

TRANSFORMAÇÕES BIOLÓGICAS: CONTRIBUIÇÕES E PERSPECTIVAS#

Luciana Gonzaga de Oliveira* e Simone Moraes Mantovani

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-971 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 2/2/09; aceito em 10/3/09; publicado na web em 7/4/09

BIOLOGICAL TRANSFORMATIONS: CONTRIBUTIONS AND PERSPECTIVES. In a moment that amazingly advances are being reached on the development of technologies to obtain high value chemical compounds as polymers, fine chemicals, pharmaceutical industry intermediates and chemical entities, we cannot refuse that a meaningful progress is due to the maturing in knowledge of biological transformations. Biocatalysis and biotransformations are being widespread applied to generate processes and products with incredible success. In this review article we present the main contributions of biotechnology and biological catalytic processes to Chemistry, the most important evolution steps on enzymatic transformations, how it has being applied and which are the perspectives to academic and industrial environments. We also would like to stimulate the community to step out research in biotechnology applicable to chemical and pharmaceutical industries, trying to achieve what we believe to be the ideal layout: integrating chemical transformations, enzymatic conversions and fermentation processes.

Keywords: biocatalysis; biotransformations; chemistry and biology integration.

INTRODUÇÃO

“Enzimas são conjuntos de proteínas que catalisam a química da vida”.¹ As transformações químicas que ocorrem nos sistemas vivos são promovidas por centenas de milhares de enzimas que atuam catalisando a conversão de um conjunto de substratos em produtos específicos.²

Catalisando a química das sinalizações de macromoléculas e moléculas pequenas, e provavelmente devido a sua forma de ação tão peculiar, as enzimas tornaram-se grandes fontes de inspiração para atuarem em subáreas como a síntese orgânica e a química inorgânica.

Utilizando um sistema altamente eficiente para conversão de energia, os sistemas biológicos são ricos em catalisadores que atuam como agentes químicos ambientalmente amigáveis, com um máximo de economia de carbonos e gerando poucos resíduos.

Em sistemas vivos, uma infinidade de catalisadores promove a construção de incontáveis moléculas, desde as mais simples até as mais complexas. As enzimas catalisam a interconversão de inúmeras estruturas moleculares, desempenhando tarefas que vão desde a fixação de nitrogênio até a biossíntese de uma rica diversidade de metabólitos que podem estar associados a inúmeras formas de comunicação.

Dentre as características mais marcantes no comportamento destas moléculas encontram-se a enorme especificidade e velocidade das reações que promovem (tipicamente da ordem de 10^{10} a 10^{23} – Walsh, C.¹). Olhando para uma suposta estrutura tridimensional de uma enzima é possível visualizar um microambiente assimétrico formado pelas subunidades que as constituem, os aminoácidos.

A natureza quiral das enzimas resulta na formação de produtos de maneira altamente estereó- e regioseletiva. A capacidade em atuar a temperaturas brandas, condições neutras e aquosas, além do elevado número de ciclos catalíticos, chama a atenção para o uso de enzimas em síntese química. Os biocatalisadores permitem a biotransformação

de compostos polifuncionalizados e sensíveis em condições amenas, ao contrário das variantes químicas correspondentes que exigem condições reacionais severas. Muitas enzimas conseguem promover a transformação de vários substratos em produtos dificilmente obtidos por rotas químicas ou ainda atuar em reações nas quais não existem alternativas químicas viáveis.

Ao longo do tempo pode-se compreender que assim como as enzimas contribuem para a sobrevivência e reprodução dos organismos, elas podem apresentar propriedades que as tornam úteis tanto como aditivos em detergentes para uso diário, como em desempenhar transformações químicas em laboratório e serem utilizadas na síntese de novas entidades químicas, o que as levou a serem graciosamente apelidadas de moléculas promíscuas, em contradição com a idéia secular de “uma enzima, um substrato” e do conceito “chave-fechadura”.

As principais abordagens exploradas em catálise biológica envolvem transformações em uma única etapa utilizando enzimas isoladas e imobilizadas, células íntegras e processos multienzimáticos. Inúmeros métodos empregando catalisadores enzimáticos são utilizados para a produção bem sucedida de solventes e ácidos orgânicos, aminoácidos, antibióticos, enzimas, vitaminas, pigmentos, vacinas, proteínas terapêuticas, anticorpos monoclonais, inseticidas, entre outras aplicações.

Frente a um aumento significativo da pressão com relação a fatores ambientais, econômicos e uso de fontes renováveis de energia, a obtenção de matérias-primas químicas utilizando métodos envolvendo biocatálise e biotransformação apresenta-se como importante alternativa e ferramenta tecnológica atrativa.

Recentemente, o emprego de organismos modificados por engenharia genética tem permitido o desenvolvimento de tecnologias aplicadas na obtenção de monômeros petroquímicos e outros compostos com alto valor agregado e de elevado interesse industrial. A estratégia permite redesenhar e reprogramar um organismo completo, suas etapas metabólicas, atividades enzimáticas, regulatórias e de transporte celular. O avanço da tecnologia do DNA recombinante ampliou a possibilidade de explorarmos um número inimaginável de variantes enzimáticas geradas por evolução *in vitro* para uma determinada aplicação.

O momento atual aponta para a necessidade de reintegrar conhecimentos, voltar no tempo e desenvolver pesquisas em áreas cuja

*e-mail: luciana@iqm.unicamp.br

#Este artigo é dedicado aos 39 anos de carreira docente da Profa. Anita Jocelyne Marsaioli, devotada e incentivadora do modelo de pesquisa criativa e interativa e por sua notável contribuição para a Química brasileira.

realização e progresso dos trabalhos envolvem necessariamente a integração entre diversos especialistas. Estamos vivenciando grandes avanços alcançados na concepção de tecnologias aplicadas na obtenção de inúmeros compostos poliméricos, entidades químicas, insumos para química fina e para aplicação na indústria farmacêutica. Certamente, este avanço significativo também se deu em função do amadurecimento do conhecimento das transformações biológicas aplicadas na obtenção de processos e produtos com enorme sucesso.

Neste artigo serão apresentadas as principais contribuições da biotecnologia e dos processos catalíticos biológicos para o avanço da Química, principalmente em vertentes nas quais as metodologias químicas e quimio-catalisadas não possuem uma alternativa satisfatória e eficiente para aplicação industrial. Serão apresentadas as principais etapas de evolução dentro das transformações enzimáticas, suas aplicações e perspectivas de exploração no ambiente acadêmico e na indústria, em busca da solução ideal: integração entre a química, conversão enzimática e fermentação. É importante considerar que a biotecnologia é ainda uma área de pesquisa em plena ascensão e o desenvolvimento de metodologias robustas deverá possibilitar uma interação fina entre estes setores.

BREVE HISTÓRICO

A aplicação de processos biotecnológicos³ é conhecida pela humanidade há milhares de anos. Os primeiros relatos de processos fermentativos pelas civilizações antigas referem-se à fermentação de cereais em grãos para produção de bebidas alcoólicas pelos sumérios e babilônios há cerca de 6000 a. C. Relatos sobre a fabricação do vinho estão presentes no livro dos Gênesis, e o fermento para a fabricação de pão já era utilizado no Egito antigo (2000 a. C.). Além dessas aplicações, a produção de queijo e iogurtes é utilizada pelo homem há milhares de anos (800 a. C.), embora os agentes responsáveis por esses processos fossem ainda desconhecidos.⁴

A história das transformações microbianas é associada com os dados da produção de vinagre há cerca de 2000 a. C., porém foi somente em 1856, após a invenção do microscópio, que Louis Pasteur provou que as fermentações eram feitas por microrganismos, e que cada processo fermentativo era característico de um tipo particular de organismos.⁵

Em 1897, Eduard Büchner relatou que os extratos celulares isolados de células de leveduras eram capazes de promover a fermentação alcoólica, concluindo assim que o agente responsável pelo processo não era a maquinaria celular complexa do microrganismo, mas sim uma substância solúvel, então chamada de “zimase”, iniciando nesse momento as biotransformações com extratos celulares.⁶

Paradoxalmente, a I Guerra Mundial motivou a produção em escala industrial de produtos resultantes de processo fermentativo como, por exemplo, a obtenção de grandes quantidades de glicerol para a fabricação de explosivos,⁷ e o processo ABE (acetona, butanol e etanol) desenvolvido pelo químico Chaim Weizmann (que posteriormente se tornou o 1º Presidente do Estado de Israel). O processo permitia a produção de grandes quantidades de acetona, para fabricação de munição, promovida pela bactéria *Clostridium acetobutylicum*, e gerava butanol e etanol como subprodutos.⁸ A obtenção de butanol por via fermentativa foi utilizada por inúmeros países até os anos 50, quando os processos baseados em petróleo superaram àqueles de fermentação por microrganismos.

Mais tarde, na década de 40, antibióticos - como a penicilina - também passaram a ser produzidos por processos fermentativos. A descoberta e isolamento da penicilina a partir do fungo *Penicillium notatum* há 80 anos pelo biólogo e farmacólogo Sir Alexander Fleming constituiu um marco histórico, sendo esta certamente uma das drogas mais importantes do século 20. Posteriormente, outros

antibióticos - como estreptomicina,⁹ cloranfenicol, neomicina e cefalosporina - foram produzidos por processos fermentativos utilizando outras linhagens de bactérias e fungos, e até os dias atuais, as principais ferramentas industriais para produção de antibióticos envolvem processos fermentativos, sendo que as etapas sintéticas são realizadas somente para pequenas modificações estruturais do produto de origem natural.¹⁰

Após outro grande marco que constituiu a descoberta da estrutura tridimensional do DNA por Watson e Crick¹¹ em 1953, houve o desenvolvimento de inúmeras ferramentas para manipulação genética que estabeleceram a base para a tecnologia do DNA recombinante. A partir da década de 70, as técnicas de engenharia genética tornaram possível a obtenção de organismos e proteínas recombinantes, de modo a produzir substâncias ou catalisar reações para as quais aqueles não se encontravam naturalmente programados.⁶ Estas técnicas ganharam aplicação em vários processos industriais, sendo um dos pioneiros a fabricação da insulina recombinante.¹²

Foi nessa mesma década, com a crise do petróleo, que o interesse em processos visando a busca por combustíveis alternativos cresceu, culminando com a renovação do processo de fermentação ABE e o desenvolvimento do etanol combustível no Brasil. Desde então as ferramentas biotecnológicas têm despertado interesse mundial.

Processos fermentativos para obtenção de biocombustível

Diante da crise do petróleo no início da década de 70, a busca por fontes alternativas de energia reacendeu o interesse mundial na procura por soluções adequadas considerando as peculiaridades de cada nação.

No Brasil, o governo incentivou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool). Nesta época o país já apresentava um setor açucareiro desenvolvido, terras e clima propícios para cultivo de cana-de-açúcar, e muita mão-de-obra disponível no campo. Com o passar do tempo, o etanol deixou de ser considerado uma resposta temporária para a crise e tornou-se uma solução permanente.¹³

O processo de produção do etanol, usado em praticamente todas as cerca de 400 usinas brasileiras, consiste na colheita da cana-de-açúcar dos canaviais que é encaminhada para a usina e passa por um processo de moagem. O mosto resultante segue para a etapa de fermentação alcoólica na qual leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, metabolizam o açúcar da cana em CO₂ e etanol.¹⁴ Nos processos convencionais, o mosto fermentado é enviado para centrífugas onde ocorre a separação das leveduras, as quais passam por um tratamento ácido e retornam às dornas de fermentação, enquanto o mosto é encaminhado para as colunas de destilação para obtenção do etanol.

A busca por processos ainda mais eficientes para obtenção do etanol a partir da cana-de-açúcar, envolve entre outros fatores a seleção de cepas mais produtivas (como as cepas industriais de *S. cerevisiae* CAT-1, PE-2, BG-1, SA-1 e Y904),¹⁵ plantas melhoradas e o processo de concepção de biorreatores adequados. Neste contexto, um ponto de estudo de interesse envolve a seleção e/ou produção de cepas floculantes, a fim de facilitar o processo pela redução de custos e manutenção de equipamentos. Cabe aqui ressaltar os estudos recentes realizado pelo grupo da Divisão de Biotecnologia e Processos do CPQBA-Unicamp^{14,16} para a seleção de linhagens floculantes e o desenvolvimento de leveduras geneticamente modificadas apresentando essa propriedade, pelo IB-Unicamp.¹⁷ Esses processos constituem uma excelente alternativa para que o mosto fermentado saia das dornas sem conter leveduras, que permanecem retidas no próprio equipamento, eliminando assim a etapa de centrifugação.

Atualmente, a busca por metodologias para obtenção do etanol celulósico compõe um tópico de grande interesse. Considerando que somente 1/3 da planta é utilizada na obtenção de açúcar, a proposta é

a aplicação de enzimas capazes de hidrolisar celulose e hemicelulose, que compõem cerca de 70% da planta, a fim de se obter a glicose que posteriormente é metabolizada a etanol.¹⁸ O aumento na produção de etanol viabiliza não somente a sua utilização como combustível, mas também a utilização deste como matéria-prima para outros processos, como o polietileno verde.¹⁹

Também na década de 70, o interesse pelo processo ABE foi retomado devido aos avanços com relação a informações estruturais do genoma de *C. acetobutylicum*²⁰ e ao barateamento dos substratos utilizados, visando aumentar a produtividade do biobutanol.²¹ Em comparação ao etanol, o butanol apresenta maior conteúdo energético,²² o baixo conteúdo de água torna-o mais adequado para ser misturado à gasolina em várias proporções, sua menor pressão de vapor e tolerância à contaminação facilitam sua distribuição e armazenamento em gasodutos e tanques. Além disto, a combustão mais limpa permite sua utilização sem a necessidade de alteração nos veículos.¹⁸ Diante dessas perspectivas, a produção de butanol por processos fermentativos tem se mostrado promissora e despertado especial interesse como fonte alternativa de combustível.

