

Artigo

Reações de Oxidação Catalisadas por Enzimas**Gonçalves, C. C. S, Fonseca, F. S. A.****Rev. Virtual Quim.*, 2018, 10 (4), 778-797. Data de publicação na Web: 2 de agosto de 2018<http://rvq.sbq.org.br>**Enzyme-Catalyzed Redox Reactions**

Abstract: During the last decades, the biocatalysis application on chemical and pharmaceutical industries has increased. Enzymes are valuable tools for organic synthesis, due to their usually high levels of regio-, enantio- and stereospecificity. The replacement of metal catalysis by redox enzymes minimizes environmental impacts and allows the development of sustainable processes. This review focus on mechanistic aspects of oxidoreductases, the second class of enzymes most employed in organic synthesis.

Keywords: Biocatalysis; redox reactions; oxirreductases.

Resumo

Nas últimas décadas a aplicação de biocatálise nas indústrias químicas e farmacêuticas tem aumentado consideravelmente. Os elevados índices de régio-, enantio- e estereoespecificidade e a capacidade de catalisar reações em condições brandas, fazem das enzimas ferramentas importantes para a síntese orgânica. No que tange os processos de oxirredução, a utilização de enzimas, em substituição aos catalisadores metálicos comumente empregados, minimiza os impactos ambientais e possibilita o desenvolvimento de processos mais sustentáveis. Nesta revisão serão discutidos aspectos do mecanismo de diferentes classes de oxirreductases, o segundo maior tipo de enzimas com aplicação em síntese orgânica.

Palavras-chave: Biocatálise; reações redox; oxirreductases.

* Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências agrárias, Campus Montes Claros, CEP 3904-547, Montes Claros-MG, Brasil.

✉ francinef@ica.ufmg.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20180057](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180057)

Reações de Oxidação Catalisadas por Enzimas

Caroline C. S. Gonçalves,^a Francine S. A. da Fonseca^{*,b}

^a Universidade Federal da Integração Latina-Americana, Instituto de Ciências da Vida e da Natureza, CEP 85867-970, Brasil.

^b Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências agrárias, Campus Montes Claros, CEP 3904-547, Montes Claros-MG, Brasil.

* francinef@ica.ufmg.br

Recebido em 20 de dezembro de 2016. Aceito para publicação em 24 de julho de 2018

1. Introdução
2. Oxirredutases
 - 2.1. Oxigenases
 - 2.2. Oxidases
 - 2.3. Peroxidades
3. Desidrogenases
4. Conclusões

1. Introdução

O mercado mundial de enzimas tem apresentado um crescimento considerável nos últimos anos. Estima-se que em 2016 o mercado de enzimas com aplicação industrial tenha gerado em torno de 5,0 bilhões de dólares, devendo atingir os 6,3 bilhões em 2021, correspondendo a uma taxa anual de crescimento de 4,7%.¹ A principal aplicação de enzimas é observada nas indústrias de processamento de alimentos e de bebidas, com as carboidrases respondendo pela maior parte do mercado em 2017.² Contudo, as inovações tecnológicas alcançadas nos últimos anos têm permitido a ampliação do campo de aplicação de enzimas em processos industriais. O emprego de rotas enzimáticas na produção de compostos quirais para a

indústria farmacêutica, por exemplo, vem apresentando um rápido crescimento nos últimos anos.³ Neste contexto, as enzimas responsáveis pelos processos de oxirredução merecem destaque, constituindo a segunda maior classe de enzimas com aplicação em síntese orgânica (25%).⁴

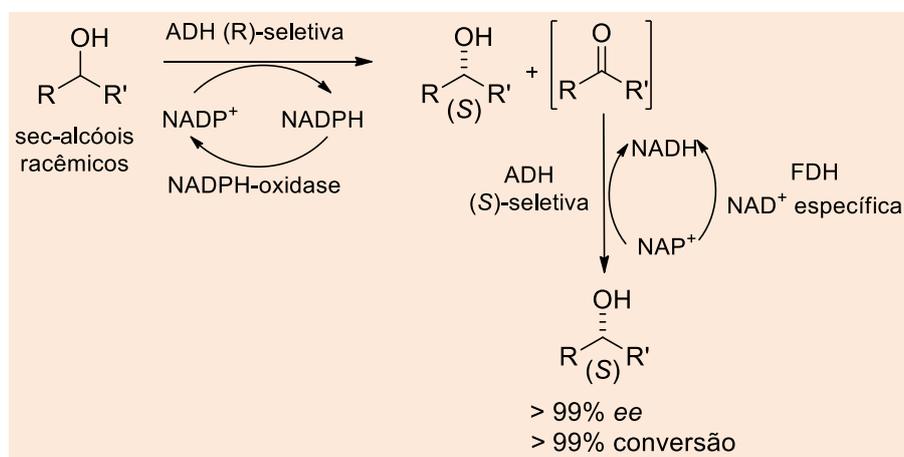
As reações de oxidação são importantes estratégias em química orgânica para a transformação de grupos funcionais. Existem várias metodologias sintéticas que utilizam reações de oxidação para obtenção de novos produtos, porém, apesar do seu potencial enquanto ferramenta sintética, algumas dessas reações apresentam aplicações limitadas, devido ao uso de reagentes que acometem o meio ambiente e a saúde humana.⁵ Alguns processos requerem quantidades estequiométricas de compostos metálicos tóxicos, solventes inflamáveis,

além de apresentarem elevado consumo energético.⁶ Face ao exposto, o uso de biocatalisadores representa uma alternativa viável às metodologias de oxirredução tradicionais, pois diminuem ou eliminam o emprego de substâncias que possam causar riscos a saúde humana e danos ambientais. Ademais, a combinação de seletividade, eficiência catalítica e habilidade de promover reações químicas em condições reacionais brandas, fazem das enzimas biocatalisadores importantes no contexto atual.⁷

Os processos biocatalíticos podem ser realizados com enzimas isoladas ou com células íntegras. Uma das grandes vantagens da utilização de enzimas isoladas é a ausência de reações secundárias, as quais podem causar perdas de rendimento. Contudo a utilização de enzimas isoladas dependentes de cofatores representa um grande desafio para a utilização sintética destas. Os cofatores são mediadores que transportam elétrons, podendo ser íons metálicos, complexos organometálicos ou moléculas

orgânicas. O enorme potencial biocatalítico das enzimas dependentes de cofatores pode ser associado à grande diversidade estrutural destes.⁸ Entretanto, os cofatores são comumente muito caros e consumidos de forma estequiométrica nas reações redox, assim para que o processo seja economicamente viável eles devem ser regenerados e reutilizados, especialmente quando aplicados em síntese de larga escala.⁹

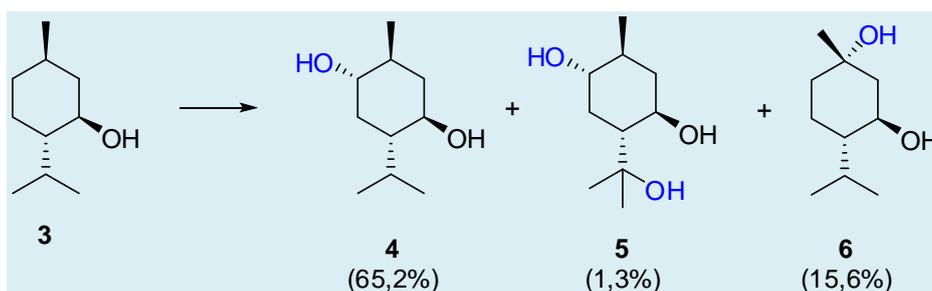
A química da reciclagem de cofatores é bastante difundida, podendo ser realizada, por exemplo, pela utilização de uma reação redox enzimática acoplada. Esta estratégia tem sido adaptada a diferentes sistemas biológicos e foi empregada por Kroutil e colaboradores no processo em cascata para a derracemização biocatalítica de *sec*-alcóois empregando dois sistemas estereocomplementares, onde a oxidação do substrato e a redução à cetona correspondente são catalisadas por duas ADHs (Álcool Desidrogenase), sendo uma (*R*)-seletiva e outra (*S*)-seletiva (Esquema 1).¹⁰



Esquema 1. Processo em cascata para derracemização de *sec*-álcoois

Apesar de todo o progresso alcançado na área de reciclagem de cofatores, a maioria dos processos biocatalíticos industriais utilizam células íntegras de microrganismos.¹¹ Uma das dificuldades da utilização de células íntegras encontra-se na formação de subprodutos seja pela ação simultânea do substrato pelas diferentes enzimas presentes

