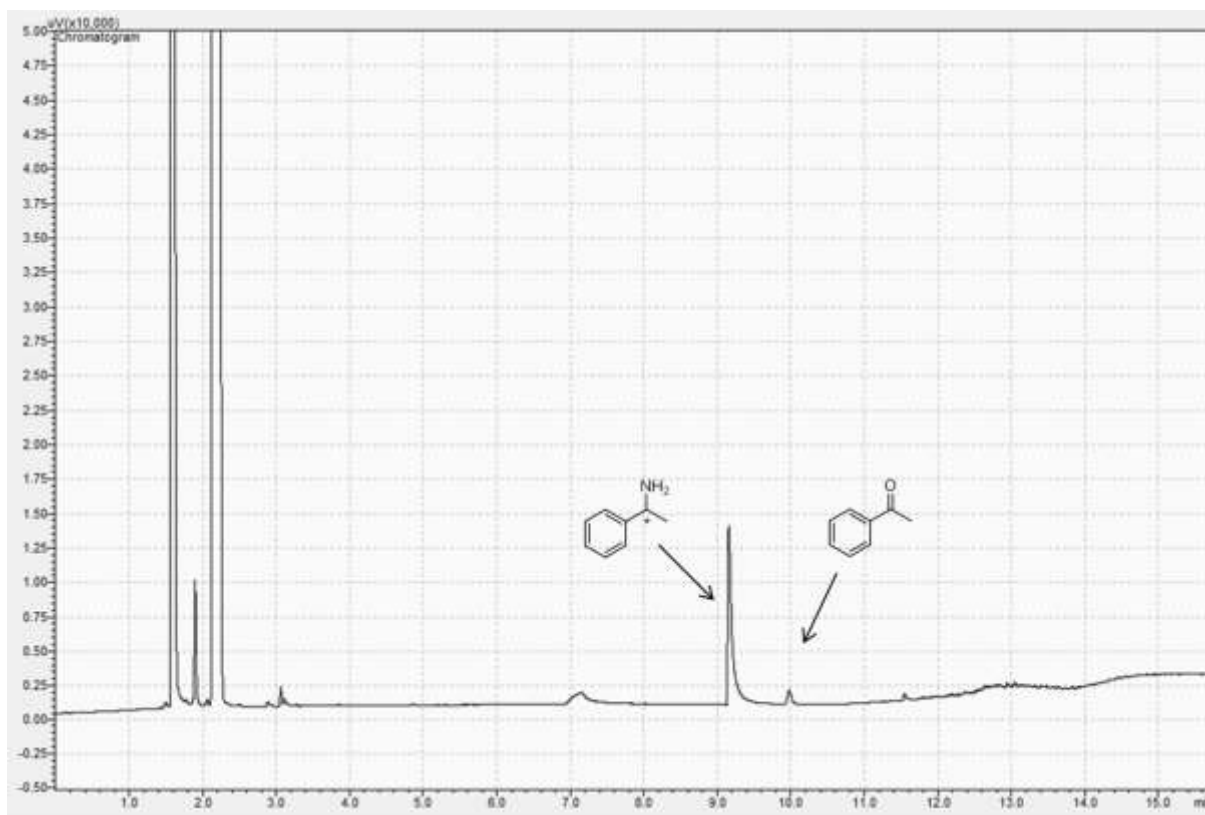


4.5 Perfil das reações empregando extratos enzimáticos

A partir dos resultados obtidos no estudo das reações de síntese assimétrica e resolução cinética empregando-se a ω -transaminase comercial, estabeleceu-se uma condição ótima que foi adotada para as reações utilizando os extratos enzimáticos.

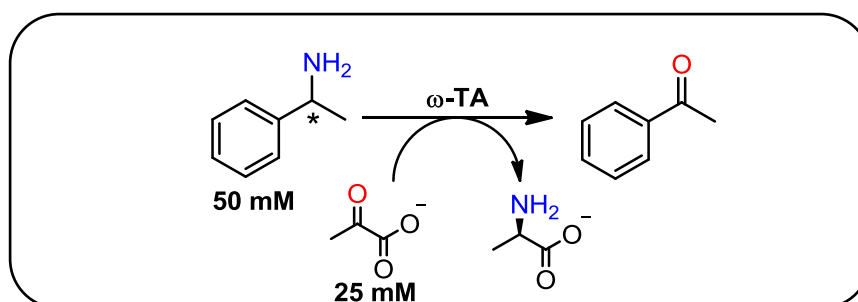
Antes de dar início às reações, foi realizado um ensaio controle conforme descrito no tópico 3.18.4, p. 53, a fim de verificar se o extrato de *E. coli* sem o plasmídeo recombinante possuía alguma atividade enzimática. Após a análise do cromatograma obtido para o ensaio controle, verificou-se que na ausência do plasmídeo recombinante, o extrato de *E. coli* não apresenta atividade ω -transaminase (Figura 26). Assim, prosseguimos dando início às reações empregando os extratos enzimáticos previamente preparados.

Figura 26 - Perfil cromatográfico obtido por GC-FID (método 3) para a reação controle utilizando extrato de *E. coli* sem plasmídeo: (*rac*)-FEA (100 mM); piruvato (25 mM), PLP (1mM).



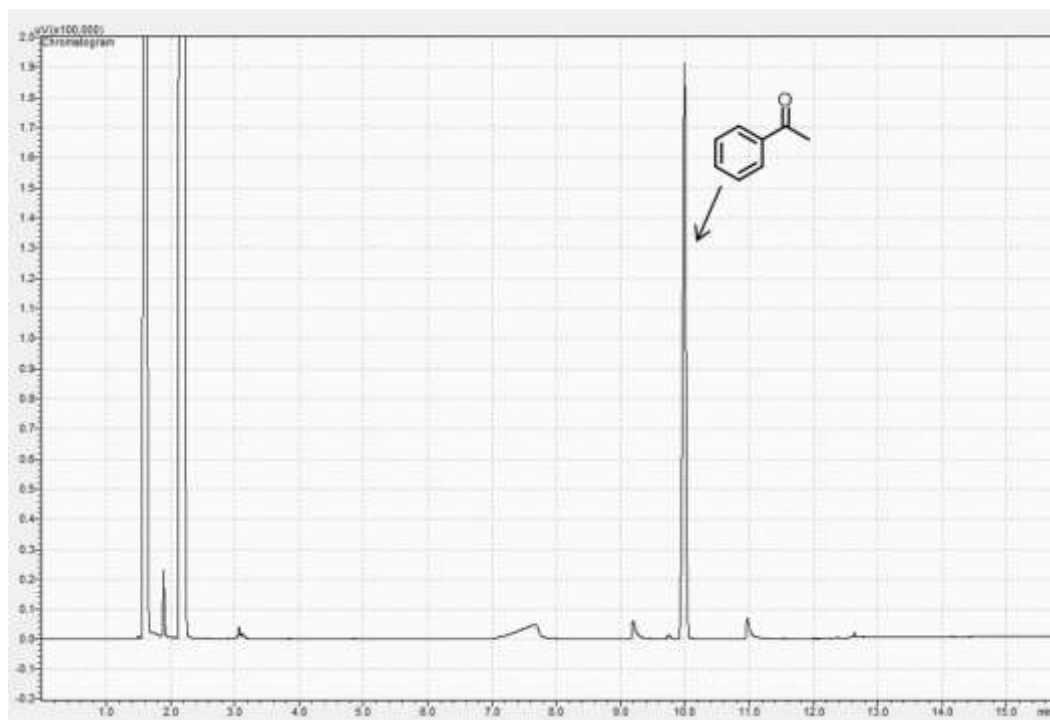
Num primeiro momento, a atividade enzimática dos extratos foi avaliada utilizando a (*R*)- ou (*S*)-feniletilamina (50 mM) como doador amino e o piruvato de sódio (25 mM) como aceptor (Esquema 15).