Processos biotecnológicos no Brasil

A aplicação de processos biotecnológicos no Brasil teve início, como mencionado, na década de 70 com o Proálcool. Nessa mesma época, o CNPq lançou dois programas pioneiros incentivando trabalhos em biotecnologia no país, o Programa Integrado de Desenvolvimento (PID) e o Programa Integrado em Doenças Endêmicas (PIDE). A partir do início da década de 80, o governo vem lançando sucessivos programas, como o Programa Nacional de Biotecnologia (PRONAB), o Programa de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), o Programa de Núcleos de Excelência (Pronex) e os Institutos do Milênio, que permitiram a nucleação de grupos importantes atuando na área da biotecnologia. As Agências Estaduais de Fomento à Pesquisa (FAPs) também fizeram investimentos significativos na área, sendo que a FAPESP se mostra especialmente ativa e instrumental na organização e financiamento de projetos em biotecnologia concentrados na região sudeste do país.^{23,24}

Como resultante destes estímulos e articulações, rapidamente produtos importantes como vacinas e proteínas recombinantes com fins terapêuticos e para diagnóstico de doenças passaram a ser produzidos no Brasil (Tabela 1). Certamente, o que o Brasil produz atualmente na área da biotecnologia é muito inferior ao seu potencial, porém exemplos de sucesso podem ser observados, como a produção de 588 milhões de doses de diferentes vacinas entre os anos de 2003 e 2006 pelo Instituto Butantã, utilizando tecnologia própria (Figura 1). De maneira geral, o suporte financeiro de fontes públicas apresenta melhoras significativas nos últimos anos, enquanto o financiamento privado ainda é um grande desafio.^{23,25}

Com relação ao setor privado, têm-se observado um aumento na aplicação de processos biotecnológicos, sendo que as empresas

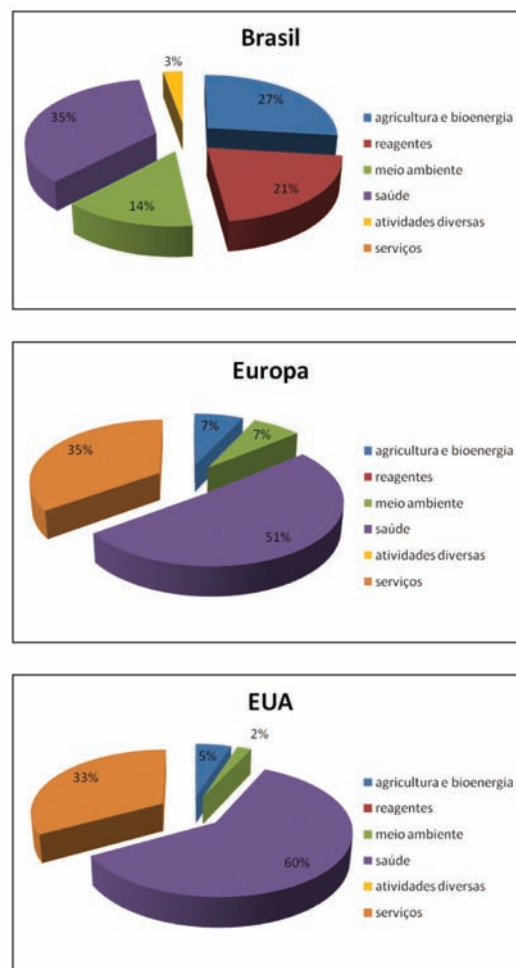


Figura 1. Divisão do uso e aplicações da biotecnologia por setores no Brasil, Europa e EUA

brasileiras de biotecnologia estão fundamentalmente envolvidas na fabricação de produtos dos setores da agricultura (22%) e reagentes (21%), seguidos por produtos para saúde (animal 18% e humana 17%) e meio ambiente (14%) - (Figura 1).²⁶ Apesar do desenvolvimento do setor, o número de patentes depositadas por empresas privadas ainda é pequeno (17 patentes por 11 empresas – fonte: Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI). Estes dados, entretanto não indicam um baixo grau de inovação das indústrias biotecnológicas brasileiras, mas sim que a maioria destas inovações ainda é desenvolvida dentro das universidades e centros de pesquisa brasileiros.²⁷

Na década de 70 a Cibran, Companhia Brasileira de Antibióticos, foi fundada de acordo com o modelo de desenvolvimento da época: a empresa contava com financiamento governamental, administra-

Tabela 1. Exemplos de produtos biotecnológicos para saúde desenvolvidos e comercializados por instituições e empresas brasileiras

Setor	Produto	Aplicação	Produtor
Vacinas	Proteína recombinante para hepatite B	Hepatite B	Instituto Butantan
	Vírus atenuado	Febre amarela	Bio-manguinhos (FIOCRUZ)
Terapêuticos	Insulina humana recombinante	Diabetes	Biobrás/Novozym
	Eritroproteína-A recombinante	Anemia	Instituto Butantan
	Anticorpos monoclonais	Imunoterapia	FK Biotechnology
Diagnóstico	Proteínas recombinantes	Doença de Chagas	Bio-Manguinhos

ção privada e compra de tecnologias. Dentro deste modelo a Cibrant tornou-se a maior fabricante de antibióticos (como eritromicina, gentamicina e lincomicina) da América Latina e se manteve entre as maiores do mundo entre os anos 70-80.²⁸

Um ponto notável é que a área de biotecnologia no Brasil está muito mais disseminada e consolidada para as aplicações em saúde e agricultura. O Brasil foi um dos pioneiros na produção de insulina humana por métodos recombinantes.²⁹ Este trabalho foi fruto de uma colaboração entre a Universidade Federal de Minas Gerais e a farmacêutica brasileira Biobrás (São Paulo), que na década de 90 era uma das quatro empresas produtoras de insulina humana no mundo. Posteriormente, foi adquirida pela multinacional dinamarquesa Novozymes.^{23,30}

A aplicação de processos enzimáticos em síntese orgânica no Brasil teve início em universidades localizadas no circuito sul-sudeste do país, a partir do início da década de 90. Os grupos pioneiros ali localizados contribuíram para a formação de recursos humanos qualificados e para uma “transformação” na mentalidade e visão das possibilidades de aplicação de biocatálise em síntese orgânica, fugindo das vertentes tradicionais aplicadas nos processos de síntese até então.

Estes grupos colaboraram significativamente com a aplicação de hidrolases,³¹ oxidorreduções³² e processos quimio-biocatalisados³³ utilizando células íntegras e enzimas parcialmente purificadas. Apesar de um aumento substancial de pesquisas na área, poucos resultados geraram processos para potencial aplicação industrial, mas levaram à elaboração de alguns registros de patente.³⁴

Nos institutos de pesquisa e universidades, o número de artigos relacionados à biotecnologia tem aumentado substancialmente desde a década de 90. A busca das palavras-chave apresentadas a seguir na base de dados *Web of Science* (limitando-se à publicação pelo país de origem como sendo *BRAZIL*) gerou o número de publicações indicado entre parênteses: *biocatalysis* (71); *biotransformations* (37); *enzymes* (química multidisciplinar: 65; química orgânica: 22). Entre as revistas de veiculação internacional, algumas edições foram especialmente dedicadas ao assunto como *Nature* (v. 409, n. 6817, 2001), *Current Opinion in Biotechnology* (v. 13, n. 6, 2002), *Tetrahedron: Asymmetry* (v. 15, n. 18, 2004), *Advanced Synthesis & Catalysis* (v. 30, n. 7-8, 2005), *Organic Process Research & Development* (v. 10, n. 3, 2006), *Journal of Molecular Catalysis B, Enzymatic* (v. 52-53, 2008). Com relação às publicações utilizando estas mesmas palavras-chave e limitando-se às revistas de veiculação da Sociedade Brasileira de Química, *Química Nova* (QN)^{35,36} e *Journal of the Brazilian Chemical Society* (JBCS)^{37,38} no biênio 2007-08, um número total de 25 artigos foram encontrados (17 na QN e 8 no JBCS).

De maneira geral, o Brasil apresenta um considerável desenvolvimento no setor biotecnológico e as universidades têm facilitado grandes avanços na formação de pesquisadores na área. Porém, o mercado brasileiro ainda é incapaz de absorver novos doutores e, como resultado, muito do corpo qualificado gerado acaba buscando oportunidades em outros países.²³

Dentre as perspectivas para o desenvolvimento do setor biotecnológico no Brasil, apesar do crescimento econômico brasileiro e as políticas governamentais estarem mais favoráveis nos últimos anos (o decreto de regulamentação da Lei de Inovação Tecnológica foi assinado pelo presidente Luiz Inácio Lula da Silva no dia 11/10/2005), uma maior interação entre a academia e o setor privado é uma estratégia fundamental para delimitar os problemas que entravam o desenvolvimento de produtos, bem como o desenvolvimento de programas de treinamento mais específicos de acordo com o interesse industrial dentro das universidades.²³

AS TRANSFORMAÇÕES ENZIMÁTICAS

O biocatalisador

Os termos biocatálise ou biotransformação, de maneira geral, abrangem os processos em que um catalisador biológico é utilizado para a conversão de um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas.

Em geral, o ponto de partida para a escolha de um biocatalisador em química orgânica envolve a especificidade (químio-, régio- e enantioseletividade) e a velocidade que a transformação desejada é efetuada. Estes pontos envolvem atributos relacionados a bases estruturais e mecânicas das transformações químicas.³⁹

As enzimas que operam em sistemas vivos estão ajustadas para atuar em sistemas aquosos tamponados, com controle de força iônica e pH. Ao longo da concepção de um processo envolvendo biocatálise é importante estar atento aos fatores relacionados a como prolongar o tempo de vida útil de um biocatalisador e mantê-lo operando em meios não compatíveis com o natural.⁴⁰

Olhando para o biocatalisador em si é importante avaliar se o conjunto enzimático a ser explorado constitui uma célula íntegra ou um extrato enzimático puro ou parcialmente purificado. Entre as vantagens em utilizar enzimas isoladas puras ou parcialmente purificadas estão a alta especificidade, maior produtividade e facilidade de isolamento dos produtos, embora os fatores relacionados a custo, disponibilidade da enzima e inexistência de sistemas apropriados de regeneração de cofatores para determinadas classes enzimáticas possam inviabilizar sua aplicação.³⁹

Por outro lado, os processos que utilizam células íntegras em geral são de baixo custo e especialmente interessantes para aplicação em sistemas dependentes de cofator, pois a própria célula possui a maquinaria para promover a regeneração. Entretanto, a ocorrência de reações paralelas, resultantes do metabolismo celular, reversibilidade e baixa tolerância a substratos e solventes orgânicos, inativando o sistema enzimático, pesam contra o uso de microrganismos íntegros em biocatálise.

Em resposta aos efeitos indesejados gerados pela aplicação de células íntegras em alguns processos e com um significativo aumento das sequências genéticas em bancos de dados em função das pesquisas em genômica e proteômica, tanto enzimas naturais como recombinantes podem hoje ser produzidas em larga escala em organismos hospedeiros adequados, empregando-se a tecnologia do DNA recombinante. A aplicação das enzimas e células geradas por esta aproximação facilita e viabiliza o uso de reações enzimáticas em síntese e representa uma oportunidade mais efetiva para o desenvolvimento de processos que possam ser aproveitados nas indústrias química e farmacêutica.

Para os casos de sistemas que necessitam da regeneração de cofator, várias alternativas para reciclagem já são disponíveis para serem acopladas ao processo geral.⁴¹ Quando não existem sistemas de reciclagem de cofatores estabelecidos torna-se conveniente o uso das próprias linhagens selvagens.

Evoluções associadas aos processos biocatalíticos

O rápido crescimento da biocatálise está certamente associado às ferramentas de biologia molecular e engenharia de proteínas que permitem gerar variáveis com propriedades diferentes como estruturas, função, seletividade e, também, tolerância a solventes não aquosos. Hoje já são conhecidas várias enzimas que atuam em solventes orgânicos⁴² ou fluidos supercríticos na ausência de água.⁴³ Maior solubilidade do substrato, especificidade enzimática modificada e reversão das reações hidrolíticas são algumas das vantagens

Tabela 2. Classe de enzimas e suas aplicações em processos. Adaptado da ref 39

Classe de enzimas	Subclasses mais utilizadas	Reações mais comuns	Aplicação
Hidrolases	esterases, lipases, amidases (proteases e acilases), fosfatases e epóxido hidrolases	Hidrólise e formação de ésteres, amidas, fosfato e hidrólise de epóxidos	60%
Oxidoredutases	desidrogenases, mono e dioxigenases, peroxidases	Oxidação e redução de álcoois, epoxidação, hidroxilação de alkenos e alcanos	25%
Transferases	quinases	Fosforilação (dependente de ATP)	5%
Ligases	aldolases, transaldolases, glicosidasas, transaminases	Reação aldólica, formação de ligação glicosídica, formação de ésteres sulfato e ligação C-N	1%
Liases	carboxiliases, amônia-liases, hidrolases	Adição e eliminação em ligações como C=C, C=O, C=N	5%
Isomerases	racemases, epimerases	Isomerizações como racemização, epimerização, rearranjos	1%

acumuladas com estas adaptações. Isso permite ampliar a gama de aplicação das reações via catálise enzimática e possibilita expandir o emprego destas reações na resolução de compostos farmacêuticos e intermediários químicos quirais e em reações de polimerização régio- e enantiosseletivas.

Entre as alternativas, existe também a possibilidade de aplicação de biocatalisadores suportados em analogia aos catalisadores químicos em fase heterogênea, que podem ser recuperados e reutilizados,⁴⁴ ou a utilização de células e enzimas suspensas, que podem ser alternativas de baixo custo e viáveis para o emprego uma única vez.

Do ponto de vista de aplicação industrial, a obtenção de intermediários e produtos enantiomericamente puros de forma eficiente e economicamente viável é que determina a aplicação de um determinado biocatalisador.