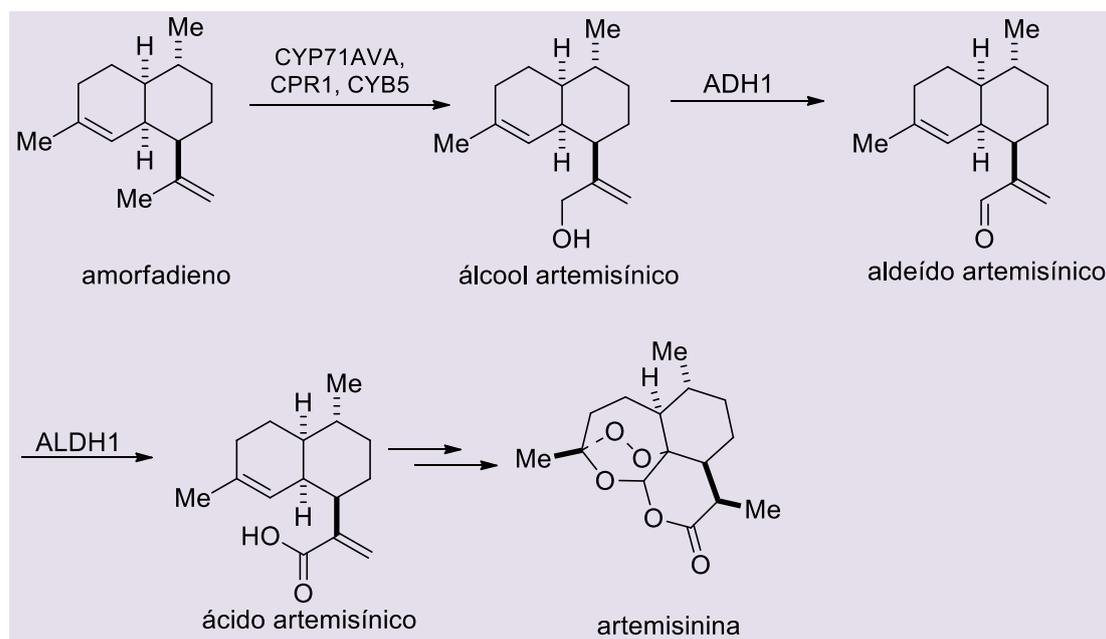
no microrganismo ou por uma baixa regiosseletividade da enzima nativa. Este tipo de impasse foi observado por Miyazawa e colaboradores ao promoverem a hidroxilação do monoterpeneo *L*-mentol utilizando o fungo *Rhizoctonia solani*. Nesse processo foi observado-se a formação de três produtos de hidroxilação (Esquema 2).¹²



Esquema 2. Biotransformação do *L*-mentol através do *Rhizoctonia solani*

Adicionalmente, avanços recentes de técnicas como evolução dirigida e *design* racional tem permitido uma expansão na produção e emprego industrial de enzimas.¹³ Paddon e colaboradores, por exemplo, desenvolveram uma metodologia para a produção de 25g/L de ácido artemisínico empregando *S. cerevisiae* engenherada. A rota biossintética se baseia em três reações

consecutivas de bio-oxidação do amorfadieno, catalisadas por oxirredutases (Esquema 3). O ácido artemisínico produzido foi então quimicamente convertido em artemisinina, um importante fármaco utilizado no tratamento de malária. Em 2016, 60 toneladas de artemisinina foram produzidas utilizando a metodologia desenvolvida por este grupo de pesquisa.¹⁴



Esquema 3. Rota biossintética para preparação do ácido artemisínico, intermediário da síntese da artemisinina¹⁴

O Brasil, tendo a maior biodiversidade do planeta, possui um enorme potencial para prospecção enzimática nos mais variados ecossistemas e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de novos processos biotecnológicos. Contudo, o setor

biotecnológico brasileiro concentra-se em áreas como bioenergia e agricultura, sendo a aplicação de enzimas em processos de síntese orgânica ainda pouco explorada. Ademais, a maioria das pesquisas desenvolvidas no país envolve resoluções de

racematos utilizando lipases e redução de cetonas com *S. cerevisiae*.¹⁵

Neste artigo, considerando a relevância dos processos de bio-oxidação, são abordados de forma concisa aspectos dos ciclos catalíticos das diferentes famílias de oxirredutases.

2. Oxirredutases

As oxirredutases podem ser organizadas de várias maneiras, e de acordo com o

mecanismo de ação, elas são classificadas em quatro grandes grupos: oxigenases, peroxidases, oxidases e desidrogenases (Figura 1).¹⁶

As oxigenases, oxidases e peroxidases catalisam reações de oxidação consideradas irreversíveis, pois as reações de redução do O_2 e H_2O_2 que as acompanham são altamente exotérmicas. Por outro lado, as desidrogenases são enzimas geralmente consideradas capazes de catalisar reações reversíveis, e podem ser usadas para biocatálise oxidativa ou redutiva.¹⁷

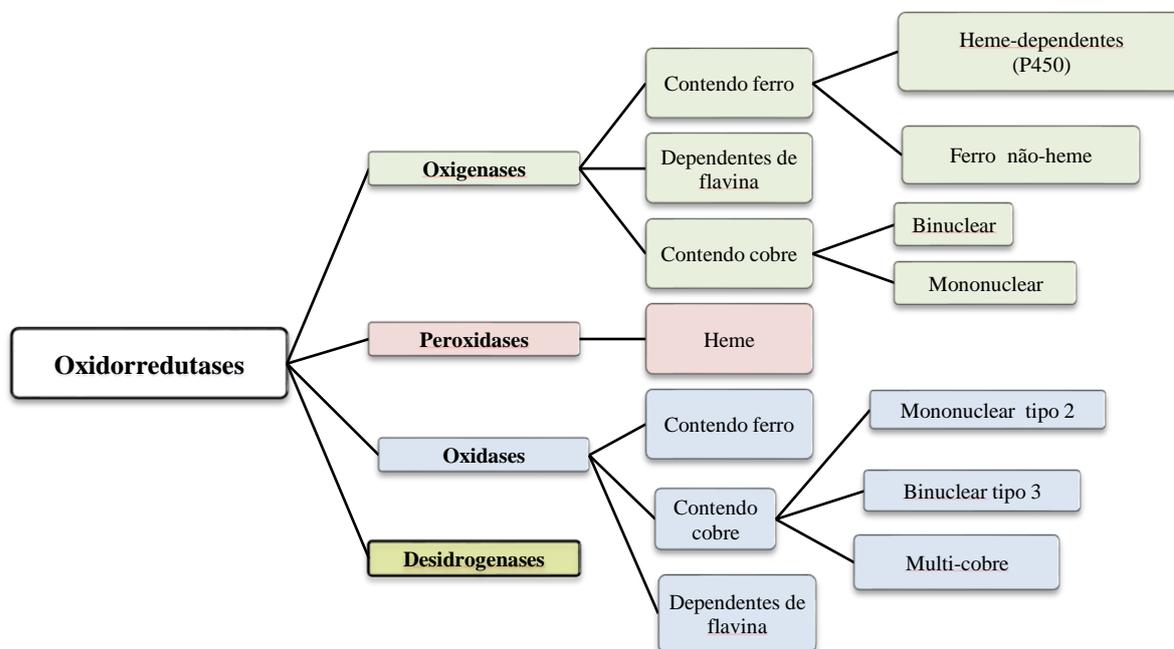
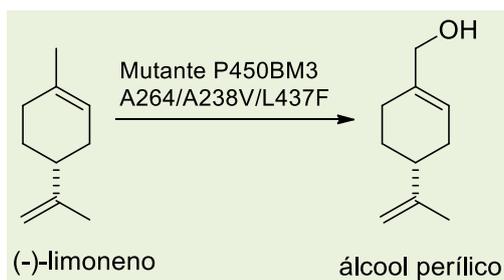


Figura 1. Classificação das oxirredutases.¹⁶

Amparado pelo desenvolvimento de técnicas de reciclagem e de engenharia genética, o interesse pelos oxirredutases têm aumentado gradativamente nos últimos anos. Esses oxidantes verdes vêm sendo aplicados em processos de oxidação de biomassa e na preparação de intermediários quirais para a indústria de química fina. Pleiss

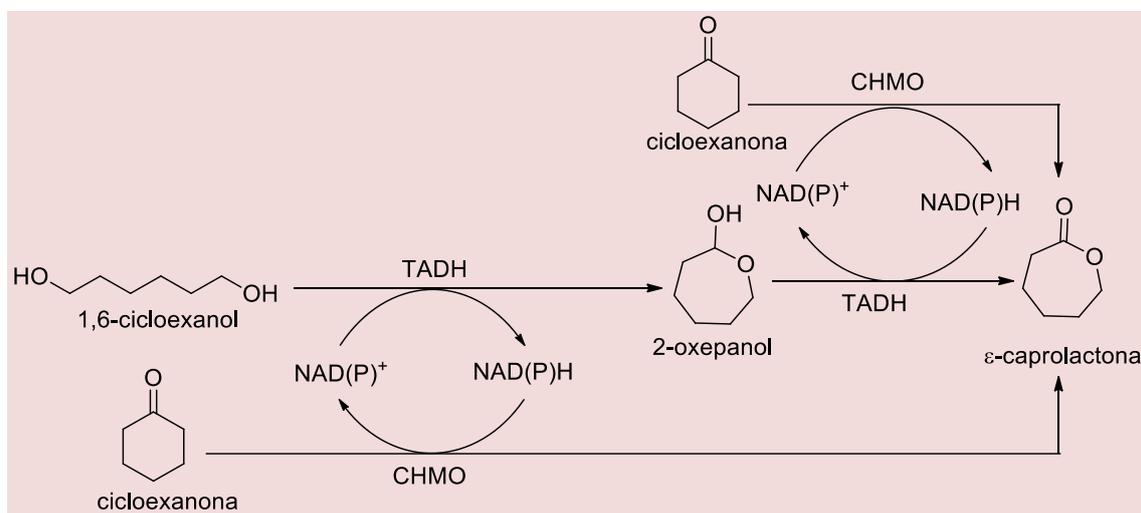
e colaboradores, por exemplo, descreveram uma estratégia para a hidroxilação seletiva da posição C7 do (-)-limoneno, utilizando como catalisador o mutante P450_{BM3} A264/A238V/L437F. O produto da reação, o álcool perílico, foi obtido em seletividade superior a 97% (Esquema 4).^{18,19}



Esquema 4. Hidroxilação seletiva da posição C7 do (-)-limoneno¹⁸

Adicionalmente, a utilização de enzimas redox em reações cascatas também tem sido explorada.²⁰ Em um exemplo bastante interessante, Kara e colaboradores utilizaram uma cascata bi-enzimática na síntese de ϵ -caprolactona, um monômero importante para a preparação de polímeros biodegradáveis, termoplásticos e elastômeros.²¹ Nesta cascata enzimática o 1,6-hexanodiol é convertido a ϵ -caprolactona após duas etapas de oxidação consecutivas, catalisadas pela desidrogenase da bactéria termófila *Thermoanaerobacter ethanolicus*

(TADH). Já a regeneração do cofator (NAD(P)H) se dá partir de uma reação paralela, que envolve a oxidação da ciclohexanona por uma Baeyer-Villiger monoxigenase (CHMO) e que também leva à formação da ϵ -caprolactona. Portanto, o processo global leva a formação de três equivalentes da ϵ -caprolactona a partir de um equivalente de 1,6-hexanodiol e dois equivalentes de ciclohexanona (Esquema 5). O produto da reação foi obtido em até 99% de conversão em 72 h, com a adição de uma segunda alíquota de CHMO após 48 h.



