



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



239550



**Relatório de Estágio**

**A INFLUÊNCIA DE AÇÚCARES EM REDUÇÕES  
ENANTIOSSELETIVAS DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS POR  
FERMENTO DE PÃO EM MEIO ORGÂNICO**

**Orientanda: Sílvia Pedroso Melegari**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria da Graça Nascimento**

Ome  
279

**Florianópolis  
2002**



04220721

## AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais e irmãos pelas grandes lições que aprendi, pelo amor, pelo amparo, e sempre estarem presentes nos momentos difíceis, mesmo distantes.
- À professora e amiga Maria da Graça Nascimento, pelo carinho, atenção, paciência e orientação na realização deste trabalho.
- À amiga Sandra Patrícia Zanotto, pelo companheirismo, atenção e coorientação no decorrer do meu estágio.
- Ao Professor Boris Stambuk do Depto. de Bioquímica (UFSC) e ao Professor Paulo J. S. Moran do Depto. de Química (UNICAMP), pelas valiosas discussões e contribuições.
- Ao meu namorado José Ricardo, por estar sempre ao meu lado, me compreendendo e fortalecendo com palavras de conforto nos momentos difíceis. Eu te amo!
- Aos colegas e amigos do Laboratório de Biocatálise, Sandra, Marcelo, "Juju", "Neidinha", "Robert", Damianni e Rogério pela grande colaboração e amizade.
- Aos meus amigos, por estarem sempre presentes e pela amizade verdadeira.
- Aos professores do Departamento de Química, que contribuíram para minha formação.
- À UFSC e ao CNPq, pelo apoio financeiro.
- E principalmente a DEUS, pela vida, e por estar sempre me presente no meu caminho, dando conforto espiritual para concluir esta etapa importante da minha vida.

“... Então me diz qual é a graça,  
de já saber o fim da estrada,  
quando se parte rumo ao nada...”

*Paulinho Mosca*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE REDUÇÕES.....	viii
RESUMO.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Enzimas.....	01
1.2. Enzimas em Síntese Orgânica.....	02
1.3. Enzima Isolada ou Célula Inteira.....	04
1.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em Síntese Orgânica.....	07
1.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como Biocatalisador em Meio Orgânico.....	08
1.6. Biocatalisadores Imobilizados.....	10
1.7. Açúcares.....	11
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Equipamentos.....	16
3.2. Reagentes.....	17
3.3. Procedimento Geral de Adsorção e Recobrimento do Fermento de Pão.....	17
3.4. Procedimento Geral para a Reação de Redução do Acetoacetato de Etila..	18

3.5. Procedimento de Reutilização do Biocatalisador.....	18
3.6. Procedimento Geral para a Reação de Redução da $\alpha$ -cloroacetofenona....	18
3.7. Procedimento Geral para Preparação dos Padrões Racêmicos.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1. Influência da Adição de Açúcares na Reação de Redução do Acetoacetato de Etila por Fermento de Pão.....	20
4.2. Influência da Adição de Açúcares na Reação de Redução da $\alpha$ -cloroacetofenona por Fermento de Pão.....	23
5. CONCLUSÕES.....	26
6. PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DA TRABALHO.....	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 01: Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	07
Figura 02: Métodos de imobilização de enzimas.(Adaptado da referência <sup>3</sup> ).....	11
Figura 03: Estrutura da trealose.....	12
Figura 04: Estrutura da sacarose.....	13
Figura 05: Cromatograma da reação de redução biocatalítica do acetoacetato de etila (A) sobreposto com o produto racêmico obtido via-química (B) e o produto da reação (C) (FP/S-20°C,24h de reação).....	21
Figura 06: Cromatograma da reação de redução da $\alpha$ -cloroacetofenona (B) sobreposto com o produto racêmico via-química (A) (FP/T-20°C,48h).....	24
Figura 07: Variação da % de conversão (A) e variação da % de ee (B) em função do tempo de reação para a redução da $\alpha$ -cloroacetofenona em diferentes sistemas, à 20°C.....	25

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 01: Enzimas x Microrganismos. Prós e contras.....	06
Tabela 02: Condições de programação do Cromatógrafo Gasoso (14B).....	16
Tabela 03: Valores de $[\alpha]_D^T$ para o (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila em clorofórmio.....	21
Tabela 04: Porcentagem de conversão para reação de redução do acetoacetato de etila em (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila, em sucessivas reutilizações dos sistemas.....	22

## LISTA DE ABREVIATÕES

### Siglas

IUBMB	= União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
UFSC	= Universidade Federal de Santa Catarina
UNICAMP	= Universidade Estadual de Campinas

### Abreviaturas

AcOH	= ácido acético
AcONa	= acetato de sódio
ccd	= cromatografia de camada delgada
CG	= cromatógrafo gasoso
Col.	= colaboradores
%c	= porcentagem de conversão
DEX CB	= $\beta$ -ciclodextrina
ee	= excesso enantiomérico
%ee	= porcentagem de excesso enantiomérico
FID	= detector de ionização de chama
FP	= fermento de pão
FPS	= fermento de pão seco
G	= gelatina
K10	= montmorillonita k-10
$K_m$	= constante de Michaelis-Menten
NAD <sup>+</sup>	= nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	= nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma protonada
PEO	= poli(oxi-etileno)
PS	= <i>Pseudomonas sp</i>
RMN	= ressonância magnética nuclear
S	= sacarose
T	= trealose
t	= tempo
TMS	= trimetilsilano
Temp.	= temperatura
$[\alpha]_D^T$	= rotação óptica específica

## RESUMO

Açúcares, especialmente a trealose, atuam *in vivo* e *in vitro* como estabilizadores de membranas e proteínas, protegendo as células de fermento de pão (FP) sob condições adversas. Este trabalho estudou a influência da adição de sacarose e trealose na reação de redução do acetoacetato de etila e  $\alpha$ -cloroacetofenona com FP imobilizado, ou não, em montmorilonita K10 (K10) e revestido com gelatina (G). Os resultados de conversão (%) e ee (%) obtidos para a redução do acetoacetato de etila foram os mesmos para os vários sistemas utilizados. O álcool (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila sempre foi obtido com %c e ee >99%. Porém na redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona, estes valores variaram dependendo das condições experimentais e do sistema de proteção das células de FP. O sistema FP/T foi o que apresentou a maior conversão em R-(-)-2-cloro-1-feniletanol. Já no sistema FP/K10/G/T, as %c foram menores, mas os valores de ee sempre foram maiores que 99%, levando a formação do produto com alta pureza óptica. No caso da sacarose os resultados obtidos para o sistema FP/S foram menores do que os obtidos com FP/T. No sistema FP/K10/G/S a porcentagem de conversão foi superior à obtida com FP/K10/G/T, mas os ee foram inferiores ao obtidos no mesmo sistema catalítico contendo trealose. Os dados obtidos permitem concluir que a trealose foi mais eficiente do que a sacarose na proteção das células de FP para a sua utilização como catalisador na redução de halocetonas e cetoésteres em meio orgânico, permitindo a obtenção de produtos com alta pureza óptica.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Enzimas

As enzimas, conhecidas como biocatalisadores, são geralmente proteínas, isto é, são formadas por longas cadeias de aminoácidos com ligações peptídicas. A maioria das enzimas sintetizadas por células são retidas para funções intracelulares. Existem algumas enzimas chamadas de extracelulares, que são subsequentemente secretadas para fora dos limites da membrana celular de onde foram sintetizadas. Elas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem as funções vitais de controle dos processos de transformação dos nutrientes em energia e em material celular. Embora alguns biocatalisadores sejam extraídos de tecidos animais e vegetais, as enzimas industriais são geralmente obtidas de microorganismos (bactérias, bolores e leveduras) e tem-se uma maior diversidade. As oportunidades sintéticas proporcionadas pelas enzimas se baseiam na especificidade com que ocorre a reação. As enzimas mais úteis para aplicação em síntese orgânica são aquelas que aceitam uma larga faixa de modificações estruturais no substrato, porém retendo a habilidade de operar estereoespecificamente em cada um em particular.<sup>1</sup>

A classificação da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) divide as reações catalisadas por enzimas em seis grupos principais:<sup>2, 3</sup>

- ✓ **Oxidoredutases:** enzimas deste grupo catalisam reações de oxidação-redução envolvendo oxigenação, como  $C-H \rightarrow C-OH$ , ou remoção de hidrogênio como  $CH(OH) \rightarrow C=O$  e  $CH-C \rightarrow C=C$ .  
Subclasses: hidrogenases, oxidases, peroxidases, etc.
- ✓ **Tranferases:** enzimas que promovem a transferência de grupos acilas, açúcares, fosforilas e grupos aldeídos ou cetonas, de uma molécula para outra.  
Subclase: transaldolases, transcetolases, etc.