Esquema 15- Ensaio de atividade enzimática para os extratos contendo ω -transaminase.



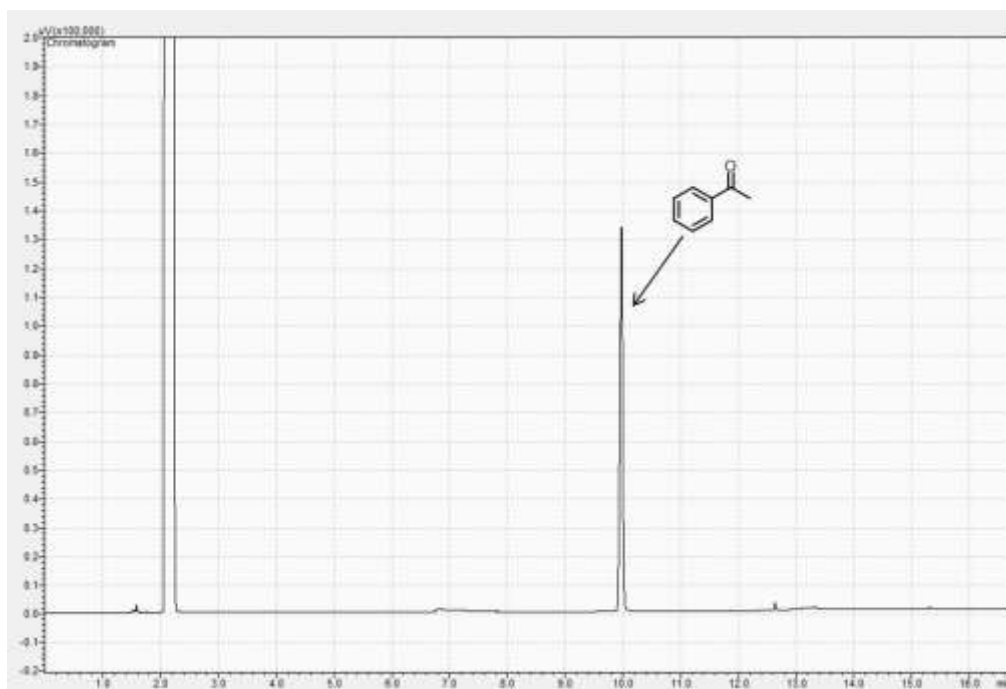
A análise do cromatograma obtido após a reação revelou um fato intrigante, uma vez que toda a feniletilamina utilizada na reação foi convertida a acetofenona (Figura 27), o que teoricamente não seria possível, visto que o substrato limitante da reação é o piruvato.

Figura 27 - Perfil cromatográfico obtido por GC- FID (Método 3) após o ensaio de atividade enzimática empregando extrato contendo ω -TA oriunda de *Asp. terreus*.



Uma hipótese para explicar o que poderia estar acontecendo durante a reação seria a presença de outro aceptor de amina além do piruvato, proveniente do próprio extrato enzimático. Esse outro aceptor poderia ser por exemplo o alfa cetoglutarato ou mesmo o próprio piruvato produzido pelo metabolismo da *E.coli*. Essa hipótese foi confirmada após a realização de um ensaio no qual a atividade do extrato enzimático foi avaliada utilizando somente a feniletilamina (50 mM) sem a adição de piruvato, e o que se observou foi a completa conversão da feniletilamina em acetofenona (Figura 28).

Figura 28 - Perfil cromatográfico obtido por GC-FID (Método 3) após o ensaio de atividade enzimática do extrato contendo ω -TA oriunda de *Asp. terreus* empregando somente a feniletilamina como substrato.



Uma vez confirmada a presença de um interferente nos extratos enzimáticos capaz de atuar como um aceptor de amina, surgiu a necessidade de se realizar uma pré-purificação desses extratos. A presença de um interferente seria um empecilho às reações com os substratos de interesse visto que poderia ocorrer uma competição entre eles pelo sítio ativo da enzima. A estratégia adotada para solucionar o problema, foi efetuar uma purificação prévia dos extratos enzimáticos por meio de diálise.

A diálise é um processo que consiste na separação de moléculas através de uma membrana semipermeável seletiva ao tamanho de partículas. A força motriz para a separação das moléculas é a diferença de concentração entre duas soluções em lados opostos da membrana. As partículas apresentando um diâmetro menor que o tamanho de poro da membrana, migram de forma passiva para a solução externa, enquanto as partículas maiores são retidas no interior da membrana (Figura 29).

Figura 29 - Uso da diálise na separação de moléculas grandes e pequenas.

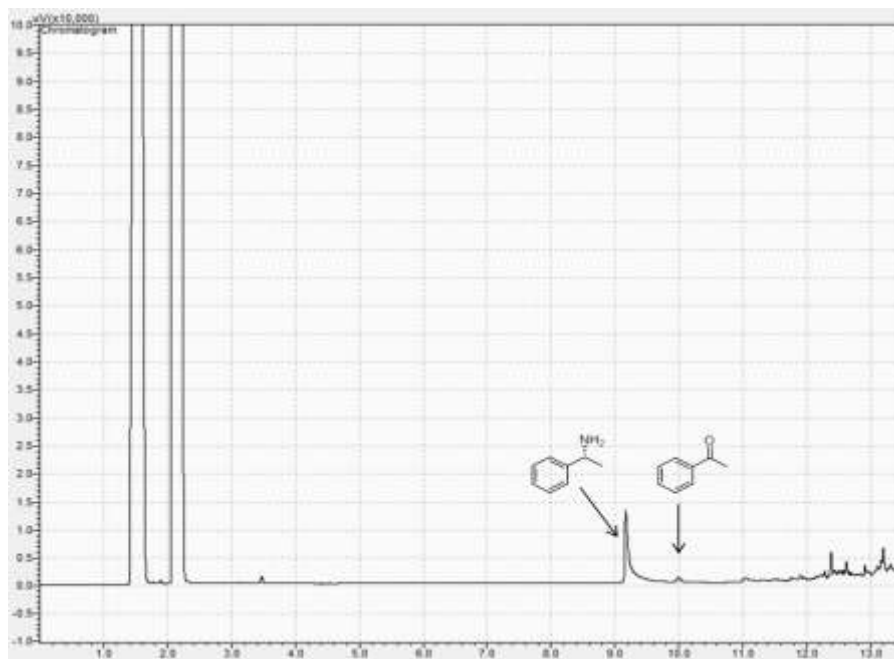


Fonte: Sivakumar, 2016.

