

ESTUDOS DE PROTEÇÃO DA CÉLULA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA UTILIZAÇÃO EM REAÇÕES DE REDUÇÃO EM MEIO ORGÂNICO

Maria da Graça Nascimento*, Sandra Patricia Zanotto e Sílvia Pedrosa Melegari

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476, 88040-900 Florianópolis - SC

Paulo J. S. Moran

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13183-970 Campinas - SP

Recebido em 16/7/01; aceito em 3/10/01

PROTECTION STUDIES OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CELLS FOR THE USE IN REDUCTION REACTIONS IN ORGANIC MEDIA. New methodologies for protection of *Saccharomyces cerevisiae* (FP) cells when supported in montmorillonite K10 (K10), recovered or not with gelatin (G) and in the presence or absence of sucrose (S) are presented. These systems were used for the enantioselective reduction of ethyl acetoacetate and α -chloroacetophenone in hexane, under FP/K10/G/S and FP/S at 20°C during 24 hours, affording *S*-(+)-ethyl-3-hydroxybutanoate in 100% conversion and 99% ee, and *R*-(-)-2-chloro-1-phenylethanol 79% and 78% ee at 20 and 30 °C, respectively.

Keywords: biotransformations; baker's yeast; enantioselective reduction.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a importância na produção de substâncias opticamente puras é um capítulo de destaque nos setores acadêmicos e industriais, preocupados com a pesquisa e o desenvolvimento de novos processos. Quando os químicos sintetizam produtos naturais e desenham novos alvos, a pureza enantiomérica dos produtos, e sua relação com as propriedades biológicas, é um tema de permanente discussão¹.

O crescente interesse por esse tipo de síntese promoveu um grande desenvolvimento na biocatálise. Contudo, ainda que a habilidade das enzimas e dos microorganismos para agir como catalisadores quirais específicos, seja conhecida, principalmente pela indústria farmacêutica, os procedimentos bioquímicos apenas tornaram-se aceitos como técnicas experimentais rotineiras em laboratórios de síntese orgânica nos últimos anos².

Portanto, a habilidade de conduzir transformações químicas que são impossíveis ou impraticáveis de outra forma, especialmente na área de obtenção de compostos enantiomericamente puros; aliada à necessidade de mudar os catalisadores hoje existentes (geralmente constituídos de metais pesados ou de transição, altamente nocivos ao ambiente) por catálises "ambientalmente corretas", tornam o uso de biocatalisadores um dos maiores desafios da síntese orgânica na atualidade³⁻⁷.

A possibilidade de atuar na catálise de reações em meios quase anidros ou micro-aquosos expandiu largamente o potencial de aplicações de enzimas e microorganismos em síntese orgânica. A ausência de fase aquosa contínua em torno do biocatalisador torna possível sua interação direta com o solvente, promovendo alterações de estabilidade, atividade e estereosseletividade^{8,9}. Além disso, nestas condições as hidrolases, por exemplo, são capazes de catalisar reações de esterificações e transesterificações com altos rendimentos.

As enzimas e os microorganismos estão sujeitos à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, como decorrência da estocagem ou mesmo durante o uso. Há assim, uma necessidade de

estabilizar estes biocatalisadores, como meio de evitar a inativação para uso em meio orgânico. Portanto, para a manutenção da atividade catalítica e do potencial de estereosseletividade, é necessário o desenvolvimento de métodos preventivos específicos.

Neste sentido, a técnica de imobilização em diferentes suportes é uma das mais utilizadas na biocatálise, sendo bastante aplicada para mediar reações de interesse sintético em solventes orgânicos^{10,11}. A imobilização do biocatalisador em um suporte, sem prejuízo de sua atividade por um razoável período de tempo, pode assegurar sua repetida utilização ou mesmo possibilitar o uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais. Assim, de modo geral, a utilização de materiais imobilizados além de diminuir o custo por análise, aumenta a rapidez e a exatidão do processo. Nos processos sintéticos, a facilidade de extração dos produtos do meio reacional aliada à estabilidade do biocatalisador em reações de longa duração (ou com substratos nocivos) são de grande interesse nas biotransformações.