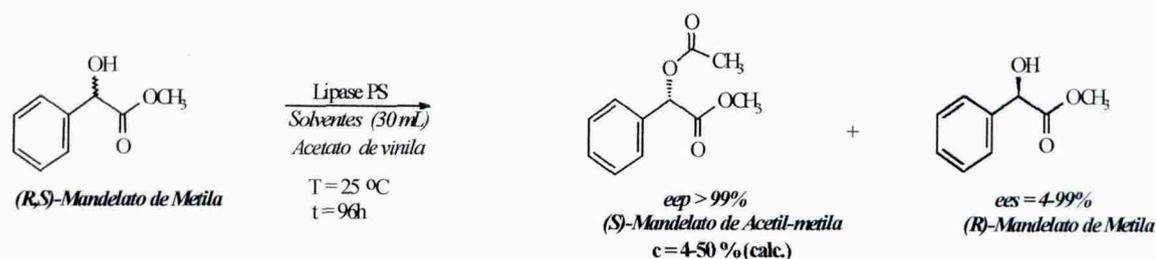
- ✓ **Hidrolases:** enzimas que catalisam reações de hidrólise e formação de glicosídeos, anidridos e ésteres, bem como amidas, peptídeos e outras funções contendo a ligação C-N.  
Subclasses: esterases, lipases, peptidases, fosfatases, etc
- ✓ **Isomerases:** podem efetuar várias isomerizações, incluindo migração da ligação C=C, isomerização cis-trans e racemização.  
Subclasses: racemases, epimerases, oxirredutases, mutases, etc.
- ✓ **Liases:** essas enzimas catalisam reações de adição, usualmente de HX, a duplas ligações como C=C, C=N, e C=O, e também os processos reversos.  
Subclasses: descarboxilases, cetoácidiolases, hidrolases
- ✓ **Ligases:** são também chamadas sintetases e mediam a formação ou clivagem de ligações C-C, C-O, C-S, C-N e ésteres de fosfato.

## 1.2. Enzimas em síntese orgânica

A aplicação de biocatalisadores em síntese orgânica, está relacionada principalmente com o alto grau de especificidade e de seletividade em relação ao substrato, além da promoção de reações régio e/ou estereosseletivas.

A possibilidade de utilizar enzimas e microorganismos na catálise de reações em meios quase anidros ou micro-aquosos, expandiu seu potencial de aplicações 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. Além disso, nestas condições as hidrolases por exemplo, são capazes de catalisar reações de esterificações e transesterificações com altos rendimentos.<sup>4, 5</sup>

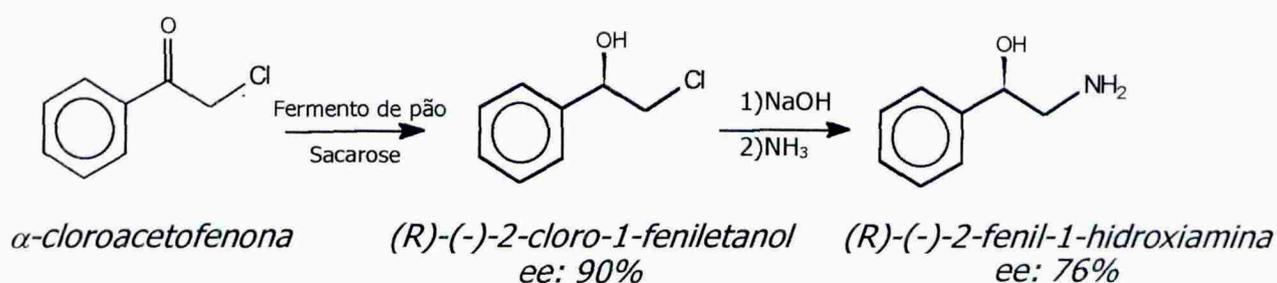
A **Esquema 01** mostra a resolução do (R,S)-mandelato de metila via transesterificação enzimática. Os produtos foram obtidos com alta pureza enantiomérica (ee>99%).<sup>6</sup>



**Esquema 01:** Resolução via acilação do (R,S)-mandelato de metila, catalisada por uma hidrolase, com a obtenção de produtos com alta pureza enantiomérica.

A maior aplicação dos biocatalisadores em síntese assimétrica envolve as suas propriedades enantiosseletivas na resolução cinética. A habilidade das enzimas ou microorganismos para atuarem como catalisadores seletivos em um amplo espectro de reações orgânicas já está bastante documentada. Mas, foi somente durante a década passada que o uso de enzimas foi aceito para a preparação de compostos quirais puros.

A **Esquema 02** mostra a reação de redução biocatalítica da  $\alpha$ -cloroacetofenona, em meio aquoso, onde mais uma vez é comprovada a eficiência deste biocatalisador na obtenção de compostos opticamente puros. O produto opticamente puro (*ee*:90%), pode ainda ser alvo de outras sínteses.<sup>7</sup>



**Esquema 02:** Biorredução da  $\alpha$ -cloroacetofenona obtendo compostos com alta pureza ótica.

Entretanto, em muitos casos, a enantiosseletividade dos biocatalisadores é insatisfatória, e assim numerosas técnicas tem sido desenvolvidas para vencer estas limitações que fazem com que os químicos orgânicos, ainda a relutem em usá-las em seus métodos sintéticos tradicionais.<sup>8</sup> As características de instabilidade em meio orgânico, a faixa limitada de substrato específico e o alto custo, são também considerados problemas para o seu uso como catalisadores sintéticos.<sup>9</sup>

Melhorias na enantiosseletividade foram obtidas por modificações de ambos os reagentes (substrato e biocatalisador) e condições de reação (temperatura, pH, solvente, imobilização). Portanto, a percepção que elas são intrinsecamente limitadas como catalisadores mudou nos últimos cinco anos devido aos novos desenvolvimentos em química e biologia e as novas exigências industriais. Assim, a cada ano que passa observa-se um aumento no interesse pela utilização de biocatalisadores em síntese orgânica.<sup>10 a,b</sup>

### **1.3. Enzimas Isoladas ou Células Inteiras.**

O estado físico do biocatalisador o qual está sendo usado para biotransformações, pode ser muito diverso. A decisão final de quando utilizar, enzimas isoladas mais ou menos purificadas ou microrganismos, ambos na sua forma livre ou imobilizada, depende de alguns fatores como tipo de reação, necessidade ou não de reciclar os cofatores e escala em que será procedida a biotransformação.

Outra forma muito comum de biocatálise é a utilização de microrganismos, os quais apresenta, em sua constituição, uma série de enzimas capazes de conduzir os mais variados tipos de reações. Porque usar células inteiras ao invés da relevante enzima complementar? Esta pergunta origina-se do problema associado com o uso de algumas enzimas, especialmente as intracelulares, isto é as que normalmente funcionam dentro da célula nas quais elas são sintetizadas.

