

FERMENTO BIOLÓGICO DE PADARIA (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*) E SEU USO EM SÍNTESES ASSIMÉTRICAS

Ricardo de Souza Pereira

Instituto de Química - Laboratório de Química Biológica - Universidade Estadual de Campinas - CP 6154 - 13084-970 - Campinas - SP

Recebido em 16/11/94; aceito em 2/2/95

This review gives a general idea about the importance of chiral carbon in medicine and a way to obtain chiral building blocks with baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for synthesis of medicaments and other organic compounds. Reactions with these microorganisms are cheaper and easier to be executed than with chemicals. Examples of important and practical reactions catalyzed by enzymes inside *Saccharomyces cerevisiae* are given and probable mechanisms of these enzymes are shown. Although these microbes have advantages such as low cost and availability, there are some cares that are necessary to be taken, like NAD(P)H dosage to choose strains more adequate for reduction reactions.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; biotransformation; asymmetric synthesis; baker's yeast.

INTRODUÇÃO

Importância da Quiralidade

Há cerca de 500 anos, o mecanismo de atuação de substâncias químicas no organismo vivo era totalmente desconhecido. A introdução de tais compostos químicos era feita na alimentação, na terapia de doenças ou acidentalmente.

Com o passar dos séculos e o advento da ciência moderna, o homem começou a purificar e identificar os compostos químicos que realmente faziam efeito no organismo.

Atualmente sabe-se que a interação substância química-organismo vivo é um processo biológico que envolve a interação substrato-sítio receptor. Para se sentir sabor e cheiro é necessário que ocorra esta interação¹. Para o último é obrigatoriamente necessário que a substância tenha um certo grau de volatilidade, para que na forma gasosa possa encontrar receptores que estimulem nosso olfato.

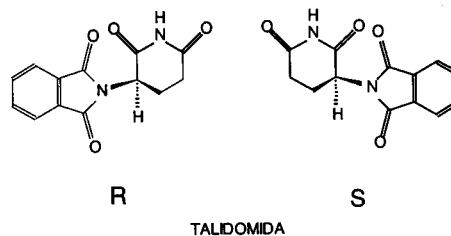
Apesar da quiralidade ser conhecida desde o século passado, quando Louis Pasteur olhando ao microscópio óptico separou mecanicamente cristais com formas isoméricas de ácido láctico², somente há poucos anos tem-se notado a sua imensa importância em termos de interação com materiais biológicos. Uma grande descoberta feita recentemente nesta área é a indução de câncer por partículas de pó de quartzo assimétrico. A incidência de tumor foi mais significativa pelo "l" do que pelo "d", existindo a evidência que a resposta biológica a cristais sólidos enantiomorfos pode diferir³. Diante desta informação, pode-se concluir que deva existir receptores específicos nas membranas das células (ou em organelas no seu interior) que são ativadas (ou sensibilizadas) pela atuação dos cristais de uma determinada conformação, levando à transmissão de mensagens errôneas e ao aparecimento do tumor³.

São muitos os exemplos de fármacos quirais que, enquanto um dos estereoisômeros é ativo farmacologicamente, o outro é inativo ou mesmo prejudicial ao organismo humano. O exemplo mais clássico é o da talidomida que foi a primeira droga quiral em que estas propriedades foram descobertas. Um dos enantiômeros causa defeitos de má formação do feto, enquanto o outro não. Esta droga foi desenvolvida pela **Chimie Grünenthal** de Aachen, na Alemanha, em meados dos anos cinquenta, como um sedativo para prevenir náusea durante a gravidez⁴.

Em 1961, descobriu-se que o composto produzia anormalidades

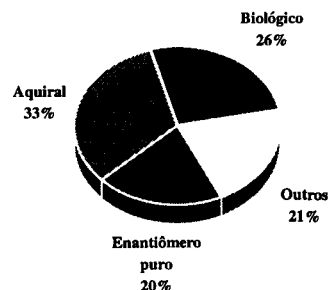
nos membros dos fetos, chamada de focomelia, quando tomada nos três primeiros meses de gravidez. A maioria dos países retirou a talidomida do mercado⁴.

Mas em 1979, pesquisadores da Universidade de Bonn, Alemanha, separaram os dois isômeros da talidomida e relataram que o enantiômero (S)-(-) é teratogênico em ratos e a forma (R)-(+) não causa nenhum problema.

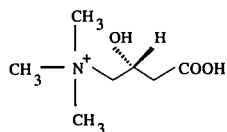


Este relato não é apenas um esforço da indústria farmacêutica para vender um sedativo, pois foi descoberto que esta droga também inibe replicação do vírus da AIDS⁴. Porém em 1984, cientistas da Universidade de Münster, Alemanha, descobriram que cada enantiômero racemiza em pH fisiológico em tubos de ensaio ou em ratos injetados com a droga. Estas descobertas sugerem que ambos os enantiômeros da talidomida podem ser teratogênicos em humanos porque podem racemizar no interior do corpo humano⁴.

Nos Estados Unidos, cerca de 20% das drogas comercializadas estão na forma de um enantiômero puro⁴, fato que não é observado no Brasil com frequência:

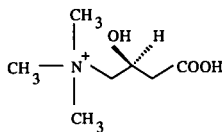


Abaixo foram colocados outros dois exemplos de fármacos que são vendidos na forma racêmica:

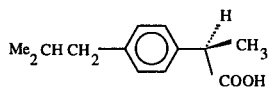


L - (R) - CARNITINA
(USADA NAS DESORDENS MUSCULARES E DOENÇAS DO CORAÇÃO)

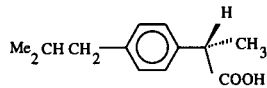
NOMES COMERCIAIS:
L - CARNITINA (LABOTANICK DO BRASIL)
ENZIVITAL (FARMASA)
NUTRIMAIZ (BIOLAB)
APETIBÊ (LUPER)



D - (S) - CARNITINA
(TÓXICA)



R (-) IBUPROFENO
(INATIVO)

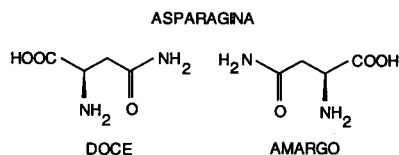


S (+) IBUPROFENO
(ANTI-INFLAMATÓRIO)

NOMES COMERCIAIS:
MOTRIN (RHODIA)
ARTRIL (FARMASA)
IBUPROFENO (UNIÃO QUÍMICA)
PARARTRIN (CAZIL)

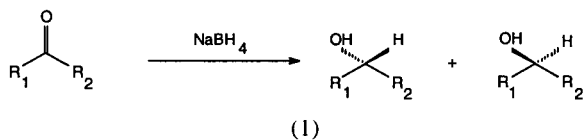
No caso da carnitina é necessário ter sempre um estereoisômero puro.