Esquema 5. Cascata bi-enzimática para síntese de ϵ -caprolactona²¹

2.1. Oxigenases

As oxigenases são enzimas que podem incorporar um (monoxigenases) ou dois (dioxigenases) átomos provenientes do oxigênio molecular em diferentes substratos

orgânicos. Elas são encontradas nos mais variados tipos de organismos vivos e, algumas delas, desempenham um papel fisiológico importante nos processos de desintoxicação e na degradação microbiana de poluentes ambientais.¹⁷

2.1.1. Monoxigenases

As monoxigenases catalisam reações de

hidroxilação de hidrocarbonetos, epoxidações de alcenos, oxidações de heteroátomos e oxidações de Baeyer-Villiger (Figura 2).²²

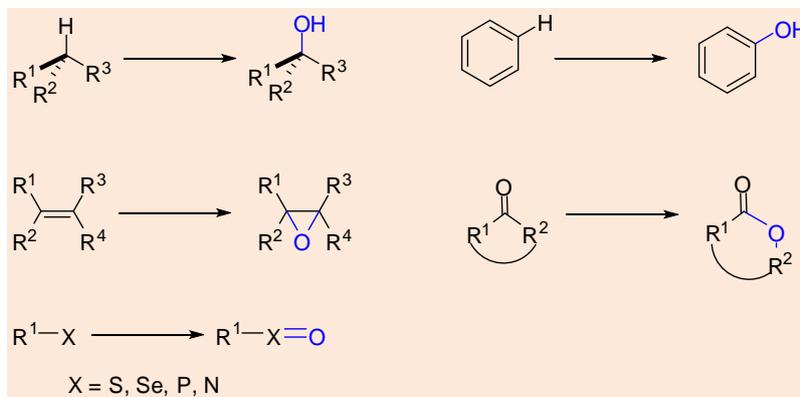


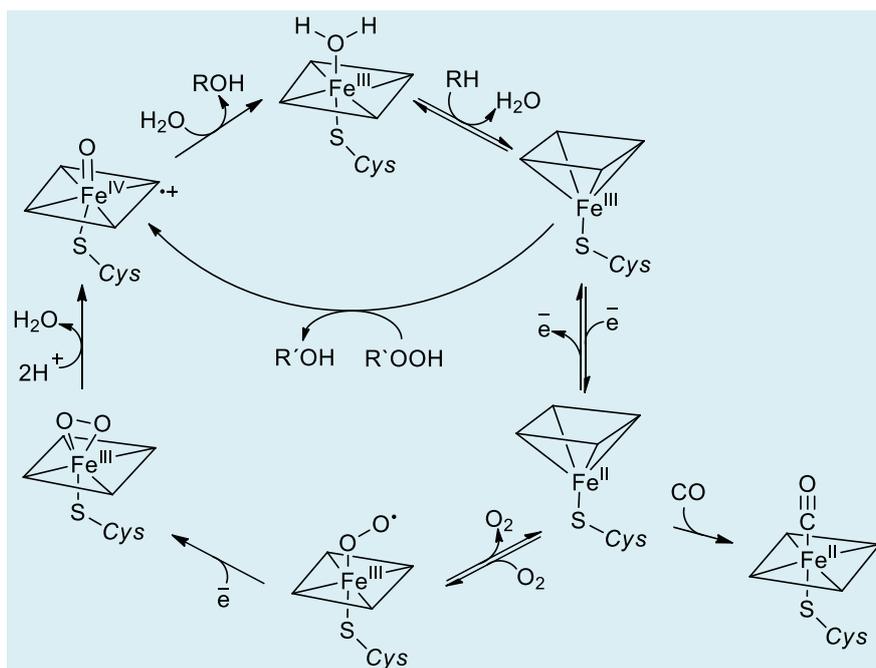
Figura 4. Exemplos da atuação das monoxigenases em diferentes substratos

Uma das famílias de monoxigenases mais estudadas são as hemoproteínas P450, que promovem a hidroxilação de centros de carbono não ativados, além de catalisarem reações como N-, S- e O-dealquilação, sulfoxidação, epoxidação e dealogenação. Essas enzimas apresentam um papel fundamental para os eucariotos, pois atuam no metabolismo de xenobióticos, estando envolvidas na biotransformação oxidativa de aproximadamente 75% dos fármacos conhecidos e na biossíntese de hormônios esteroides e ácidos graxos.²³

A maioria das P450 apresenta peso molecular entre 40-60 kDa com alta similaridade na topologia, na orientação da estrutura secundária e na sequência de aminoácidos, contudo diferenças significativas são observadas no sítio de ligação substrato-enzima e ao redor do sítio ativo.²⁴ As monoxigenases do tipo P450 de procariotos geralmente são encontradas dissolvidas no citoplasma, enquanto na maioria dos eucariotos essas enzimas encontram-se ligadas a membranas (retículo endoplasmático ou mitocôndrial). As reações de hidroxilação catalisadas pelas P450 são termodinamicamente favoráveis, mas

apresentam uma elevada barreira cinética. O ciclo catalítico é bastante complexo e se inicia com a ligação do substrato na cavidade do sítio ativo, próximo ao Fe, ocasionando uma alteração na conformação da enzima e a liberação de uma molécula de água. A adição de um elétron reduz o Fe (III) a Fe (II), formando um novo intermediário que se liga a uma molécula de oxigênio molecular. Após a transferência de mais um elétron tem-se a formação de um composto ferro-óxido, que sofre uma clivagem heterolítica na ligação O-O levando a formação de uma molécula de água e do cátion radical altamente reativo Fe (IV), também conhecido como Composto I, o qual é responsável por hidroxilar o substrato. Após a formação do produto a enzima retorna ao estado inativo contendo o Fe (III) hexacoordenado (Esquema 6).

Na presença de peróxido o complexo ferro pentacoordenado pode ser convertido diretamente ao intermediário Fe (IV). As P450 podem sofrer inativação definitiva na presença de CO, devido à formação de um complexo entre o ferro e o monóxido de carbono, que ocorre após a etapa de redução de Fe (III) a Fe (II).²⁵



Esquema 6. Proposta de mecanismo da hidroxilação de substratos por uma P450²⁵

Em contraste com as monoxigenases P450 que utilizam um metal de transição ligado ou não a um cofator orgânico, monoxigenases dependentes de flavina empregam cofatores puramente orgânicos.²⁶ Monoxigenases dependentes de flavina constituem a maior família de flavoenzimas conhecida, estando

envolvidas em diversos processos biológicos e na degradação de poluentes orgânicos, incluindo cloro e nitrofenóis, toluenos e xilenos.²⁷ Estas enzimas catalisam reações de Baeyer-Villiger, de epoxidação e oxidações de heteroátomos, incluindo enxofre, nitrogênio e selênio (Figura 3).²⁶