Após a diálise, os extratos enzimáticos foram submetidos a um novo ensaio a fim de avaliar a eficiência da purificação como descrito no tópico 3.18.4. Cada um dos extratos foi testado frente à feniletilamina na ausência de piruvato, e as conversões foram monitoradas por GC-FID.

Os resultados obtidos no controle de diálise foram bastante satisfatórios, visto que foi possível reduzir significativamente a quantidade de interferente presente no extrato como pode ser observado no cromatograma obtido após o ensaio (Figura 30).

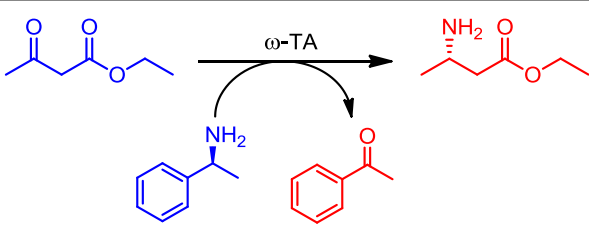
Figura 30 - Perfil cromatográfico obtido por GC- FID (Método 3) após a reação controle de diálise.



Após a purificação prévia dos extratos enzimáticos, um novo ensaio foi realizado para averiguar se o procedimento de diálise não acarretou em perda de atividade das enzimas. A análise dos dados obtidos após o ensaio comprovou que o processo de purificação não interferiu na atividade das ω -transaminases, e assim, prosseguimos para a etapa de reações utilizando os substratos acetoacetato de etila e benzoilacetato de etila.

Os oito extratos foram empregados primeiramente nas reações de síntese assimétrica, todavia, assim como nas reações utilizando a enzima comercial, os extratos enzimáticos também só foram capazes de aceitar o substrato acetoacetato de etila pelos motivos já discutidos anteriormente. O acetoacetato de etila foi bem aceito por todos os extratos avaliados exceto para o extrato contendo ω -transaminase oriunda de *Rhodobacter sphaeroides*. As conversões obtidas nas reações são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores de conversão (%) obtidos nas reações de síntese assimétrica mediadas por ω -TAs presentes nos extratos enzimáticos utilizando o acetoacetato de etila como substrato.



Seletividade	Espécie	Conversão (%) ^b
(R)-Seletiva	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	>99
	<i>Aspergillus terreus</i>	>99
	<i>Gibberella zeae</i>	84
	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	>99
(S)-Seletiva	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	>99
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	5
	<i>Vibrio fluvialis</i> JS17	>99
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	>99

^a Condições reacionais: (R) ou (S)-FEA (100 mM), acetoacetato de etila (30 mM), PLP, (1mM), extratos enzimáticos q.s.p 1,5 mL;

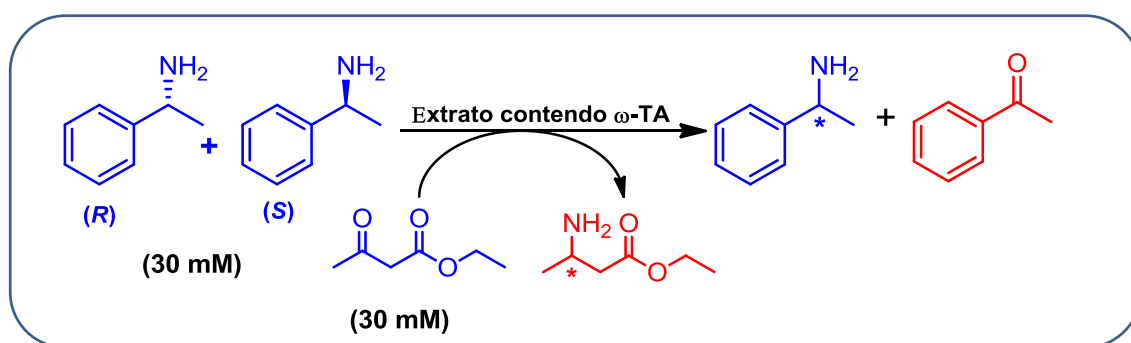
^b Determinado por GC-FID.

Como pode ser observado na Tabela 9, os resultados obtidos foram excelentes, visto que a maioria das enzimas avaliadas foi capaz de realizar a aminação redutiva do acetoacetato de etila com conversões > 99 %. Em estudos realizados por Mutti et al (2012) foi possível obter resultados semelhantes utilizando 3 diferentes enzimas, dentre elas uma ω -transaminase de *V. fluvialis*. No entanto, a aminação do acetoacetato de etila foi promovida utilizando a alanina como doador de amina, assim, era necessário remover o piruvato formado durante a reação visto que sua presença em altas concentrações prejudica o equilíbrio da reação e pode provocar a inibição da enzima. Para remover o piruvato do meio reacional, os pesquisadores empregaram um sistema enzimático acoplado utilizando as enzimas lactato desidrogenase (LDH) e alanina desidrogenase (AlaDH). Embora tenha sido possível obter elevadas conversões, a desvantagem em se utilizar esses sistemas enzimáticos acoplados está no custo gerado durante o processo. Em vista disso, a

metodologia empregada em nossos estudos onde a feniletilamina foi utilizada como doador de amina, se mostrou mais atrativa, uma vez que foi possível obter elevadas conversões sem a necessidade de enzimas adicionais.

A partir dos resultados observados nas reações de síntese assimétrica, os extratos enzimáticos foram testados nas reações de resolução cinética da (*rac*)-feniletilamina, empregando apenas o acetoacetato de etila como substrato (Esquema 15).

Esquema 16 - Resolução cinética da (*rac*)-FEA mediada por ω -TA dos extratos enzimáticos empregando acetoacetato de etila como aceptor de amina.



Os resultados das conversões e excessos enantioméricos são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de conversão (%) e ee (%) obtidos nas reações de resolução cinética da (*rac*)-FEA mediadas por ω -TAs presentes nos extratos enzimáticos utilizando o acetoacetato de etila como substrato.

Seletividade	Espécie	Conversão (%) ^b	ee (%) ^c
(R)-Seletiva	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	27	>99 (S)
	<i>Aspergillus terreus</i>	28	>99 (S)
	<i>Gibberella zeae</i>	48	>99 (S)
	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	48	>99 (S)
(S)-Seletiva	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	24	>99 (R)
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	23	52 (R)
	<i>Vibrio fluvialis</i> JS17	50	>99 (R)
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	50	>99 (R)

^a Condições reacionais: (*R*) ou (*S*)-FEA (30 mM), acetoacetato de etila (30 mM), PLP, (1mM), extratos enzimáticos q.s.p 1,5 mL;

^b Determinado por GC-FID;

^c Determinado por GC-FID com fase estacionária quiral.