A célula de *Saccharomyces cerevisiae*, que utiliza glicose ou sacarose como fonte de energia, é um dos biocatalisadores mais versáteis e baratos. A facilidade de manuseio, que não requer nenhum cuidado especial, o faz alvo de escolha quando se deseja conduzir reações de oxidação-redução. É preferencialmente utilizado na forma de célula inteira, ao invés de enzimas isoladas, evitando dessa forma, o problema da dificuldade de reciclar o cofator, um passo necessário quando se usa a enzima pura. As células inteiras apresentam uma grande variedade de atividades enzimáticas. Por isso, o maior problema encontrado neste tipo de biocatálise é a baixa seletividade, devido à ação simultânea das várias enzimas presentes, que geralmente apresentam diferentes cinéticas e velocidades de conversão para um mesmo substrato¹². No entanto, quando o processo não é satisfatoriamente seletivo, modificações simples nas condições experimentais podem ser realizadas no sentido de influenciar tanto a estereoquímica como a enantioseletividade¹³. Algumas das modificações mais comuns são o uso de solventes orgânicos, a adição de inibidores ou co-substratos^{14, 15} e as técnicas de imobilização^{11,16,17}, entre outras².

Algumas enzimas hidrolíticas, como as lipases e as proteases, são reconhecidamente retentoras da atividade catalítica em solventes

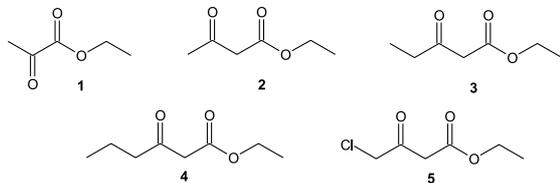
*e-mail: gracia@qmc.ufsc.br

orgânicos. Entretanto, as desidrogenases e redutases são diferentes das hidrolíticas e requerem quantidades estequiométricas das coenzimas NADH ou NADPH. Devido ao alto custo, essas coenzimas são normalmente recicladas. A utilização de células inteiras é uma maneira de resolver o problema de reciclagem da coenzima, porém os solventes orgânicos frequentemente acarretam danos na membrana hidrofóbica da célula do microorganismo.

O uso de solventes orgânicos é vantajoso devido à solubilidade do substrato e à capacidade que possuem em impedir as reações laterais pela água. Além disso, a seletividade da enzima do fermento pelo substrato pode mudar em meio orgânico. A adição de pequenas quantidades de água é necessária sob tais condições de reação, para que a enzima se mantenha cataliticamente ativa⁸. Já o isolamento de produtos de meios não aquosos é bem mais fácil do que de meios aquosos, sendo este mais um grande benefício^{18,19}.

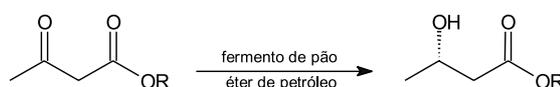
Nakamura e col. realizaram os primeiros estudos de redução de α -ceto ésteres com fermento de pão (FP) seco não imobilizado em benzeno e hexano. Observaram que a utilização controlada de gotas de água (0,4 equivalentes; mL H₂O/g FP) no sistema é indispensável para promover a redução. Já o excesso de água suprime radicalmente a redução¹⁸. Smallridge e col. em 1994, estenderam as investigações na redução de β -cetoésteres com FP em uma série de solventes polares e não polares, num estudo que foi completado verificando-se o efeito da influência da água na reatividade²⁰. Estes resultados demonstraram clara e seguramente que a reação é afetada tanto pela natureza do solvente, quanto pela razão água/fermento (independente da razão água/solvente). Também foi constatado, que a redução do acetoacetato de etila (**2**) com FP em solvente orgânico resultou na formação exclusiva de (*S*)-3-hidroxiacetato de etila com ee de 96%, para todas as condições de reação empregadas. Estes resultados contrastam com os obtidos por Nakamura e col.²¹, onde a redução de α -cetoésteres com FP em água formou o enantiômero-*S*, enquanto que em solvente orgânico obteve-se o enantiômero-*R*²⁰.