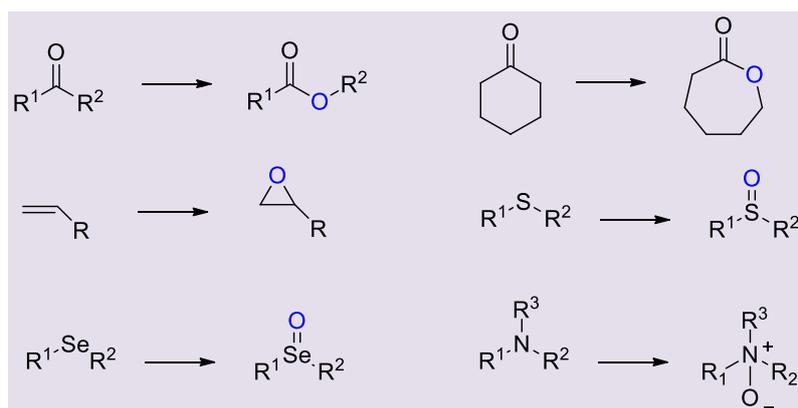
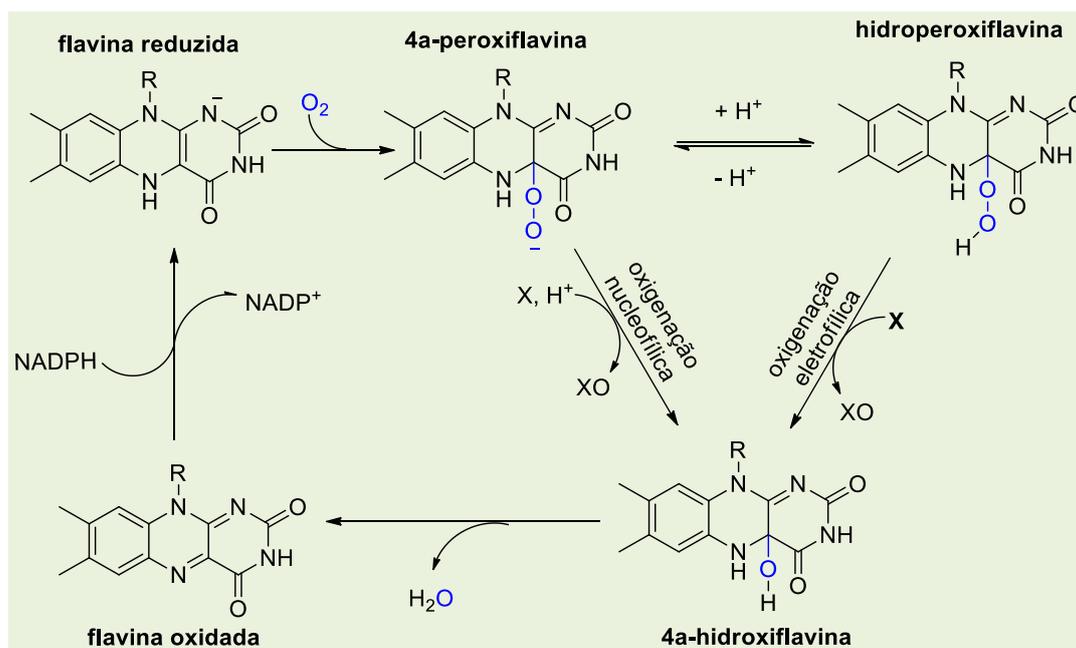


Figura 3. Exemplos de reações catalisadas por monoxigenases dependentes de flavina

A ativação do oxigênio por estas monoxigenases comumente envolve a formação de uma ligação covalente entre oxigênio molecular e o carbono C4a da flavina, levando a formação de um

intermediário 4a-peroxiflavina que pode agir como nucleófilo ou, quando na forma protonada (hidroperoxiflavina), como eletrófilo (Esquema 7).^{28,26}



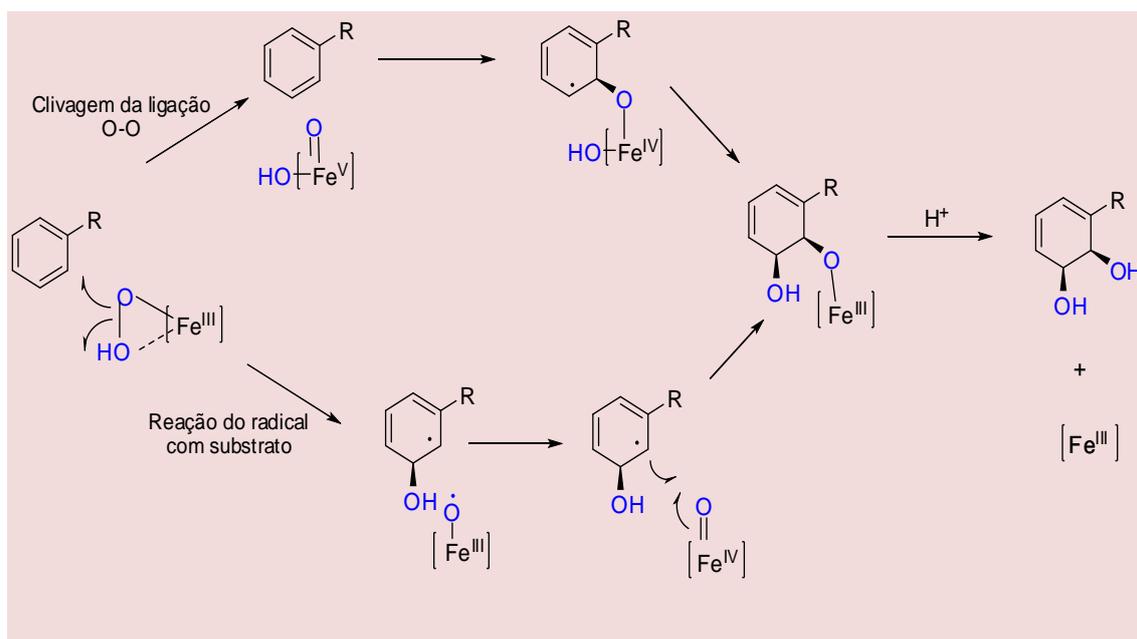
Esquema 7. Mecanismo geral de reações de oxidação catalisadas por monoxigenases dependentes de flavina²⁸

2.1.2. Dioxigenases

As dioxigenases realizam reações onde dois átomos de oxigênio são transferidos para o substrato levando à formação de espécies dihidroxiladas. Geralmente essas reações apresentam peróxidos como intermediários que, devido a sua alta reatividade, não são facilmente isolados.²⁹ A maioria das dioxigenases utilizam metais de transição, frequentemente Fe(II) ou Fe(III), ou cofatores orgânicos na ativação do oxigênio.

As reações de dihidroxilação de sistemas aromáticos, por exemplo, são comumente

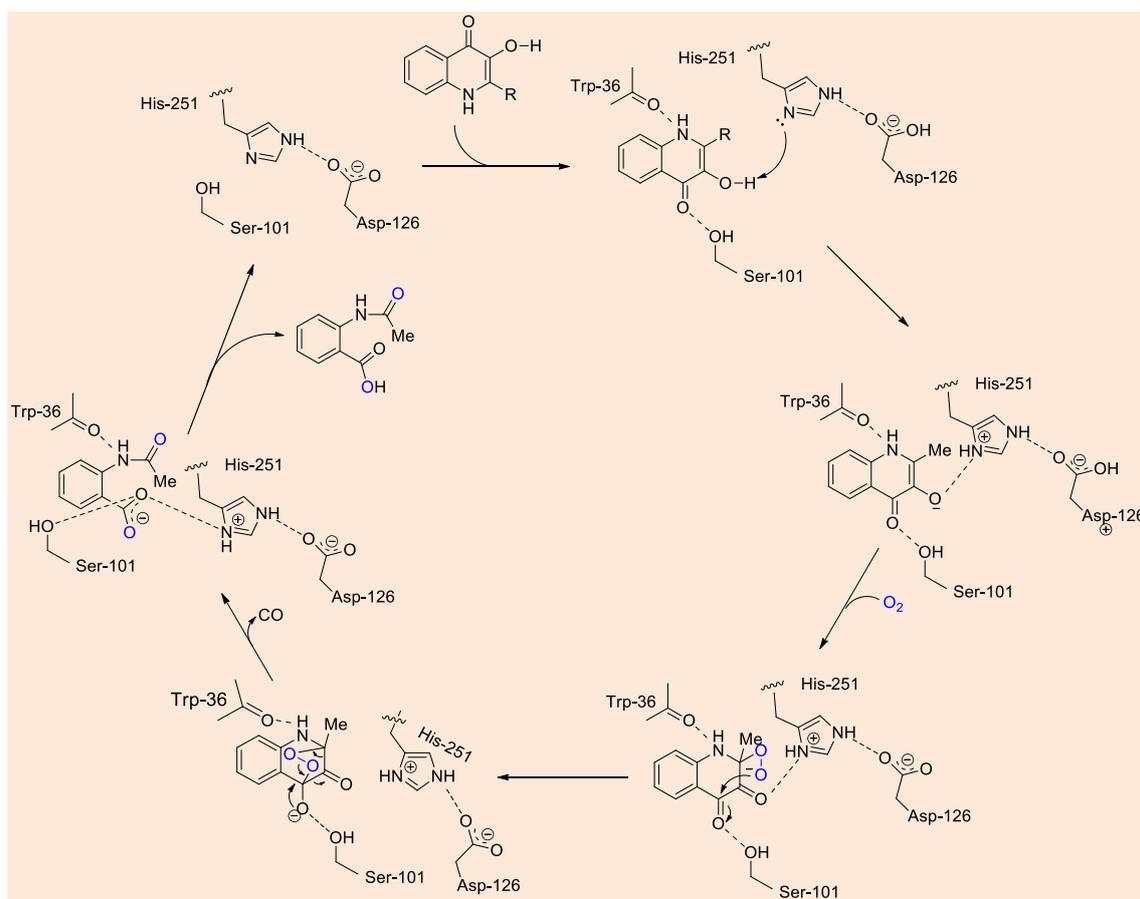
catalisadas por dioxigenases do tipo Rieske (NAD(P)H-dependente) que utilizam peróxido de hidrogênio. Essas oxirredutases atuam em conjunto com outras enzimas (flavoproteína redutase ferro-enxofre e ferredoxina ferro-enxofre) compreendendo assim um grupo heterogêneo. Segundo Bugg e colaboradores, o mecanismo destas reações deve envolver a formação de um intermediário hidroperoxido de Fe(III), podendo passar por dois caminhos distintos: clivagem da ligação O-O, conduzindo a reação pelo intermediário Fe(III) ou oxidação da espécie inicial e, neste caso, e a reação é efetuada com o radical Fe(V) (Esquema 8).^{28,29}