Sistemas enzimáticos e suas funções

Dentre as classes de enzimas mais comumente aplicadas em síntese orgânica (Tabela 2), as enzimas hidrolíticas compreendem o grupo com maior aplicação por catalisarem reações de biotransformação com alta quimio-, régio- e enantiosseletividade, além de possuírem a vantagem de não dependerem da regeneração de cofatores. Dentre as hidrolases, as lipases, esterases, proteases, amidases, nitrilases, nitrila hidratases e epóxido-hidrolases são comumente aplicadas na obtenção de blocos de construção quirais a partir de misturas racêmicas via resolução cinética,⁴⁵ compostos pró-quirais⁴⁶ e misturas diastereoisoméricas (Figura 2).^{39,47}

Um grande avanço nos processos de resolução enzimática se deu após a incorporação de reagentes adicionais para promover a racemização catalítica *in situ* via processos de resolução dinâmica. A racemização *in situ* permite o aumento gradativo do substrato reconhecido pela enzima, possibilitando a obtenção do produto desejado em rendimentos superiores a 50% e excessos enantioméricos >99%.⁴⁸

A versatilidade das enzimas hidrolíticas permite ainda a catálise enantiocomplementar por meio das reações reversas (esterificação, transesterificação, aminólise ou amidação) permitindo o acesso a ambos os enantiômeros de um par de racemato.⁴⁹

Dentro da classe das hidrolases, as reações catalisadas por lipases possuem uma grande importância biotecnológica.⁵⁰ As lipases pertencem a um grande grupo de enzimas capazes de hidrolisar ligações éster em triacilgliceróis, processar gorduras ou atuar como detergentes. O entendimento do ciclo catalítico das lipases representou um importante passo para disseminar sua aplicação em síntese orgânica.⁵¹ Como, em geral, apresentam alta especificidade, promovem reações enantiosseletivas e devido ao baixo custo e alta eficiência, as lipases são aplicadas em inúmeros processos em indústria farmacêutica.

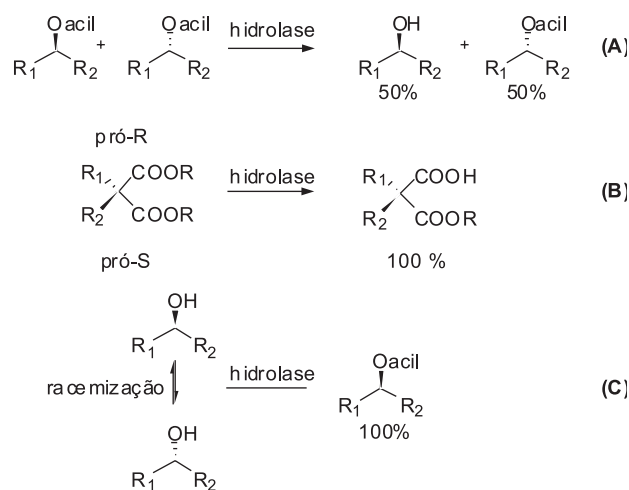


Figura 2. Processos enzimáticos para obtenção de enantiômeros puros: (A) resolução cinética de racemato para obtenção de 50% do produto e recuperação de 50% do substrato enantiomericamente puro; (B) dessimetriação de compostos pró-quirais; (C) Resolução cinética dinâmica para obtenção de 100% do produto enantiomericamente puro

Alguns exemplos envolvem a acilação quimio- e regioseletiva do 506U78, uma droga terapêutica utilizada no tratamento da leucemia, via Novozyme-435 pela Glaxo Wellcome,⁵² a aplicação de resolução cinética na síntese do Ca-antagonista Diltiazem,⁵³ e a preparação de aminas quirais pela BASF.

A incorporação das reações enzimáticas hidrolíticas junto à síntese química permite várias aplicações práticas e bem estabelecidas como o uso de penicilina G acilase para clivar a cadeia lateral de antibióticos β-lactâmicos possibilitando a introdução de novas cadeias laterais,⁵⁴ o uso de lipases na síntese do Taxol⁵⁵ e de nucleosídeo fosforilases na síntese do agente antiviral Ribavirina.⁵⁶

Ainda tratando-se da síntese de antibióticos β-lactâmicos, no âmbito nacional foi firmado um Convênio entre a Prodotti Laboratório Farmacêutico LTDA e UFSCar e UFRJ para a produção enzimática de ampicilina e amoxicilina. No processo industrial a D-fenilglicina e D-*p*-hidroxifenilglicina são produzidas por vias enzimáticas utilizando-se penicilina G acilase imobilizada.⁵⁷

O segundo grupo de enzimas mais utilizado compreende as oxidoredutases. Este grupo de enzimas é cofator dependente e neste caso a utilização de células íntegras ou de alternativas que permitam a regeneração destes cofatores a partir dos subprodutos das reações são necessárias para viabilizar o custo na aplicação destas enzimas

industrialmente. A regeneração do cofator também viabiliza o processo sintético geral e permite que a reação química se processe por completo, previne o acúmulo de subprodutos que venham a promover a inibição da enzima, facilita o tratamento da reação e promove o aumento da enantiosseletividade (Tabela 3).

Tabela 3. Coenzimas comumente requeridas em biotransformação. Adaptado da ref. 39

Coenzimas	Tipo de reação	Reciclagem
NAD ⁺ / NADH ou NADP ⁺ /NADPH	Remoção e adição de hidreto	(+) [++]
ATP	Fosforilação	(+) [+]
SAM	C ₁ -alquilação	(+) [±]
Acetil-CoA	C ₂ -alquilação	(+) [±]
Flavinas	Oxigenação	(-)
Piridoxal-fosfato	Transaminação	(-)
Biotina	Carboxilação	(-)
Complexos metálicos metal-porfirina	Peroxidação e oxigenação	(-)

Dentre as enzimas dependentes de cofator, as oxigenases (mono- e dioxigenases) são capazes de promover a inserção de um átomo de oxigênio a partir do oxigênio molecular, em alcanos, compostos aromáticos e olefinas. As reações de oxidação específicas para promover a obtenção de produtos com alto excesso enantiomérico ainda constituem um problema em química orgânica clássica. Estas oxidases oferecem a possibilidade de promover reações de oxidação e bio-hidroxilação em átomos de carbono não ativados.⁵⁸ As mono- e dioxigenases utilizam metais em baixo estado de oxidação (em geral Fe²⁺ ou Cu⁺) para ativar a molécula de oxigênio e, consequentemente, o processo de regeneração em geral utiliza NAD(P)H. Estas mono-oxigenases geralmente são empregadas como células íntegras que promovem a sua regeneração *in vivo*.

Dentre as mono-oxigenases, as do tipo citocromo P450 apresentam em seu sítio catalítico o grupo ferro-heme que se liga ao oxigênio molecular e permite a oxidação do substrato.^{59,60} Já as cicloexanonas mono-oxigenases são dependentes de flavina e promovem oxidações assimétricas do tipo Baeyer-Villiger podendo ser aplicadas na síntese enantiosseletiva de lactonas, importantes blocos de construção quirais. Outras reações de oxidação têm sido aplicadas na obtenção de cetonas, alcoóis fluorinados, aminas e lactamas. Todas estas aplicações levam à obtenção dos compostos hidroxilados em altos rendimentos e excesso enantiomérico (*ee*).

As outras classes de enzimas como proteases e glico-hidrolases também apresentam importantes funções como catalisadores em síntese. As proteases são utilizadas na síntese de peptídeos e reações de aminólise, além de poderem ser induzidas *in vitro* para atuarem na formação de ligações amida e éster.⁶¹ Entre as glico-hidrolases, as glicosiltransferases podem ser utilizadas para promover a incorporação de açúcares na síntese de glicoproteínas,⁶¹ as endoglicosidases na clivagem e substituição de cadeias de açúcares⁶² e as exoglicosidases na formação de ligações glicosídicas.

Algumas ligases, em especial as aldolases, permitem a construção de ligações C-C com total controle da estereoquímica, mostrando-se também atraentes para aplicação em síntese orgânica.⁶³

Triagem por biocatalisadores

A busca inicial por um biocatalisador adequado para uma determinada conversão envolve o uso de uma enzima já conhecida,

disponível comercialmente ou descrita na literatura ou ainda a triagem da biodiversidade por organismos que possuam o perfil enzimático desejado. Várias indústrias investiram em programas para a identificação de novos biocatalisadores por processo de triagem microbiana em busca das atividades desejadas. A BASF⁶⁴ e a Chirotech⁶⁵ estão entre as empresas que utilizaram metodologias de triagem e seleção para a obtenção de linhagens produtoras de nitrilases e γ -lactamases, respectivamente.

Ainda assim é possível afirmar que os biocatalisadores utilizados na atualidade representam uma fração bastante pequena do que é possível se estimar. Cerca de apenas 1% da diversidade microbiana existente é possível de ser cultivada utilizando metodologias padrão.⁶⁶

O Brasil, entretanto, possui uma vantagem territorial que torna o processo de triagem por novas enzimas para aplicação em processos catalíticos extremamente atrativo, além de necessário para conhecermos pelo menos uma parte da nossa microbiota.

O conjunto catalítico de um microrganismo selvagem pode ser avaliado através de metodologias eficientes de seleção e/ou triagem da atividade enzimática para encontrar o biocatalisador ideal para o processo de interesse. O termo seleção é utilizado para técnicas que permitem o crescimento ou vantagem de sobrevivência aos organismos que apresentam a função enzimática de interesse.⁶⁷

Por outro lado, os procedimentos de triagem envolvem a aplicação de um sistema rápido, suficientemente sensível e específico, que permita a identificação das variantes positivas. Os ensaios no formato de microplacas de 96 poços são bastante interessantes, pois fornecem resultados quantitativos e podem ser automatizados pelo uso de sistemas robotizados e leitoras de microplaca para aquisição de dados.⁶⁷ É claro que a metodologia de triagem precisa ser necessariamente planejada e adaptada para encontrar a atividade enzimática de interesse.

Existem vários métodos para seleção de microrganismos relacionados na literatura. Entretanto, poucos métodos de triagem aplicáveis para células íntegras podem ser encontrados, sendo que os diversos sistemas existentes são em geral direcionados para a triagem de enzimas isoladas ou parcialmente purificadas. Marsaioli e colaboradores⁶⁸ foram pioneiros no país em implantar metodologias de triagem rápida adaptadas para sistemas íntegros utilizando sondas fluorogênicas derivadas da umbeliferona.

Metagenoma

As metodologias de biologia molecular utilizadas na tecnologia do DNA recombinante representam uma ferramenta de grande importância para acessar o potencial enzimático de organismos de difícil isolamento e cultivo. Como mencionado, somente uma pequena fração de microrganismos da biodiversidade (menos de 1%), são cultiváveis sob condições padrão em laboratórios de microbiologia. Uma alternativa para acessar os grupos de genes presentes em solo, ambiente marinho, ou ambientes extremos, como microbiota anaeróbia de petróleo entre outras, envolve a construção de bibliotecas metagenômicas. O processo consiste na extração do DNA total de amostras do ambiente (metagenoma) e expressão em organismos adequados, de fácil cultivo e crescimento rápido, como *Escherichia coli*.⁶⁹

A Diversa Corporation relatou recentemente⁷⁰ o descobrimento de 200 novas nitrilases através da triagem de uma biblioteca metagenômica criada a partir de amostras de DNA extraídas de vários *habitats*. A triagem da biblioteca de nitrilases frente à 3-hidroxi-glutaronitrila revelou 22 nitrilases capazes de fornecer o enantiômero de configuração *S* com 90-98% *ee*. O enantiômero com configuração *R* foi produzido por uma única variante em 98% rendimento e 95% *ee*.

Evolução dirigida e engenharia de proteínas

As ferramentas biológicas da tecnologia do DNA recombinante⁷¹ tornaram-se um aliado forte na concepção de novas enzimas para promover reações de biotransformação em química, provocando uma modificação da sequência de passos para a escolha de uma enzima para uma determinada aplicação. Após selecionar a enzima capaz de catalisar a reação específica e aperfeiçoar as condições de reação, é possível ainda promover um incremento na atividade do biocatalisador através de ciclos de evolução dirigida e engenharia de proteínas.^{67,72}

Durante os últimos 30 anos a engenharia de enzimas baseada em mutagênese sítio dirigida contribuiu enormemente para o entendimento do processo de catálise enzimática e permitiu a obtenção de algumas variantes enzimáticas com propriedades modificadas para a aplicação em síntese. Entretanto, apesar da característica racional do método, existe uma grande limitação na aplicação, já que é necessário um conhecimento prévio da conexão entre sequência e função da proteína e sua estrutura tridimensional.