Os melhores resultados de conversão foram obtidos a partir dos extratos enzimáticos contendo as ω -transaminases (S)-seletivas de *Vibrio fluvialis* JS17 e *Chromobacterium violaceum* ambas apresentando 50 % de conversão, e as ω -transaminases (R)-seletivas de *Gibberella zeae* e *Mycobacterium vanbaalenii* que apresentaram 48 % de conversão. A feniletilamina foi obtida com elevados excessos enantioméricos (ee > 99 %) em praticamente todas as reações, exceto na reação mediada por ω -transaminase oriunda de *Rhodobacter sphaeroides* (ee 52 %).

Considerando-se dados da literatura, as reações de resolução cinética mediadas por ω -transaminases são termodinamicamente mais favorecidas do que as reações de síntese assimétrica. Para essas últimas, a obtenção de elevadas conversões muitas vezes exige a adoção de estratégias com a finalidade de deslocar o equilíbrio reacional. Interessantemente, os resultados obtidos ao longo deste trabalho apresentaram melhores conversões nas reações de síntese assimétrica comparadas à resolução cinética.

De modo geral, as enzimas oriundas dos extratos enzimáticos preparados no laboratório apresentaram excelentes conversões para as reações de síntese assimétrica e elevados excessos enantioméricos em praticamente todas as resoluções cinéticas. Os resultados observados em ambas as reações utilizando os extratos enzimáticos foram melhores se comparados àqueles obtidos nas reações mediadas pela ω -transaminase comercial.

5.0 Conclusões

Os estudos apresentados neste trabalho tiveram como foco principal a preparação de β -aminoésteres enantiopuros valendo-se de reações enzimáticas mediadas por ω -transaminases (*R*) e (*S*)-seletivas.

Num primeiro momento, realizou-se a triagem em uma biblioteca de micro-organismos na busca por novas enzimas pertencentes a essa classe. A triagem resultou em 2 *hits* positivos (MLH 15 e MLH 51), ambos apresentando enzimas (*S*)-seletivas. A aminação assimétrica dos substratos β -cetoésteres empregando os micro-organismos MLH 15 e MLH 51 também foi avaliada, todavia, não se observou a formação dos produtos correspondentes.

A produção das ω -transaminases (*R*) e (*S*)-seletivas a partir de plasmídeos recombinantes foi realizada com sucesso e as enzimas produzidas apresentaram excelentes conversões (> 99 %) para as reações de síntese assimétrica e elevados excessos enantioméricos (> 99 %) em praticamente todas as reações de resolução cinética nas quais o acetoacetato de etila foi empregado como substrato. Em contrapartida, nas reações onde o benzoilacetato de etila foi empregado como aceptor de amina, não se observou a formação do produto de interesse.

Os resultados observados em ambas as reações utilizando os extratos enzimáticos foram melhores comparados àqueles obtidos nas reações mediadas pela ω -transaminase comercial, que apresentou conversões de 50 % (ee 88 %) e 86 % nas reações de resolução cinética e síntese assimétrica respectivamente.

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho são bastante promissores, e proporcionam uma nova via de acesso a (*R*) ou (*S*)- β -aminoésteres empregando condições reacionais brandas. Esses β -aminoésteres enantiopuros por sua vez, podem ser convertidos a β -aminoácidos a partir de metodologias simples como hidrólise em meio ácido ou básico, ou mediada por biocatalisadores como a lipase.

Somados a todos esses resultados, a triagem de novos biocatalisadores revelou o potencial dos micro-organismos selvagens em produzir ω -transaminases. Até o momento, poucos são os trabalhos desenvolvidos no Brasil envolvendo essa classe de enzimas, daí a importância de se buscar na biodiversidade brasileira micro-organismos capazes de produzir novas (*R*)- e (*S*)- ω -transaminases.

Por fim, o conjunto de dados obtidos neste trabalho contribuirá para futuras pesquisas envolvendo estratégias de síntese quimioenzimática aplicando essas enzimas.

Referências

- ABARZÚA, E. G. O.; ANDRADE, L. H.; VILLELA FILHO, M. Enzimas em síntese orgânica. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Org.). **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 349-368.
- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: principles and practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301-312, 2010.
- ANDRADE, L. H.; KROULTIL, W.; JAMISON, T. F. Continuous flow synthesis of chiral amines in organic solvents: immobilization of *E.coli* cells containing both ω -transaminase and PLP. **Organic Letters**, v. 16, p. 6092-6095, 2014.
- BERGLUND, P.; HUMBLE, M. S.; BRANNEY, C. C–X bond formation: transaminases as chiral catalysts: mechanism, engineering, and applications. **Comprehensive Chirality**, v. 7, p. 390-401, 2012.
- CARVALHO, P. O. et al. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.
- CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-1454, 2015.
- CLAY, D. et al. Testing of microorganisms for ω – transaminase activity. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, p. 2005-2009, 2010.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. Introdução. In: _____. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: EPUB, 2009. Cap. 1, p. 8-16.
- DIAGNOSTICO LABORATORIAL. **Immunoblot (western blotting-immunoblotting)**. 2010. Disponível em: <diagnosticolaboratorial.com/2010/06/14/western-blot/>. Acesso em: 20 ago. 2015.
- FERNANDES, P.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Biocatálise aplicada. In: LIMA, N.; MOTA, M. (Org.). **Biotecnologia**: fundamentos e aplicações. Lisboa: Lidel, 2003. p. 219-246.
- FESKO, K. et al. Enzymatic investigation of one-enzyme systems in the ω - transaminase-catalyzed synthesis of chiral amines. **Journal of Molecular Catalysis B**, v. 96, p. 103-110, 2013.
- GONÇALVES, C. C. S.; MARSAIOLI, A. J. Fatos e tendências da biocatálise. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1587-1590, 2013.
- GRYGORENKO, O. Bicyclic β -amino acids. **Tetrahedron**, v. 71. p. 5169-5216, 2015.