Esquema 8. Proposta de mecanismo para dioxigenases do tipo Rieske²⁸

Nos últimos anos, contudo, o número de dioxigenases capazes de atuar de forma independente de cofatores tem aumentado,³⁰ o modo de ação destas enzimas é bastante intrigante e o mecanismo de ativação do oxigênio é ainda pouco compreendido.³¹ A enzima 1-*H*-3-hidroxi-4-oxaquinaldina 2,4-dioxigenase (HOD) foi uma das primeiras dioxigenases independentes de cofatores descritas na literatura.³² Estudos apontam que a HOD pertence a classe da superfamília α/β -hidrolases e catalisam a clivagem oxigenolítica de duas ligações C-C de substratos *N*-heteroaromáticos com

concomitante liberação de monóxido de carbono. A HOD apresenta uma tríade catalítica altamente conservada formada por Ser-101, His-251 e Asp-160. O resíduo H251 age como uma base geral desprotonando seletivamente o grupo hidroxila em C3 (Esquema 9). Já a ativação do oxigênio é assistida pelo substrato e envolve a transferência de um elétron do ânion do substrato para uma molécula de O_2 , formando um para de radicais que se recombina em um intermediário C2-peróxido.^{32,33}



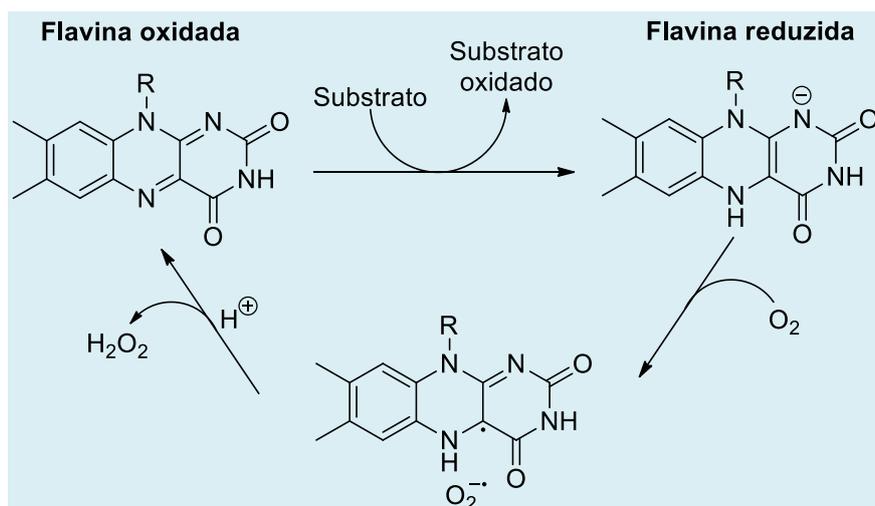
Esquema 9. Reação catalisada por HOD; R= H ou *n*-aquil (C1 a C9)³³

2.2. Oxidases

As oxidases utilizam oxigênio molecular como acceptor de elétrons (oxidante), produzindo intermediários reativos de oxigênio e H₂O ou H₂O₂ como subprodutos, sendo que em alguns casos pode-se observar a formação de superóxido (O₂⁻).³⁴ Membros desta família estão envolvidos em diferentes eventos biológicos, como defesas contra micro-organismos invasores e sinalização celular,³⁵ além de catalisarem a oxidação de substratos de interesse sintético como, por exemplo, de aminas³⁶ e de alcoóis.³⁷ A maioria das oxidases necessita de cofatores, comumente flavina, cobre ou ferro, mas oxidases independentes de cofatores também são conhecidas como, por exemplo, a urato oxidase que é responsável pela

oxidação do ácido úrico a 5-hidroxiisourato, o qual se decompõe em CO₂ e alantoína.³⁸

A maioria das oxidases conhecidas utiliza flavina como cofator, que pode estar na forma de FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) ou, menos frequentemente, de FMN (Mononucleotídeo de Flavina).³⁹⁻⁴⁰ O ciclo catalítico das enzimas flavoproteínas oxidases se inicia com a transferência de dois elétrons do substrato para a flavina, resultando na oxidação do substrato e na redução da flavina a hidroquinona. Posteriormente, a flavina reduzida é oxidada por O₂, que age como acceptor de elétrons em uma reação termodinamicamente favorecida, mas proibida por *spin*, pois envolve uma molécula (O₂) em estado triplete (Esquema 10).^{40a}

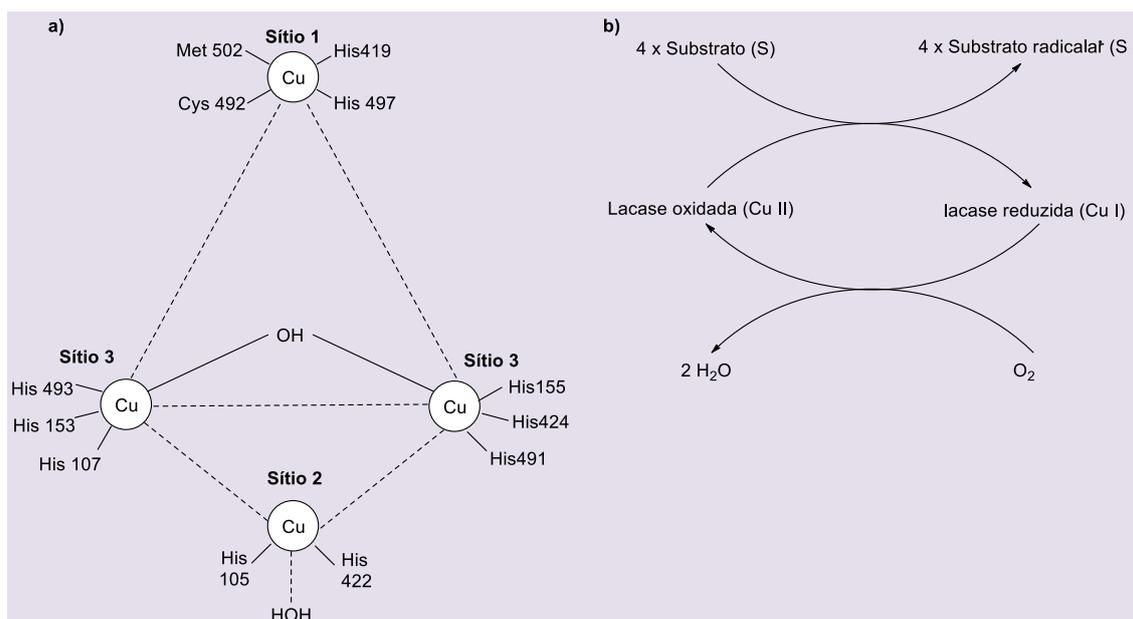


Esquema 10. Ciclo catalítico de flavoproteínas oxidases^{40a}

Nas enzimas dependentes de flavina para a ativação do O_2 é necessário um grupo positivamente carregado.⁴⁰ A glucose oxidase, por exemplo, apresenta um resíduo de histidina (His-516) no sítio ativo, cuja protonação é essencial na etapa de redução do dioxigênio. Estudos de mutagênese sítio-dirigida, em conjunto com estudos cinéticos e de mecanismo, revelaram que a ativação do O_2 em muitas flavoproteínas oxidases envolve primordialmente um resíduo lisina ao invés de histidina. Na sarcosina oxidase, por exemplo, a substituição do resíduo Lys-256 levou a uma diminuição considerável na velocidade da reação. O mesmo efeito sobre a velocidade foi observado ao se substituir o resíduo Lys-276 da frutossamina oxidase.^{40c} Por outro lado, na colina oxidase, apesar desta apresentar três resíduos conservados de His no sítio ativo, a ativação do O_2 é efetuada pelo grupo amina positivamente carregado do substrato.^{40d}

Em contrapartida, as lacases são oxidases multicobre que utilizam oxigênio molecular para oxidar compostos inorgânicos (ex: KI_3 , $[Fe(CN)_6]^{-4}$, $[W(CN)_8]^{-4}$ e $[Os(CN)_6]^{-4}$) e orgânicos (ex: fenóis, aminas aromáticas e

benzenotiois).⁴¹ Estas enzimas apresentam um grande apelo biotecnológico, sendo aplicadas, por exemplo, na biorremediação de pesticidas e herbicidas, descoloração de corantes, degradação de xenobióticos, no tratamento de efluentes, no branqueamento da pasta lignocelulósica usada na fabricação de papel, na síntese de intermediários para a indústria farmacêutica e como biossensores.⁴² A clivagem reductiva da ligação O-O utilizada pelo menos quatro átomos de Cu, dois paramagnéticos (Sítio 1 e Sítio 2) e dois cobres diamagnéticos binucleares (Sítio 3). O Cu do sítio 1, também conhecido como cobre azul (600 nm), é responsável pela coloração azulada das lacases em água, já o cobre do Sítio 2 não é detectável no UV. Os átomos de Cu dos Sítios 2 e 3 formam um cluster trinuclear, onde ocorre a redução do oxigênio molecular e a liberação de água.⁴³ As reações catalisadas por lacases se baseiam na transferência de quatro elétrons do substrato para o oxigênio molecular (acceptor final), formando água e um radical livre, o qual é convertido ao produto final após nova reação enzimática ou espontânea (Esquema 11).⁴⁴