Muitas enzimas potencialmente úteis são relativamente instáveis fora das células nas quais elas normalmente operam; conseqüentemente, tal enzima tem um valor menor como agente para biotransformação se extraída da fonte celular. O fundamento molecular desta instabilidade e concomitante redução da atividade catalítica é a perda da conformação da estrutura protéica da forma ativa desta enzima. Existem várias razões para esta alteração da forma tridimensional nativa da proteína intracelular fora do ambiente celular no qual ela normalmente existe. Um outro fator, é que muitas enzimas intracelulares estão sujeitas ao ataque hidrolítico por outras enzimas, particularmente as proteases que atuam durante os processos de fracionamento de células vivas.<sup>11</sup>

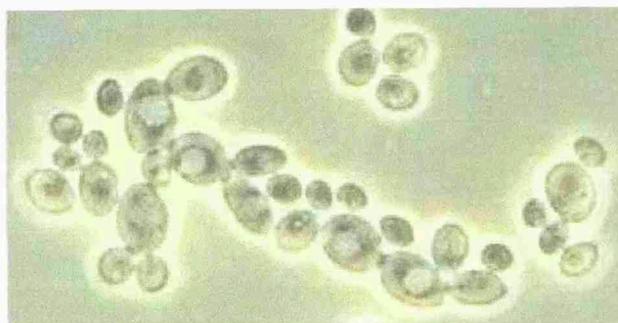
Alguns prós e contras no uso de enzimas ou microorganismos são mostrados na **Tabela 1.**<sup>3</sup>

**Tabela 1:** Enzimas x Microrganismos. Prós e contras.<sup>3</sup>

Biocatalisador	Forma	Prós	Contras
Enzimas Isoladas	Dissolvida em água	Alta atividade enzimática	Possibilidade de reações paralelas, insolubilidade, requer extração
	Suspensa em solvente orgânico	Fáceis de conduzir e extrair, fácil solubilização do substrato, fácil recuperação da enzima	Baixa atividade, algumas classes de enzimas necessitam recidagem de cofator
	Imobilizada	Fácil recuperação da enzima	Possível perda de seletividade durante a imobilização
Microorganismos	Cultura em crescimento	Alta atividade	Alta biomassa, produtos secundários, processo difícil de controlar
	Célula em repouso	Fácil isolamento, menos produtos secundários	Baixa atividade
	Célula imobilizada	Possibilidade de reutilização	Baixa atividade
	Qualquer	Não necessita reciclar cofator	Isolamento trabalhoso, grande volume, baixa produtividade devido à baixa tolerância à concentração, baixa tolerância a solventes orgânicos, reações paralelas

#### 1.4. *Saccharomyces cerevisiae* em Síntese Orgânica

Transformações mediadas por microorganismos são largamente utilizadas desde a antigüidade. Exemplos dessas transformações são a fabricação de pão e de bebidas alcoólicas usando a *Saccharomyces cerevisiae*. A **Figura 01** mostra as células de *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figura 01:** Células de *Saccharomyces cerevisiae*.

A *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, faz dele um alvo de escolha quando se quer realizar reações de oxi-redução. É preferencialmente utilizado, na forma de célula inteira ao invés da enzima isolada; evitando dessa forma, o problema da dificuldade de reciclar o cofator que é necessário quando se usa a enzima pura. As células inteiras apresentam um grande número de atividades enzimáticas. Por isso, o maior problema encontrado neste tipo de biocatálise é a seletividade que pode ser baixa devido à ação simultânea de várias enzimas, e geralmente apresentando diferentes cinéticas e velocidades de conversão para um mesmo substrato.<sup>12</sup> Porém, se o processo não for satisfatoriamente seletivo, modificações simples nas condições experimentais podem influenciar tanto a estereoquímica como a enantiosseletividade.<sup>13</sup> Algumas modificações mais comumente utilizadas são o uso de solventes orgânicos, adição de inibidores ou co-substratos<sup>14, 15</sup> e técnicas de imobilização<sup>16, 17, 18</sup>, entre outras.<sup>19</sup>

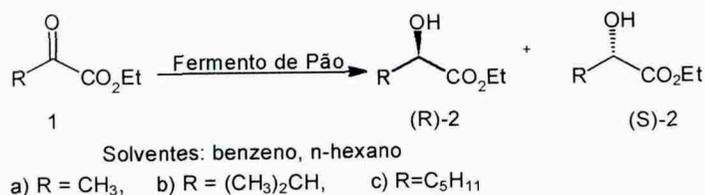
### 1.5. *Saccharomyces cerevisiae* como Biocatalisador em Meio Orgânico

Algumas enzimas hidrolíticas tais como lipases e proteases são conhecidas por reterem sua atividade catalítica em solventes orgânicos. Entretanto, as dehidrogenases e redutases são diferentes das hidrolíticas e requerem quantidades estequiométricas de NAD<sup>+</sup>-coenzima, ou a coenzima no microorganismo tem de ser reproduzida para efetuar a redução catalítica do substrato. Entretanto, a reprodução da coenzima consumida não pode ser mantida em solventes orgânicos porque freqüentemente estes causam sérios danos na membrana da célula hidrofóbica do microorganismo.

O uso de solventes orgânicos é vantajoso devido à solubilidade do substrato orgânico e o impedimento de 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 manter a enzima cataliticamente ativa.<sup>20</sup> O processo para isolar o produto de um meio não aquoso, é muito mais fácil do que aquele utilizado para isolá-lo de um meio aquoso, sendo este mais um grande benefício.<sup>21,22</sup>

O uso de fermento de pão em síntese orgânica envolve reações tais como redução, condensação, ciclização e oxidação. Existem duas dehidrogenases que atuam possivelmente nas reações de redução; a álcool dehidrogenase (que produz o isômero R) e lactato dehidrogenase (que produz o isômero S). Obviamente existem outras enzimas que podem interferir no processo, mas suas concentrações são mais baixas e sua influência no rendimento final é insignificante.<sup>17</sup>

Nakamura e col. realizaram os primeiros estudos de redução de  $\alpha$ -ceto esterres com fermento de pão seco (FPs) em benzeno e hexano, sem estar imobilizado, como mostra a **Esquema 03**.



**Esquema 03:** Redução de  $\alpha$ -ceto esterés, com fermento de pão seco.

Eles observaram que a utilização de gotas de água (0,4 equivalentes; mL H<sub>2</sub>O/g FPS) no sistema é suficiente, mas indispensável, para promover a redução. O excesso de água suprime radicalmente a redução. Os melhores resultados foram obtidos quando uma solução tampão 0,1M AcOH/AcONa, a pH 5 e 0,6-0,8 equivalentes (mL H<sub>2</sub>O/g FPS) foram usados em substituição a água pura. Finalmente, foi constatado que a utilização de solventes orgânicos pode alterar a estereosseletividade nesta reação.<sup>25</sup>

Smallridge e col. em 1994 estenderam as investigações na redução de  $\beta$ -cetoésteres com fermento de pão (seco e refrigerado), em vários solventes polares e não polares. Foi também realizado um estudo do efeito da influência da água na reatividade. Quando éter de petróleo foi utilizado no meio reacional, o consumo completo do material de partida ocorreu com 0,8mL de água por grama de fermento de pão. Um efeito semelhante ocorreu com tolueno, éter dietílico e tetracloreto de carbono, onde foram também adicionadas pequenas quantidades de água destilada (0,2 a 1,2mL/g fermento). Porém, para estes casos não foi verificada a completa redução. Eles observaram, que a reação de redução não ocorreu quando outros solventes como acetona, acetonitrila, clorofórmio, diclorometano, N,N-dimetilformamida, etanol, acetato de etila, etil metil cetona, isobutilmetil cetona e tetraidrofurano foram utilizados, independentes da quantidade de água.<sup>23</sup>

A partir destes resultados é obvio que tanto a natureza do solvente como a razão água/fermento (independente da razão água/solvente), afeta a reação.