Outro exemplo interessante é o da alteração de sabor quando uma substância apresenta quiralidade, conforme ilustrado^{7, 8}:



Sínteses Assimétricas

A redução de uma carbonila pró-quiral por boriidreto de sódio, produz uma mistura racêmica de alcoóis quirais. Isto é visto na equação abaixo⁶:



onde R₁ é diferente de R₂. É freqüente produzir uma mistura racêmica e então separar os enantiômeros por métodos físicos⁹. Por exemplo, membranas líquidas contendo éteres coroa quirais têm resolvido enantiômeros de DL-fenilglicina¹⁰. Entretanto, aplicações industriais desta tecnologia têm sido limitadas devido ao longo tempo gasto⁹.

Outra grande área em desenvolvimento para produção de fármacos quirais puros é a separação da mistura racêmica por métodos de cromatografia líquida⁴. A desvantagem está na perda econômica do processo, ou seja, 50% de material é perdido (isômero indesejável). Uma alternativa é, se não for achado outro uso para este enantiômero indesejável, racemizá-lo e tentar reciclá-lo para poder diminuir a perda econômica⁴. Outro problema que desfavorece o uso de métodos cromatográficos é a grande quantidade de solvente usada, o que também

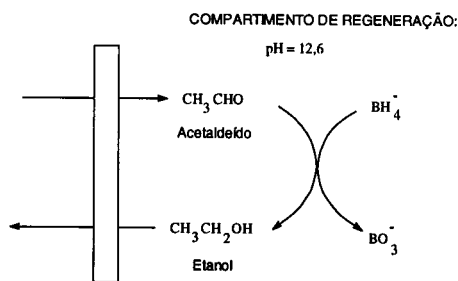
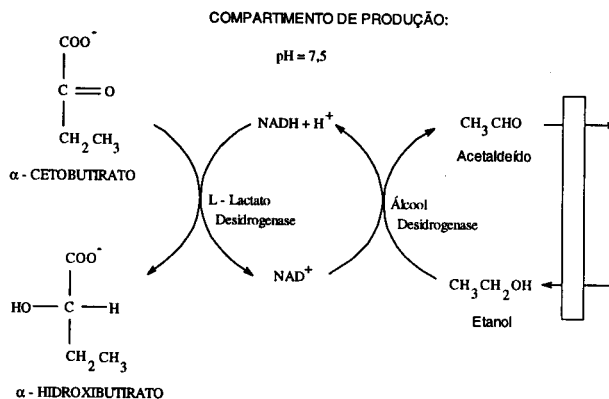
inviabiliza economicamente o processo de grande escala⁴.

Existem alguns catalisadores químicos modernos, especialmente compostos organometálicos, que são usados em sínteses assimétricas. Neste caso, eles produzem apenas um estereoisômero, ou seja, a reação tem um alto excesso enantiomérico, porém está limitada pelo alto custo e pela sua grande ação empírica^{11, 12}.

Além dos organometálicos, existem outros catalisadores altamente estereoespecíficos: são as enzimas, que hoje estão despondando como uma solução para sínteses assimétricas.

Na maioria das vezes, o preço destes biocatalisadores também é alto, porém o seu uso na forma imobilizada torna possível a sua reutilização e facilita a separação do produto. Isto torna viável o seu uso a nível industrial.

As enzimas da classe das desidrogenases é que substituem o boriidreto de sódio (NaBH₄) na reação da equação 1. Para tal, elas requerem como cofator NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo - forma reduzida) ou NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma reduzida), que têm um alto custo (5mg = US\$ 29,90). Para contornar este problema, empresas americanas de química fina, que produzem síntons quirais para a indústria farmacêutica, têm conseguido reciclar estes cofatores de maneira barata e simples como é visto no esquema 1⁵. Neste caso, o sínton produzido é o α - hidróxi - butirato, reduzido a partir do α - cetobutirato pela enzima L - lactato desidrogenase, que o faz oxidando uma molécula de NADH. A reciclagem deste último é feita através da álcool desidrogenase tipo II, a partir da oxidação de etanol que é convertido a acetaldeído. Este acetaldeído atravessa a membrana e passa para o "compartimento de regeneração" onde é reduzido novamente a etanol por boriidreto⁴. Se ele não fosse reciclado desta maneira, a fabricação deste sínton seria economicamente inviável. O reator tem que ser estéril, ou seja, livre de microorganismos oportunistas que podem degradar estas enzimas, pois na verdade elas são proteínas e como consequência uma boa fonte de alimento para estes microorganismos invasores.