- 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.
- ILLANES, A. et al. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 48-57, 2012.
- JUARISTI, E.; SOLOSHONOK, V. A. **Enantioselective synthesis of beta-amino acids**. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005.
- KOSZELEWSKI, D. et al. Deracemization of mexiletine biocatalyzed by ω -transaminases. **Organic Letters**, v. 11, n. 21, p. 4810-4812, 2009.
- KOSZELEWSKI, D. et al. ω -Transaminases for the synthesis of non-racemic α -chiral primary amines. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 324-332, 2010.
- KROUTIL, W. et al. Asymmetric preparation of prim-, sec-, and tert-amines employing selected biocatalysts. **Organic Process Research & Development**, v. 17, p. 751-759, 2013.
- LILJEBLAD, A.; KANERVA, L. T. Biocatalysis as a profound tool in the preparation of highly enantiopure β -amino acids. **Tetrahedron**, v. 62, p. 5831-5854, 2006.
- LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 229-245, 1999.
- ŁYSKOWSKI, A. et al. Crystal structure of an (*R*)-selective ω -transaminase from *Aspergillus terreus*. **PLoS One**, v. 9, n. 1, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0087350.
- MALIK, M. S.; PARK, E. S.; SHIN, J.- S. Features and technical applications of ω -transaminases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 5, p. 1163-1171, 2012.
- MATHEW, S.; YUN, H. ω -Transaminases for the production of optically pure amines and unnatural amino acids. **ACS Catalysis**, v. 2, n. 6, p. 993-1001, 2012.
- MATHEW, S. et al. Production of chiral β -amino acids using ω -transaminase from *Burkholderia graminis*. **Journal of Biotechnology**, v. 196/197, p. 1-8, 2015.
- MOORE, J. C.; BORNSCHEUER, U. T. Editorial overview: biocatalysis and biotransformation: riding the third wave of biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, p. 1-2, 2014.
- MUTTI, F. G. et al. Amination of ketones by employing two new (*S*)-selective ω -transaminases and the his-tagged ω -TA from *Vibrio fluvialis*. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 5, p. 1003-1007, 2012.
- OJIMA, I.; LIN, S.; WANG, T. Recent advances in the medicinal chemistry of taxoids with novel beta-amino acid side chains. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 927-954, 1999.

- OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.
- PÄIVIÖ, M.; KANERVA, L. T. Reusable ω -transaminases sol-gel catalyst for preparation of amine enantiomers. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1488-1494, 2013.
- 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.
- REIS, J. S.; SIMON, R. C.; KROUTIL, W. ANDRADE, L. H. Asymmetric reductive amination of boron-containing aryl-ketones using ω -transaminases. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 24, p. 1495-1501, 2013.
- RUDAT, J.; BRUCHER, B. R.; SYLDATK, C. Transaminases for the synthesis of enantiopure beta-amino acids. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2012.
- SEEBACH, D.; MATTHEWS, J. L. Beta-peptides: a surprise at every turn. **Chemical Communications**, n. 2, p. 2015-2022, 1997.
- SHIN, G.; MATHEW, S.; YUN, H. Kinetic resolution of amines by (*R*)-selective omega-transaminase from *Mycobacterium vanbaalenii*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 23, p. 128-133, 2015.
- SHIN, G. et al. One-pot one-step deracemization of amines using ω -transaminases. **Chemical Communications**, v. 49, n. 77, p. 8629-8631, 2013.
- SHIN, J.-S.; KIM, B. G. Comparison of the omega-transaminases from different microorganisms and application to production of chiral amines. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 8, p. 1782-1788, 2001.
- SHIN, J.-S.; KIM, B.-G. Exploring the active site of amine: pyruvate aminotransferase on the basis of the substrate structure-reactivity relationship: how the enzyme controls substrate specificity and stereoselectivity. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 9, p. 2848-2853, 2002.
- SIMON, R. C. et al. Recent developments of cascade reactions involving ω -transaminases. **ACS Catalysis**, v. 4, n. 1, p. 129-143, 2014.
- SIVAKUMAR, S. **Protein isolation and purification**. Kanchipuram. Disponível em: <biosiva.50webs.org/proiso.htm>. Acesso em: 20 jan. 2016.
- THOMSEN, M. et al. Crystallographic characterization of the (*R*)-selective amine transaminase from *Aspergillus fumigatus*. **Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography**, v. 70, p. 1086-1093, 2014.
- TRUPPO, M. D. et al. Rapid screening and scale-up of transaminase catalysed reactions. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 395-398, 2009.

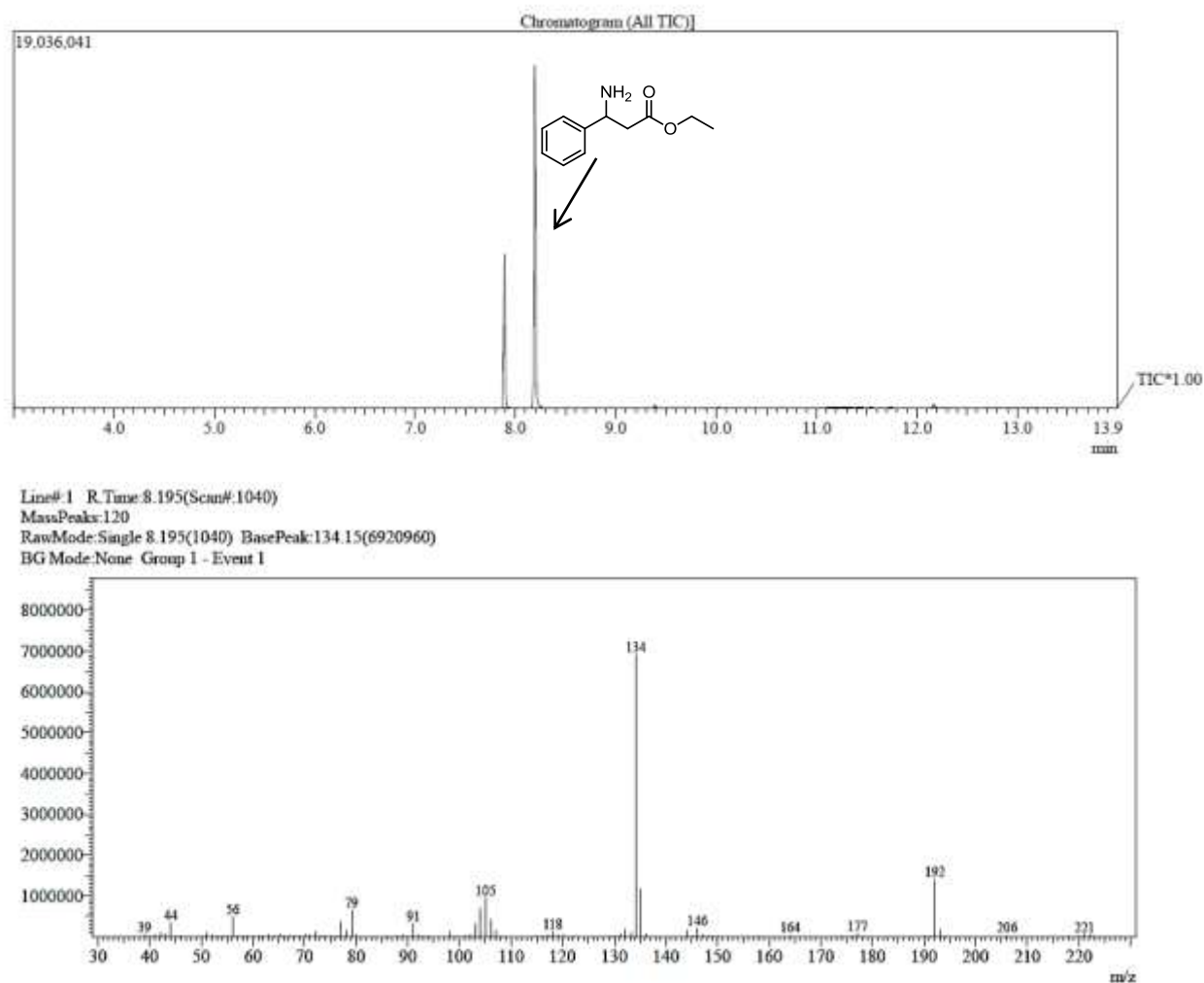
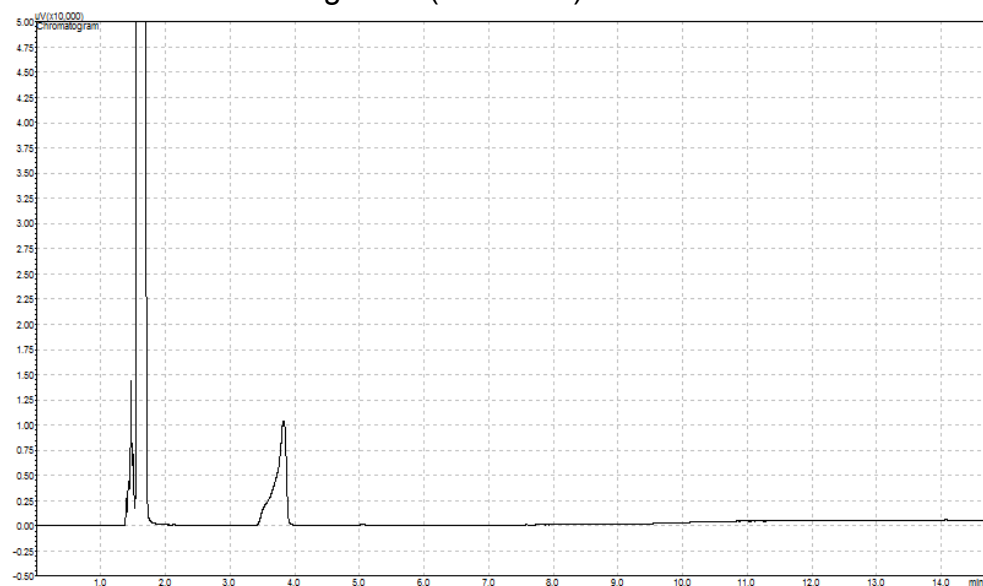
TURNER, N. J.; TRUPPO, M. D. Biocatalytic routes to nonracemic chiral amines. In: NUGENT, T. C. **Chiral amine synthesis**: methods, developments and applications. Weinheim: Wiley-VHC, 2010. Chap. 14, p. 432-457.