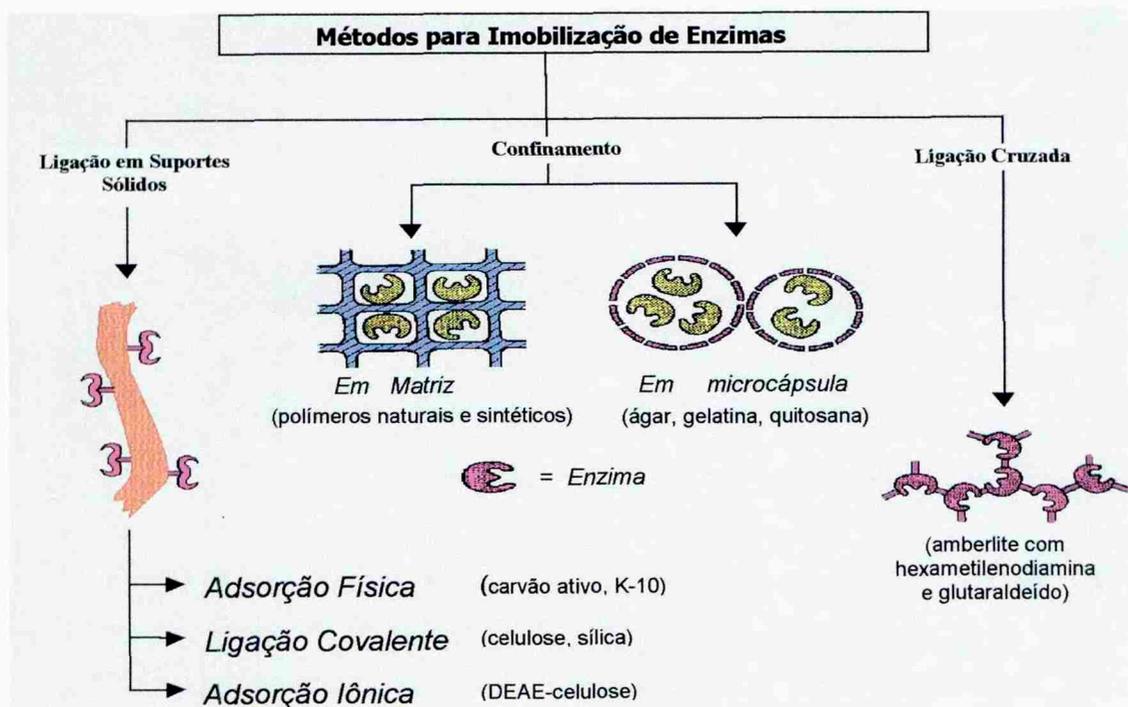
Uma das contribuições mais recentes para o avanço dos estudos de redução mediadas por fermento de pão em meio orgânico, foram realizadas por Smallridge e col.. Eles observaram que a atividade do fermento decresce após 24 horas em solventes orgânicos, e investigaram os fatores associados com esta baixa da atividade<sup>24</sup>. Outro estudo foi o da redução de  $\beta$ -ceto ésteres com substituintes de diferentes tamanhos ligados ao carbono ceto e mostrou que a facilidade de redução está relacionada com o tamanho ou seja, com a proximidade de grupos mais volumosos à carbonila. Finalmente, foi verificado que as  $\beta$ -ceto amidas são consideravelmente menos reativas que os correspondentes  $\beta$ -ceto ésteres.<sup>25</sup> Em outro trabalho, verificou-se a capacidade de redução de grupos metilênicos conjugados para uma cetona, aldeído ou nitrila com um alto grau de estereosseletividade e bons rendimentos.<sup>26</sup>

## 1.6. Biocatalisadores Imobilizados

A imobilização de enzimas e microrganismos fornece uma maneira fácil de recuperá-los e reciclá-los. Os biocatalisadores imobilizados, geralmente são mais estáveis e fáceis de manipular, e mais ajustáveis a um processo contínuo.<sup>11, 22, 27</sup> Vários materiais de diferentes tipos e propriedades têm sido usados com sucesso para aplicações de enzimas em meio orgânico.<sup>28</sup> Cita-se, por exemplo, o carvão, poli-(oxietileno) (PEO), organo gel, crisotila, montmorilonita K-10 (K10) entre outros.

Moran e col. tem estudado a imobilização de fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) em crisotila e sua aplicação na redução enantiosseletiva de compostos carbonílicos tais como azidopropiofenonas, obtendo-se os azido-álcoois syn e anti com bons rendimentos e excessos enantioméricos.<sup>29</sup> Os métodos de imobilização são divididos em três categorias: ligação em suporte, ligação cruzada e confinamento. Dependendo da técnica de

imobilização usada, as propriedades dos biocatalisadores tais como estabilidade, seletividade, valor de  $K_m$  (Constante de Michaelis-Menten), pH e temperatura ótimos, podem ser significativamente alteradas, às vezes para melhor, às vezes para pior (**Figura 02**).<sup>3, 30, 31</sup>

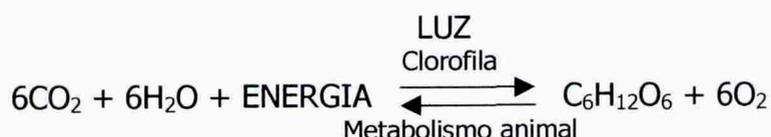


**Figura 02:** Métodos de imobilização de enzimas. (Adap. da referência).<sup>3</sup>

## 1.7. Açúcares

Açúcares, ou carboidratos (ou ainda, sacarídeos), são compostos essenciais a todos os organismos vivos, e são de fato, a classe mais abundante de moléculas biológicas. O nome carboidrato vem literalmente de "carbono hidratado", possuindo fórmula mínima  $(CH_2O)_n$  (sempre com  $n \geq 3$ ). Através da fotossíntese as plantas podem transformar o dióxido de carbono em carboidratos, que são utilizados como fonte de energia em processos biológicos e como material estrutural.<sup>32</sup>

Enquanto as plantas sintetizam os carboidratos a partir de dióxido de carbono e água os animais degradam os carboidratos a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , que pode ser visualizado na **Esquema 04**.<sup>32</sup>

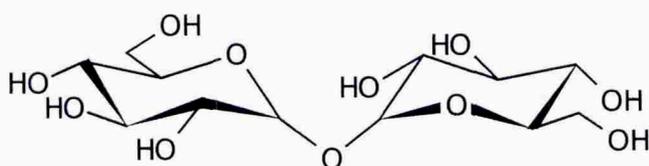


**Esquema 04:** Equação geral da fotossíntese e do metabolismo animal.<sup>32</sup>

Os açúcares de interesse neste trabalho são a trealose e a sacarose.

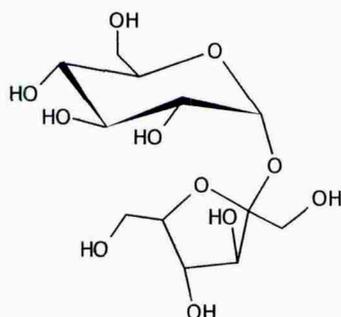
A trealose, um dissacarídeo constituído por duas unidades de glicose. É produzida por uma grande variedade de organismos, e conhecida pela sua capacidade de proteção de organismos. Um exemplo muito utilizado é o emprego de soluções de trealose na conservação de vacinas.<sup>33, 34</sup>

A trealose, ou O- $\alpha$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 1) $\alpha$ -D-glicopiranosídeo é um açúcar não redutor, e sua estrutura é demonstrada na **Figura 03**.



**Figura 03:** Estrutura da trealose.

A sacarose é um dissacarídeo formado por uma unidade de glicose e uma de frutose. É o açúcar mais abundante na natureza. A sacarose, ou 2-O- $\alpha$ -D-glicopiranosil-(1-2)- $\beta$ -D-frutofuranose é um açúcar não redutor e sua estrutura pode ser visualizada na **Figura 04**.



**Figura 04:** Estrutura da sacarose.

Açúcares inibem o desdobramento das estruturas das proteínas durante a etapa de secagem na liofilização porque substituem as pontes de hidrogênio perdidas com a remoção da água.