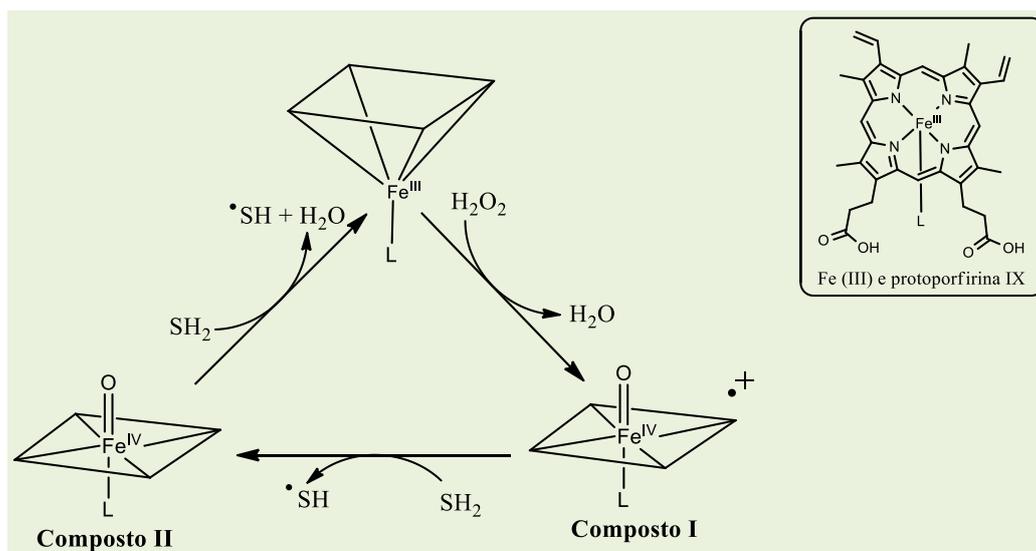
Esquema 11. a) Centro multicobre da lacase isolada de *B. subtilis*. b) Representação esquemática do ciclo catalítico das lacases⁴⁴

2.3. Peroxidases

As peroxidases representam um grupo heterogêneo de enzimas encontradas em células vegetais, animais e microbianas, que utilizam o peróxido, usualmente H₂O₂, como acceptor de elétrons.⁴⁵ Estas enzimas catalisam a oxidação de um grande número de compostos orgânicos e inorgânicos, apresentando uma ampla gama de aplicações biotecnológicas sendo aplicadas, por exemplo, em processos de descoloração de corantes sintéticos⁴⁶ e de biorremediação de compostos fenólicos,⁴⁷ na síntese de polímeros e de compostos aromáticos, na indústria de papel, como biossensores e em ensaios imunoenzimáticos.⁴⁸ Ademais, as peroxidases apresentam uma grande variedade de funções biológicas, participando, por exemplo, da síntese de biomoléculas, do metabolismo oxidativo de xenobióticos⁴⁹ e da desintoxicação por H₂O₂. A maioria das peroxidases são enzimas

extracelulares relativamente estáveis⁵⁰ e são classificadas, de acordo com a especificidade do sítio ativo, como heme peroxidases, vanádio peroxidase ou não-metal peroxidases.⁵¹

As hemiperoxidases são uma superfamília de enzimas que contém Fe (III) e protoporfirina IX como grupo prostético, mas que evoluíram de forma independente, divergindo, por exemplo, na arquitetura do sítio ativo e na atividade enzimática.⁵² Contudo, as hemiperoxidases atuam sobre o mesmo mecanismo, que se inicia com a formação de um intermediário cátion radical que contém um centro Fe(IV)=O (Composto I), após a oxidação da peroxidase com H₂O₂. Após a oxidação de uma molécula do substrato o Composto I é convertido ao Composto II. Finalmente, a redução do Composto II com concomitante oxidação de uma segunda molécula do substrato, restabelece a enzima ao seu estado natural (Esquema 12).⁵³

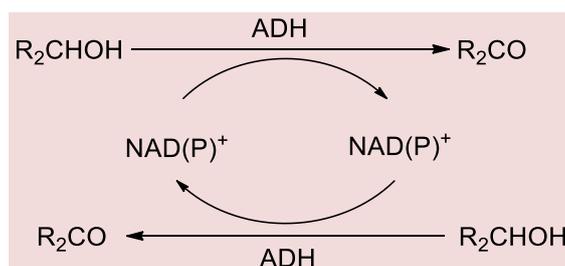


Esquema 12. Ciclo catalítico de heme peroxidases. L (ligante) geralmente é uma histidina e S é o substrato enzimático.⁵³

3. Desidrogenases

As desidrogenases são enzimas amplamente empregadas e apresentam diferentes sítios de ligação que permitem a catálise de transferência de hidrogênio. As enzimas ADHs, por exemplo, pertencem ao grupo das desidrogenases zinco-dependentes e catalisam a interconversão reversível de

alcoóis a aldeídos ou cetonas. A oxidação de um álcool a uma cetona (ou aldeído) consome NAD(P)^+ e a reação reversa, conversão da cetona (ou aldeído) ao álcool correspondente, consome NAD(P)H (Esquema 13). Assim, a utilização de ADHs isoladas em escala preparativa requer um sistema de regeneração contínua de cofatores, conforme discutido anteriormente.⁵⁴



Esquema 13. Representação da reação reversível de oxidação de um álcool à cetona correspondente, catalisada por ADHs

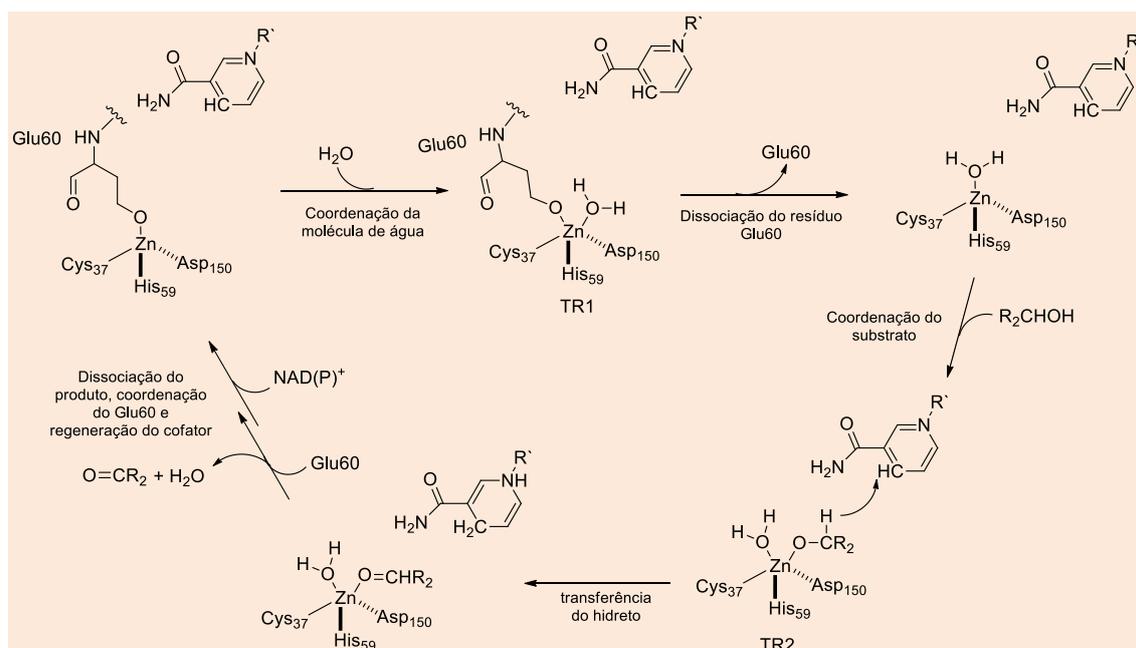
Devido a sua alta especificidade na oxirredução catalítica de compostos hidroxilados e carbonílicos, as ADHs encontram uma grande aplicabilidade na preparação de compostos para a indústria de química fina e farmacêutica.⁵⁵ A partir de estudos de elucidação estrutural de ADHs,

utilizando como protótipo a álcool desidrogenase do fígado (LADH), foi possível se verificar que estas enzimas apresentam dois domínios: um domínio para ligação do nucleotídeo e um domínio catalítico, com o zinco se localizando entre eles.⁵⁶ Na ausência do substrato, o Zn encontra-se coordenado a

uma molécula de água e a três resíduos de aminoácidos, comumente His, Glu, Asp e Cys.⁵⁷ No caso da LADH, por exemplo, o zinco encontra-se coordenado aos resíduos Cys-46, His-46 e Cys-174.⁵⁶

No mecanismo clássico, a água coordenada ao zinco é substituída pela hidroxila do substrato, com subsequente formação de um intermediário alcóxido, o qual é convertido na cetona correspondente após transferência de um hidreto para o NAD(P)⁺. Contudo, diferentes estudos apontam para um mecanismo muito mais complexo, podendo envolver um átomo de zinco pentacoordenado ou uma reação de duplo deslocamento com a participação de um resíduo glutamato.⁵⁸ Estudos realizados com a álcool desidrogenase da bactéria

termófila *Thermoanaerobacter brockii* (TbADH), por exemplo, apontaram para dois novos estados do zinco pentacoordenado, TR1 e TR2 (Esquema 14).⁵⁹ No primeiro estado (TR1) o Zn está coordenado a uma molécula de água e aos resíduos His59, Cys37, Asp150 e Glu60. A formação do segundo estado (TR2) se dá após a dissociação do resíduo Glu60 e complexação do substrato (álcool). Os resíduos His59, Cys37 e Asp150 permanecem coordenados ao zinco durante todo o ciclo catalítico e após a dissociação do produto (cetona), o resíduo Glu60 volta a se coordenar. Nesta proposta, o estado de coordenação do zinco altera-se de forma dinâmica durante todo o ciclo catalítico.