Rothaus e col. estudaram a redução de α - e β -cetoésteres (**1-5**) com FP em hexano, tolueno, éter dietílico e acetato de etila⁸. As reações de redução em solventes orgânicos ocorreram preferencialmente em tolueno e hexano, sendo que os melhores resultados foram obtidos para o composto **1** em hexano, e para o **2** em tolueno. A tendência do ee na redução dos compostos **1** a **5**, em solvente orgânico, sugere que o aumento do comprimento da cadeia no lado ceto do substrato está relacionada diretamente ao aumento da percentagem de produto com a configuração *R*. Estes resultados estão de acordo com a regra de Prelog²².



Uma série de (*S*)- β -hidroxiésteres foi preparada por Smallridge e col. usando fermento de pão como mediador da redução de β -oxoésteres em éter de petróleo (40-60 °C). Os produtos foram obtidos com rendimentos entre 56 e 96%, e alto grau de estereosseletividade (94-99% ee). Estes resultados são superiores aos descritos na literatura quando as mesmas reações foram conduzidas em fase aquosa²³ (Esquema 1).

Recentemente Kanda e col. verificaram que o duplo entrapamento da célula do fermento de pão com alginato de cálcio e pré-polímero uretano (PU-6), torna-a suficientemente protegida do solvente orgânico, para repetidas reduções estereosseletivas, em reações de longa duração²⁴.



R= Me, Et, i-Pr, n-Bu, t-Bu, s-Bu, Bz

Esquema 1

Uma das contribuições mais recentes, para o avanço dos estudos de redução mediada por FP em meio orgânico, foi realizada por Smallridge e col. Eles observaram que a atividade do fermento decresce após 24 horas de exposição a solventes orgânicos; e investigaram os fatores associados com esta redução da atividade²⁵. Num estudo complementar, a facilidade de redução de β -ceto ésteres foi relacionada à variação do tamanho da cadeia carbônica ligada ao carbono ceto. A proximidade dos grupos mais volumosos à carbonila proporciona uma redução mais rápida. Finalmente, as β -ceto amidas são consideravelmente menos reativas que os correspondentes β -ceto ésteres²⁶. Em outro trabalho, verificou-se que grupos metilênicos conjugados com carbonilas e nitrilas, podem ser reduzidos com um alto grau de estereosseletividade e bons rendimentos²⁷.

Em contribuição a estes estudos, neste trabalho foram investigadas várias metodologias para a proteção de células de *Saccharomyces cerevisiae*, visando a sua utilização em reações de redução de compostos carbonílicos em meio orgânico. A obtenção estereosseletiva de uma halodrina foi testada juntamente com a facilidade de sua extração do meio reacional, para verificar a eficiência dos sistemas de proteção em estudo, quando se tem um substrato tóxico para o FP, como a α -cloroacetofenona.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Os espectros RMN ¹H foram obtidos em um espectrômetro da Bruker AC 200 MHz. Os cromatogramas e espectros de massas foram obtidos em um cromatógrafo a gás GC-MS-QP5000 da Shimadzu, equipado com coluna da Supelco (Simplicity 1 Capillary Column, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, N^o 11702-05B). As determinações dos excessos enantioméricos foram realizadas em GC-14B Shimadzu, com coluna quiral CHROMPACK (chirasil - DEX CB 25m x 0,25). As rotações ópticas específicas foram medidas em um Polarímetro - Polartronic E. Fermento de pão (FP) biológico, instantâneo e seco (*Saccharomyces cerevisiae*, EMULZINT - LTDA da Bélgica), foi utilizado como biocatalisador. As células foram imobilizadas em montmorilonita K10 (K10) (Aldrich Chemical Co.) e revestidas com gel de gelatina (G) (SIGMA G2500, Tipo A). Acetoacetato de etila e α -cloroacetofenona (Carlo Erba) foram utilizados sem purificação. Os produtos racêmicos utilizados como padrões para CG quiral (\pm)-3-hidroxiacetato de etila e (\pm)-2-cloro-1-fenil-etanol foram obtidos através da reação de redução com NaBH₄ (Aldrich Chemical Co.)²⁸. O hexano (Grupo Química) foi purificado através de lavagem com ácido sulfúrico e neutralização, seguida de destilação (p.e._{exp} = 68°C; p.e._{lit.} = 69°C)²⁹. A pré-purificação dos produtos obtidos foi realizada por coluna cromatográfica de sílica (Carlo Erba, 0,05-0,20 mm)