Anchordoquy e col. estudaram a manutenção da estrutura quaternária estabilizando no estado congelado uma lactato desidrogenase, durante a liofilização. Foi estudada a hibridização e recuperação da atividade catalítica durante o congelamento e o descongelamento utilizando polímeros (dextrana, Ficoll, polietileno-glicol), açúcares (sacarose, trealose e glicose) e surfactantes (Tween 80, Brij 35,  $\beta$ -ciclodextrina hidroxipropila) no processo de liofilização. Os polímeros e principalmente, os açúcares evitaram a dissociação da lactato desidrogenase, durante estas etapas, resultando em uma grande recuperação da atividade da enzima após a liofilização e reidratação.

Estes efeitos benéficos são observados mesmo em sistemas que não formam sólidos vítreos durante o congelamento e descongelamento.<sup>35</sup> Com este exemplo fica claro que o papel principal dos açúcares nas reações em meio orgânico é substituir a água, que é necessária para atividade da enzima.

O crescente interesse pela influência da adição de açúcares, em reações de redução, vem sendo bem documentado na literatura. Açúcares, especialmente a trealose, atuam *in vivo* e *in vitro* como estabilizadores de membranas e proteínas,

protegendo as células de *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão - FP) sob condições adversas.

A trealose é o carboidrato acumulado em maior quantidade e constitui mais 23% do peso da célula desidratada, dependendo das condições de crescimento e do estágio do ciclo de vida.<sup>36, 37, 38</sup>

Altos níveis de trealose em leveduras estão também correlacionados com resistência a condições ambientais adversas tais como desidratação, congelação, e choque por adição de etanol. Foi proposto que a função fundamental da trealose é proteger contra estas condições ambientais adversas, não atuando como uma reserva de carboidrato.<sup>36, 37, 38</sup>

Até o momento nenhum estudo sistemático foi realizado para esclarecer a influência da adição de açúcares em reações de redução por fermento de pão (FP) de cetoésteres e  $\alpha$ -haloacetofenonas em solventes orgânicos.

Moran e col. realizaram estudos da influência da adição de carboidratos em reações de redução de  $\alpha$ -haloacetofenonas com FP em água. Assumiu-se que a presença de sacarídeos nas células de FP pode produzir NADH ou NADPH e conseqüentemente ter poder de redução mesmo sem a necessidade da adição complementar de sacarose.<sup>39</sup>

Em contribuição a estes estudos, neste trabalho foi avaliada a influência da sacarose e a trealose na proteção das células do fermento de pão para sua utilização em meio orgânico. Os biocatalisadores, imobilizados ou não, serão utilizados em reações de redução do acetoacetato de etila e  $\alpha$ -cloroacetofenona.

Este projeto contou com a colaboração dos Professores Boris Stambuk, do Departamento de Bioquímica da UFSC e Paulo J. S. Moran do Instituto de Química da UNICAMP. Deve-se ainda mencionar a participação da doutoranda Sandra Patrícia Zanotto, regularmente matriculada no curso de Pós-Graduação do Departamento de Química da UFSC.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Investigar a influência da adição de trealose e sacarose em reações de redução, mediadas por fermento de pão, do acetoacetato de etila e da  $\alpha$ -cloroacetofenona.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 1- Avaliar sistemas de proteção da célula do fermento de pão (FP/K10/G/S e FP/K10/G/T) e comparar com os sistemas não imobilizados (FP/S e FP/T). Estes complementam os estudos já realizados por nosso Grupo de Pesquisa com relação a metodologias para a proteção das células de *Saccharomyces cerevisiae* do meio reacional.<sup>40</sup>
- 2- Investigar a influência dos açúcares na proteção da célula de *Saccharomyces cerevisiae* da toxicidade do solvente orgânico.
- 3- Comparar os valores de %c e ee obtidos nas reações com sacarose e trealose, para avaliar a eficiência da proteção dos diferentes açúcares.
- 4- Obter compostos com alta pureza ótica com células de *Saccharomyces cerevisiae*, sob condições suaves de reação.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Equipamentos

Os espectros RMN 1H foram obtidos em um espectrômetro da Brucker AC 200 MHz, utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente e TMS como referência interna.

As determinações dos excessos enantioméricos foram realizadas no Cromatógrafo Gasoso da Shimadzu, GC-14B, com a coluna quiral (CHROMPACK, 25m x 0,25mm, revestida: chirasil - DEX CB DF=0,25).

A **Tabela 02** apresenta as programações aplicadas na identificação dos produtos racêmicos de redução do acetoacetato de etila e da  $\alpha$ -cloroacetofenona, com os diversos sistemas utilizados.

**Tabela 02:** Condições de programação do Cromatógrafo Gasoso (14B).

Parâmetros	Condições
Temperatura Inicial	90°C
Temperatura final	150°C
Taxa de aquecimento	3°C/ min.
Tempo final	40 min.
Injetor: split, 200:1	250°C
Detector: FID	275°C
Pressão do gás carreador ( $\text{H}_2$ )	75kPa
Fluxo do gás carreador	32cm/s
Volume da amostra	1 $\mu\text{L}$

### 3.2. Reagentes

O Fermento de pão (FP), biológico, instantâneo e seco (*Saccharomyces cerevisiae*, fabricado na Bélgica por N.V. Algist – Bruggeman S.A EMULZINT – LTDA), foi utilizado como biocatalisador. As células foram imobilizadas em montmorillonita K10 (K10) (Fulka) e revestidas com gel de gelatina (G) (SIGMA, G2500, Tipo A). O acetoacetato de etila e a  $\alpha$ -cloroacetofenona (Carlo Erba) foram utilizados sem purificação. Os produtos racêmicos utilizados como padrão para CG quiral: o (+)-3-hidroxi-butanoato de etila e o (+)-2-cloro-1-feniletanol foram obtidos através da reação de redução com  $\text{NaBH}_4$  (Aldrich Chemical Co.).<sup>41</sup> O hexano (Grupo Química) foi utilizado sem purificação.

### 3.3. Procedimento Geral para a Adsorção e Recobrimento do Fermento de Pão

Preparou-se uma suspensão com 2,0 g de FP belga seco e 6,0 g de montmorillonita K10, em aproximadamente 100 mL de água. Deixou-se sobre agitação magnética vigorosa por uma noite, a temperatura ambiente. Em seguida, filtrou-se a vácuo e secou sob corrente de ar. Após a mistura de FP/K10 estar aparentemente seca, esta foi triturada em um gral até obter-se partículas finas para facilitar o recobrimento com gelatina. Uma solução de 0,5 g de gelatina em 5,0 mL de água foi aquecida até 50°C, e a seguir, deixou-se esfriar até  $\pm 30^\circ\text{C}$ , para adicionar a mistura FP/K10. A mistura de FP/K10/G foi seca sob corrente de ar e triturada.

### **3.4. Procedimento Geral da Reação de Redução do Acetoacetato de Etila**

As reações de redução do acetoacetato de etila e  $\alpha$ -cloroacetofenona foram estudadas por Nascimento e col.<sup>40</sup>, utilizando FP livre e FP imobilizado em K10. As melhores quantidades e condições foram utilizadas neste trabalho como referência.

Em um erlenmeyer colocou-se 100 mL de hexano e sob agitação magnética adicionou-se o biocatalisador(FP/K10/G ou FP). Foi gotejada lentamente sob agitação magnética vigorosa 1,6mL de uma solução de sacarose(S) ou de trealose(T) 10%. Em seguida adicionou-se de 0,2 mL (1,57 mmoles) de acetoacetato de etila e a mistura reacional foi agitada em um banho termostatizado tipo-Dubnoff a 20 °C.

