

## BIOCATÁLISE: AVANÇOS RECENTES

Roseli De Conti\*, José Augusto R. Rodrigues e Paulo J. S. Moran

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas – SP

Recebido em 24/4/00; aceito em 18/1/01

BIOCATALYSIS: RECENT ADVANCES. The work here presented was based on 4<sup>th</sup> International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations "BIOTRANS '99" held in Giardini - Naxos, Italy, from september 26 to October 1, 1999. Some of the lectures presented during the congress will be commented which exemplifies the technological innovations and the actual tendencies in the area of biocatalysis.

Keywords: biocatalysis; biotransformations; industrial enzymes.

A área multidisciplinar de biocatálise encontra-se atualmente em amplo desenvolvimento. Pesquisas realizadas em vários ramos da química e da biologia tem como principal objetivo o desenvolvimento de novos catalisadores para uso industrial.

Novas técnicas de biologia molecular, metodologias de seleção de biocatalisadores e novas abordagens de pesquisa, foram desenvolvidas afim de se obter catalisadores com suas especificidades alteradas bem como a exploração da biodiversidade. Os catalisadores biológicos nativos atualmente disponíveis, em sua maioria apresentam limitações quanto à utilização em processos industriais, sendo este o maior desafio do campo<sup>1</sup>. As limitações encontradas na aplicação sintética de enzimas em sua forma nativa, estão sendo contornadas atualmente através da alteração da estereoespecificidade, termoestabilidade e atividade envolvendo técnicas de biologia molecular de mutações sítio dirigidas ou aleatórias<sup>1-5</sup>.

As mutações sítio dirigidas podem ser aplicadas para melhorar a atividade enzimática e a seletividade de um biocatalisador, mas não de um modo geral, uma vez que este processo requer o conhecimento detalhado da estrutura tridimensional da enzima, do mecanismo catalítico e também um certo grau intuitivo com respeito à escolha do aminoácido a ser substituído<sup>3</sup>.

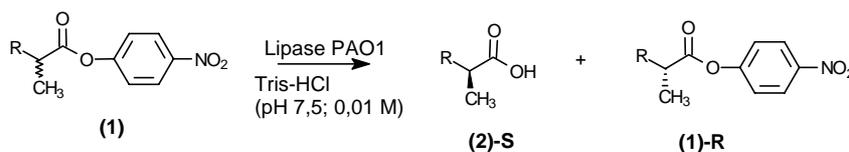
Neste contexto, uma nova abordagem para o desenvolvimento de catalisadores enantiosseletivos foi desenvolvida por Reetz e col.<sup>3</sup>. Este método denominado evolução *in vitro* (*in vitro* evolution) aumenta a enantiosseletividade passo a passo de um dado catalisador não seletivo. O princípio está baseado na combinação de métodos biológicos apropriados de mutações aleatórias e expressão gênica, com uma metodologia eficiente de seleção (*screening*) para a identificação de mutantes seletivos. Esta nova abordagem não requer o conhecimento da estrutura enzimática ou do mecanismo de biocatálise. A grande vantagem do método desenvolvido por Reetz e col., é a utilização das técnicas de termografia de infravermelho que detecta os mutantes mais eficientes e de espectrometria de massas ESI/MS que leva a determinações rápidas e com alta precisão dos excessos enantioméricos (ee)<sup>4</sup>.

Um exemplo ilustrativo do método é a hidrólise de 2-decanoato de *p*-nitrofenila (**1**) mediada por lipase da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, que na sua forma nativa apresenta enantiosseletividade de apenas 2% ee em favor do ácido de configuração *S*-(**2**) (Esquema 1)<sup>3</sup>.

Através da técnica PCR (*polimerase chain reaction*), um gene da bactéria foi submetido a mutações aleatórias. Os genes mutantes foram ligados a um vetor de expressão, amplificado em *Escherichia coli* e transformado em *Pseudomonas aeruginosa*. Os clones da bactéria foram então cultivados, cada um produzindo teoricamente uma lipase mutante. Cerca de 1000 mutantes isolados desta maneira, foram então selecionados em função da enantiosseletividade, com reações testes em microplacas de 96 orifícios. Foi utilizado sobrenadante das culturas de lipases em tampão – Tris, pH 7,5 - contendo os substratos *R* e *S* enantiomericamente puros do composto (**1**), dissolvidos em DMSO. A hidrólise de cada enantiômero *R*-(**1**) e *S*-(**1**) pode ser monitorada por espectroscopia de UV (410 nm) e ou termografia de IV, e os ee avaliados por ESI/MS. Em cada geração foi escolhido o clone com maior enantiosseletividade para um novo ciclo de mutagênese. A enantiosseletividade da enzima pode assim ser aumentada acima de 81% ee após quatro gerações<sup>3-4</sup>.