Procedimento geral para a adsorção e recobrimento

Uma suspensão com 2,0 g de FP belga seco e 6,0 g de montmorilonita K10, em aproximadamente 100 mL de água foi agitada vigorosamente por uma noite, à temperatura ambiente. A mistu-

ra de FP/K10 foi então filtrada a vácuo, seca sob corrente de ar e triturada até resultar em partículas finas. Uma solução de 0,5 g de gelatina em 5,0 mL de água foi aquecida até 50 °C, e em seguida, resfriada a \pm 30 °C, e misturada ao sólido FP/K10. A mistura FP/K10/G resultante foi seca sob corrente de ar.

Procedimento geral para biotransformação

Em um erlenmeyer foram colocados 100 mL de hexano, e em seguida o biocatalisador foi adicionado, sob agitação magnética. Água ou solução de sacarose, foi gotejada lentamente sob agitação magnética vigorosa. Após a adição de 0,2 mL (1,57 mmoles) de acetoacetato de etila, a mistura reacional foi mantida sob agitação em um banho termostatizado tipo Dubnoff a 20 e 30 °C por 24 h (Tabela 1).

Procedimento para reutilização do biocatalisador

Após o término de cada reação, o sobrenadante foi filtrado a vácuo lavado com hexano (3 x 30,0 mL), ressuspendido em 100 mL de hexano e novamente 0,2 g (1,57 mmoles) de acetoacetato de etila foram adicionados. A mistura reacional foi mantida sob agitação em um banho termostatizado tipo Dubnoff a 20 e 30 °C por 24 h (Tabela 1).

Procedimento para as reações controle

As reações de controle foram realizadas, utilizando FP sem qualquer imobilização. O procedimento geral para estas reações foi a adição de 2,0 g de FP em 50 mL de hexano com 0,2 mL (1,57 mmoles) de acetoacetato de etila (Tabela 1, Entrada 1).

Procedimento geral para a reação de redução da α -cloroacetofenona

As metodologias de adsorção e recobrimento já descritas foram utilizadas, porém, verificou-se a necessidade de se usar o dobro das quantidades acima descritas. Os melhores resultados foram obtidos para a reação modelo com os sistemas FP/K10/G/S e FP/S. Estes dois sistemas determinaram, portanto, os ensaios de redução da α -cloroacetofenona em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas) e temperaturas (20 e 30 °C). As estereosseletividades foram avaliadas nestas condições. Para cada sistema (FP/K10/G e FP), foram adicionados 50 mL de hexano e estes submetidos à agitação magnética. Com uma bomba peristáltica e agitação magnética vigorosa, foram adicionadas vagarosamente uma solução de 0,32 g de sacarose em 3,2 mL de água em cada um dos sistemas. Sob agitação tipo Dubnoff a