Uma alternativa para a obtenção de novos biocatalisadores úteis para expandir a capacidade do desenho biológico é o desenvolvimento de proteínas por um processo evolucionário *in vitro*. Os métodos baseiam-se na combinação de técnicas de mutagênese aleatória de genes, expressão das enzimas mutantes e triagem ou seleção das propriedades funcionais desejadas. O gene do melhor variante da biblioteca inicial de mutantes é então usado como molde para outros ciclos de mutagênese/expressão/triagem e o processo é repetido quantas vezes forem necessárias até que seja atingido o nível de melhoramento desejado (Figura 3). É este caráter *Darwinístico* que torna robusto o processo de evolução dirigida e o distingue das aproximações exploradas por engenharia de proteínas baseadas, por exemplo, em um plano *de novo*.⁷³ As metodologias não requerem o conhecimento prévio da relação entre estrutura e função da enzima⁷⁴ e possibilitam a obtenção de enzimas modificadas com relação à especificidade ao substrato, enantiosseletividade, topologia da proteína, termoestabilidade e tolerância a solventes orgânicos.⁷⁵

Vários métodos de biologia molecular para mutagênese foram relatados nas últimas décadas.^{72, 75} O método mais utilizado é o *epPCR* (*error-prone PCR* – PCR: reação em cadeia da polimerase)⁷⁶

que se baseia na propriedade de algumas polimerases termoestáveis em apresentarem baixa fidelidade ao longo da extensão da cadeia de DNA introduzindo erros ao acaso (0.1×10^{-4} a 2×10^{-4} /nucleotídeo por ciclo). Em geral são aplicados de 3 a 8 ciclos de *epPCR* para introduzir mutações que possam amplificar uma determinada atividade enzimática.⁷⁷

O método conhecido como “DNA *shuffling*”, introduzido por Stemmer⁷⁸ promove a criação de uma biblioteca de genes híbridos (quimeras) por recombinação homóloga dos genes parentais. Este processo é muito similar à reprodução sexual de procariontes e leva à geração de novos genes que codificam as proteínas que acumulam informações de seus precursores.⁷⁹ Aplicando métodos de recombinação como o DNA *shuffling* ou outras variações que surgiram posteriormente,⁸⁰ genes de diferentes espécies podem sofrer cruzamento e levar à formação de biocatalisadores com atividades amplificadas, ou ainda completamente diferentes de seus genes parentais e também das encontradas na natureza.

As metodologias que empregam uma aproximação aleatória para gerar uma biblioteca de enzimas mutantes fundamentam-se no fato de que muitas propriedades importantes de biocatalisadores não estão localizadas em um número pequeno de resíduos catalíticos, mas sim refletem a contribuição de muitos resíduos distribuídos ao longo da proteína. Em posições adequadas, os aminoácidos atuam promovendo perfeita sintonia entre o substrato e a especificidade da reação. Algumas substituições benéficas geradas por mutagênese aleatória e triagem podem promover apenas modificações estruturais discretas, mas resultar em consequências positivas que estão além da resolução por análise estrutural ou qualquer tipo de previsão.

Já a técnica de mutagênese por saturação⁸¹ refere-se a randomizações de aminoácidos em uma, duas ou mais posições simultâneas em uma enzima e constitui uma metodologia que emprega uma aproximação semirracional baseada na propriedade que se quer amplificar. Para ampliar aceitação por substrato ou enantiosseletividade de um biocatalisador, em geral, são construídas bibliotecas focadas no sítio ativo.^{75,81,82} Para termoestabilidade, em geral, características como a flexibilidade enzimática podem ser alteradas.⁸³ Este método tem a vantagem de restringir a sequência espacial e, portanto, facilita o trabalho de triagem e seleção. Outra vantagem é que a escolha correta das posições a serem randomizadas leva à produção de bibliotecas de alta qualidade e ciclos iterativos podem ser realizados permitindo que ocorra o acúmulo de efeitos sinérgicos.⁸³

O método de evolução a ser empregado depende de cada caso, mas um sistema de triagem e seleção rápida da atividade enzimática fundamentalmente tem que estar acoplado à metodologia de criação de bibliotecas de enzimas mutantes (Arnold e colaboradores⁷⁵). O maior desafio relacionado a estas técnicas é o envolvimento de métodos e estratégias que minimizem o esforço experimental e maximizem os efeitos catalíticos positivos.

Um exemplo bem sucedido da aplicação de técnicas de evolução dirigida foi atingido para a hidroxilação de alcanos de cadeia curta (C3-C10) pela mono-oxigenase do tipo citocromo P450.⁸⁴ A enzima citocromo P450 isolada da bactéria de solo *Bacillus megaterium*, cuja função natural é a hidroxilação seletiva de ácidos graxos de cadeia longa, foi modificada após cinco gerações de mutagênese, sendo dois ciclos de *epPCR* e 3 rodadas de StEP (Zhao e colaboradores⁸⁰) gerando cerca de 10.000 mutantes. Após a triagem baseada no consumo de NADH, foi identificado um clone capaz de hidroxilar alcanos de cadeia curta, como propano e butano. A hidroxilação seletiva de alcanos em condições brandas é uma alternativa mais limpa e seletiva que os métodos de síntese química e biorremediação. Esta aproximação em especial está relacionada à busca de uma enzima capaz de promover a hidroxilação de etano para gerar etanol.⁸⁴

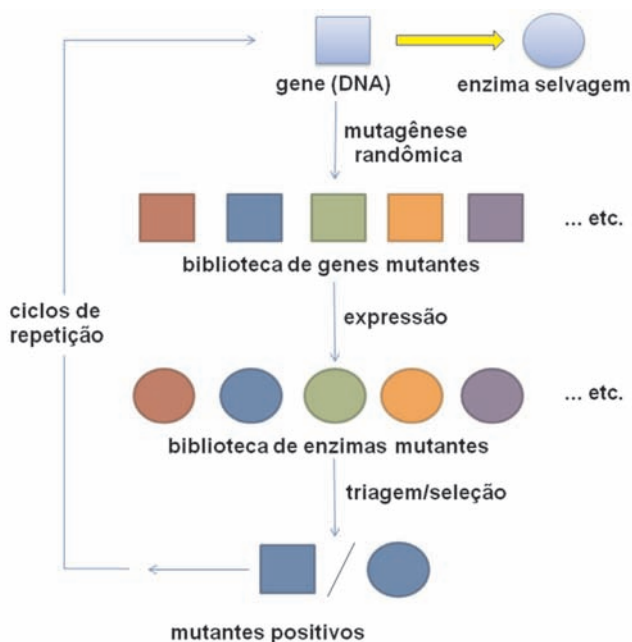


Figura 3. Evolução dirigida de enzimas

Em outro estudo relativamente recente, após três rodadas de mutagênese e triagem foi possível obter uma hidantoinase com seletividade revertida frente à L-5-(2-metiltoetil) - hidantoína além de promover um incremento de cinco vezes em sua atividade catalítica. O processo está sendo avaliado pela Degussa AG, que pretende incorporar a enzima desenvolvida em célula íntegra para a produção comercial da L-metionina.⁸⁵

Modificação de etapas biossintéticas

Microorganismos, plantas e animais produzem uma ampla gama de compostos que atuam como drogas, corantes, fragrâncias, flavorizantes e cosméticos. Entretanto, muitos destes compostos são produzidos em quantidades diminutas por suas fontes naturais e muitos ainda são extremamente difíceis de serem obtidos por síntese química, dada a sua complexidade estrutural. Um importante avanço da biotecnologia está em possibilitar a produção destes compostos em organismos com rápido ciclo de crescimento, possibilitando a produção em larga escala.

Algumas das aproximações mais relevantes envolvem a recombinação de assembléia de genes (engenharia de etapas metabólicas) e metodologias de evolução molecular. Este conceito permite a criação de etapas multienzimáticas completamente novas e eficientes para produzir compostos naturais e não naturais e certamente representa uma ferramenta importante para a descoberta e produção de novos compostos biologicamente ativos.

As enzimas multimodulares, por exemplo, funcionam como assembléias lineares que produzem milhares de compostos da classe dos policetídeos e peptídeos não-ribossomais e muitos deles são dotados de importantes atividades farmacológicas, como eritromicina, epotilona, lovastatina, penicilinas, ciclosporina e vancomicinas. Algumas destas assembléias lineares, como as precursoras da eritromicina e ciclosporina, promovem a ciclização intramolecular originando macrolactonas e macrolactamas.⁸⁶

A possibilidade de reprogramar os domínios enzimáticos destas assembléias lineares para dar origem a produtos não naturais é um dos objetivos da biossíntese combinatorial. A ordem dos domínios enzimáticos determina quais subunidades monoméricas serão ativadas, condensadas e estendidas. Alterando a ordem e/ou permutando os domínios enzimáticos é possível controlar a estrutura do produto formado. O uso de ferramentas de evolução dirigida, como DNA *shuffling* e outras aproximações promovendo modificações dos domínios catalíticos das policetídeo sintases (PKS) e peptídeo não-ribossomais sintetases (NRPS), permite ampliar a diversidade molecular de produtos naturais complexos.

Outro exemplo, também dentro deste contexto, envolve a expressão funcional das etapas biossintéticas para a obtenção de carotenóides modificados. Schmidt-Dannert e colaboradores⁸⁷ aplicaram este conceito para o desenvolvimento de etapas modificadas na síntese de pigmentos carotenóides. Mesclando grupamentos de genes produtores de fitoenos de *Erwinia sp.* com uma biblioteca de genes híbridos gerados por *shuffling*, codantes para uma dessaturase foram geradas milhares de bactérias providas de pigmentos e várias delas apresentaram coloração amarela ou rósea, diferente da coloração alaranjada presente nas linhagens selvagens. Outras combinações com uma nova biblioteca de genes híbridos de ciclaes levaram à formação de uma variedade ainda maior de bactérias pigmentadas. Entre os compostos identificados foi encontrado o toruleno, um carotenóide cuja produção por linhagens de *Erwinia* ou outras bactérias era desconhecida. Outra observação interessante é que a etapa biossintética criada pela recombinação de genes é completamente diferente da utilizada por leveduras para a produção deste mesmo composto.⁸⁷

É de se esperar que avanços ainda maiores sejam alcançados com o progresso da genômica estrutural, revelando as estruturas tridimensionais de vários membros das principais superfamílias de enzimas. Em adição, o grupo de genes que codifica enzimas que catalisam uma série de reações químicas necessárias para sintetizar um composto em particular pode ser transferido para hospedeiros mais amigáveis, facilitando o trabalho experimental e conferindo a estes hospedeiros a habilidade de sintetizar os produtos desejados. Metodologias aplicadas na evolução dirigida de enzimas podem aperfeiçoar o processo de engenharia de etapas metabólicas, criando novas etapas e, consequentemente, levando à produção de novos compostos.

Enzimas em biorremediação

O estudo de enzimas capazes de promover biorremediação é um tópico vastamente explorado nas últimas três décadas e caracteriza a degradação de moléculas poluentes orgânicas e inorgânicas. A eliminação das moléculas orgânicas poluentes, principalmente compostos aromáticos e heteroaromáticos, pode ocorrer via transformações oxidativas, redutivas e hidrolíticas. A enzimologia do processamento de íons inorgânicos tóxicos também tem progredido continuamente de forma a viabilizar a eliminação eficiente de mercúrio, cobre, cádmio, prata, arsênio e cobalto.⁸⁸

O processo de biorremediação requer o uso de enzimas programadas para trabalhar em células microbianas e não via um processo catalítico isolado (com enzimas exudadas). A engenharia de etapas metabólicas por introdução de genes heterólogos e expressão *in vivo* pode ser uma alternativa para promover a degradação de compostos não biogênicos (como compostos poliaromáticos: naftaleno; aromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno); hidrocarbonetos (aldeídos alifáticos, ciclohexanonas), heterocompostos (policlorobenzenos – PCBs), sulfatos, nitratos, haletos, sulfetos, metais pesados, entre outros⁸⁹), assim como a utilização de comunidades bacterianas mistas ou coexistentes.⁸⁸

Biocatálise na indústria

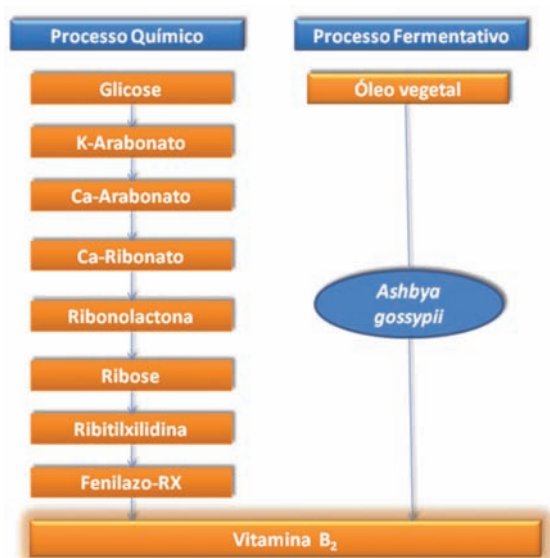
No campo industrial, algumas empresas como BASF, DSM, Lonza, Eli Lilly, Bristol-Myers Squibb e Yamasa desenvolvem e aplicam processos biocatalíticos para a produção em larga escala de um número considerável de blocos de construção opticamente ativos (Tabela 4).