Esquema 14. Mecanismo proposto para a oxidação de alcoóis secundários pela TbADH⁵⁹

4. Conclusões

O apelo por processos sustentáveis e limpos tornou-se uma tendência mundial ao longo dos anos e com isso as reações mediadas por enzimas ganham maior destaque. A biocatálise tem conseguido mimetizar as condições naturais de atuação das enzimas para o uso em reações com

substratos de interesse específico. Os avanços alcançados no setor se refletem no aumento da utilização de etapas biocatalíticas em rotas sintéticas de produtos quirais para a indústria farmacêutica, por exemplo. Neste contexto, é evidente a importância dos processos de bio-oxidação como uma alternativa a utilização de catalisadores metálicos. As bio-oxidações permitem a obtenção de produtos de forma

químio-, regio-, e estereosseletiva, contudo, em muitos casos o emprego industrial de oxirredutases é limitado devido principalmente à necessidade de reciclagem de cofator.

Referências Bibliográficas

- ¹ Sítio Mordor Intelligence. Disponível em: <<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-industrial-enzymes-market-industry>>. Acessado em: 22 junho 2018.
- ² Sítio Grand View Research. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/industrial-enzymes-market>>. Acessado em: 22 junho 2018.
- ³ a) Patel, R. N. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, *26*, 1252; [CrossRef] [PubMed]. b) Li, G.; Wang, J.-B.; Reetz, M. T. Biocatalysts for the pharmaceutical industry created by structure-guided directed evolution of stereoselective enzymes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2018**, *26*, 1241. [CrossRef][PubMed]
- ⁴ a) Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Buehler, K. Biocatalytic Redox Reactions for Organic Synthesis: Nonconventional Regeneration Methods. *ChemCatChem* **2010**, *2*, 762; [CrossRef] b) Drauz, K.; Gröer, H.; May, O. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* 3a. ed., vol. 1. Wiley: New York, 2012; c) Grunwald, P. *Biocatalysis: Biochemical Fundamentals and Applications*. Imperial C. P.: London, 2009.
- ⁵ Cavani F. Catalytic selective oxidation: The forefront in the challenge for a more sustainable chemical industry. *Catalysis Today* **2010**, *157*, 8. [CrossRef]
- ⁶ Hirano, J.; Miyamoto, K.; Ohta, H. The green and effective oxidation of alcohols to carboxylic acids with molecular oxygen via biocatalytic reaction. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 1217. [CrossRef]
- ⁷ a) Richter, M.; Schulenburg, C.; Jankowska, D.; Heck, T.; Faccio, G. Novel materials through Nature's catalysts. *Materials Today*, **2015**, *18*, 459; [CrossRef] b) Narancic, T.; Daves, R.; Nikodinovic-Runic, O'Conor, K. E. Recent developments in biocatalysis beyond the laboratory. *Biotechnology Letters* **2015**, *37*, 943; [CrossRef] [PubMed] c) Bommarius, A. S. Biocatalysis: A Status Report. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* **2015**, *6*, 319; [CrossRef] [PubMed] d) Torrelo, G.; Hanefeld, U.; Hollmann, F. Biocatalysis. *Catalysis Letters* **2015**, *145*, 309; [CrossRef] e) Reetz, M. T. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 12480. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Richter, M. Functional diversity of organic molecule enzyme cofactors. *Natural Product Reports* **2013**, *30*, 1324. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹ a) Schrittwieser, J. H.; Sattler, J.; Resch, V.; Mutti, F. G.; Kroutil, W. Recent biocatalytic oxidation–reduction cascades. Recent biocatalytic oxidation–reduction cascades. *Current Opinion in Chemical Biology* **2011**, *15*, 249; [CrossRef] [PubMed] b) Voss, C. V.; Gruber, C. C.; Faber, K.; Knaus, T.; Macheroux, P.; Kroutil, W. Orchestration of Concurrent Oxidation and Reduction Cycles for Stereoinversion and Deracemisation of *sec*-Alcohols. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 13969. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰ Hudlicky, T.; Reed, J. W. Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 3117. [CrossRef] [PubMed]
- ¹¹ a) Zhang, M. M.; Wang, Y.; Ang, E. L.; Zhao, H. Engineering microbial hosts for production of bacterial natural products. *Natural Product Reports* **2016**, *33*, 963; [CrossRef] [PubMed] b) Kuriata-Adamusiak, R.; Strub, D.; Lochynski, S. Application of microorganisms towards synthesis of chiral terpenoid derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2012**, *95*, 1427. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Miyazawa, M.; Kawazoe, H.; Hyakumachi, M. Biotransformation of *l*-menthol by twelve

isolates of soil-borne plant pathogenic fungi (*Rhizoctoniasolani*) and classification of fungi. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2003**, *78*, 620. [CrossRef]

¹³ a) Zhang, M. M.; Wang, Y.; Ang, E. L.; Zhao, H. Engineering microbial hosts for production of bacterial natural products. *Natural Product Reports*, **2016**, *33*, 963; [CrossRef] [PubMed]

b) de Carvalho, C. C. R. Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry. *Microbial Biotechnology* **2016**, *10*, 250; [CrossRef] [PubMed] c) Porter, J. L.; Rusli, R. A.; Ollis, D. L. Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 197; [CrossRef] [PubMed] d) Choi, J. -M.; Han, S. -S.; Kim, H. -S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances* **2015**, *33*, 1443; [CrossRef] [PubMed] e) Reetz, M. T. Directed Evolution of Enantioselective Enzymes: An Unconventional Approach to Asymmetric Catalysis in Organic Chemistry. *Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74*, 5767. [CrossRef] [PubMed]

¹⁴ Paddon C. J.; Westfall, P. J.; Pitera, D. J.; Benjamin, K.; Fisher, K.; McPhee, D.; Leavell, M. D.; Tai, A.; Main, A.; Eng, D.; Polichuk, D. R.; Teoh, K. H.; Reed, D. W.; Treynor, T.; Lenihan, J.; Fleck, M.; Bajad, S.; Dang, G.; Dengrov, D.; Diola, D.; Dorin, G.; Ellens, K. W.; Fickes, S.; Galazzo, J.; Gaucher, S. P.; Geistlinger, T.; Henry, R.; Hepp, M.; Horning, T.; Iqbal, T.; Jiang, H.; Kizer, L.; Lieu, B.; Melis, D.; Moss, N.; Regentin, R.; Secrest, S.; Tsuruta, H.; Vazquez, R.; Westblade, L. F.; Xu, L.; Yu, M.; Zhang, Y.; Zhao, L.; Lievens, J.; Covelho, P. S.; Keasling, J. D.; Reiling, K. K.; Renninger, N. S.; Newman, J. D. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* **2013**, *496*, 528. [CrossRef] [PubMed]

¹⁵ a) Birolli, W. G.; Ferreira, I. M.; Alvarenga, N.; Santos, D. A.; de Matos, I. L.; Comasseto, J. V.; Porto, A. L. M. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: Na overview. *Biotechnology Advances* **2015**, *33*, 481; [CrossRef] [PubMed] b) Gonçalves, C. C. S.; Marsaioli, A. J. Fatos e Tendências da biocatálise. *Química Nova* **2013**, *36*, 1587. [CrossRef]

¹⁶ Blank, L. M.; Ebert, B. E.; Buehler, K.; Bühler, B. Redox Biocatalysis and Metabolism: Molecular Mechanisms and Metabolic Network Analysis. *Antioxidants & Redox Signaling* **2010**, *13*, 349. [CrossRef] [PubMed]

¹⁷ a) Holtmann, D.; Fraaije, M. W.; Arends, I. W. C. E.; Opperman, D. J.; Hollmann, F. The taming of oxygen: biocatalytic oxyfunctionalisations. *Chemical Communications* **2014**, *50*, 13180; [CrossRef] [PubMed] b) Pazmiño, D. E. T.; Winkler, M.; Glieder, A.; Fraaije, M. W. Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of Biotechnology* **2010**, *146*, 9. [CrossRef] [PubMed]

¹⁸ Seifert, A.; Antonovici, M.; Hauer, B.; Pleiss, J. An Efficient Route to Selective Bio-Oxidation Catalysts: an Iterative Approach Comprising Modeling, Diversification and Screening, Based on CYP102A1. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1346. [CrossRef] [PubMed]

¹⁹ Girvan, H. M.; Munro, A. W. Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology. *Chemical Biology* **2016**, *31*, 136. [CrossRef] [PubMed]

²⁰ Schrittwieser, J. H.; Velikogne, S.; Hall, M.; Kroutil, W. Artificial Biocatalytic Linear Cascades for Preparation of Organic Molecules. *Chemical Reviews* **2018**, *118*, 270. [CrossRef] [PubMed]

²¹ Bornadel, A.; Hatti-Kaul, R.; Hollmann, F.; Kara, S. A Bi-enzymatic Convergent Cascade for ϵ -Caprolactone Synthesis Employing 1,6-Hexanediol as a 'Double-Smart Cosubstrate'. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 2442. [CrossRef]

²² Zanger, U. M.; Schwab, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* **2013**, *138*, 103. [CrossRef] [PubMed]

²³ a) Lee, C. W.; Lee, J. -H; Rimal, H.; Lee, J. H.; Oh, T. -J. Crystal Structure of Cytochrome P450 (CYP105P2) from *Streptomyces*

23 a) Lee, C. W.; Lee, J. -H; Rimal, H.; Lee, J. H.; Oh, T. -J. Crystal Structure of Cytochrome P450 (CYP105P2) from *Streptomyces*