20 ou 30 °C, foram adicionados 0,2 g (1,3 mmoles) de α -cloroacetofenona. Após 24, 48 e 72 h de reação, o meio reacional foi separado do suporte por filtração, e pré-purificado em uma coluna cromatográfica de sílica para eliminar partículas provenientes do FP, o solvente foi evaporado. A análise da mistura reacional foi realizada por CG, com uma coluna quiral. A reutilização dos dois sistemas foi testada, adicionando-se novamente 0,2 g (1,3 mmoles) de α -cloroacetofenona e 50 mL de hexano; após a filtragem a vácuo do sobrenadante e a lavagem do suporte com hexano (3 x 30,0 mL) sob agitação magnética.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação de redução do acetoacetato de etila foi utilizada como um modelo em todos os estudos dos processos de imobilização e recobrimento, com a finalidade de padronizar uma metodologia para outros substratos. Muitos detalhes desta reação modelo são bem conhecidos, principalmente considerando-se que o valor do excesso enantiomérico do álcool produzido pode ser facilmente monitorado por cromatografia gasosa com uma coluna com fase estacionária quiral. Além disto, β -hidroxiésteres enantiomericamente puros, tem sido usados como materiais de partida em sínteses orgânicas (Esquema 2)²⁶.



Esquema 2

Estudos anteriores realizados por Moran e col.³⁰ demonstraram que a relação ideal de FP fresco (contém 70% de umidade) e K10 é de 1:1. Neste trabalho foi usado o FP desidratado e a proporção biocatalisador : suporte foi 3:1. Não foi observada qualquer diferença na obtenção do produto final, após a hidratação do FP antes de sua adsorção em K10, com solução de KCl (2%) e sacarose (razão de sacarose/ FP 1:1).

Sabe-se que a utilização de quantidades de água (entre 0,2 a 1,2 mL de água por grama de fermento) adicionadas ao meio reacional é indispensável para que ocorra a reação^{18,20,21,26}. Foram realizados testes para estabelecer a quantidade ideal de água, dentro da faixa estipulada pela literatura como aceitável, que pode ser adicionada ao meio sem alterar a morfologia dos sistemas em estudo (FP, FP/K10, FP/G, FP/K10/G). O valor máximo de água foi de 0,8 mL por grama de FP, quantidade esta que ainda preserva a área superficial dos sistemas de ser diminuída por aglutinação.

Tabela 1. Diferentes condições experimentais empregadas nas reações de redução de acetoacetato de etila mediadas por FP, em hexano^a

Entradas	Sistemas	H ₂ O (mL)	FP ^b (g)	K10 ^c (g)	G ^d (g/mL)	Sacarose(S) (g)
1	FP	1,6	2,0	–	–	–
2	FP/S	1,6	2,0	–	–	0,16
3	FP/G	1,6	2,0	–	0,1	–
4	FP/G/S	1,6	2,0	–	0,1	0,16
5	FP/K10	1,6	2,0	6,0	–	–
6	FP/K10/S	1,6	2,0	6,0	–	0,16
7	FP/K10/G	1,6	2,0	6,0	0,1	–
8	FP/K10/G/S	1,6	2,0	6,0	0,1	0,16

a) O meio reacional sofreu agitação tipo Dubnoff, e os experimentos foram realizados em duplicatas para comparação dos resultados; b) FP = fermento de pão; c) K10 = montmorilonita K-10; d) G = gelatina

Temperaturas: 20 e 30°C

Conforme esperado, não houve formação de produto quando a reação foi realizada na presença de K10 sem a adição de FP. Verificou-se por CG-quiral, com os sistemas FP, FP/S e FP/K10/G/S a 20 °C que, após 24 h de reação obteve-se 100% de conversão (%c) ao produto 3-hidroxi-butanoato de etila. (Figura 1).