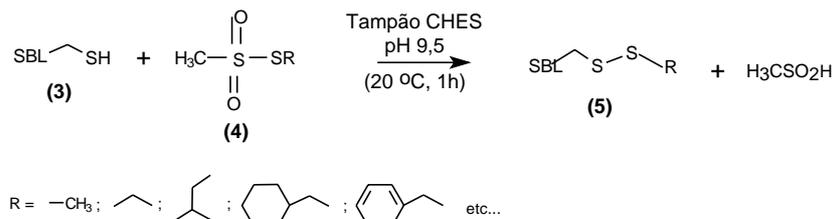
Uma vez que as modificações das propriedades enzimáticas através de técnicas de biologia molecular se restringem a fazer substituições de aminoácidos naturais em proteínas, um método novo que combina mutações sítio dirigidas com modificações químicas da enzima está sendo utilizado para a alteração das propriedades enzimáticas objetivando sua aplicação sintética<sup>6</sup>.

Utilizando esta nova técnica Jones e col.<sup>6</sup>, empregaram uma estratégia na qual cisteína, um aminoácido natural, foi introduzido em uma enzima alvo, subtilisin *Bacillus lentus* (SBL) (**3**), por mutação sítio dirigida em posições pré-selecionadas. A seguir esta enzima mutante foi quimicamente modificada com reagentes metanotiosulfonados (**4**), oferecendo assim possibilidades ilimitadas para se criar novos ambientes estruturais em qualquer localização da molécula da enzima (**5**) (Esquema 2).



Esquema 1

\* e-mail: Decontilourenco@aol.com



Esquema 2

Neste estudo a enzima SBL foi considerada ideal, uma vez que o tipo selvagem não contém cisteína em sua estrutura. Esta enzima bem caracterizada, de interesse industrial e sintético bem reconhecido, teve sua estrutura cristalina identificada por cristalografia de raios-X bem como já foi clonada, expressada e purificada, com comportamento cinético bem caracterizado. As modificações estruturais obtidas por este método podem ser reversíveis por tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol, independentemente do grupo R utilizado. As várias modificações da enzima assim obtidas levaram em alguns casos a melhorias na atividade e estabilidade térmica. Foi feito também um estudo de estrutura atividade SAR afim de se prever a melhoria da atividade estrutural da enzima estudada<sup>6</sup>.

Haring e col.<sup>7</sup> também mostraram que esta nova técnica pode ser empregada com grande sucesso levando a enzimas altamente seletivas e termoestáveis.

Métodos de biotransformação que utilizam enzimas em solventes orgânicos são bem conhecidos atualmente e, bastante úteis em síntese orgânica. Assim, a síntese de ésteres, lactonas, amidas, peptídeos e perácidos tem sido realizada através de procedimentos padrões. Por outro lado, o entendimento da influência da natureza do solvente na enantiosseletividade de enzimas é ainda pouco conhecida, não havendo regras de aplicação geral para um melhor entendimento dos fatores envolvidos na ligação enzima-substrato, no estado de transição em solventes orgânicos<sup>8</sup>.

Neste sentido, estudos mecanísticos relevantes para um melhor entendimento da atividade enzimática em solventes orgânicos, foram desenvolvidos por Alexander e col.<sup>9</sup>. Uma nova abordagem com o objetivo de se aumentar a enantiosseletividade de enzimas em solventes orgânicos está sendo estudada, assumindo-se que o substrato enantiomérico menos reativo experimentalmente, no estado de transição maiores impedimentos estéricos na ligação com a enzima, que o enantiômero mais reativo. Tornando o substrato ainda mais volumoso através da formação de sais com um contra-íon, estes impedimentos estéricos seriam desproporcionalmente aumentados no enantiômero menos reativo e portanto, a enantiosseletividade será aumentada.

Esta estratégia foi implementada e confirmada utilizando-se compostos quirais de diversas estruturas, os quais foram convertidos aos seus sais correspondentes, reagindo-se com vários ácidos ou bases de Bronsted-Lowry. Transesterificações ou hidrólises enzimáticas dos sais racêmicos resultantes, foram muito mais enantiosseletivas que as observadas com as bases livres. Este efeito foi observado em vários solventes orgânicos (mas não em água onde os sais aparentemente dissociam-se

regenerando a base livre), utilizando-se enzimas cristalinas ou liofilizadas (*Pseudomonas cepacia* e protease subtilisin Carlsberg). Em alguns casos, os quais foram demonstrados em escala analítica ou em quantidades preparativas, a enzima estudada não exibiu enantiopreferência frente ao substrato na forma de base livre, porém exibiu uma profunda seletividade perante os seus sais<sup>9</sup>.