### **3.5. Procedimento para Reutilização do Biocatalisador.**

Após o término de cada reação, a reutilização dos dois sistemas foi testada após a filtragem a vácuo do sobrenadante e a lavagem do suporte com hexano (3 x 30,0 mL) sob agitação magnética. Adicionou-se então, novamente 0,2 g (1,57 mmoles) de acetoacetato de etila e 50 mL de hexano. Mesmo não sendo o solvente ideal para extração, devido sua polaridade, ele garante uma preservação da célula para os estudos de reutilização. Como foi padronizada a metodologia para todos os sistemas, o erro ocorrido por não extrair todos os reagentes e produtos dos suportes, foi sistemático não influenciado na análise dos resultados.

### **3.6. Procedimento Geral para a Reação de Redução da $\alpha$ -Cloroacetofenona.**

Utilizaram-se as metodologias de adsorção e recobrimento já descritas (item 3.3.). Os sistemas foram utilizados em reações de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona

em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas) à temperatura 20°C. As estereosseletividades foram avaliadas nestas condições. Para cada sistema (FP/K10/G e FP), foram adicionados 50 mL de hexano e estes submetidos a agitação magnética. Foram adicionadas lentamente e com agitação magnética vigorosa, 3,2 mL de uma solução de sacarose (S) ou trealose (T) a cada um dos sistemas. Sob agitação tipo Dubnoff à 20°C, foram adicionados 0,2 g (1,3 mmoles) de  $\alpha$ -cloroacetofenona. Após 24, 48 e 72 horas 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  $\alpha$ -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.

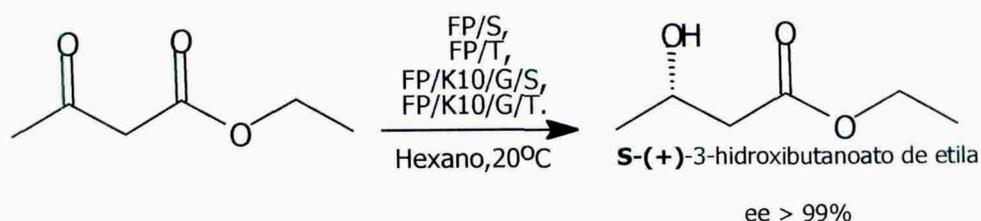
### **3.7. Procedimento Geral para a Preparação dos Padrões Racêmicos.**

Dissolveu de 1 mmol do reagente (acetoacetato de etila ou  $\alpha$ -cloroacetofenona) em metanol. Sob banho de gelo, adicionou-se 0,04g de NaBH<sub>4</sub> e agitou-se por 30 minutos. A seguir, adicionou 5mL de uma solução de NaCl saturada, e extraiu a solução com éter etílico. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente evaporado em um rotaevaporador. As reações foram acompanhadas por ccd (15% acetona/85% hexano) e cromatografia gasosa.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão discutidos separadamente, analisando a influência dos açúcares em cada um dos substratos utilizados com os diferentes sistemas de imobilização.

### 4.1. Influência da Adição de Açúcares na Reação de Redução do Acetoacetato de Etila por Fermento de Pão (FP).



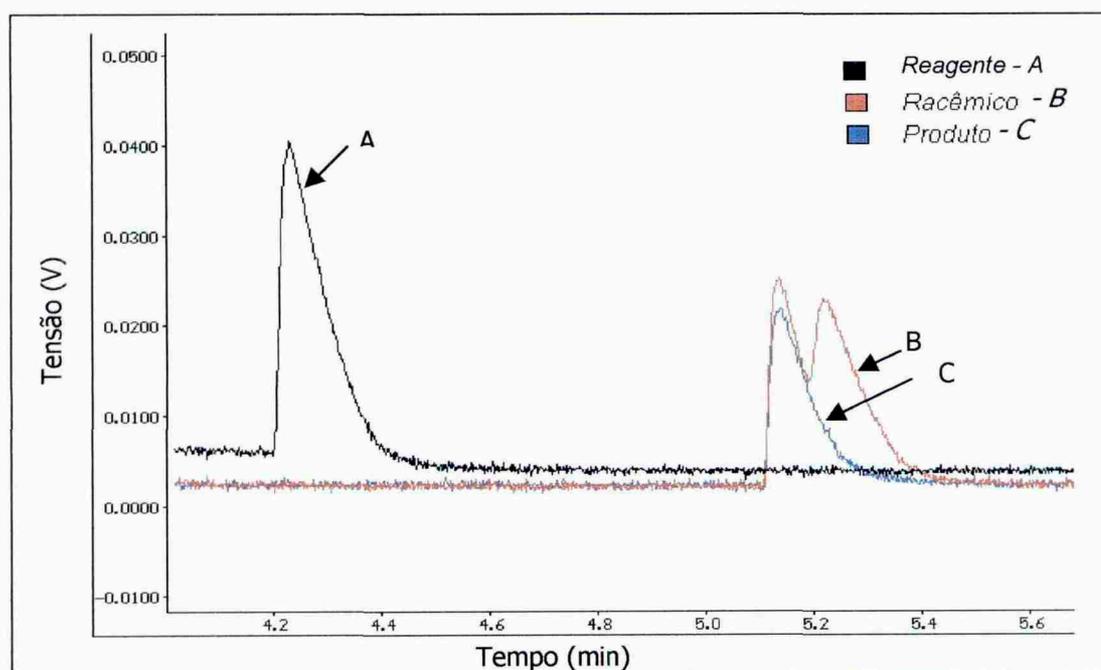
**Esquema 05:** Reação de redução enantioselectiva do acetoacetato de etila, com diferentes sistemas.

As reações de redução biocatalítica do acetoacetato de etila foram acompanhadas com retirada de alíquotas em intervalos de 24 horas, e em paralelo foram realizados os ensaios de reutilização. Nestes ensaios de reutilização, o tempo de reação foi de 24 horas, e a seguir adicionou-se ao sistema as mesmas quantidades de solvente e substrato, para avaliar sua eficiência.

Os resultados de conversão (c - %) e excessos enantioméricos (ee - %) (obtidos a partir da razão das áreas entre substrato e produto nos cromatogramas) para a redução do acetoacetato de etila foram os mesmos para os vários sistemas utilizados. O álcool (S)-(+)-3-hidroxibutanoato de etila sempre foi obtido com conversão e ee >99%.

Postula-se com estes resultados que a sacarose pode atuar como fonte de carbono e/ou proteção adicional para as células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para todos os sistemas utilizados, apenas um dos picos dos enantiômeros foi detectado, como mostra a **Figura 05**.



**Figura 05:** Cromatograma da reação de redução biocatalítica do acetoacetato de etila (A) sobreposto com o produto racêmico obtido via-química (B) e o produto de reação (C) (FP/S-20°C, 24h).

As condições pre-estabelecidas cromatográficas para a separação dos enantiômeros e as medidas de rotação ótica ( $[\alpha]_D^T$ ), demonstrados na **Tabela 03**, indicaram a formação do (S)-(+)-3-hidroxibutanoato de etila puro de acordo com a literatura.<sup>42, 43, 44</sup>

**Tabela 03:**  $[\alpha]_D^T$  para o (S)-(+)-3-hidroxibutanoato de etila em clorofórmio.

$[\alpha]_D^T$ Experimental	$[\alpha]_D^T$ Lit. <sup>44</sup>
+41,8	+43

A determinação da configuração do isômero formado foi feita por RMN  $^1\text{H}$ . De acordo com a literatura, postula-se que a enzima desidrogenase que está atuando para esta reação é uma lactato desidrogenase, e produz o isômero S. <sup>14</sup>

A reutilização dos suportes foi avaliada até quatro vezes. Observou-se que para todos os sistemas, após a primeira reutilização, a eficiência diminui bastante, como é mostrado na **Tabela 04**.

**Tabela 04:** Porcentagem de conversão para reação de redução do acetoacetato de etila em (S)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila, em sucessivas reutilizações dos sistemas.