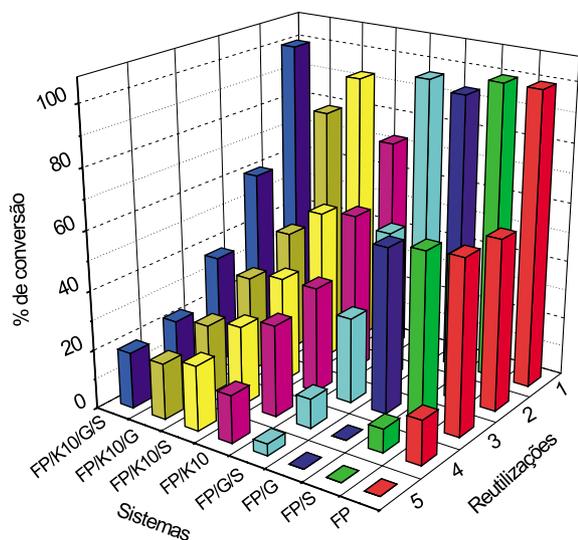


Figura 1. Porcentagem de conversão (%c) do acetoacetato de etila em (S)-(+)-3-hidroxi-butirato de etila mediada por FP em diferentes sistemas de imobilização e em função do número de reutilização, em hexano a 20 °C.

Nas reações efetuadas a 30°C, também foi obtido 100% de conversão para o produto utilizando os sistemas FP, FP/S e FP/K10/G/S. Para o sistema FP o valor de %c diminuiu para 7% na primeira reutilização. Com o sistema FP/K10/G/S, obteve-se o produto com 19% de conversão na primeira reutilização, mostrando uma modesta proteção para as células do FP. Após a primeira reação, todos os sistemas foram avaliados em até quatro reutilizações (Figura 2).

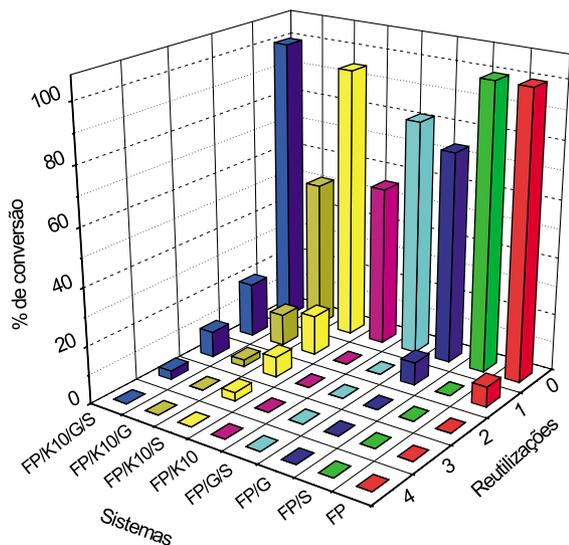


Figura 2. Porcentagem de conversão (%c) do acetoacetato de etila em (S)-(+)-3-hidroxi-butirato de etila mediada por FP em diferentes sistemas de imobilização e em função do número de reutilização, em hexano a 30 °C.

Através da análise das Figuras 1 e 2, pode-se verificar que a partir da segunda reutilização, ou seja, a terceira reação a que o sistema foi submetido, as áreas que correspondem aos produtos da reação diminuíram significativamente, principalmente à temperatura de 30 °C. A temperatura exerce uma influência na desativação da enzima redutase do FP²⁵. Como consequência, ocorreu a desativação da enzima após 24 h e obtiveram-se valores de conversão menores quando as reações foram realizadas a 30 °C.

Os valores de ee, analisados por CG-quiral, foram para todos os sistemas superiores a 99%. Para todos eles, apenas um dos enantiômeros foi detectado. As condições cromatográficas para a separação dos enantiômeros preestabelecidas e as medidas de rotação ótica $[\alpha]_D^T$ indicaram a formação do (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila puro de acordo com a literatura^{12,31}.

Para os sistemas FP/K10 e FP/K10/G sem a adição de sacarose, a %c diminuiu consideravelmente em relação aos mesmos sistemas com adição de sacarose, nas temperaturas de 20 e 30 °C. Estes resultados podem estar associados ao fato de que a sacarose pode atuar como fonte de carbono e proteção adicional para as células de *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de conversão (%c) do acetoacetato de etila em (S)-(+)-3-hidroxi-butirato de etila nos sistemas com e sem sacarose, em hexano

Sistemas	% c (20 °C)	% c (30 °C)
FP/K10	73	56
FP/K10/S	93	95
FP/K10/G	79	52
FP/K10/G/S	100	100

Tempo reacional: 24 horas

Constatou-se também que o maior tempo de permanência do FP não imobilizado em solventes orgânicos está relacionado a um aparecimento de produtos secundários, detectados pelos cromatogramas. Porém, para o sistema imobilizado, ou seja, FP/K10/G/S, houve uma maior resistência quanto à formação de subprodutos indesejáveis.