Dentre alguns processos biocatalíticos desenvolvidos em indústrias podemos destacar aqueles utilizados pela BASF (Alemanha), que desde 1993 aplica lipases na produção de álcoois enantiomericamente puros a partir de misturas racêmicas; reações de condensação e redução de cetonas para a resolução dos racematos; resolução de aminas em escala de centenas de toneladas (os produtos formados (*R*-amida e *S*-amina) são recuperados e separados por destilação e apresentam elevadas purezas óptica e química). Um exemplo representativo deste último é ilustrado pela produção anual de 2000 toneladas de *S*-metóxi-isopropilamina, um bloco de construção quiral utilizado para a obtenção do herbicida Frontier X2.⁹⁰ A empresa utiliza também processos empregando nitrilases para a preparação de ácido (*R*)-mandélico em escala de multitoneladas.⁹¹

Dentre esses processos podemos destacar a substituição do processo químico multietapas para a produção de vitamina B₂, utilizada como suplemento em ração animal, por um processo de fermentação biológica em uma única etapa pelo fungo geneticamente modificado *Ashbya gossypi* (Esquema 1). O fungo utiliza óleos vegetais como nutriente e produz os cristais de vitamina B₂, os quais são então separados do excesso de líquido. Esse processo permitiu ampliar a produtividade em 20% utilizando o micro-organismo, reduzir os

Tabela 4. Sistemas biocatalíticos em larga escala aplicados por indústrias químicas

Aplicabilidade	Reação	Biocatalisador / Enzima	Empresa
Ácido <i>R</i> -mandélico	hidrólise	Enzima/nitrilase	BASF
Produção de aminoácidos não-proteinogênicos	resolução	Enzima/amidase	DSM
Ácido L-aspártico	adição de amônia	Enzima/liase	DSM
Aspartame (L- α -I-fenilalanina)	acoplamento seletivo	Enzima/termosilina	DSM
6-APA	hidrólise	Enzima/penicilina acilase	DSM
Penicilinas semissintéticas	hidrólise	Enzima /penicilina acilase	DSM
Precusores de penicilinas modificadas	hidrólise	Enzima /penicilina acilase	Eli Lilly
Taxol	hidrólise	Enzima/lipase	Bristol-Myers Squibb
Antiviral Ribavirina	hidrólise	Nucleosídeo fosforilases	Yamasa
PHB biopolímero	fermentação	Célula íntegra	PHB Industrial, instalada junto à Usina da Pedra, em Serrana (SP)
6-hidróxi- <i>S</i> -nicotina	adição de água	Célula íntegra/ hidroxilase	Lonza
Intermediário farmacêutico do (-)-LY300164	hidroxilação	Célula íntegra/ desidrogenase	Eli Lilly
Ácido (<i>R</i>)-2-(4'-hidróxi-fenóxi-propionico) – intermediário da síntese de herbicida	hidroxilação	Célula recombinante/ oxidase	BASF

**Esquema 1.** Processo fermentativo para obtenção da vitamina B₂ (BASF-Alemanha)

custos do processo em 50%, além da redução de 60% dos resíduos descarregados em água e de 50% de resíduos gasosos.⁹²

Outra grande empresa que tem empregado processos biocatalíticos em larga escala é a DSM, uma empresa holandesa, pioneira em iniciar a aplicação de transformações biocatalisadas desde 1970. Os primeiros processos envolviam a resolução enzimática de D/L-fenilglicinamida em D-fenilglicinamida e L-fenilglicina utilizando leucina aminopeptidase de porco e L- α -aminoacilamidase de *Pseudomonas putida*.⁹³ Atualmente a empresa emprega tecnologias baseadas em biocatálise, biotransformação e fermentação aliadas a métodos químicos para a produção de intermediários avançados.^{94,95,96}

Entre alguns exemplos, a DSM detém processos enzimáticos para a produção de L-aminoácidos não proteinogênicos, baseados na resolução de α -aminoamidas, obtidas a partir de aldeídos através

da síntese de Strecker.⁹⁷ A resolução é promovida por amidases estritamente L-seletivas. As enzimas utilizadas são produzidas por *Pseudomonas putida*, *Mycobacter neoaurum* e *Ochrobactrum anthropii* e variam em aceitação de substrato, atividade específica e enantio-seletividade.^{94,95,98,99} Atualmente, os genes que codificam as amidases foram isolados e superexpressados em *E. coli* para a produção das enzimas, resultando em processos ainda mais eficientes.

O adoçante aspartame (éster metílico da L- α -aspartil-L-fenilalanina) é produzido em escala de quilotoneladas pela Holland Sweetner Company, uma *joint venture* formada pela Tosoh e DSM. O processo de produção do aspartame utiliza uma enzima proteolítica, a termolisina, para catalisar a formação de um dipeptídeo derivado do ácido L-aspártico *N*-protegido e do éster metílico da D/L-fenilalanina.⁹⁴ O ácido L-aspártico também é obtido por biocatálise promovida por uma aspartase que catalisa a adição de amônia ao ácido fumárico.¹⁰⁰ A termolisina promove o acoplamento entre os aminoácidos conduzindo ao produto desejado com uma seletividade marcante. O éster metílico da fenilalanina remanescente pode ser racemizado e reciclado ao longo do processo.

Além dos processos enzimáticos, a DSM também é a produtora de penicilina G/V por fermentação utilizando linhagens de *Penicillium chrysogenum*. A penicilina G, por exemplo, é convertida ao ácido 6-aminopenicilânico que é utilizado para a obtenção de penicilinas e cefalosporinas semissintéticas.^{101,102}

A DSM hoje aplica um processo extremamente eficiente para a obtenção da cefalexina. A via antiga foi desenvolvida em 1970 e combinava 1 etapa de fermentação (etapa 3) com 7 etapas de síntese química (Esquema 2).¹⁰³

Com o intuito de diminuir o número de etapas utilizadas no processo e obter um método mais eficiente, econômico e ambientalmente amigável para a síntese da cefalexina, a resposta foi encontrada com a integração entre síntese química, conversão enzimática e fermentação (Figura 4).

Em 2000, a empresa divulgou a nova rota para a síntese da cefalexina, consistindo de 1 etapa de síntese orgânica (etapa 1), 1 etapa de fermentação (etapa 2) e 2 etapas enzimáticas (etapas 3 e 4 – Esquema 3).¹⁰³

1. Benzaldeído → D-fenilglicina
2. D-fenilglicina → cloridrato de D-fenilglicina
3. Açúcar + ácido fenilacético → penicilina G
4. Penicilina G → Penicilina G sulfóxido
5. Penicilina G sulfóxido → Penicilina G sulfóxido trimetilsilil éster
6. Expansão de anel da Penicilina G sulfóxido trimetilsilil éster para o ácido 7-aminodeacetoxipenicilânico (7-ADCA) protegido
7. Hidrólise (7-ADCA) protegido para formação do 7-ADCA
8. cloridrato de D-fenilglicina + 7-ADCA → cefalexina

Esquema 2. Rota utilizada para a síntese da cefalexina (1970)

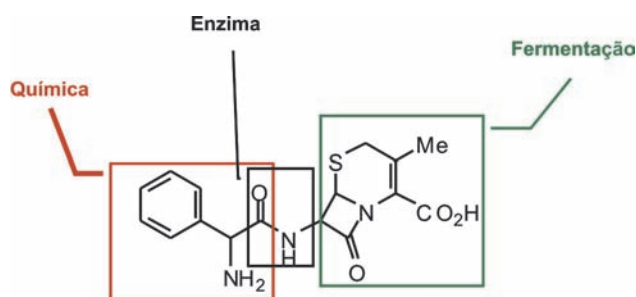


Figura 4. Integração entre síntese química, conversão enzimática e fermentação para obtenção da cefalexina

1. Benzaldeído → D-fenilglicina amida
2. Açúcar + ácido adípico → 7-ADCA-amida do ácido adípico
3. 7-ADCA-amida do ácido adípico → 7-ADCA + ácido adípico (reciclado para uso na etapa 2)
4. D-fenilglicina amida + 7-ADCA → cefalexina

Esquema 3. Rota utilizada para a síntese da cefalexina (2000)

O processo antigo, além de seguir uma sequência multietapas linear, requer uma grande quantidade de energia e gera cerca de 30-40 kg de resíduos por kg de produto. O novo processo, além de integrar etapas de conversão biológica, eliminou a necessidade de utilizar cloreto de metileno como solvente e reduziu drasticamente a geração de resíduos e emissão de compostos tóxicos.

A D-fenilglicina e D-para-hidróxi-fenilglicina, que são utilizadas como cadeias laterais na obtenção dos antibióticos semissintéticos ampicilina, amoxicilina, cefalexina e cefadroxil, também são produzidas pela DSM. A reação de acoplamento da cadeia lateral ao núcleo pode ser facilmente realizada por métodos químicos, mas a empresa também investiu em um método biocatalítico que utiliza uma segunda penicilina acilase.^{94,104,105,106} Em outubro de 2008, a empresa em conjunto com outros sete grupos de pesquisa internacionais divulgou o sequenciamento completo do genoma do *P. chrysogenum*,¹⁰⁷ um projeto que corresponde a um grande avanço na história das penicilinas e abre oportunidade para o desenvolvimento de metodologias biotecnológicas ainda mais eficientes para serem aplicadas na síntese de antibióticos β-lactâmicos.

A Companhia Suíça Lonza também utiliza uma série de rotas biocatalíticas para a produção de *N*-heterociclos funcionalizados.¹⁰⁸ O ponto forte do processo é que a obtenção destes heterociclos por via química é bastante ineficiente, enquanto as biotransformações que envolvem hidroxilação seletiva de *N*-heterociclos aromáticos, resolução cinética com amidases estereoespecíficas de carboxamidas *N*-heterocíclicas aos correspondentes ácidos carboxílicos enantio-

mericamente puros e a oxidação seletiva de grupamentos alquila em *N*-heterociclos aromáticos fornecem os produtos desejados em elevado rendimento. Esse tipo de processo é aplicado na obtenção do ácido 6-hidróxinicotínico obtido a partir da niacina em rendimentos de cerca de 90% e produção de 65 g L⁻¹.¹⁰⁸

Indústria de commodities

O uso de fermentação para obtenção de *commodities* químicos é atualmente o grande objetivo a ser alcançado pela indústria química.¹⁰⁹ Existem duas vertentes para atuação utilizando processos de fermentação microbiológica, a primeira voltada para a obtenção de biopolímeros e a segunda, voltada para a obtenção dos monômeros petroquímicos a partir de fontes renováveis de carbono.

Um exemplo bem sucedido que engloba a primeira estratégia é representado pela obtenção do poli-hidroxibutirato biodegradável (PHB) a partir da fermentação de glicose por algumas espécies de procariotos, como *Alcaligenes eutrophus* ou *Bacillus megaterium*.¹¹⁰ A biossíntese do PHG envolve a condensação de duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA, a qual é subsequentemente reduzida a hidroxibutiril-CoA, o monômero básico para a polimerização.¹¹¹ Apesar das vantagens de serem considerados polímeros verdes, produtos como o PHB enfrentam resistências de natureza tecnológica, que refletem na incerteza dos investimentos para a sua produção.¹¹²

Já a obtenção de monômeros petroquímicos, como ácido fumárico, ácido láctico, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, ácido succínico, 1,4-butanodiol, ácido adípico e ácido propiônico, entre outros, por processos fermentativos são estratégias que estão ganhando um grande enfoque.¹¹³ Em conjunto com a engenharia de etapas metabólicas e evolução de enzimas acopladas às etapas metabólicas é possível amplificar a produção do produto de interesse utilizando microrganismos, e este tópico já compõe objetos de estudos de vários grupos de pesquisa e indústrias, como a DSM.

Em 1995, a DuPont firmou uma parceria com a Genencor, empresa especializada em biotecnologia, para o desenvolvimento de rotas que levassem à produção biológica de monômeros – em grandes quantidades e a baixo custo – para a síntese de polímeros, em substituição às vias petroquímicas. O estudo garantiu a produção de 1,3-propanodiol (1,3-PD), a partir da glicose utilizando microrganismos recombinantes,¹¹⁴ o qual participa do processo de polimerização junto ao ácido tereftálico (AT) ou dimetiltereftalato (DMT) originando o polítrimetilenotereftalato (PTT). Após o desenvolvimento do processo biotecnológico, DuPont e Tate & Lyle, Plc., uma das maiores companhias produtoras de milho e especializada em processos de fermentação, formaram uma *joint venture* para a construção de uma planta para a produção do 1,3-propanodiol (Sorona®) com expectativas de 50.000 toneladas métricas por ano a partir de 2006. Esse processo de produção do Bio-1,3-propanodiol consome cerca de 40% menos energia que a produção via rota petroquímica e é, sem dúvida, um novo modelo para a produção de monômeros petroquímicos a partir de fontes renováveis de carbono.¹¹⁵

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os pontos ressaltados neste artigo dão uma idéia do potencial das transformações biológicas aplicadas à síntese química na obtenção de blocos de construção quiral, novas entidades químicas e intermediários úteis nas indústrias química e farmacêutica.

É possível notar que muitas referências mencionadas datam da década de 90, mostrando que a biotecnologia aplicada à química (acadêmica e industrial) já se encontrava em desenvolvimento no exterior e que tanto as pesquisas acadêmicas como na indústria caminharam juntas para alcançar o patamar elevado em que hoje se encontram.

Diante dos processos mencionados é importante ressaltar que o setor biotecnológico, assim como os avanços na pesquisa neste campo, obrigatoriamente exige a integração entre várias áreas - como química, biologia, engenharia e informática - no desenvolvimento de produtos. A organização é multidisciplinar.

No Brasil, apesar de o crescimento econômico e as políticas governamentais estarem mais favoráveis nos últimos anos (Lei de Inovação de 2005), uma maior interação entre a academia e o setor privado é uma estratégia fundamental para solucionar os problemas que limitam o desenvolvimento de vários processos aplicáveis e que possam vir a se tornar produtos.

O grande avanço do setor biotecnológico no Brasil, principalmente relacionado à saúde e à agricultura, está relacionado a uma melhora significativa do suporte financeiro de fontes públicas nos últimos anos. Entretanto, o financiamento privado ainda é um grande desafio. Dentre as agências públicas, FINEP e BNDES são as principais fontes de financiamento da maioria das companhias.

Os convênios firmados entre as agências públicas de financiamento (FAPs, CNPq, MCT) e algumas empresas como Dedini, Braskem, Oxiteo, entre outras, têm direcionado uma maior interação entre a indústria e as universidades, favorecendo a consolidação de parcerias para inovação tecnológica. Porém, é fundamental que as políticas econômicas voltadas para Ciência e Tecnologia sejam mantidas independentemente das frentes governamentais que estejam operando nos diferentes momentos.

É importante salientar que o mercado brasileiro continua incapaz de absorver novos doutores e, conseqüentemente, recrutar recursos humanos especializados. Ainda existe um grande *gap* entre a formação que as universidades proporcionam e as necessidades do setor industrial. Além disso, muitos jovens doutores e pesquisadores que saem do país para se especializar em áreas de ponta, acabam por não retornar devido à falta de oportunidades. O crescimento do setor tecnológico será um incentivo para acolher essa mão-de-obra altamente especializada.