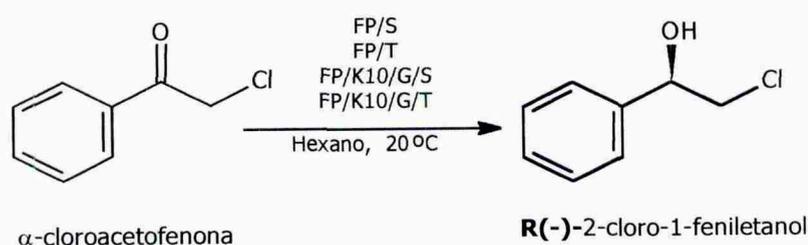
Sistemas	CONVERSÃO (%)				
	Número de Reutilizações dos Sistemas				
	0	1	2	3	4
FP/K10/G/S	100	60	37	22	19
FP/K10/G/T	100	63	40	25	20
FP/S	100	65	26	7	2
FP/T	100	49	58	8	0

\* Para todos os sistemas utilizados, e independente do número de reutilizações, os ee foram sempre >99%.

Quando se analisa os resultados da **Tabela 04**, pode-se constatar que o papel principal da sacarose é como agente protetor exatamente da mesma forma que a trealose. No entanto, observa-se que independente do açúcar e/ou método de imobilização, ocorre uma diminuição na conversão do acetoacetato de etila no correspondente (S)-(+)-álcool, após a primeira reutilização. É evidente que a

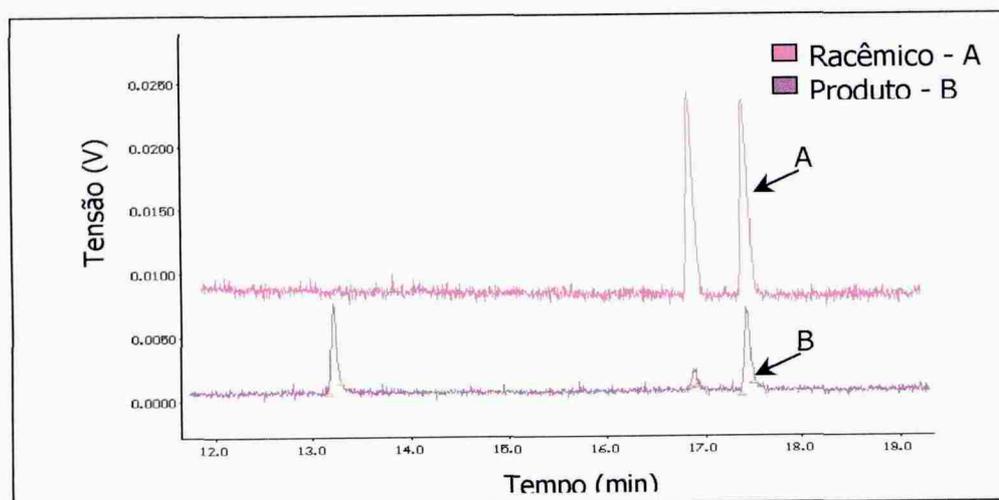
imobilização do fermento de pão em K-10, revestido com gelatina resulta em uma maior estabilidade do biocatalisador, refletida nos valores de conversão. Após a imobilização também há uma maior proteção das células da toxicidade do solvente orgânico.

#### 4.2. Influência da Adição de Açúcares na Reação de Redução da $\alpha$ -Cloroacetofenona por Fermento de Pão (FP).



#### Esquema 06: Reação de redução enantiosseletiva da $\alpha$ -cloroacetofenona.

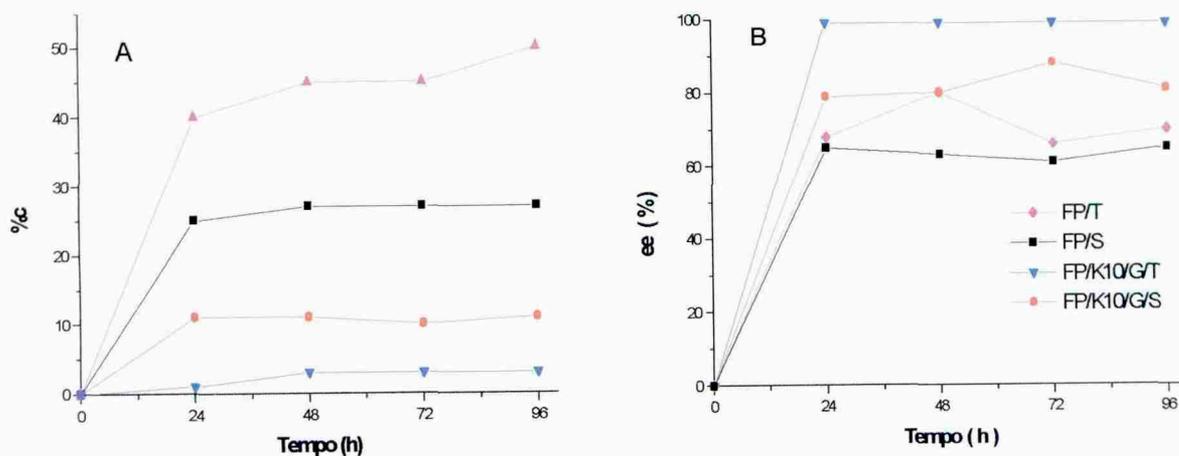
As reações de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona foram acompanhadas por retiradas de alíquotas em intervalos de 24 h. Observa-se que para esta reação o sistema FP/K10/G/T foi um eficiente para a proteção do FP, sendo que os produtos foram obtidos com altos valores de ee. No entanto, com este sistema foram obtidos baixos valores de %conversão, mesmo após 192 horas de reação. Com o sistema de FP/T os resultados foram mais satisfatórios para a redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona. Em 48 horas de reação obteve-se o produto com ee de 80% e a %c de 45%, como mostra a **Figura 06**.



**Figura 06:** Cromatograma da reação de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona(B) sobreposto com o produto racêmico via-química(A). (FP/T-20°C,48h).

Na redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona, estes valores variaram dependendo das condições experimentais e do sistema de proteção das células de FP como mostra a **Figura 07**.

O efeito de proteção da trealose no sistema catalítico é evidenciado nos resultados apresentados. O sistema FP/T foi o que apresentou a maior conversão em R-(-)-2-cloro-1-feniletanol. No caso da sacarose os resultados obtidos para o sistema FP/S foram menores do que os obtidos com FP/T.



**Figura 07:** Variação da % de conversão (A) e variação da % de ee (B) em função do tempo de reação para a redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona em diferentes sistemas, à 20°C.

Para sistema FP/K10/G/T as porcentagens de conversão foram menores, mas os valores de ee sempre foram maiores que 99%, levando a formação do produto com alta pureza óptica. A conversão foi baixa para os sistemas FP/K10/G/S e FP/K10/G/T provavelmente devido ao fenômeno de difusão. As células mais protegidas após imobilização, dificultam a entrada do substrato e saída do produto. Essa proteção é muito importante para a célula, pois assim aumenta sua estabilidade em meio orgânico, e a enantiosseletividade é maior.

De acordo com a literatura, postula-se que a enzima desidrogenase que está atuando para esta reação é uma álcool desidrogenase e produz o isômero R.<sup>14</sup>

## 5. CONCLUSÕES

Através da utilização de fermento de pão, para a obtenção de compostos opticamente ativos, pode-se concluir que:

- Quando se analisam os resultados da redução do acetoacetato de etila, pode-se constatar que o papel principal da sacarose é como agente protetor exatamente da mesma forma como a água e a trealose.
- A partir da segunda reutilização, o papel dos açúcares como fonte de carbono é observado pois neste caso o FP já utilizou suas reservas de carboidratos, necessitando assim de um suplemento para que a reação continue ocorrendo. É preciso considerar que o solvente orgânico é tóxico para as células de FP.
- Os valores de conversão e o ee para a redução do acetoacetato de etila foram os mesmos para os vários sistemas utilizados, obtendo-se o álcool (*S*)-(+)-3-hidroxi-butanoato de etila sempre com conversão e ee >99%. Para todos os sistemas, apenas um dos picos dos enantiômeros foi detectado por CG-quiral.
- As células mais protegidas pela imobilização e a presença da trealose dificultam a entrada do substrato, diminuindo assim a porcentagem de conversão. Esta proteção é muito importante para a célula, pois aumenta sua estabilidade em meio orgânico, e a enantiosseletividade é maior.