A redução estereosseletiva de α -haloacetofenonas é potencialmente um excelente processo para obtenção de halodirais quirais, que podem ser usadas como blocos de construção quirais para alguns produtos naturais e fármacos opticamente ativos³². A biorredução da α -cloroacetofenona tem sido realizada com FP em meio aquoso^{30,32,33}. Neste trabalho, esta reação foi realizada em meio orgânico (Esquema 3).



Esquema 3

Os dados de %c e ee (%) para formação do (R)-(-)-2-cloro-1-feniletanol estão na Tabela 3.

A Tabela 3 demonstra que os valores de ee para o sistema FP/K10/G/S (ee 73-79) foram sempre maiores que para FP/S (ee 55-60%), independente do tempo e da temperatura. Os dados de %c usando o sistema FP/K10/G/S foram menores que para FP/S. Estes resultados provavelmente mostram a maior dificuldade de difusão do reagente e do produto, no meio reacional, causada pela gelatina (G) e o K10.

Tabela 3. Porcentagem de conversão (%c) da α -cloroacetofenona em *R*-(-)-2-cloro-1-feniletanol e os valores de ee (%) obtidos em diferentes condições experimentais

Sistemas	ee % ^a (%c) ^b 24h		ee % ^a (%c) ^b 48h		ee % ^a (%c) ^b 72h	
	20 °C	30 °C	20 °C	30 °C	20 °C	30 °C
FP/S	60 (30)	56 (19)	56 (26)	55 (39)	56 (26)	60 (35)
FP/K10/G/S	77 (10)	73 (9)	77 (15)	73 (10)	79 (10)	78 (19)

^a ee calculado pela % de área (CG quiral).

^b determinados por RMN ¹H.

Foram realizados testes para verificar a ocorrência de inversão de configuração ao reutilizar estes sistemas nestas condições experimentais, considerando que isto ocorre em meio aquoso³⁰. Entretanto, observou-se que não houve a inversão de configuração do (*R*)-(-)-2-cloro-1-feniletanol quando os sistemas foram reutilizados, e que a %c foi menor que 5%. Este resultado mostra que o sistema de proteção FP/K10/G/S, para a parede celular, ainda não foi eficiente quando um substrato tóxico como a α -cloroacetofenona foi utilizado em hexano, sugerindo a desativação das oxido-redutases.

CONCLUSÕES

O sistema FP/K10/G/S foi o que melhor protegeu as células na reação modelo, produziu menos subprodutos e manteve-se com atividade (ee >99%) até a quarta reutilização com uma porcentagem de conversão de acetoacetato de etila para o (*S*)-(+)-3-hidroxi-butanoato (ee > 99%) de etila de 19% a 20°C.

A metodologia estudada para a proteção das células de *Saccharomyces cerevisiae* do meio reacional, mostrou-se também bastante eficiente na obtenção de produtos enantiomericamente puros como o (*R*)-(-)-2-cloro-1-feniletanol (ee 78%, 72h a 30°C). Uma grande vantagem deste método, está na facilidade de separação do produto desejado do meio reacional. Entretanto, a dificuldade de difusão dos reagentes e produtos pode levar à formação de produtos com baixos valores de %c.

O método é adequado para ser empregado em reações de redução enantiosseletivas em laboratórios de química orgânica.