As perspectivas de aplicação de transformações biológicas no circuito acadêmico-industrial são positivas, desde que os pontos mencionados acima possam superar as atuais limitações. O Brasil apresenta uma grande vantagem territorial e climática, com uma imensurável biodiversidade ainda pouco explorada. É importante que a comunidade reflita e lute para promover as interações necessárias, muitas vezes com o laboratório vizinho, vislumbrando o crescimento que pode ser gerado em termos de conhecimento e projetando ainda mais a visibilidade da Química e outras ciências no âmbito nacional e internacional.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo constante financiamento às nossas pesquisas (bolsas e auxílio financeiro – JP 2008/00605-1 – L. G. de Oliveira) e ao CNPq (S. M. Mantovani). Em especial gostaríamos de agradecer à Profa. A. J. Marsaioli pelo apoio incondicional, e por nos ensinar a enxergar a química com os olhos da natureza.

REFERÊNCIAS E NOTAS

- Walsh, C.; *Nature* **2001**, *409*, 226; Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 3rd ed., Worth Publishers: New York, 2000; Campbell, M. K.; *Biochemistry*, 2nd ed., Saunders College Publication, 1995.
- Classicamente o conjunto de proteínas com atividade catalítica, as enzimas, é o principal foco das pesquisas em biocatálise. Entretanto, estudos sobre a atividade catalítica do RNA (riboenzimas) assim como da atividade de anticorpos catalíticos (monoclonais) também se encontram em ascensão.
- A palavra biotecnologia foi usada inicialmente em 1919 pelo engenheiro húngaro Karl Ereky. Em 1992, foi estabelecida a definição padrão no marco da Convenção sobre Diversidade Biológica: “qualquer aplicação tecnológica que usa sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados, para criar ou modificar produtos e processos para usos específicos”. Esta definição foi mais tarde ratificada por 168 países e aceita pela FAO e a OMS. http://www.accessexcellence.org/RC/AB/BC/Overview_and_Brief_History.php, <http://www.roche.com.br/NR/rdonlyres/27273F4A-1D0B-4FE4-9DD2-8951FB89EE6E/6488/medicamentosbiologicos1.pdf>, acessadas em Março 2009.
- Leresche, J. E.; Meyer, H. P.; *Org. Proc. Res. Develop.* **2006**, *10*, 572.
- Turner, M. K.; *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 173.
- Bornscheuer, U. T.; Buchholz, K.; *Eng. Life Sci.* **2005**, *5*, 309.
- Behr, A.; Eilting, J.; Irawadi, K.; Leschinski, J.; Lindner, F.; *Green Chem.* **2007**, *10*, 13.
- Weizmann, C.; *US Pat.* **1,315,585 1919**; <http://www.freepatentsonline.com/1315585.html>, acessada em Março 2009.
- Propriedade adquirida pela Merck e produzida em uma escala de 1000 kg/mês em 1947: “Of Microbes and Men”; Report of the Rutgers Research and Educational Foundation, June 1959.
- Hopwood, D. A.; *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotics Makers*, Oxford University Press: New York, 2007; Kieser, T.; Bibb, M. J.; Buttner, M. J.; Chater, K. F.; Hopwood, D. A.; *Practical Streptomyces Genetics*, 2nd ed., John Innes Foundation: Norwich, 2000.
- Watson, J. D.; Crick, F. H.; *Nature* **1953**, *171*, 737.
- Em 1982, Eli Lilly obteve a aprovação do primeiro produto farmacêutico de proteína recombinante nos Estados Unidos: a insulina recombinante humana, Humulin®; Davies, D. M.; *Lilly & Co Eli ZA 8,008,097-A 1981*; *JP 57 123,120-A 1982*.
- A Verdadeira História do Pró-Álcool: <http://www.biodieselbr.com/>, acessada em Março 2009.
- Vasconcelos, Y.; *Revista FAPESP*, Maio 2007, 135.
- Basso, L. C.; Amorim, H. V.; Oliveira, A. J.; Lopes, M. L.; *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8*, 1155; <http://www.fermentec.com.br/br/news/fermentec-news.html> (01/2008), acessada em Março 2009.
- Andrietta, S. R.; Steckelberg, C.; Andrietta, M. G. S.; *Biores. Tecnol.* **2008**, *99*, 3002; Andrietta, S. R.; Andrietta, M. G. S.; *Br PI 0.706.009-2*, **2007**.
- Cunha, A. F.; Missawa, S. K.; Gomes, L. H.; Reis, S. F.; Pereira, G. A. G.; *FEMS Yeast Res.* **2006**, *6*, 280; Cunha, A. F.; Pereira, G. A. G.; *Br PI 0.001.122-3*, **2000**.
- Arnold, F. H.; *Eng. Sci.* **2008**, *2*, 12.
- http://www.braskem.com.br/site/portal_braskem/pt/sala_de_imprensa/sala_de_imprensa_detalhes_6062.aspx, acessada em Março 2009; Morschbacker, A. L. R. C.; *WO 0,067,627-A2 2008*; *WO 0,067,627-A3 2008*; *Br PI 0.005.173-A*, **2006**.
- Nölling, J.; Breton, G.; Omelchenko, M. V.; Makarova, K. S.; Zeng, Q.; Gibson, R.; Lee, H. M.; Dubois, J.; Qiu, D.; Hitti, J.; Wolf, Y. I.; Tatusov, R. L.; Sabathe, F.; Doucette-Stamm, L.; Soucaille, P.; Daly, M. J.; Bennett, G. N.; Koonin, E. V.; Smith, D. R.; *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 4823.
- O butanol é produzido como produto primário em um biorreator de leito fibroso utilizando biotecnologia recente codese desenvolvida pela Environmental Energy Inc. e Ohio State University; Ramey, D. E.; *Environmental Energy Inc. US pat.* **5,753,474-A 1998**.
- Ramey, D.; *Butanol: The Other Alternative Fuel*, Agricultural Biofuels: Technology, Sustainability and Profitability (NABC19): http://nabc.cals.cornell.edu/pubs/nabc_19/NABC19_5Plenary2_Ramey.pdf, acessada em Março 2009.
- Ferrer, M.; Thorsteinsdóttir, H.; Quach, U.; Singer, P. A.; Daar, A. S.; *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 8.
- Dentro da Linha de Fomento à Pesquisa para Inovação Tecnológica: O Programa FAPESP-Bioen apresentou 5 chamadas de propostas acadêmicas e em convênios com indústrias em 2008.

25. Rezaie, R.; Frew, S. E.; Sammut, S. M.; Maliakkal, M.; Abdallah, S. D.; Daar, A. S.; Singer, P. A.; *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 627.
26. Fundação Biominas: http://win.biominas.org.br/estudobio/estudo/download/resumo_estudo_biominas_2007.pdf, acessada em Março 2009.
27. Santos, V.; *Brazil Biotechnology Industry: Massachusetts Office of International Trade & Investment (MOITI)*: <http://www.moiti.state.ma.us/pdf/Brazil%20Biotechnology%20Industry.pdf>, acessada em Março 2009; Galembek, F.; Santos, A. C. M.; Schumacher, H. C.; Rippel, M. M.; Rosseto, R.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1413; Pinto, A. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18* (8), editorial.
28. www.protec.org.br/arquivos/eventos/download/Leliomacairagenvidadpdf.pdf, acessada em Março 2009.
29. de Oliveira, S. B. L.; Xavier, M. S. S. P.; Zuculin Jr., M.; Vilela, L.; Souza, H. R. T.; Guia, M. L. M.; *Br PI 8.803.346-5*, **1988**; *Br PI 8.803.346-5*, **1988**.
30. <http://www.novozymes.com>, acessada em Março 2009.
31. Souza, R. O. M. A.; Matos, L. M. C.; Gonçalves, K. M.; Costa, I. C. R.; Babics, I.; Leite, S. G. F.; Oestreicher, E. G.; Antunes, O. A. C.; *Tetrahedron Letters* (2009), doi:10.1016/j.tetlet.2009.02.100; Alonso, F. O. M.; Oestreicher, E. G.; Antunes, O. A. C.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2008**, *25*, 1; Machado, G. D. C.; Gomes Jr, M.; Antunes, O. A. C.; Oestreicher, E. G.; *Proc. Biochem.* **2005**, *40*, 3186; Monteiro, J. B.; Nascimento, M. G.; Ninow, J. L.; *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 641; Arcuri, M. B.; Sabino, S. J.; Antunes, O. A. C.; Oestreicher, E. G.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *21*, 107; Arcuri, M. B.; Antunes, O. A. C.; Sabino, S. J.; Pinto, G. F.; Oestreicher, E. G.; *Amino Acids* **2000**, *19*, 477; Arcuri, M. B.; Sabino, S. J.; Antunes, O. A. C.; Oestreicher, E. G.; *J. Fluor. Chem.* **2003**, *221*, 55.
32. Milagre, C. D. F.; Milagre, H. M. S.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *56*, 59; Ceni, G. C.; Baldissera, E. M.; Oliveira, D.; Oestreicher, E. G.; Antunes, O. A. C.; Dariva, C.; *Bioproc. Biosystems. Eng.* **2008**, *31*, 541; Perles, C. E.; Moran, P. J. S.; Volpe, P. L. O.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *52-53*, 82; Ribeiro, J. B.; Sousa, L. M. A.; Fraga, C. A. M.; Leite, S. G. F.; Ramos, M. C. K. V.; Aquino Neto, F. R.; Aguiar, L. C. S.; Souza, R. O. M. A.; Antunes, O. A. C.; *Catal. Commun.* **2008**, *9*, 1782; Pinheiro, L.; Marsaioli, A. J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *44*, 78; Limberger, R. P.; Ursini, C. V.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *46*, 37; Lunardi, I.; Cazetta, T.; Conceição, G. J. A.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 925; Clososki, G. C.; Milagre, C. D. F.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *48*, 70; Rozenbaum, H. F.; Patitucci, M. L.; Antunes, O. A. C.; Pereira Jr, N.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2006**, *23*, 273; Fardelone, L. C.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *39*, 9; Lacerda, P. S. B.; Ribeiro, J. B.; Leite, S. G. F.; Coelho, R. B.; Lima, E. L. S.; Antunes, O. A. C.; *Biochem. Eng. J.* **2006**, *28*, 299; Toniazzo, G.; Lerin, L.; Oliveira, D.; Dariva, C.; Cansian, R. L.; Padilha, F.; Antunes, O. A. C.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2006**, *129-132*, 1023; Ribeiro, J. B.; Sousa, L. M. A.; Soares, M. V.; Ramos, M. C. K. V.; Aquino Neto, F. R.; Fraga, C. A. M.; Leite, S. G. F.; Cordeiro, Y.; Antunes, O. A. C.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 984; Lacerda, P. S. B.; Ribeiro, J. B.; Leite, S. G. F.; Ferrara, M. A.; Coelho, R. B.; Bon, E. P. S.; Lima, E. L. S.; Antunes, O. A. C.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1186; Ribeiro, J. B.; Ramos, M. C. K. V.; Aquino Neto, F. R.; Leite, S. G. F.; Antunes, O. A. C.; *Catal. Commun.* **2005**, *6*, 131; Milagre, H. M. S.; Milagre, C. D. F.; Rodrigues, J. A. R.; Rocha, L. L.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N.; *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *90*, 888; Lunardi, I.; Conceição, G. J. A.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 2515; Rodrigues, J. A. R.; Milagre, H. M. S.; Milagre, C. D. F.; Moran, P. J. S.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3099; Toniazzo, G.; Oliveira, D.; Dariva, C.; Oestreicher, E. G.; Antunes, O. A. C.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005**, *123*, 837; Lourenço, E.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *29*, 37; Fardelone, L. C.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *29*, 41; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; Conceição, G. J. A.; Fardelone, L. C.; *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, *42*, 295; Santos, A. S.; Pereira Jr, N.; Sarquis, M. I. M.; Silva, I. M.; Antunes, O. A. C.; *Proc. Biochem.* **2004**, *39*, 2269; Santos, A. S.; Pereira Jr, N.; Conceição, G. J. A.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 43; Conceição, G. J. A.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2327; Fardelone, L. C.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; *Arkivoc* **2003**, *X*, 404; Conceição, G. J. A.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Arkivoc* **2003**, *X*, 500; Silva, I. M.; Sarquis, M. I. M.; Antunes, O. A. C.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2003**, *107*, 649; Ribeiro, J. B.; Ramos, M. C. K. V.; Aquino Neto, F. R.; Leite, S. G. F.; Antunes, O. A. C.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *24-25*, 121; Gonçalves, L. P. B.; Antunes, O. A. C.; Pinto, G. F.; Oestreicher, E. G.; *J. Fluor. Chem.* **2003**, *124*, 219; de Conti, R. M.; Porto, A. L. M.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; Manfio, G. P.; Marsaioli, A. J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 233; Filho, E. P. S.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *15*, 23; Filho, E. P. S.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 847; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 893; de Conti, R. M.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 672; Gonçalves, L. P. B.; Antunes, O. A. C.; Pinto, G. F.; Oestreicher, E. G.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1465; Duran, N.; de Conti, R. M.; Rodrigues, J. A. R.; *Bol. Soc. Chil. Quím.* **2000**, *45*, 109; Kreutz, O. C.; Segura, R. C. M.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2107; Patrocínio, A. F.; Corrêa Jr, I. R.; Moran, P. J. S.; *Perkin Trans. 1* **1999**, *21*, 3133; Kreutz, O. C.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2649; Gonçalves, L. P. B.; Antunes, O. A. C.; Pinto, G. F.; Oestreicher, E. G.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1237; Aleixo, L. M.; Carvalho, M.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1637; Carvalho, M.; Okamoto, M. T.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Tetrahedron* **1990**, *47*, 2073.
33. Bitencourt, T. B.; Nascimento, M. G.; *Green Chem.* **2009**, *11*, 209; Moreira, M. A.; Nascimento, M. G.; *Catal. Commun.* **2007**, *8*, 2049; Moreira, M. A.; Bitencourt, B. T.; Nascimento, M. G.; *Synthetic Commun.* **2005**, *35*, 2107.
34. Antunes, O. A. C.; *Br PI 603.824-7*, **2006**; Antunes, O. A. C.; Dariva, C.; Oliveira, D.; Oestreicher, E. G.; Toniazzo, G.; *Br PI 603.061-0*, **2006**; Leite, S. G. F.; Bom, E. P. S.; Antunes, O. A. C.; Ribeiro e Silva, J. B.; Lima, E. L. S.; Ferrara, M. A.; *Br PI 501.179-5*, **2005**; Cassiola, F. M.; Marsaioli, A. J.; Joekes, I.; Porto, A. M.; *Br PI 0.204.931-7*, **2004**; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; Fardelone, L. C.; *Br PI 0.404.755-9*, **2004**; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; Conceição, G. J. A.; *Br PI 0.303.835-1*, **2003**; Moran, P. J. S.; Fardelone, L. C.; Rodrigues, J. A. R.; *Br PI 0.303.790-8*, **2003**; Comasseto, J. V.; Clososki, G. C.; Missio, L. J.; *Br PI 0.303.909-9*, **2003**; Marsaioli, A. J.; Gonçalves, J. E.; Gonçalves, R. A. C.; Gushikem, Y.; *Br PI 0.100.200-7*, **2002**; Santos, A. S.; Antunes, O. A. C.; Pereira Jr, N.; *Br PI 202.014-9*, **2002**.
35. Paula, A. V.; Moreira, A. B. R.; Braga, L. P.; de Castro, H. F.; Bruno, L. M.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 35; Arantes, G. M.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 377; Urioste, D.; Castro, M. B. A.; Biaggio, F. C.; de Castro, H. F.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 407; Ferraz, H. M. C.; Bianco, G. G.; Bombonato, F. I.; Andrade, L. H.; Porto, A. L. M.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 813; Lopes, A. M.; Pessoa, A.; Rangel-Yagui, C. D.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 998; Melo, H. C.; da Silva, D. B.; Pereira, N.; Anna, L. M. M. S.; dos Santos, A. S.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1104; Huber, P. C.; Almeida, W. P.; de Fatima, A.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1170; Freitas, L.; Bueno, T.; Perez, V. H.; de Castro, H. F.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1514.
36. Lima, R. S.; Nunes, G. S.; Nogueira, T.; Marty, J. L.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 9; Gomes, E.; Guez, M. A. U.; Martin, N.; da Silva, R.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 136; Guaratini, T.; Medeiros, M. H. G.; Colepicolo, P.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 206; Marostica, M. R.; Pastore, G. M.; *Quim.*