- peucetius* and Its Conformational Changes in Response to Substrate Binding. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science* **2016**, *17*, 813; [CrossRef] [PubMed] b) Omura, T. Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *Journal of Biochemistry* **2010**, *147*, 297. [CrossRef]
- ²⁴ Rittle J.; Green, M. T. Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics. *Science* **2010**, *330*, 933. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Danielson, P. B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current Drug Metabolism* **2002**, *3*, 561. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁶ van Berkel, W. H. J.; Kamerbeek, N. M.; Fraaije, M. W. Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *Journal of Biotechnology* **2006**, *124*, 670. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁷ a) Bucko, M.; Gemeiner, P.; Schenk Mayerová, A.; Krajcovic, T.; Rudroff, F.; Mihovilovic, M. D. Baeyer-Villiger oxidations: biotechnological approach. *Applied Microbiology Biotechnology* **2016**, *100*, 6586; [CrossRef] [PubMed] b) Ferroni, F. M.; Tolmie, C.; Smit, M. S.; Opperman, D. J. Structural and Catalytic Characterization of a Fungal Baeyer-Villiger Monooxygenase. *Plos One* **2016**, *11*, e0160186; [CrossRef] [PubMed] c) Leisch, H.; Morley, K.; Lau, P. C. K. Baeyer-Villiger Monooxygenases: More Than Just Green Chemistry. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 4165. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Bugg, T. D.; Ramaswamy, S. Non-heme iron-dependent dioxygenases: unravelling catalytic mechanisms for complex enzymatic oxidations. *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, *12*, 134. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁹ Bugg, T. D. H. Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7075. [CrossRef]
- ³⁰ Thierbach, S.; Bui, N.; Zapp, J.; Chhabra, S. R.; Kappl, R.; Fetzner, S. Substrate-Assisted O₂ Activation in a Cofactor-Independent Dioxygenase. *Chemistry & Biology* **2014**, *21*, 217. [CrossRef] [PubMed]
- ³¹ Hernandez-Ortega, A.; Quesne, M. G.; Bui, S.; Heuts, D. P. H. M.; Steiner, R. A.; Heyes, D. J.; de Visser, S. P. Scrutton, N. S. Origin of the Proton-transfer Step in the Cofactor-free (1H)-3-Hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-Dioxygenase- Effect of the basicity of an active site His residue. *The Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, 8620. [CrossRef] [PubMed]
- ³² a) Hernandez-Ortega, A.; Quesne, M. G.; Bui, S.; Heyes, D. J.; Steiner, R. A.; Scrutton, N. S.; de Visser, S. P. Catalytic Mechanism of Cofactor-Free Dioxygenases and How They Circumvent Spin-Forbidden Oxygenation of Their Substrates. *Journal of American Chemical Society* **2015**, *137*, 7474; [CrossRef] [PubMed] b) Frederichs-Deeken, U.; Ranguelova, K.; Huttermann, J.; Fetzner, S. Dioxygenases without Requirement for Cofactors and Their Chemical Model Reaction: Compulsory Order Ternary Complex Mechanism of 1H-3-Hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-Dioxygenase Involving General Base Catalysis by Histidine 251 and Single-Electron Oxidation of the Substrate Dianion. *Biochemistry* **2004**, *43*, 14485. [CrossRef] [PubMed]
- ³³ Steiner, R. A.; Janssen, H. J.; Roversi, P.; Oakley, A. J.; Fetzner, S. Structural basis for cofactor-independent dioxygenation of N-heteroaromatic compounds at the alpha/beta-hydrolase fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 657. [CrossRef] [PubMed].
- ³⁴ Burton, S. G. Oxidizing enzymes as biocatalyst. *Trends in Biotechnology* **2003**, *21*, 543. [CrossRef]
- ³⁵ Panday, A.; Sahoo, M. K.; Osorio, D.; Batra, S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular & Molecular Immunology* **2015**, *12*, 5. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁶ Heath, R. S.; Pontini, M.; Bechi, B.; Turner, N. J. Development of an R-Selective Amine Oxidase with Broad Substrate Specificity and High Enantioselectivity. *ChemCatChem* **2014**, *6*, 996. [CrossRef]
- ³⁷ Goswami, P.; Chinnadayala, S. S. R.; Chakraborty, M.; Kumar, A. K.; Kakoti, A. An overview on alcohol oxidases and their

- potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2013**, *97*, 4259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸ Fetzner, S.; Steiner, R. A. Cofactor-independent oxidases and oxygenases. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2010**, *86*, 791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁹ a) Winter, R. T.; Fraaije, M. W. Applications of Flavoprotein Oxidases in Organic Synthesis: Novel Reactivities that Go Beyond Amine and Alcohol Oxidations. *Current Organic Chemistry* **2012**, *16*, 2542; [[CrossRef](#)]
 b) Mattevi, A. To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes. *Trends in Biochemical Sciences* **2006**, *31*, 276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ a) Dijkman, W.; de Gonzalo, G.; Mattevi, A.; Fraaije, M. W. Flavoprotein oxidases: classification and applications; [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 b) Gadda, G. Oxygen Activation in Flavoprotein Oxidases: The Importance of Being Positive. *Biochemistry* **2012**, *51*, 2662; [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 c) Roth, J. P.; Klinman, J. P. Catalysis of electron transfer during activation of O₂ by the flavoprotein glucose oxidase. *Proceedings of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 62; [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 d) Gadda, G.; Fan, F.; Hoang, J. V. On the contribution of the positively charged headgroup of choline to substrate binding and catalysis in the reaction catalyzed by choline oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2006**, *451*, 182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴¹ Forootanfar, H.; Faramarzi, M. A. Insights into laccase producing organisms, fermentation states, purification strategies, and biotechnological applications. *Biotechnology Progress* **2005**, *31*, 1443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴² a) Chandra, R.; Chowdhari, P. Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. *Environmental Science: Processes & Impacts* **2015**, *17*, 326; [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 b) Couto, S. R.; Herrera, J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol. Biotechnology Advances* **2006**, *24*, 500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴³ Claus, H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* **2004**, *35*, 93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁴ Riva, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* **2006**, *24*, 219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁵ Hamid, M.; Rehman, K. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry* **2009**, *115*, 1177. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁶ Min, K.; Gong, G.; Woo, H. M.; Kim, Y.; Um, Y. A dye-decolorizing peroxidase from *Bacillus subtilis* exhibiting substrate-dependent optimum temperature for dyes and β -ether lignin dimer. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ a) Kurnik, K.; Treder, K.; Skorupa-Klaput, M.; Tretyn, A.; Tyburski, J. Removal of Phenol from Synthetic and Industrial Wastewater by Potato Pulp Peroxidases. *Water, Air, & Soil Pollution* **2015**, *226*, 254; [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 b) Savic, S. R.; Stojmenovic, S. M.; Petronijevic, M. Z.; Petronijevic, Z. B. Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase extracted from horseradish. *Applied Biochemistry and Microbiology* **2014**, *50*, 214. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁸ a) Yadav, M.; Yadav, H. S. Applications of ligninolytic enzymes to pollutants, wastewater, dyes, soil, coal, paper and polymer. *Environmental Chemistry Letters* **2015**, *13*, 309; [[CrossRef](#)]
 b) Regalado, C.; Garcia-Almendárez, B. E.; Duarte-Vásquez, M. A. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews* **2004**, *3*, 243. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁹ Tafazoli, S.; O'Brien, P. J. Peroxidases: a role in the metabolism and side effects of drugs. *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 617. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁰ van de Velde, F.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Peroxidases: a role in the metabolism and side effects of drugs. *Trends in Biotechnology* **2001**, *19*, 73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Battistuzzi, G.; Bellei, M.; Bortolotti, C. A.; Sola, M. Redox properties of heme peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2010**, *500*, 21. [[CrossRef](#)]
- ⁵² Zámocky, M.; Hofbauer, S.; Schaffner, I.; Gasselhuber, B.; Nicolusso, A.; Soudi, M.;

- Pirker, K. F.; Furtmüller, P. G.; Obinger, C. Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2014**, *574*, 108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵³ a) Raven E.; Dunford, B. *Heme Peroxidases* 1th ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2015. b) Poulos, T. L. Thirty years of heme peroxidase structural biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2010**, *500*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁴ Brummund, J.; Sonke, T.; Müller, M. Process Development for Biocatalytic Oxidations Applying Alcohol Dehydrogenases. *Organic Process Research & Development* **2015**, *19*, 1590.
- ⁵⁵ Nealon, C. M.; Musa, M. M.; Patel, J. M.; Pjillips, R. S. Controlling Substrate specificity and Stereospecificity of Alcohol Dehydrogenases. *ACS Catalysis* **2015**, *5*, 2100.
- ⁵⁶ Baker, P. J.; Britton, K. L.; Fisher, M.; Esclapez, J.; Pire, C.; Bonete, M. J.; Ferrer, J.; Rice, D. W. Active site dynamics in the zinc-dependent medium chain alcohol dehydrogenase superfamily. *Proceedings of Sciences of the United States of America*. **2009**, *106*, 779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁷ Auld, D. S. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals* **2001**, *14*, 271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁸ Plapp, B. V.; Savarimuthu, B. R.; Ferraro, D. J.; Rubach, J. K.; Brown, E. N.; Ramaswamy, S. Horse Liver Alcohol Dehydrogenase: Zinc Coordination and Catalysis. *Biochemistry* **2017**, *56*, 3632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁹ Kleifeld, O.; Frenkel, A.; Martin, J. M. L.; Sagi, I. Active site electronic structure and dynamics during metalloenzyme catalysis. *Nature Structural Biology* **2003**, *10*, 98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]