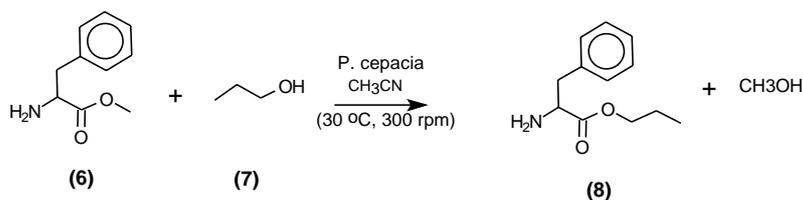
Um exemplo ilustrativo do método é a transesterificação enzimática do éster metílico de fenilalanina (6) com propanol (7), para formar o éster propílico de fenilalanina (8) em acetonitrila (Esquema 3).

Nesta reação, o valor observado da enantiosseletividade  $E = 5.7$  em favor do enantiômero (*S*) de (6) foi insuficiente para a resolução eficiente do racemato. Então foi formado um sal reagindo-se o grupo amino de (6) com um grupo carboxila de um ácido orgânico comum tal como o ácido benzóico. Este sal foi também submetido à transesterificação enzimática nas mesmas condições da reação com a base livre. Observou-se que enquanto a reatividade do enantiômero mais reativo (*S*) na forma do sal diminuiu em menos de 1/3, a reatividade do enantiômero menos reativo (*R*), teve uma grande diminuição, resultando assim num aumento de quatro vezes no valor da enantiosseletividade  $E$  da reação de transesterificação estudada. Todos estes efeitos foram racionalizados através de modelagem molecular para se derivar estruturas do estado de transição enzima-ligante dos enantiômeros *R* ou *S* das bases livres e seus sais. As áreas de superfície em sobreposição dos substratos com as enzimas, as quais foram obtidas através dos modelos, mostraram uma excelente previsão da enantiosseletividade enzimática ( $E$ ). Quanto maior a diferença entre as áreas de superfície de sobreposição entre os substratos, maiores os valores de  $E$ <sup>9</sup>.

Em recente publicação Costa e Amorim<sup>10</sup> descreveram vários fatores que afetam a especificidade, quimiosseletividade, regioseletividade, seletividade proquiral e enantiosseletividade de lipases e outras hidrolases, em solventes orgânicos. Nesse trabalho é discutido também a importância do emprego de métodos teóricos para um melhor entendimento da dinâmica das interações destas enzimas, com a interface e com o substrato, sob a influência de um determinado solvente orgânico.

A utilidade da biocatálise no desenvolvimento de novas drogas e agrotóxicos é bem reconhecida e, uma variedade de enzimas já são comumente utilizadas em processos industriais<sup>11-18</sup>.

Como exemplo podemos citar os processos de síntese dos fármacos, (1*R*, 2*S*)- efedrina (9) com atividade  $\beta$ -adrenérgico mediado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*<sup>16</sup> e dos antibióticos ampicilina (10), amoxicilina (11), cefalexina (12) e



Esquema 3

cefadroxil (13), utilizando-se a enzima Penicilina acilase<sup>17</sup>. Também, o caso pioneiro de síntese enzimática do agrotóxico fusilade (14) envolvendo a enzima D-CPA desalogenase (Figura 1)<sup>18</sup>.