- Na reação de redução da  $\alpha$ -cloroacetofenona, o sistema FP/T foi o que apresentou a maior conversão em R-(-)-2-cloro-1-fenil-etanol. Usando a sacarose os resultados obtidos em termos de %c e ee para o sistema FP/S foram menores do que os obtidos com FP/T.
- No sistema FP/K10/G/S a porcentagem de conversão foi superior à obtida com FP/K10/G/T, mas o ee foi inferior ao obtido no mesmo sistema catalítico contendo trealose. Este resultado evidencia que a trealose protege as células de FP, conforme já discutido anteriormente.

## 6. PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DO TRABALHO

- Crescer as células de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* em meio rico de lactato de potássio. Assim, espera-se que a lactato desidrogenase esteja presente em maior concentração, e que isômeros S sejam obtidos com alta pureza;
- Estudar a eficiência do biocatalisador imobilizado ou não para outros compostos carbonílicos;
- Estudar o efeito da temperatura e do solvente na eficiência do biocatalisador;
- Obter o álcool opticamente puro, reduzindo quimicamente uma cetona pró-quiral seguida de resolução biocatalítica com lipases.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bon, Elba P. S.; Pereira Jr., Nei.; Tecnologia Enzimática, **1999**, Rio de Janeiro: Fundação Biblioteca Nacional, p.113
2. Castro, H. F. de; Anderson, W. A.; Química Nova, **1995**, v. 18, n. 6, p. 544-554.
3. Faber, K.; Biotransformations in Organic Chemistry, **1997**, 3<sup>rd</sup> Edition; Springer-Verlag; New York.
4. Rotthaus, D. K.; Demuth, M. ; Scaffner, K.; Tetrahedron **1997**, v.53 , p.935.
5. Hudlicky, T.; Gonzalez, D.; Gibson, D. T.; Aldrichimica Acta **1999**, v.32 , p.35.
6. Queiroz,N.; Nascimento,M.; Tetrahedron: Letters **2002**, v.43 , p.5225-5227.
7. Brenelli, E. C. S.; Carvalho, M.; Okubo, M. T.; Marques, M.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; Sorrilha, A. E. P. M.; Indian Journal of Chemistry.,**1992**, v. 31B, p. 821-823,.
8. Chen, Ching-Shih; Sih, Charles J.; Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **1989**, v. 28, p. 695-707,.
9. Klibanov, A. M.; Acc. Chem. Res. ,**1990**, v.23, p. 114,.
10. a) Roberts, S. M.; J. Chem. Soc. Perkin Trans 1, **1999**, p. 1-21.  
b) Roberts, S. M.; *Biocatalysis for Fine Chemical Synthesis*, John Wiley & Sons Ltd. **1999**, Cap. 1(10,11).
11. Roberts, S. M.; Turner, N. J.; Willetts, J.; Turner, M. K. *Introduction to Biocatalysis using Enzymes and Micro-organisms*. New York: Cambridge University Press,**1995**, p. 195.
12. D´Arrigo, P.; Fantoni, G. P. ; Servi, S.; Strinti, A.; Tetrahedron: Asymmetry, **1997**, 8, 2375.
13. Hayakawa, R.; Nozawa, K.; Shimizu, M. ; Fujisawa, T.; Tetraedron Letters, **1998**,v.39, p.67.
14. Pereira, R. S.; Critical Reviews in Biotechnology, **1998**,v.18, p.25.
15. Dahl, A. C. ; Madsen, J. O. ; Tetrahedron: Assymetry, **1998**, v.6, p.4395.
16. Bekatorou, A.; Koutinas, A. A.; Kaliafas, A.; Kanellaki, M.; Process Biochemistry, **2001**, 36, 549.
17. Grunwald, P.; Biochemical Education, **2000**, 28, 96.

- 
18. Narvátil, M.; Sturdik, E.; *Biologia*, **1999**, 54, 635.
  19. Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A.; *Chem. Rev.*, **1992**, 92, 1071.
  20. Rotthaus, D. K.; Demuth, M.; Scaffner, K.; *Tetrahedron*, **1997**, 53, 935.
  21. Nakamura, K.; Kondo, S.; Kawai, Y.; Ohno, A.; *Tetrahedron Letters*, **1991**, 32, 7075.
  22. León, R.; Fernandes, P.; Pinheiro, H. M.; Cabral, J. M.; *Enzyme and Microbial Technology*, **1998**, 23, 483.
  23. Jayasinghe, L. Y.; Kodituwakku, D.; Smallridge, A. J.; Trehella, M. A.; *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1994**, 67, 2528.
  24. Medson, C.; Smallridge, A. J.; Trehella, M. A.; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, 11, 897.
  25. Athanasiou, N.; Smallridge, A. J.; Trehella, M. A.; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, 11, 893.
  26. Dumanski, P. G.; Florey, P.; Knetting, M.; Smallridge, A. J.; Trehella, M. A.; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, 11, 905.
  27. Othmer, K., *Encyclopedia of Chemical Technol*, **1980**, 3<sup>rd</sup> ed. Vol. 9. New York: New York: John Wiley & Sons.
  28. Villeneuve, P., Muderhwa, J. M., Graille, J. Haas, M., *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, **2000**, v. 9, p. 113-148.
  29. Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R.; Joekes, I.; Brenelli, E. C. S.; Leite, R. A.; *Biocatalysis*, **1994**, v. 9, p. 321-328.
  30. Wu, Y.X., Jaaskelainen, S., Linko, Y.; *Enzyme Microbiol. Technol.*, **1996**, 19: p. 223-226.
  31. Costa, V.E.U., Amorim, H. L. N., *Química Nova*, **1999**, 22: p. 863-873.
  32. Voet, Donald; Voet, Judith G. *Biochemistry*. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, **1995**, p. 251 e 627.
  33. Moynihan, J. S.; Blair, J.; Coombes, A.; D'Mello, F.; Howard, C.R.; *Vaccine*, **2002**, v. 20, 3, p. 1870-1876.
  34. Arya, S. C.; *Vaccine*, **2000**, v.19, 4-5, p. 595-597.

- 
35. Anchordoquy, T. J.; Izutsu, K-I.; Randolph, T. W. ; Carpenter J. F.; *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2001**, v. 390, 1, p. 35-41.
  36. Majara, M., O'Conno-Cox, E.S.C., e Axcell, B.C.; *Am. Soc. Brew. Chem.*, 54 (4): 221-227, **1996**
  37. Fujii, S., Obuchi, K., Iwahashi, H., Fujii, T., and Komatsu, Y.; *Biosci. Biotech. Biochem*, 60 (3): 476-478, **1996**.
  38. Sano, F., Asakawa, N., Inoue, Y., and Sakurai, M., *Cryobiology*, 39, 80-87, **1999**.
  39. Carvalho, M., Okamoto, M.T., Moran, P.J.S., Rodrigues, A.R., 47 (12/13): 2073-2080, **1991**.
  40. Nascimento, M.G.; Zanotto, S.P.; Melegari, S.P., Moran, P.J.S.; *Química Nova*, **2002**, v. 25, n. 4, p.567-571.
  41. Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Rogers, V.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R.; *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, fourth Edition; Longman Group Limited; New York, **1978**; p 353.
  42. D'Arrigo, P.; Fantoni, G. P.; Servi, S.; Strinti, A.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 2375.
  43. Wendhausen, R. Jr.; Moran, P. J. S. ; Joekes, I. ; Rodrigues, J. A. R.; *J. Mol. Cat. B: Enz.* **1998**, 5, 69.
  44. Catalog of Organic and Fine Chemicals, *Acrós Organic*, **2002/2003**, Fisher Scientific, p. 1008.