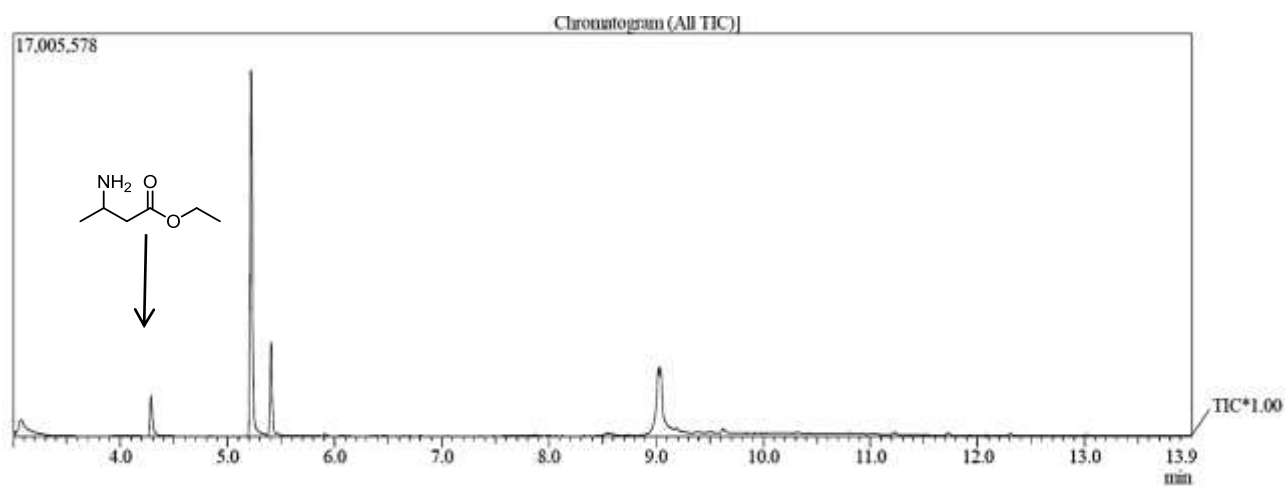
WOHLGEMUTH, R. Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 713-724, 2010.

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

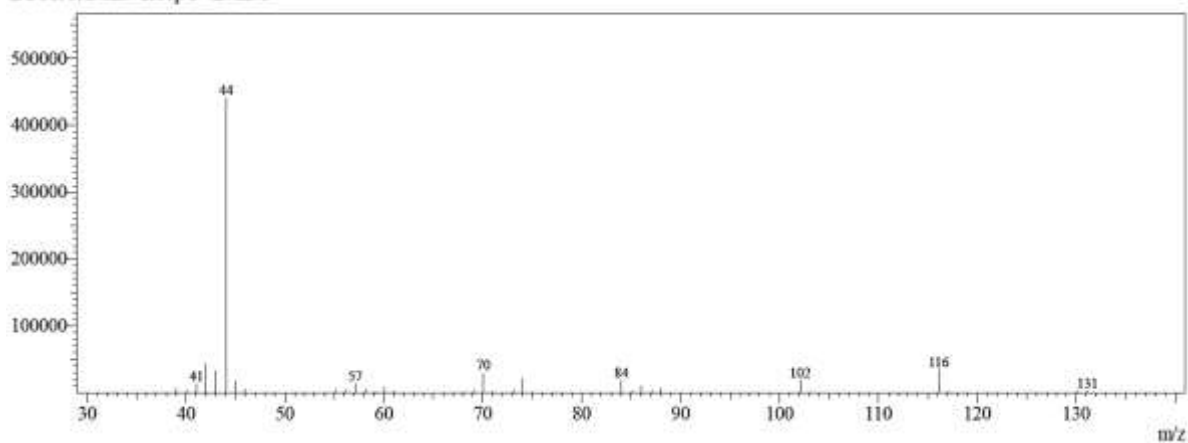
ZHAO, Y. et al. Efficient synthesis of β -amino- α,β -unsaturated carbonyl compounds. **New Journal of Chemistry**, v. 29, p. 769-772, 2005.