AGRADECIMENTOS

Ao DQ-UFSC, IQ-UNICAMP e CNPq pelo suporte financeiro e bolsas concedidas (SPM, SPZ e MGN) e ao Dr. A. C. Siani (FIOCRUZ) pelas sugestões e revisão do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- Bon, E. P. S.; Pereira Jr., N.; *Tecnologia Enzimática*; Fundação Biblioteca Nacional; Rio de Janeiro, RJ, 1999, p. 113.
- Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A.; *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1071.
- Roberts, S. M.; Turner, N. J.; Willetts, J.; Turner, M. K.; *Introduction to Biocatalysis using Enzymes and Micro-organisms*, Cambridge University Press: New York; 1995, p. 195.
- Hudlicky, T.; Gonzalez, D.; Gibson, D. T.; *Aldrichimica Acta* **1999**, *32*, 35.
- Duran, N.; Conti, R. De; Rodrigues, J. A. R.; *Bol. Soc. Chil. Quím.* **2000**, *45*, 109.
- Stewart, J. D.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 363.
- Stanley, M. R.; *J. Chem. Educ.* **2000**, *77*, 344.
- Rothaus, O.; Krüger, D.; Demuth, M.; Schaffner, K.; *Tetrahedron* **1997**, *53*, 935.
- Hudlicky, T.; Gonzalez, D.; Gibson, D. T.; *Aldrichimica Acta* **1999**, *32*, 35.
- Fernandez-Lafuente, R.; Armisen, P.; Sabuquillo, P.; Fernández-Lorente, G.; Guisán, J. M.; *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 185.
- Narvátil, M.; Sturdik, E.; *Biologia* **1999**, *54*, 635.
- D'Arrigo, P.; Fantoni, G. P.; Servi, S.; Strintí, A.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2375.
- Hayakawa, R.; Nozawa, K.; Shimizu, M.; Fujisawa, T.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 67.
- Pereira, R. S.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **1998**, *18*, 25.
- Dahl, A. C.; Madsen, J. O.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *6*, 4395.
- Bekatorou, A.; Koutinas, A. A.; Kaliafas, A.; Kanellaki, M.; *Process Biochem.* **2001**, *36*, 549.
- Grunwald, P.; *Biochem. Educ.* **2000**, *28*, 96.
- Nakamura, K.; Kondo, S.; Kawai, Y.; Ohno, A.; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7075.
- León, R.; Fernandes, P.; Pinheiro, H. M.; Cabral, J. M.; *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*, 483.
- Jayasinghe, L. Y.; Kodituwakku, D.; Smallridge, A. J.; Trehwella, M. A.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 2528.
- Nakamura, K.; Kondo, S.; Kawai, Y.; Ohno, A.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66*, 2738.
- Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag: Berlin 1997, p.p 402.
- Medson, C.; Smallridge, A. J.; Trehwella, M. A.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1049.
- Kanda, T.; Miyata, N.; Fukui, T.; Kawamoto, T.; Tanaka, A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 377.
- Medson, C.; Smallridge, A. J.; Trehwella, M. A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 897.
- Athanasios, N.; Smallridge, A. J.; Trehwella, M. A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 893.
- Dumanski, P. G.; Florey, P.; Knetting, M.; Smallridge, A. J.; Trehwella, M. A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 905.
- Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Rogers, V.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R.; *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 4^a ed., Longman Group Limited: New York, 1978, p. 353.
- Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press: Boca Raton, 1979.
- Sorriha, A. E. P. M.; Marques, M.; Joekes, I.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 191; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; Joekes, I.; Brenelli, E. C. S.; Leite, R. A.; *Biocatalysis* **1994**, *9*, 321.
- Wendhausen, R. Jr.; Moran, P. J. S.; Joekes, I.; Rodrigues, J. A. R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, *5*, 69.
- Brenelli, E. C. S.; Carvalho, M.; Okubo, M. T.; Marques, M.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Indian J. Chem.* **1992**, *31B*, 821; Barbieri, C.; Bossi, L.; D'Arrigo, P.; Fantoni, G. P.; Servi, S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 415.
- Carvalho, M.; Okamoto, M. T.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2073; Aleixo, L. M.; Carvalho, M.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1637; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; Carvalho, M.; Brenelli, E. C. S. de; *Atualidades de Física Química Orgânica*, Ed. E. Humeres: Florianópolis, 1995, p. 499.