Esquema 1

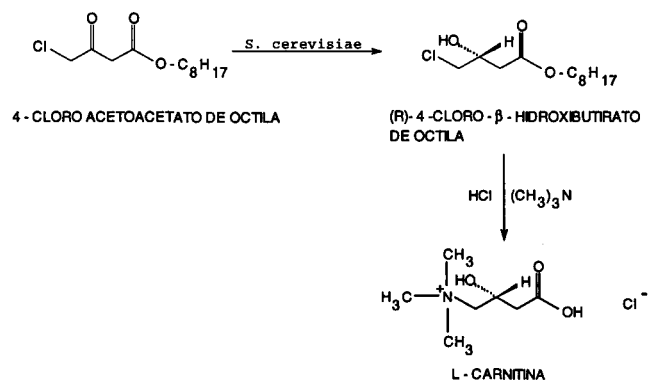
Uma alternativa eficaz e barata aos catalisadores anteriormente citados é o fermento biológico de padaria, que é um microorganismo vivo cujo nome científico é *Saccharomyces cerevisiae* e que teve seu uso intensificado em sínteses assimétricas nos últimos anos¹³⁻¹⁵. Fica entendido aqui que não é o uso das enzimas isoladas deste microorganismo que são usadas, mas ele *in natura* como é usado para fazer bolos, pães, etc. O uso de microorganismos vivos íntegros, para catalisar reações (na verdade são as enzimas no seu interior que fazem isto) em química orgânica, é denominado biotransformação¹⁶. Este conceito ainda abrange o uso de outros materiais biológicos: RNA¹⁷, anticorpos¹⁸⁻²⁰ ou enzimas isoladas¹⁶, porém estes são caros e difíceis para o químico orgânico trabalhar, pois requerem um bom conhecimento de imunologia e/ou bioquímica. Mais adiante serão consideradas as vantagens e limitações do uso de fermento biológico de padaria em sínteses assimétricas.

O fermento biológico de padaria consegue catalisar vários tipos de reações: redução⁶, condensação²¹, ciclização^{22, 23}, oxidação^{24, 25}, sendo que somente a última não produz carbono quiral. Cada uma das reações será exemplificada a seguir e com os respectivos mecanismos das enzimas que as catalisam.

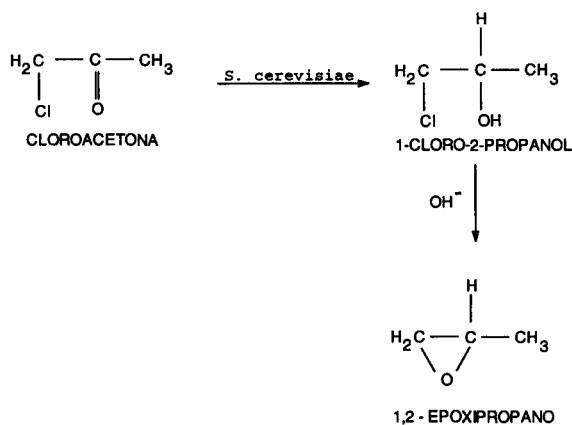
a. Reações de Redução

a.1 Redução de carbonilas^{6, 26, 27}

Síntese de L-carnitina:

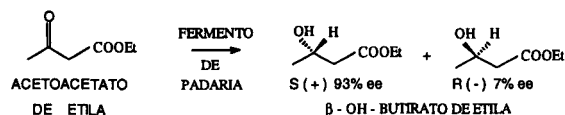


Síntese de epoxipropano:

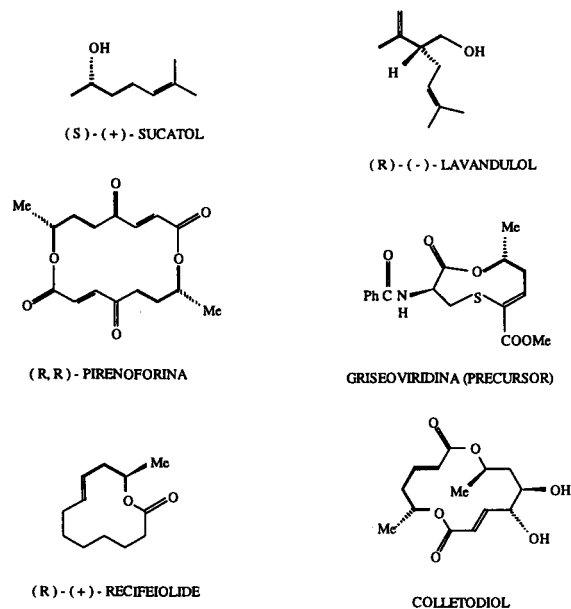


É interessante notar que ocorre geração de um centro assimétrico nas moléculas reduzidas. Estas reações são catalisadas por enzimas (no interior da célula do fermento) pertencentes à classe das desidrogenases. Estas enzimas são a L (S) Lactato desidrogenase (E.C. = 1.1.1.27) e a álcool desidrogenase

Síntese de β -OH-butirato de etila:

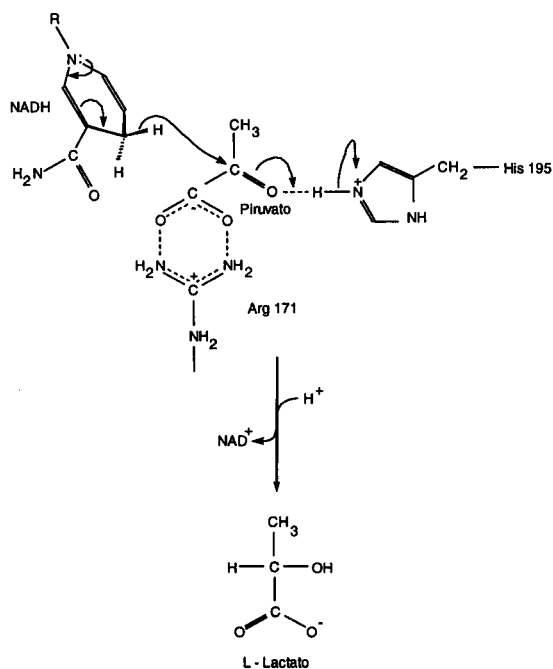


COMPOSTOS NATURAIS SINTETIZADOS A PARTIR DO β -OH-BUTIRATO DE ETILA:



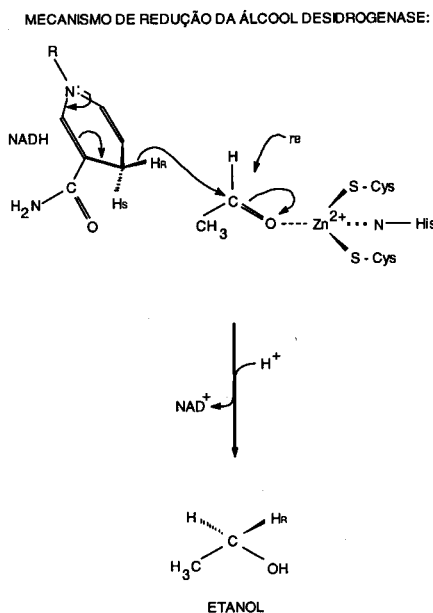
(E.C. = 1.1.1.1)²⁸. Como estes biocatalisadores estão no interior do microorganismo, o composto químico a ser biotransformado tem que penetrar nestas células vivas e depois sair. Para que tais reações ocorram, é necessário que as células de fermento estejam vivas (células mortas não catalisam reações). A viabilidade celular pode ser testada por consumo de oxigênio através do eletrodo de Clark²⁹. As enzimas reduzem o substrato utilizando como cofator NADH (nicotinamida adenina

MECANISMO DE REDUÇÃO DA L(S) LACTATO DESIDROGENASE:



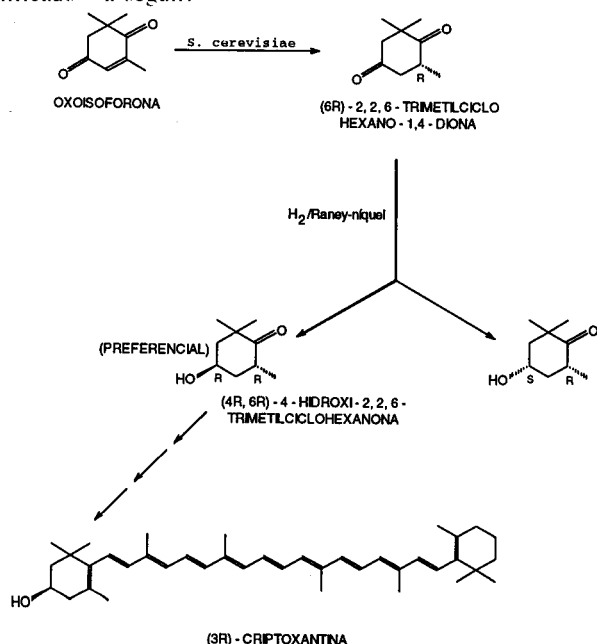
dinucleotídeo na forma reduzida). O NADH entrega seus equivalentes redutores para o substrato e sai na forma oxidada (NAD⁺), como é demonstrado no mecanismo a seguir quando estas enzimas reduzem seus substratos naturais (estão mostrados apenas os aminoácidos que participam do sítio ativo da enzima)²⁸.

Nota-se que o piruvato, que é o substrato natural desta enzima, é muito semelhante ao acetoacetato (difere apenas por um CH₂). A enzima atua sobre o substrato artificial devido ele ser semelhante ao substrato natural, e o mecanismo de ação para ambos, provavelmente, são semelhantes. A álcool desidrogenase depende de íons zinco e é por isto que alguns pesquisadores adicionam zinco ao meio com *S. cerevisiae*³⁰. O seu mecanismo é o seguinte²⁸:

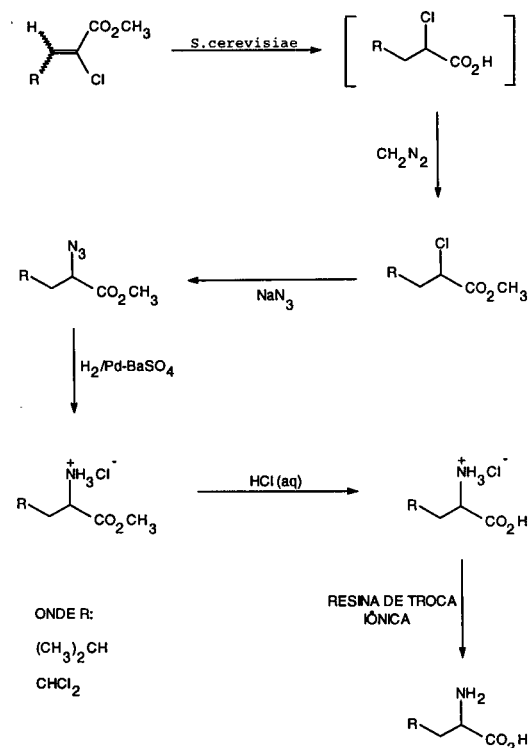


a.2 Redução de dupla ligação

Além das reações de redução de carbonilas, que são várias¹⁴, as desidrogenases no interior do fermento de padaria reduzem duplas ligações, produzindo centros quirais como exemplificado¹⁶ a seguir:



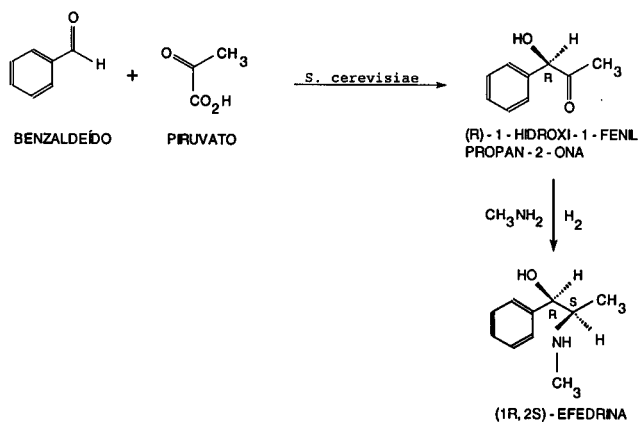
Na síntese de aminoácidos³¹:



Quando se usa o isômero E, ocorre a formação do isômero R com 92% de excesso enantiomérico. No caso do isômero Z, há a formação de S com 98% de excesso enantiomérico³¹.