- Nova* **2007**, *30*, 382; Uenojo, M.; Pastore, G. M.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 388; Fraige, K.; Crespilho, F. N.; Rezende, M. O. O.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 588; de Moura, J. M. L. N.; Ribeiro, A. P. B.; Grimaldi, R.; Gonçalves, L. A. G.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 965; Sebrao, D.; Silva, V. D.; Nascimento, M. G.; Moreira, M. A.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1182; Vasconcelos, S. M. L.; Goulart, M. O. F.; Moura, J. B. D. F.; Manfredini, V.; Benfato, M. D. S.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1323.
37. França, T. C. C.; Rocha, M. R. M.; Reboredo, B. M.; Rennó, M. N.; Tinoco, L. W.; Figueroa-Villar, J. D.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 64; Liria, C. W.; Romagna, C. D.; Rodovalho, N. N.; Marana, S. R.; Miranda, M. T. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 1574.
38. Pires, C. K.; Morales-Rubio, A.; de la Guardia, M.; Lima, J. L. F. C.; Zagatto, E. A. G.; Reis, B. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 519; Alonso, F. O. M.; Antunes, O. A. C.; Oestreicher, E. G.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 566; Manjarrez, N.; Pérez, H. I.; Solís, A.; Luna, H.; Liévano, R.; Ramírez, M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 709; Linden, R.; Ziulkoski, A. L.; Wingert, M.; Tonello, P.; Souto, A. A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 733; de Melo, H. C.; Selegim, A. P. D.; Polito, W. L.; Fatibello-Filho, O.; Vieira, I. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 797; Freitas, L.; Perez, V. H.; Santos, J. C.; de Castro, H. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 1360.
39. Koeller, K. M.; Wong, C.-H.; *Nature* **2001**, *409*, 232; Faber, K.; *Bioretransformations in Organic Chemistry*, 3rd ed., Springer: Berlin, 1997; Roberts, S. M.; *Biocatalysis for Fine Chemicals Synthesis*, Wiley: Weinheim, 1999.
40. Neste contexto, micro-organismos provenientes de ambientes extremos são de particular interesse, já que sua maquinaria enzimática pode exibir características desejáveis e marcantes, como atuar em condições extremas de temperatura, salinidade e pH.
41. Liu, W.; Wang, P.; *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 369.
42. Uma vantagem dos processos que aplicam solventes orgânicos é a possibilidade de aproveitar o conhecimento prévio das técnicas de *downstream* industriais. Wang, P.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *152*, 343; Luetz, S.; Giver, L.; Lalonde, J.; *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101*, 647; Tonova, K.; Lazarova, Z.; *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 516; Iyer, P. V.; Ananthanarayan, L.; *Proc. Biochem.* **2008**, *43*, 1019; Albuquerque, P.; Witt, M.; Stambuk, B.; Nascimento, M.; Nascimento, M. G.; *Proc. Biochem.* **2007**, *42*, 141; Pilissao, C.; Nascimento, M.; Nascimento, M. G.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 428; Costa, C.; Clososki, G.; Barchesi, H.; Zanotto, S.; Nascimento, M.; Comassetto, J. V.; Nascimento, M. G.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3945; Nascimento, M. G.; Zanotto, S. P.; Melegari, S. P.; Moran, P. J. S.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 567; Klibanov, A. M.; *Nature* **2001**, *409*, 241; Rees, G. D.; Jenta, T. R. J.; Nascimento, M. G.; Catauro, M.; Robinson, B. H.; Stephenson, G. R.; Olphert, R. D. G.; *Indian J. Chem.* **1993**, *32B*, 30.
43. Roosen, C.; Mueller, P.; Greiner, L.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 607; De Maria, P. D.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 6960.
44. Wang, Z. G.; Wan, L. S.; Liu, Z. M.; Huang, X. J.; Xu, Z. K.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *56*, 189; Santos, D. T.; Sarrouh, B. F.; Rivaldi, J. D.; Converti, A.; Silva, S. S.; *J. Food Eng.* **2008**, *86*, 542; Marquez, L. D. S.; Cabral, B. V.; Freitas, F. F.; Cardoso, V. L.; Ribeiro, E. J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *51*, 86; Zhang, Y.; Li, J.; Han, D.; Zhang, H.; Liu, P.; Li, C.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *365*, 609; Antunes, O. A. C.; Almeida, R. V.; Branco, R. V.; Lima, C. S.; Alqueres, S. M. C.; Martins, O. B.; Freire, D. M. G.; *Biochem. Eng. J.* **2008**, *39*, 531; Andrade, J. M.; Perez, R. C.; Oestreicher, E. G.; Dariva, C.; Antunes, O. A. C.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *55*, 185; Sheldon, R. A.; *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289; Rodrigues, J. A. R.; Milagre, H. M. S.; Moran, P. J. S.; Milagre, C. D. F.; Santana, M. H. A.; *Org. Proc. Res. Develop.* **2006**, *10*, 611; Rodrigues, J. A. R.; Milagre, H. M. S.; Milagre, C. D. F.; Santana, M. H. A.; Moran, P. J. S.; *Enz. Microbiol. Technol.* **2005**, *37*, 121; Crespo, J. S.; Nascimento, M. G.; *Proc. Biochem.* **2005**, *40*, 401; Dalla-Vecchia, R.; Sebrão, D.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; *Proc. Biochem.* **2005**, *40*, 2677; Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 623; Adelhorst, K.; Björkling, F.; Antunes, O. A. C.; Oestreicher, E. G.; Arcuri, M. B.; Machado, S. P.; Almeida, C. H. F.; *Amino Acids* **2004**, *27*, 69; Nascimento, M.; Nascimento, M. G.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2003; Antunes, O. A. C.; Arcuri, M. B.; Sabino, S. J.; Oestreicher, E. G.; *Catal. Lett.* **2002**, *79*, 17; Rodrigues, J. A. R.; Porto, A. L. M.; Cassiola, F.; Dias, S. L. P.; Joekes, I.; Gushikem, Y.; Marsaioli, A. J.; Manfio, G. P.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *19-20*, 327; Nascimento, M. G.; Queiroz, N.; *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5225; Rodrigues, J. A. R.; Wendhauser Jr, R.; Fregonesi, A.; Moran, P. J. S.; Joekes, I.; Tonella, E.; Althoff, K.; *J. Biosc. Bioeng.* **2001**, *91*, 48; Queiroz, N.; Nascimento, M. G.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 335; Jesus, P. C.; Silva, P. L. F.; João, J. J.; Nascimento, M. G.; *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 2893; Wendhauser Jr, R.; Moran, P. J. S.; Joekes, I.; Rodrigues, J. A. R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, *5*, 57; Joekes, I.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; Wendhauser Jr, R.; Tonella, E.; Cassiola, F.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1998**, *73*, 54; Jesus, P. C.; João, J. J.; Silva, P. L. F.; Burlin, G.; Nascimento, M. G.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 664; Lima, C.; Silva, P. L. F.; Nascimento, M. G.; Rezende, M. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 173; Jesus, P. C.; Rezende, M. C.; Nascimento, M. G.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 63; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; Joekes, I.; Brenelli, E. C. S.; Leite, R. A.; *Biocatalysis* **1994**, *9*, 321; Aguiar, L. M. Z.; Nascimento, M. G.; Prudencio, G. E.; Rezende, M. C.; Dalla-Vecchia, R.; *Quim. Nova* **1993**, *16*, 414; Nascimento, M. G.; Rezende, M. C.; Dalla-Vecchia, R.; Jesus, P. C.; Aguiar, L. M. Z.; *Tetrahedron Lett.* **1992**, *30*, 5891; Sorriilha, A. E. P. M.; Marques, M.; Joekes, I.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 191; Rees, G. D.; Nascimento, M. G.; Jenta, T. R. J.; Robinson, B. H.; *Biochem. Biophys. Acta* **1991**, *1073*, 493; Godtfredsen, S. E.; Kirk, O.; *Synthesis* **1990**, 112.
45. Kumar, P.; *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2745.
46. Drauz, K.; Waldmann, H.; *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, 2002, vol. II, p. 361-362.
47. Jones, J. B.; *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3351; Sih, C. J.; Wu, S. H.; *Topics Stereochem.* **1989**, *19*, 63; Wong, C.-H.; Whitesides, G. M.; *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon: Oxford, 1994; Drauz, K.; Waldmann, H.; *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley: Weinheim, 1995; Wong, C.-H.; Halcomb, R. L.; Ichikawa, Y.; Kajimoto, T.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1995**, *34*, 412; Wong, C.-H.; Halcomb, R. L.; Ichikawa, Y.; Kajimoto, T.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1995**, *34*, 521; Schoffers, E.; Golebiowski, A.; Johnson, C. R.; *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3769; Klibanov, A. M.; *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 97; Schmid, R. D.; Verger, R.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608; Zaks, A.; Dodds, D. R.; *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **1998**, *1*, 290; Sugai, T.; *Curr. Org. Chem.* **1999**, *3*, 373; Carrea, G.; Riva, S.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 2226.
48. Persson, B. A.; Larsson, A. L. E.; Le Ray, M.; Backvall, J.-E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1645.
49. Mugford, P. F.; Wagner, U. G.; Jiang, Y.; Faber, K.; Kazlauskas, R. J.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8782.
50. Jaeger, K.-E.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T.; *Annu. Rev. Microbiol.* **1999**, *53*, 315; Reetz, M. T.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 145; Krishna, S. H.; Karanth, N. G.; *Catal. Rev.* **2002**, *44*, 499; Ghanem, A.; *Tetrahedron* **2007**, *63*, 172; Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J.; *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*, 2nd ed., Wiley-VCH: Weinheim; 2006.
51. O sítio ativo de uma lipase é composto por uma tríade de resíduos dos aminoácidos: serina, histidina e aspartato ou glutamato.
52. Mahmoudian, M.; *Biocatal. Biotrans.* **2000**, *18*, 105.
53. Tanabe (Japão), Synthelabo (França), Sepracor (USA) e Andeno-DMS (Holanda).
54. Demain, A. L.; Baez-Vasquez, M. A.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *87*, 135.