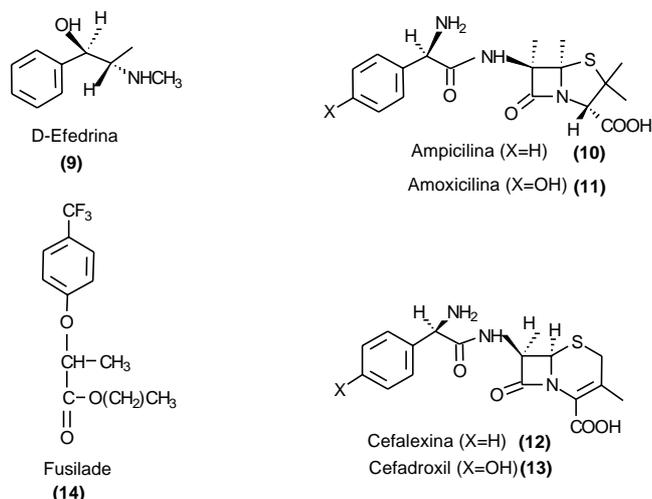


Figura 1

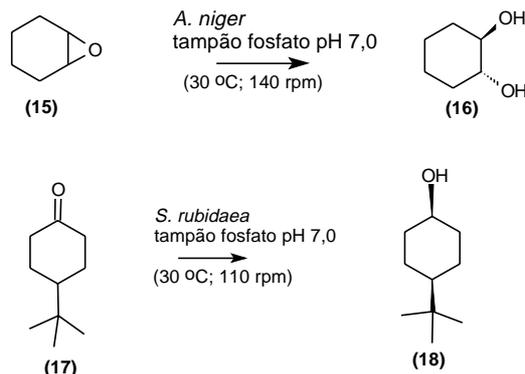
Companhias que adquiriram conhecimentos em síntese assimétrica, atualmente apresentam grandes vantagens tecnológicas e industriais, comparadas com as que não se encontram capacitadas para a produção de compostos enantiomericamente puros. Também, a área de biocatálise emergiu como uma ferramenta poderosa para a chamada 'química ecologicamente correta' (*green chemistry*), a qual levará cada vez mais a processos industriais comprometidos com o controle ambiental. As tecnologias competitivas e complementares que estão sendo desenvolvidas possibilitarão a utilização de biocatalisadores em processos industriais<sup>6</sup>.

Geralmente, a biocatálise em processos industriais é desenvolvida por caminhos tradicionais, que levam desde a identificação de fontes de microorganismos, seleção de biocatalisadores, desenvolvimento e otimização de processos da escala laboratorial à planta piloto. Uma pesquisa prévia que também faz uso de bibliotecas de compostos orgânicos, enzimas e microorganismos, tem sido empregada pela denominada química combinatória quimio-enzimática (*chemoenzymatic combinatorial chemistry*). Esta baseia-se na integração que incorpora também processos enzimáticos interfaciais, transformações microbianas e reações químicas, desta forma interconectando a catálise química com a biocatálise<sup>19-23</sup>.

Procedimentos de avaliação e seleção de microorganismos de plantas ou células animais representam o método tradicional de descoberta de novas enzimas. Os microorganismos neste caso são de particular interesse devido o curto período de geração, a grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas e, não há um número limitado de microorganismos na natureza que possam ser testados, os quais são bastante diferentes entre si. Eles modificam e degradam uma variedade de moléculas orgânicas complexas e então, é de se esperar que pelo menos um deles catalise uma dada reação de interesse<sup>8</sup>.

No Instituto de Química da UNICAMP grupos de pesquisa estão atuando nesta área e, o trabalho desenvolvido visa avaliar o potencial biocatalítico de microorganismos isolados de território nacional frente a substratos orgânicos de interesse sintético<sup>24,25</sup>. Os microorganismos estudados são fornecidos pela Coleção de Culturas Tropical da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", e tem demonstrado excelente potencial em reações hidrolíticas, de oxidação e redução.

A seguir encontram-se esquematicamente representados (Esquema 4), dois exemplos de biotransformações de substratos orgânicos utilizando-se cepas microbianas brasileiras.

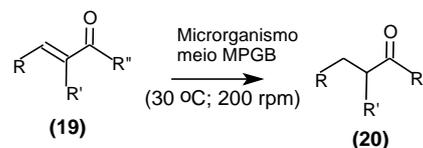


Esquema 4

A hidrólise da oxirana (15) pelo fungo *Aspergillus niger* CCT 4846 levou à formação de (1*R*, 2*R*)-*trans* diol (16) em rendimento maior que 98% e 70% ee.<sup>24</sup>. A bactéria *Serratia rubidaea* CCT 5742 reduziu quantitativamente a cetona *tert*-butilciclohexanona (17), ao álcool termodinamicamente menos estável *cis-tert*-butilciclohexanol (18) com 96% de excesso diastereoisomérico<sup>25</sup>.

Apesar do grande desenvolvimento de técnicas de biologia molecular com o objetivo de se obter enzimas com suas especificidades alteradas, a exploração da biodiversidade com a seleção de novos microorganismos e enzimas<sup>24-26</sup> é ainda o método mais empregado para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial. Também de uso mais imediato é a clonagem e expressão de enzimas em microorganismos hospedeiros de fácil cultivo (nos casos em que as enzimas são encontradas em pequenas quantidades nos organismos sensíveis), que levam à obtenção de biocatalisadores em quantidades compatíveis para a utilização em processos industriais<sup>8</sup>.