b. Reações de Condensação

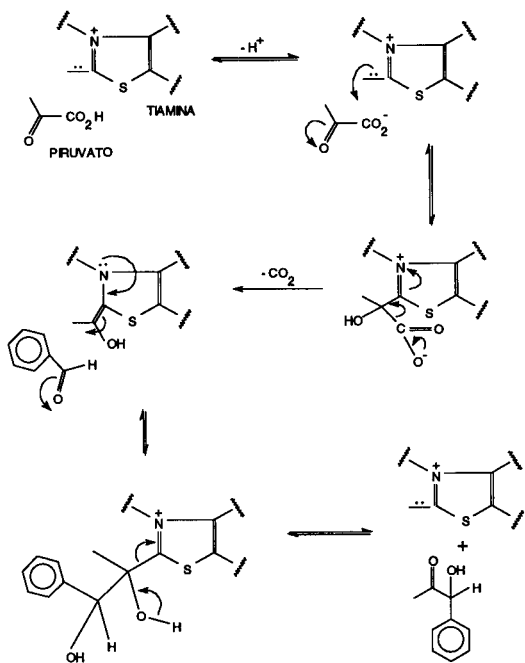
Síntese de efedrina:



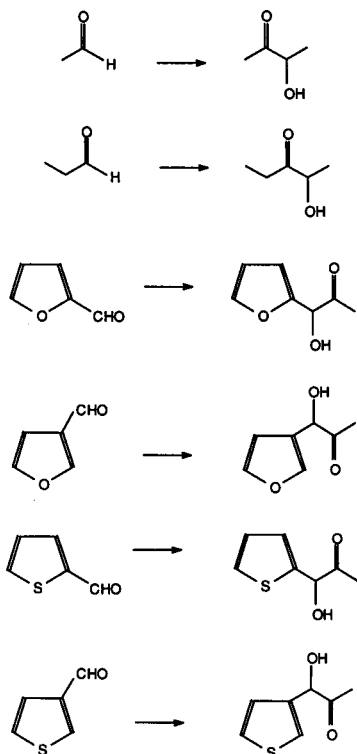
Esta síntese tem utilidade industrial e é uma patente alemã de 1930³². A efedrina tem importância no tratamento da asma, hipotensão e congestão nasal³³.

A enzima que suple-se que atue nesta reação é a piruvato descaboxilase (E.C. = 4.1.1.1)³⁴, o principal cofator da enzima é a tiamina pirofosfato (forma coenzimática da vitamina B₁), sendo ela que promove a ocorrência da reação, como mostrado a seguir³⁴:

MECANISMO DA REAÇÃO DE CONDENSÃO CATALISADA PELA
PIRUVATO DESCARBOXILASE:



Além deste, existem outros tipos de compostos que são condensados pela enzima piruvato descarboxilase como exemplificado a seguir³⁴:

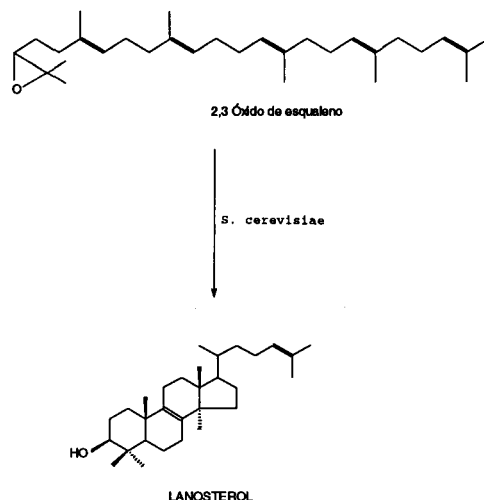


Deve-se entender que cada composto anteriormente mostrado está sendo condensado com uma molécula de piruvato.

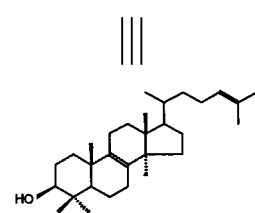
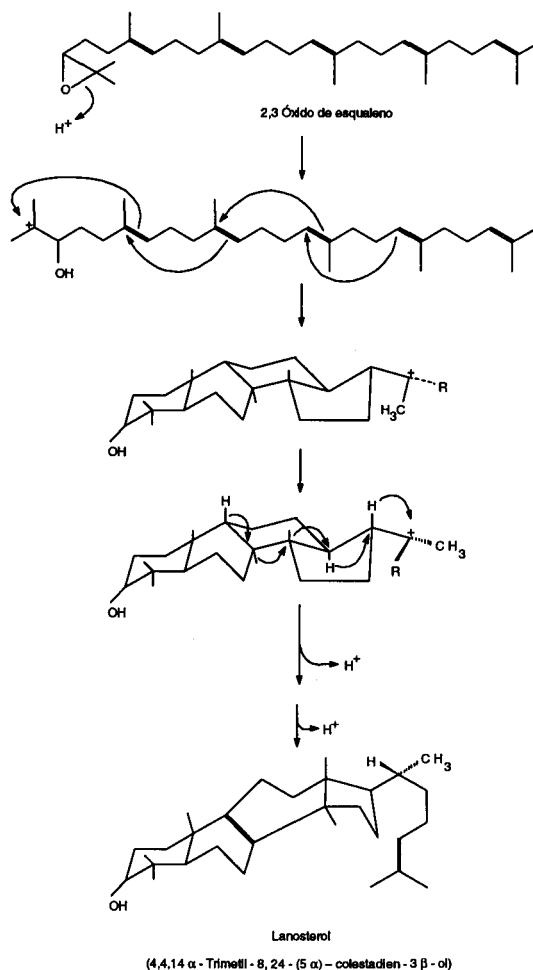
c. Reação de Ciclização

Até hoje só se conseguiu um tipo de reação de ciclização com o fermento de padaria. Esta reação é catalisada pela 2,3

óxido de esqualeno lanosterol ciclase (E.C. = 5.4.99.7)^{22, 23}:



MECANISMO DE AÇÃO DA 2,3 ÓXIDO DE ESQUALENO
LANOSTEROL CICLASE:



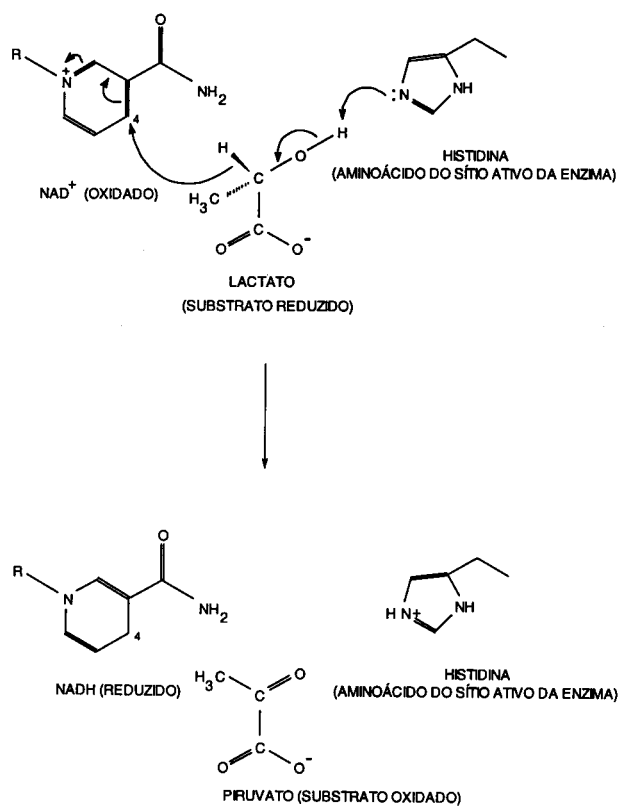
O mecanismo mostrado foi proposto no início de 1955 por Albert Eschenmoser e Leopold Ruzicka e demais colaboradores, em Zurique, e também por Gilbert Stork e Albert Burgstahler nas Universidades de Harvard e Columbia, respectivamente³⁵.

De acordo com esta formulação, o anel do epóxido abre, gerando assim um átomo de carbono deficiente de elétron, como mostrado. É isto que dá a força diretriz para a série de fechamento de anéis que se segue. Com o fechamento do quarto anel (anel de 5 membros), um átomo de carbono da cadeia lateral torna-se deficiente de elétron. Este, por sua vez, é a força diretriz para a seqüência de migrações do íon-hidreto e grupo metila, os quais culminam na formação da ligação olefínica entre C(8) e C(9)³⁵.

d. Reações de Oxidação

Estas não têm muita importância, pois não geram centros assimétricos como as anteriores. Elas ocorrem por simples reversão das reações de redução, como mostrado abaixo³⁶:

MECANISMO DE AÇÃO DA LACTATO DESIDROGENASE (TIPO II):



Existem dois tipos de lactato desidrogenase no interior do *S. cerevisiae*:

- tipo I: faz redução;
- tipo II: faz oxidação³⁷.

Dos tipos de reações que o *S. cerevisiae* pode executar, apenas as de redução tem recebido maior destaque em termos de controle estereoquímico, ou seja, controle da produção de apenas um enantiômero. Por este motivo, será a metodologia mais comentada nos pontos seguintes.

METODOLOGIA PARA USO DO FERMENTO DE PADARIA EM SÍNTESE

Existem duas maneiras de se trabalhar com células de fermento em síntese orgânica:

a. Forma livre

As células (fermento biológico de padaria) são misturadas com água (de preferência bidestilada e deionizada) e em seguida é adicionado o composto químico a ser biotransformado. Os métodos empregados nas reações com *S. cerevisiae* são basicamente dois:

a.1 Método com adição de açúcar

Este método é baseado no procedimento descrito por Seebach e colegas³⁸. Pode-se introduzir uma modificação que é a introdução de uma pequena quantidade de ZnSO₄³⁰, quando se quer aumentar a atividade da enzima álcool desidrogenase que é zinco dependente (como visto no mecanismo de ação desta enzima). A álcool desidrogenase aumenta a produção de isômeros R²⁸. Preparar em separado a seguinte composição:

- 20 g de fermento de padaria dissolvido em 10mL de água;
- 10 g de açúcar em 38mL de água;
- 0,0128 g de sulfato de zinco (se houver a necessidade de produção de isômeros R, do contrário não adicionar) em 1,3mL de água.

Misturar tudo sob agitação mecânica em banho termostatizado a 30°C por 30 minutos. Em seguida adiciona-se 1 mmol de substrato a ser biotransformado. O tempo que leva para ocorrer a biotransformação varia para cada tipo de substrato (composto químico a ser biotransformado) e normalmente leva de 6 a 72 horas. Após este período extrai-se a mistura com clorofórmio em extrator líquido-líquido contínuo por 48 horas. Depois disto este extrato é purificado por cromatografia de coluna.

a.2 Método sem adição de açúcar

Adiciona-se 1 mmol de substrato a uma suspensão de 35 g de fermento de padaria em 20 mL de água, sob agitação mecânica e em banho termostatizado a 30°C por 30 minutos. Após o tempo necessário para terminar a reação, extrai-se e purifica-se a mistura conforme descrito no item anterior. Em ambos os métodos as células são mortas no processo de extração, não podendo ser reutilizadas³⁹.

b. Forma imobilizada

As células de fermento são previamente imobilizadas (fixas) num suporte. Existem diversos tipos de suporte: crisotila 5 RL³⁹, montmorilonita K10³⁹, poliácridamida^{40, 41} e alginato de cálcio⁴². Nos dois primeiros as células são fixas por atração eletrostática (carga do suporte é positiva e, das células, negativa) e nos demais por aprisionamento na rede de um polímero. Depois de fixas num suporte, este último é mergulhado em água e por fim é adicionado o composto a ser biotransformado. A separação das células de fermento do produto (composto biotransformado) é mais simples que na forma livre, bastando filtrar o suporte que contém as células. O meio contendo o produto é então purificado através de cromatografia de coluna. As células não morrem neste processo e podem ser reutilizadas³⁹.