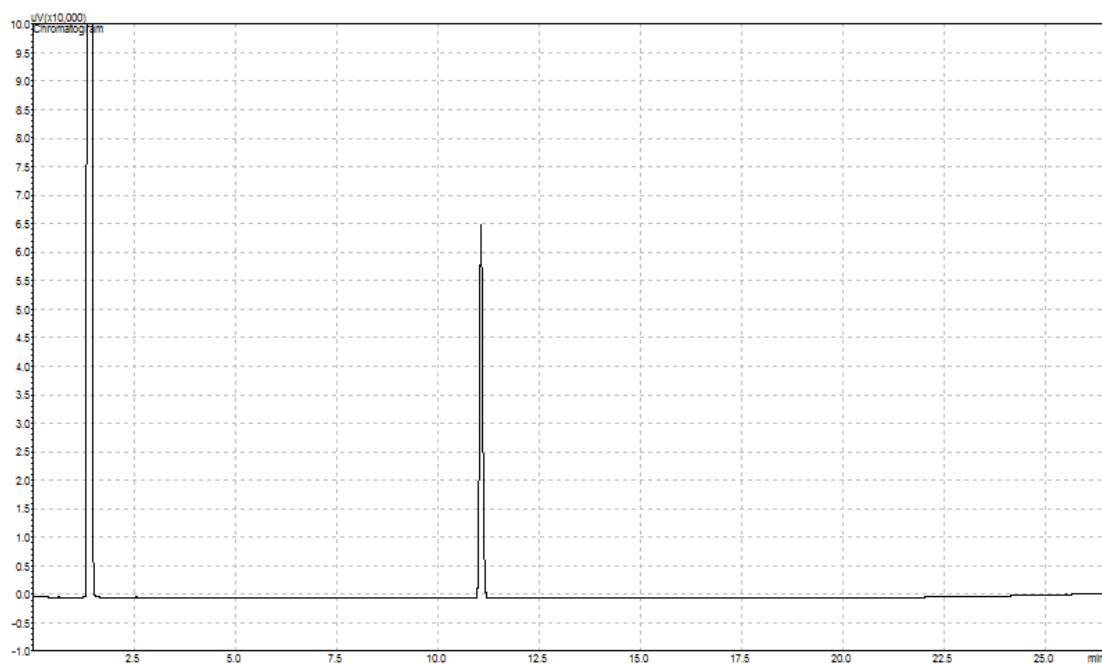
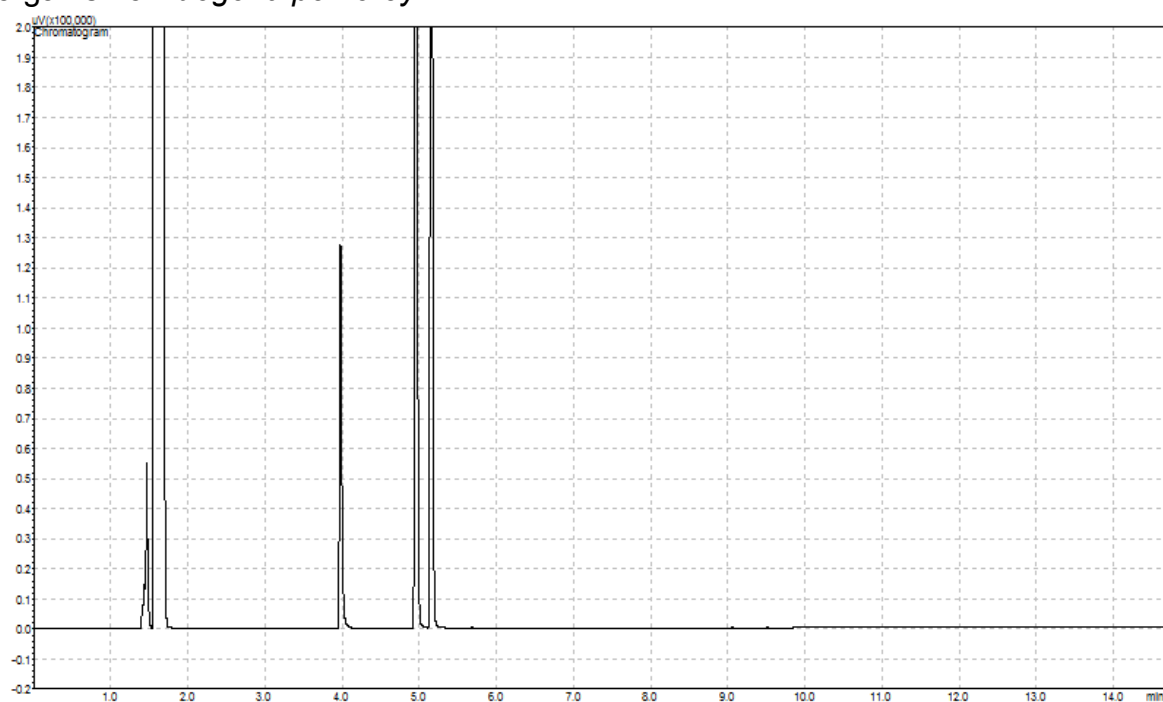
ZHENG, G.-W.; XU, J.-H. New opportunities for biocatalysis: driving the synthesis of chiral chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 784-792, 2011.

APÊNDICE C – GC-MS do padrão 3-amino-3-fenilpropanoato de etila.**APÊNDICE D – Perfil cromatográfico (método 2) do substrato acetoacetato de etila.**

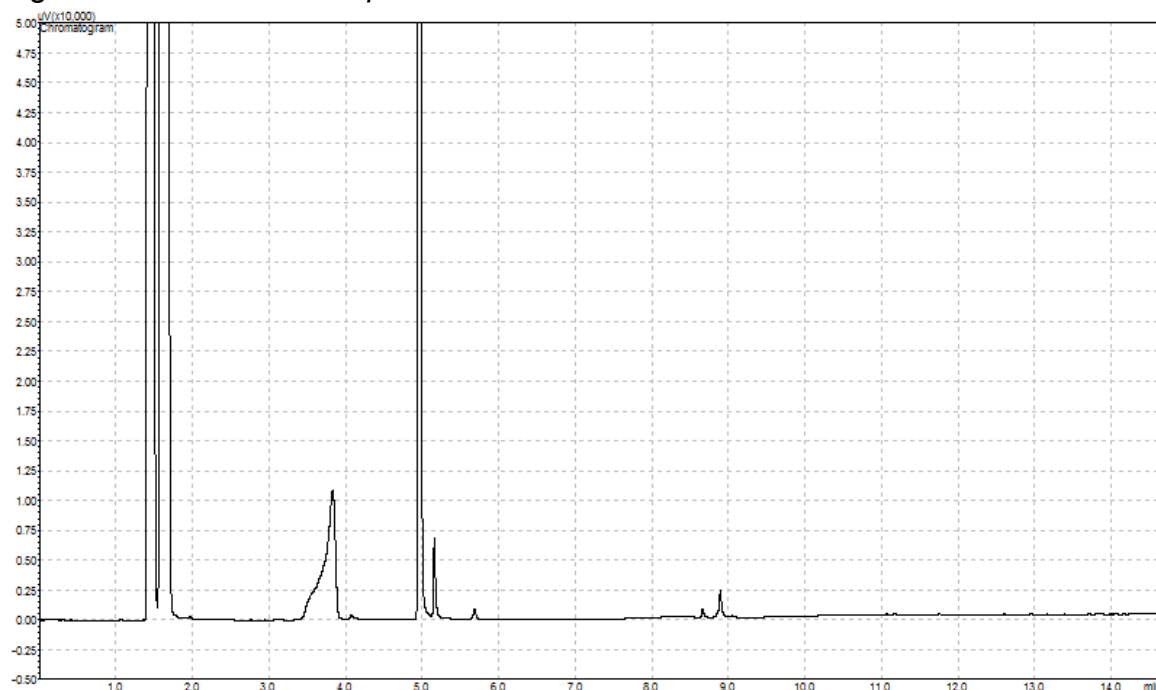
APÊNDICE E – GC-MS do produto 3-aminobutanoato de etila.