55. Khmelnitsky, Y. L.; Budde, C.; Arnold, J. M.; Usyatinsky, A.; Clark, D. S.; Dordick, J. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11554.
56. Tetsuro, F.; Yoshitomi, Y.; *JP* **59**, 143,599 **1984**.
57. Antunes, O. A. C.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, S64.
58. Raadt, A.; Griengel, H.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 537.
59. Bernhardt, R.; *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 128.
60. Silverman, R. B.; *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*, Elsevier Science: San Diego, 2001.
61. Bordusa, F.; Ullman, D.; Elsner, C.; Jakubke, H.-D.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1997**, *36*, 2473; Plettner, E.; DeSantis, G.; Stabile, M.; Jones, J. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4977; Witte, K.; Seitz, O.; Wong, C.-H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1979; Jackson, D. Y.; Burnier, J.; Quan, C.; Stanley, M.; Tom, J.; Wells, J. A.; *Science* **1994**, *266*, 243.
62. Wang, L.-X.; Tang, M.; Suzuki, T.; Kitajima, K.; Inoue, Y.; Inoue, S.; Fan, J. Q.; Lee, Y. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11137.
63. Machajewski, T. D.; Wong, C.-H.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 1352.
64. Engels, D.; Mattes, R. F.; Hauer, B.; Friedrich, T.; Ress-Loeschke, M.; *German Pat. DE19 848,129*, **2000**.
65. Taylor, S. J.; Brown, R. C.; Keene, P. A.; Taylor, I. N.; *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2163.
66. Torsvik, V.; Ovreas, L.; Thingstad, T. F.; *Science* **2002**, *296*, 1064.
67. Valetí, F.; Gilard, G.; *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 490.
68. Marsaioli, A. J.; Bicalho, B.; Chen, L. S.; Grognum, J.; Reymond, J.-L.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 911; Mantovani, S. M.; de Oliveira, L. G.; Marsaioli, A. J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *52*, 173; Marsaioli, A. J.; Bicalho, B.; Chen, L. S.; Grognum, J.; Reymond, J.-L.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 911.
69. Em geral, *E. coli* é o hospedeiro mais utilizado na construção de um biocatalisador que carrega um sistema enzimático adequado, seja ele gerado a partir de enzimas já conhecidas, ou selecionadas por triagem ou seleção, ou ainda a partir de enzimas geradas por engenharia de proteína ou evolução dirigida: Panke, S.; Witholt, B.; Schmid, A.; Wubolts, M. G.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 2032 (Errata em *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 3546); Li, Z.; Feiten, H.-J.; Van Beilen, J. B.; Duetz, W.; Witholt, B.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1323.
70. DeSantis, G.; Zhu, Z.; Greenberg, W. A.; Wong, K.; Chaplin, J.; Hanson, S. R.; Farwell, B.; Nicholson, L. W.; Rand, C. L.; Weiner, D. P.; Robertson, D. E.; Burk, M. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9024 (Errata em *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12922).
71. Sambrook, J.; Russell, D. W.; *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor: New York, 2001.
72. *Directed Molecular Evolution of Proteins*; Brakmann, S.; Johnsson, K., eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2002; *Directed Enzyme Evolution: Screening and Selection Methods*; Arnold, F. H.; Georgiou, G., eds.; Humana Press, Totowa: New Jersey, 2003; *Evolutionary Methods in Biotechnology*; Brakmann, S.; Schwienhorst, A., eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2004; Arnold, F. H.; *Nature* **2001**, *409*, 253; Cadwell, R. C.; Joyce, G. F.; *Genome Res.* **1992**, *2*, 28; Reetz, M. T. Em *Directed Evolution of Enantioselective Enzymes as Catalysts for Organic Synthesis*, *Advances in Catalysis*; Gates, B. C.; Knözinger, H., eds.; Elsevier: Amsterdam, 2006, vol. 49, p. 1-69; Reetz, M. T.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 5716; Reetz, M. T.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *113*, 292; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 284; Lutz, S.; Patrick, W. M.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 219.
73. Svendsen, A.; *Enzyme Functionality Design, Engineering, and Screening*, Marcel Dekker: New York, 2004; Fersht, A.; *Structure and Mechanism in Protein Science: a Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, W. H. Freeman: New York, 1999.
74. Lehmann, M.; Wyss, M.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 371; Chen, R.; *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 13.
75. Powell, K. A.; Ramer, S. W.; delCardayré, S. B.; Stemmer, W. P. C.; Tobin, M. B.; Longchamp, P. F.; Huisman, G. W.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 3948; Reetz, M. T.; Zonta, A.; Schimossek, K.; Liebeton, K.; Jaeger, K. E.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1997**, *36*, 2830; Brakmann, S.; Schwienhorst, A.; *Evolutionary Methods in Biotechnology: Clever Tricks for Directed Evolution*, Wiley-VCH: Weinheim, 2004; Taylor, S. V.; Kast, P.; Hilvert, D.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 3311.
76. Rice, G. C.; Goeddel, D. V.; Cachianes, G.; Woronicz, J.; Chen, E. Y.; Williams, S. R.; Leung, D. W.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 5467; Leung, D. W.; Chen, E. Y.; Goeddel, D. V.; *Technique* **1989**, *1*, 11; *PCR Primer: A Laboratory Manual*; Dieffenbach, C. W.; Dveksler, G. S., eds.; CSHL Press: New York, 1995.
77. Zhao, H. M.; Arnold, F. H.; *Protein Eng.* **1999**, *12*, 47.
78. Stemmer, W. P. C.; *Nature* **1994**, *370*, 389; Powell, K. A.; Ramer, S. W.; del Cardayré, S. B.; Stemmer, W. P. C.; Tobin, M. B.; Longchamp, P. F.; Huisman, G. W.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 3948.
79. A natureza utiliza vários caminhos para gerar diversidade molecular via processos evolutivos. Um deles é a recombinação, altamente explorada em laboratórios para evolução *in vitro* de enzimas.
80. Zhao, H. M.; Giver, L.; Shao, Z. X.; Affholter, J. A.; Arnold, F. H.; *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 258; Ostermeier, M.; Shim, J. H.; Benkovic, S. J.; *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 1205; Lutz, S.; Ostermeier, M.; Moore, G. L.; Maranas, C. D.; Benkovic, S. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 11248; Sieber, V.; Martinez, C. A.; Arnold, F. H.; *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 456; Ostermeier, M.; *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *82*, 564; Ostermeier, M.; Nixon, A. E.; Benkovic, S. J.; *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2139; Lutz, S.; Ostermeier, M.; Benkovic, S. J.; *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, E16; O'Maille, P. E.; Bakhtina, M.; Tsai, M. D.; *J. Mol. Biol.* **2002**, *321*, 677; Coco, W. M.; Levinson, W. E.; Crist, M. J.; Hektor, H. J.; Darzins, A.; Pienkos, P. T.; Squires, C. H.; Monticello, D. J.; *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 354; Ness, J. E.; Kim, S.; Gottman, A.; Pak, R.; Krebber, A.; Borchert, T. V.; Govindarajan, S.; Mundorff, E. C.; Minshull, J.; *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1251; Zha, D.; Eipper, A.; Reetz, M. T.; *ChemBioChem* **2003**, *4*, 34; Murakami, H.; Hohsaka, T.; Sisido, M.; *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2000**, *44*, 69.
81. Wells, J. A.; Vasser, M.; Powers, D. B.; *Gene* **1985**, *34*, 315.
82. Black, M. E.; Newcomb, T. G.; Wilson, H. M. P.; Loeb, L. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 3525; Chica, R. A.; Doucet, N.; Pelletier, J. N.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 378; Park, S.; Morley, K. L.; Horsman, G. P.; Holmquist, M.; Hult, K.; Kazlauskas, R. J.; *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 45; Reetz, M. T.; Wilensek, S.; Zha, D. X.; Jaeger, K. E.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 3589; Geddie, M. L.; Matsumura, I.; *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 26462.
83. Reetz, M. T.; Carballeira, J. D.; *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 890; Reetz, M. T.; Carballeira, D.; Vogel, A.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 7745.
84. Glieder, A.; Farinas, E. T.; Arnold, F. H.; *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1135.
85. Syldatk, C.; Altenbuchner, O. M. J.; Mattes, R.; Siemann, M.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 293.
86. Sattely, E. S.; Fischbach, M. A.; Walsh, C. T.; *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 757.
87. Schmidt-Dannert, C.; Umeno, D.; Arnold, F. H.; *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 750; Arnold, F. H.; *Nature* **2001**, *409*, 253.
88. Shumkova, E. S.; Solyanikova, I. P.; Plotnikova, E. G.; Golovleva, L. A.; *Appl. Biochem. Microbiol.* **2009**, *45*, 43; Martinkova, L.; Uhnakova, B.; Patek, M.; Nesvera, J.; Kren, V.; *Environ. Int.* **2009**, *35*, 162; Mohapatra, B. R.; Gould, W. D.; Dinardo, O.; Koren, D. W.; *Clean: Soil, Air, Water* **2008**, *36*, 823; Yair, S.; Ofer, B.; Arik, E.; Shai, S.; Yossi, R.; Tzvika, D.; Amir, K.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **2008**, *28*, 265; Asgher, M.; Bhatti, H. N.; Ashraf, M.; Legge, R. L.; *Biodegradation* **2008**, *19*, 771; Nakatani, A. S.; Siqueira, J. O.; Soares, C. R. F.; Lambais, M. R.; *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **2008**, *32*, 1501; Wackett, L. P.; Ellis, L. B. M.; Speedie, S. M.; Hershberger, C. D.; Knackmuss, H. J.; Spormann, A. M.; Walsh, C. T.; Forney, L. J.; Punch, W. F.; Kazic, T.; Kanehisa, M.;

- Berndt, D. J.; *Am. Soc. Microbiol. News* **1999**, 65, 87; McDaniel, R.; Ebert-Khosla, S.; Hopwood, D. A.; Khosla, C.; *Nature* **1995**, 375, 549; Bizily, S. P.; Rugh, C. L.; Summers, A. O.; Meagher, R. B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 6808.
89. Whiteley, C. G.; Lee, D.-J.; *Enz. Microbial Technol.* **2006**, 38, 291.
90. Balkenhohl, F.; Ditrich, K.; Hauer, B.; Ladner, W.; *J. Prakt. Chemie* **1997**, 339, 381.
91. Ress-Löschke, M.; Friedrich, T.; Hauer, B.; Mattes, R.; Engels, D.; *German pat. DE 198,448,129-A1* **1998**.
92. Karos, M.; Revuelta, D. J. L.; Kroeger, B.; Althoefer, H.; *CA 2,458,953-A1* **2003**.
93. Boesten, W. H. J.; Meyer-Hoffman, L. R. M.; *GB pat. 1,577,087* **1977**.
94. Schulze, B.; Broxterman, R.; Shoemaker, H.; Boesten, W.; *Spec. Chem.* **1998**, 18, 244.
95. Broxterman, R.; Sonke, T.; Worries, H.; van den Tweel, W.; *Pharm. Manuf. Int.* **2000**, 61.
96. Broxterman, Q. B.; Boesten, W. H. J.; Schoemaker, H. E.; Schulze, B.; *Spec. Chem.* **1997**, 17, 186.
97. Baeza, A.; Nájera, C.; Sansano, J. M.; *Synthesis* **2007**, 1230; Pan, S. C.; List, B.; *Synlett* **2007**, 318; Surendra, K.; Krishnaveni, N. S.; Mahesh, A.; Rao, K. R.; *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 2532.
98. Boesten, W. H. J.; Broxterman, Q. B.; Plaum, M. J. M.; *EP pat. 0,905,257* **1999**.
99. Schoemaker, H. E.; Boesten, W. H. J.; Broxterman, Q. B.; Roos, E. C.; Kaptein, B.; van den Tweel, W. J. J.; Kamphuis, J.; Meijer, E. M.; Rutjes, F. P. J. T.; *Chimia* **1997**, 51, 308.
100. Kirchner, G.; Salzbrenner, E.; Werenka, C.; Boesten, W. H. J.; *EP pat. 0,832,982*, **1998**.
101. Bruggink, A.; *Chimia* **1996**, 50, 431.
102. Demain, A. L.; Baez-Vasquez, M. A.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, 87, 135.
103. Schoevaart, R.; Kieboom, T.; *Chemical Innovation* **2001**, 31, 33.
104. Boesten, W. H. J.; Moody, H. M.; Roos, E. C.; *WO 9,630,376* **1996**.
105. Boesten, W. H. J.; van Dooren, T. J.; Smeets, J. C. M.; *WO 9,623,897* **1996**.
106. Bruggink, A.; Roos, E. C.; de Vroom, E.; *Org. Process Res. Dev.* **1998**, 2, 128.
107. van den Berg, M. A.; Albang, R.; Albermann, K.; Badger, J. H.; Daran, J.-M.; Driessen, A. J. M.; Garcia-Estrada, C.; Fedorova, N. D.; Harris, D. M.; Heijne, W. H. M.; Joardar, V.; Kiel, J. A. K. W.; Kovalchuk, A.; Martín, J. F.; Nierman, W. C.; Nijland, J. G.; Pronk, J. T.; Roubos, J. A.; van der Klei, I. J.; van Peij, N. M. E.; Veenhuis, M.; von Döhren, H.; Wagner, C.; Wortman, J.; Bovenberg, R. A. L.; *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26, 1161.
108. Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B.; *Nature* **2000**, 409, 256.
109. Klass, D. L.; *Biomass for Renewable Energy, Fuels, and Chemicals*, Academic Press, 1998; Lynd, L. R.; Wyman, C. E.; Gerngross, T. U.; *Biotechnol. Progr.* **1999**, 15, 777.
110. Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y.; *Progr. Pol. Sci.* **2000**, 25, 1503; Khanna, S.; Srivastava, A. K.; *Proc. Biochem.* **2005**, 40, 607.
111. Biebl, H.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 27, 18.
112. Muita atenção foi dada ao caráter originalmente “verde” e biodegradável do PHB. Nos anos 90, a Monsanto detinha as patentes para a sua produção, comercializando o produto sob o nome de Biopol. Esses direitos foram vendidos para a americana Metabolix em 2001 e a Monsanto encerrou a sua planta de produção em 2004. A Metabolix recebeu, em 2005, o prêmio “Presidential Green Chemistry Challenge Award” por tornar poli-hidroxiclcanoatos, como o PHB, em produtos comercializáveis (<http://www.greenchemex.org/?module=resources.edit&fs=1&id=2>, acessada em Março 2009). No Brasil existe uma planta piloto de PHB, localizada nas instalações da Usina da Pedra em Serrana, estado de São Paulo, construída por uma *joint venture* entre os Grupos Biagi e Balbo, que constituíram a empresa PHB S.A.
113. Lee, S. Y.; Hong, S. H.; Lee, S. H.; Park, S. J.; *Macromol. Biosci.* **2004**, 4, 157.
114. Tong, I. T.; Cameron, D. C.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1992**, 34-35, 149; Tong, I. T.; Liao, H. H.; Cameron, D. C.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, 57, 3541.
115. Haas, T.; Wiegand, N.; Arntz, D.; *US pat. 5,334,778* **1994**; Emptage, M.; Haynie, S. L.; Laffend, L. A.; Pucci, J. P.; Whited, G.; *US pat. 6,514,733-B1* **2003**.