O melhor processo de imobilização é com gel de poliácridamida. Este método é dado a seguir^{40, 41}:

2 gramas de células secas são dissolvidas em 10mL de água. Em seguida são misturadas com 16mL de uma solução contendo 8,8g de acrilamida e 0,6g de N,N' - metilenebisacrilamida. 1mL de solução de persulfato de amônio e 20μL de TEMED. A mistura é incubada por 30 minutos a 37°C. O gel formado é triturado num blender ou liquidificador para aumentar a superfície de contato e reduzir o tempo de catálise^{40, 41}.

VANTAGENS DE UTILIZAÇÃO DO *S. CEREVISIAE* EM BIOTRANSFORMAÇÃO²⁹

- Baixo custo;
- Fácil de adquirir;

- Fácil de manipular;
- Não é necessário preparar meio de cultura, o que exigiria, do químico orgânico, conhecimentos de microbiologia;
- Reações são executadas à temperatura ambiente (25°C);
- Não é tóxico;
- Em condições adequadas (meio com nutrientes), as reações ocorrem mais rapidamente do que com catalisadores químicos convencionais;
- Não é patogênico.

Limitações do processo

- Pouca solubilidade em água dos compostos a serem biotransformados. A solução para este problema é a adição de moléculas que têm efeito detergente junto com o composto químico (Ex: dodecanol⁶), ou então, usar as células em meio orgânico⁴³. A presença de solvente orgânico pode promover a inativação do biocatalisador (seja ele célula intacta ou enzima isolada)⁴⁴, porém parece que a presença de água ajuda a diminuir estes efeitos lesivos⁴³.
- Cada fabricante de fermento usa cepas (linhagens) próprias e isto pode dificultar a reprodutibilidade de experimentos feitos em outros países²⁹. Cada cepa possui morfologia própria⁴⁵ e produz quantidades diferentes de NADH²⁹. Isto faz com que o rendimento químico (que é diretamente proporcional à produção de NADH) seja alterado²⁹. Se mudarmos o tipo de cepa, ocorre também alteração no excesso enantiomérico²⁶. Um experimento interessante foi feito por Weijers e colaboradores que usaram as cepas CBS 1242 e CBS 1394 de *Saccharomyces cerevisiae*, na biotransformação da cloroacetona em condições iguais de reação e obtiveram 74% e 98% de excessos enantioméricos, respectivamente²⁶. Para contornar o problema de cepas diferentes, torna-se necessário dosar os nucleotídeos de piridina (NADH) no interior destas células, para que a reprodutibilidade de experimentos não seja comprometida²⁹, ou então, nunca mudar a marca do fermento;
- O fermento de padaria, como todos os organismos vivos, possui muitas enzimas no seu interior. Como citado anteriormente, as desidrogenases que atuam nas reações de redução são duas: Álcool desidrogenase (produz isômeros R)²⁸ e a Lactato desidrogenase (produz isômeros S)³⁵. Dependendo do substrato a ser biotransformado, pode ocorrer a formação de uma mistura escalêmica. Para solucionar este problema, deve-se adicionar inibidores enzimáticos específicos.

Inibidores Enzimáticos

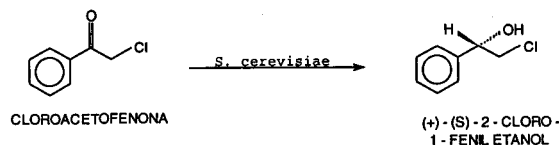
Os inibidores mais utilizados para aumentar o excesso enantiomérico são: álcool alílico⁴⁶, cloroacetato de etila⁴⁶, e ácido acético⁴⁷. Existem outros, algumas vezes mais eficientes, descobertos na década de 40⁴⁸, mas que só recentemente (e acidentalmente) foram usados em reações com fermento de padaria³⁹. Eles são dados a seguir, juntamente com seu poder de inibição da enzima álcool desidrogenase de fermento³⁹.

Composto	Concentração	Inibição (%)
Cloroacetofenona	0,33 mM	85
Bromoacetofenona	0,33 mM	100
Iodoacetato de etila	0,16 mM	85
Iodoacetato de etila	0,33 mM	100
Cloropicrina	0,33 mM	100

O tempo para ocorrer a inibição é maior que 60 minutos para a maioria deles⁴⁸.

A cloroacetofenona é um inibidor da álcool desidrogenase, porém não inibe a ação da lactato desidrogenase⁴⁸ que atua

sobre ela transformando-a no seu correspondente álcool quiral³⁹:

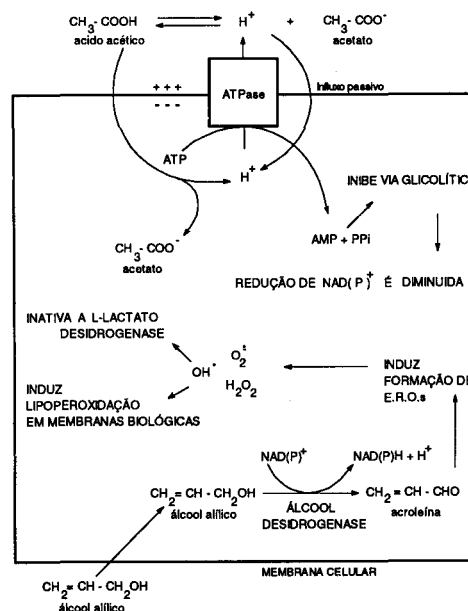


Esta reação foi executada há aproximadamente três anos atrás e o excesso enantiomérico era alto (97%)³⁹.

O (+)-(S)-2-cloro-1-feniletanol é usado como sinton (bloco construtor) para a síntese de fármacos quirais⁴⁹.

O mecanismo de inibição destes compostos é devido a eles se ligarem ao sítio ativo da enzima e formarem um complexo altamente estável que não se desfaz, impedindo que outros compostos entrem no sítio ativo. Somente o ácido acético e o álcool alílico é que possuem mecanismos de ação diferentes. A explicação bioquímica para a atividade inibitória deles está demonstrada no esquema 2²⁹. Quando o álcool alílico é adicionado ao meio de reação, ele penetra na célula e no interior dela é oxidado a acroleína pela ação da álcool desidrogenase (tipo II). A acroleína é um aldeído e por isto tem capacidade de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (E.R.O.s), que inativam a enzima L(S) - lactato desidrogenase²⁹, restando no citossol apenas a enzima álcool desidrogenase (ocorrerá o predomínio de isômeros R). As E.R.O.s podem danificar a membrana²⁹ e as organelas⁵⁰ celulares, por esta razão a quantidade de álcool alílico adicionado não pode ser alta²⁹.