Existe também uma área de pesquisa denominada biogeração de aromatizantes, na qual a biocatálise pode levar vantagens em vários aspectos sobre a química orgânica sintética. Por exemplo, a bioconversão seletiva de cetonas insaturadas (19) que leva à formação de cetonas saturadas (20) (Esquema 5), não oferece vantagens sobre processos químicos existentes de hidrogenação catalítica. Entretanto, esta simples transformação levando a intermediários para a síntese de fragrâncias e aromatizantes, é bastante significativa se feita enzimaticamente<sup>27</sup>.



Esquema 5

De fato, uma legislação recente discrimina aromatizantes quimicamente idênticos em produtos naturais e não naturais<sup>28</sup>. A preferência dos consumidores por produtos naturais, tem estimulado estudos com a finalidade de se obter abundantemente precursores extrativos naturais através de métodos enzimáticos. Estes métodos tem capacidade de produzir grandes quantidades de substâncias aromáticas, que não seriam acessíveis por processos extrativos. Os produtos obtidos desta forma são de fato considerados naturais pela legislação<sup>27,28</sup>.

## CONCLUSÃO

Com as novas tecnologias que estão sendo desenvolvidas, enzimas mais compatíveis com solventes orgânicos e altas temperaturas estão se tornando cada vez mais disponíveis, o que certamente levará às indústrias a utilizarem a biocatálise como

uma alternativa técnica e economicamente viável para a síntese assimétrica.

#### AGRADECIMENTOS

A FAPESP pelo apoio financeiro (processo 99/06368-0)

#### REFERÊNCIAS

1. Jones, J. B.; Wong C. H.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 61.
2. Arnold, F. H.; *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 125.
3. Reetz, M. T.; Becker, M. H.; Kuhling K. M.; Arnold F. H.; *Angew Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2647.
4. Reetz, M. T.; Becker, M. H.; Klein H. W.; Shockigl D.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1758.
5. Rilland, C. A.; Bermudez, E.; Shemmer, W. P. C.; *Nature* **1998**, 391, 288.
6. Jones, J. B.; Desantis, G.; *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 99.
7. Haring, D.; Schuler, E.; Scheirer, P.; *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **1998**, 5, 339.
8. Faber, K.; *Pure Appl. Chem.* **1997**, 69, 1613.
9. Ke, T.; Klivanov A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3334.
10. Costa, V. E. U.; Amorim, H. L. N.; *Quim. Nova* **1999**, 22, 863.
11. Zaks, A.; Dodds, R. S.; *Drug Discovery Today* **1997**, 12, 513.
12. Sanches, A.; Ferrer, P.; Serrano, A.; *J. Biotechnol.* **1999**, 9, 633.
13. Rozell, J. D.; *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2253.
14. Demirjian, D.; Moris-Vas F.; Golobov M.; Calugaru S.; *Chemical Processing* **1999**, 62, 57.
15. Schulze, B.; Wubboltz, M. G.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, 10, 609.
16. Pereira, R. S.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **1998**, 18, 25.
17. Lalonde, J.; *Chem. Eng.* **1997**, 108.
18. Taylor, S.; *Chem. Br.* **1998**, 23.
19. Chartrain, M.; Armstrong, J.; Katz, L.; *Ann. NY Acad. Sci.* **1996**, 799, 12.
20. Chung, J. Y. L.; Ho, G. J.; Chartrain, M.; Roberge, C.; Zhad; D.L.; Leazer, J.; Fair; R.; Robbins; M.; Emerson; K.; Mathre; D. J.; McNamora; J. M., Hughes; D. L.; Grabowshi; E. J. J.; Reider, P. J.; *Tetrahedon. Lett.* **1999**, 40, 6739.
21. Mozhaev, V. V.; Budde, C. L.; Rich, J. O.; Usyatinsky, A. Y.; Michels, P. C.; Khmelnsky, Y. L.; Clarck, D. S.; Dordick, J. S.; *Tetrahedron* **1998**, 54, 3971.
22. Michells, P. C.; Khmelnsky; Y. D.; Dordick J. S.; Clarck, D. S.; *Trends Biotechnol.* **1998**, 16, 210.
23. Krstenansky, J. L.; Khmelnsky, Y.; *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 2, 246.
24. Cagnon, J. R.; Porto, A. L. M.; Marsaioli, A. J.; *Chemosphere* **1999**, 38, 2237.
25. De Conti, R.; Porto, A. L. M.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; Manfio, G. P.; Marsaioli A. J.; *J. Mol. Cat B: Enzym.* **2001**, 11, 235.
26. Demirjian, D. C.; Shah P. C.; Moris-Vas F.; *Biocatalysis - From Discovery To Application*, **1999**, 200, 1.
27. Fuganti, C.; Zucchi G.; *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **1998**, 4, 289.
28. US Code of Fed. Reg. 1985, 21, 101.22a.3.