Line#:1 R.Time:4.300(Scan#:261)
MassPeaks:33
RawMode:Single 4.300(261) BasePeak:44.05(441376)
BG Mode:None Group 1 - Event 1

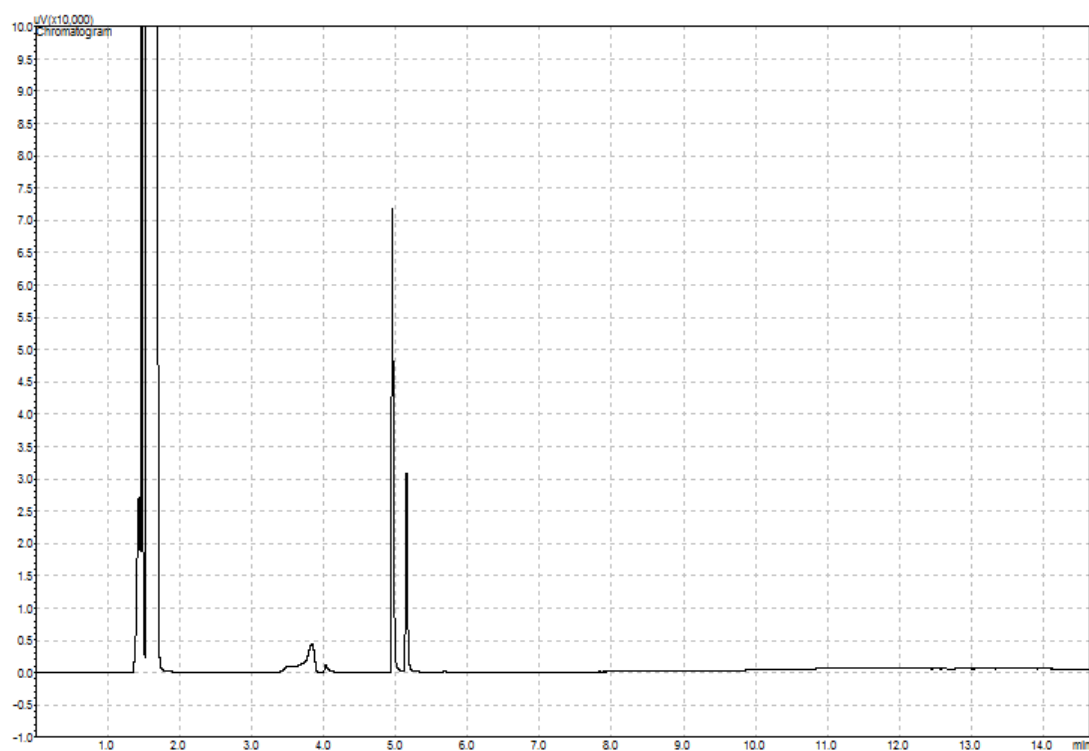


APÊNDICE F – Perfil cromatográfico da acetofenona em CG com fase quiral.**APÊNDICE G** – Cromatograma obtido por GC-FID (Método 2) para a reação de síntese assimétrica utilizando extrato enzimático contendo ω -TA oriunda do micro-organismo *Ruegeria pomeroyi*.

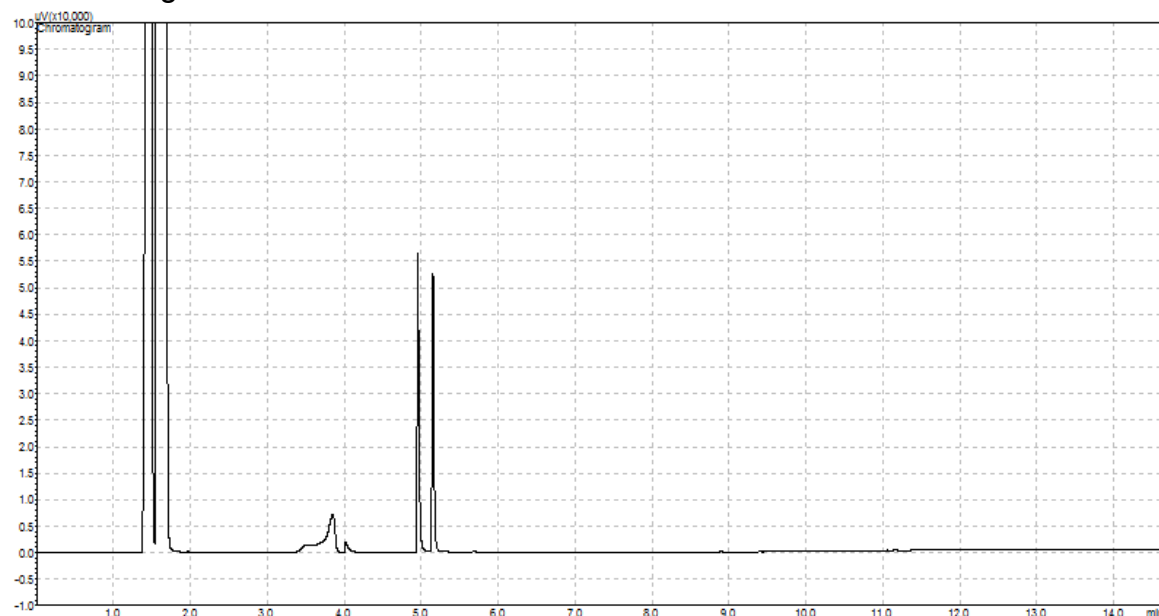
APÊNDICE J – Cromatograma obtido por GC-FID (Método 2) para a reação de síntese assimétrica utilizando extrato enzimático contendo ω -TA oriunda do micro-organismo *Rhodobacter sphaeroides*.



APÊNDICE K – Cromatograma obtido por GC-FID (Método 2) após reação de resolução cinética da (*rac*)-FEA utilizando extrato enzimático contendo ω -TA oriunda do micro-organismo *Rhodobacter sphaeroides*.



APÊNDICE T – Cromatograma obtido por GC-FID (Método 2) após reação de resolução cinética da (*rac*)-FEA utilizando extrato enzimático contendo ω -TA oriunda do micro-organismo *Chromobacterium violaceum*.



APÊNDICE U – Excesso enantiomérico obtido após reação de resolução cinética da (*rac*)-FEA utilizando extrato enzimático contendo ω -TA oriunda do micro-organismo *Chromobacterium violaceum*.