O ácido acético, por sua vez, tende a abaixar o pH intracelular selecionando a enzima que melhor atua neste pH. Deve-se lembrar que a atividade das enzimas varia com o pH do meio, sendo que cada uma delas tem a sua atividade aumentada (ou diminuída) em determinadas faixas de pH²⁹. Vale notar que a adição destes inibidores é feita um por vez, e que foram colocados juntos no esquema para poder economizar espaço, ou seja, eles não são adicionados ao mesmo tempo, sendo cada um específico para um tipo de reação²⁹.



Esquema 2

AGRADECIMENTOS

Desejo agradecer ao Prof. Dr. Nelson Durán pela leitura crítica deste manuscrito e o estímulo para escrevê-lo, à senhorita

Maria Célia Ribeiro por seu constante apoio, à Profa. Maria das Dores Pereira pelo suporte técnico e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

1. Greenberg, M. J.; *J. Agric. Food Chem.* (1979), **27**, 347.
2. De Camp, W. H.; *Chirality* (1989), **1**, 2.
3. Ebbesen, P.; *Eur. J. Cancer Prev.* (1991), **1**, 39.
4. Stinson, S. C.; *Chem. Eng. News* (1994), **72**, 38.
5. Stinson, S. C.; *Chem. Eng. News* (1992), **28**, 46.
6. Bare, G.; Jacques, P. H.; Hubert, J. B.; Rikir, R.; Thonart, P. H.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* (1991), **28/29**, 445.
7. Chen, C. S.; Sih, C. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (1989), **28**, 695.
8. Ariens, E. J. Stereospecificity in Bioactive Agents, Elsevier, Amsterdam, pp 39 (1988).
9. Creagh, A. L.; Hasenack, B. B. E.; Van der Padt, A.; Sudhölter, E. J. R.; Van't Riet K.; *Biotechnol. Bioeng.* (1994), **44**, 690.
10. Yamaguchi, T.; Nishimura, K.; Shimbo, T.; Sugiura, M.; *Chem. Lett.* (1985), 1549.
11. Bosnik, B.; Fryzuk, M. D.; Topics in Inorganic and Organometallic Stereochemistry, Geoffroy, G. L., ed., Wiley, New York, p. 119 (1981).
12. Kagan, H.; Wilkinson, G.; F. G. A.; Comprehensive Organometallic Chemistry, Abel, E. W., ed., Pergamon; Oxford, vol. 8, p.463 (1982).
13. Ward, O. P.; Young, C. S.; *Enzyme Microb. Technol.* (1990), **12**, 482.
14. Csuk, R.; Glänzer, B. I.; *Chem. Rev.* (1991), **91**, 49.
15. Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Guerzoni, M. E.; Medici, A.; Pedrini, P.; Poli, S.; *J. Org. Chem.* (1994), **59**, 924.
16. Präve, P.; Faust, U.; Sittig, W.; Sukatsch, D. A.; Fundamentals of Biotechnology, VCH publishers, Weinheim; 563 (1987).
17. Prudent, J. R.; Uno T.; Schultz, P. G.; *Science* (1994), **264**, 1924.
18. Pollack, J. W.; Jacobs, J. W.; Schultz, P. G.; *Science* (1986), **234**, 1570.
19. Schultz, P. G.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (1989), **28**, 1283.
20. Tramantano, A.; Janda, K. D.; Lerner, A.; *Ibid.* (1991), **252**, 1566.
21. Long, A.; Ward, O. P.; *Biotechnol. Bioeng.* (1989), **34**, 933.
22. Medina, J. C.; Kyler, K. S.; *J. Am. Chem. Soc.* (1988), **110**, 4818.
23. Bujons, J.; Guajardo, R.; Kyler, K. S.; *J. Am. Chem. Soc.* (1988), **110**, 604.
24. Crumbie, R. L.; Deol, B. S.; Nemorin, J. E.; Ridley, D. D.; *Aust. J. Chem.* (1978), **31**, 1965.
25. Gill, G.; Ferre, E.; Barre, M.; Le Petit, J.; *Tetrahedron Lett.* (1988), **29**, 3797.
26. Weijers, C. A. G. M.; Litjens, M. J. J.; de Bont, J. A. M.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1992), **38**, 297.
27. Mori, K.; *Tetrahedron* (1989), **45**, 3233.
28. Voet, D.; Voet J. G.; Biochemistry, John Wiley & Sons, pp 445 (1990).
29. Pereira, R. S.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* (1995), **55**, 1.
30. MacLeod, R.; Prosser H.; Fikentscher, L.; Lanyi, J.; Mosher, H.S.; *Biochemistry* (1964), **3**, 838.
31. Utaka, M.; Konishi, S.; Mizuoka, A.; Ohkubo, T.; Sakai, T.; Tsuboi, S.; Takeda, A.; *J. Org. Chem.* (1989), **54**, 4989.
32. Hilderbrandt, G.; Klavehn, W.; *Ger. Pat.* (1930), 548.459.
33. Goodman, L. S.; Gilman, A.; As Bases Farmacológicas da Terapêutica, Guanabara Koogan, 8a. ed., pp 140 (1991).
34. Crout, D. H. G.; Dalton, H.; Hutchinson, D. W.; Miyagoshi, M.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1991), 1329.
35. Cunningham, E. B.; Mechanisms of Metabolism, McGraw-Hill, pp 526 (1978).
36. Rawn, J. D.; Biochemistry - International Edition, Neil Patterson Publishers, pp 317 (1989).
37. Nikolova, P.; Ward, O. P.; *Biotechnol. Bioeng.* (1991), **20**, 493.
38. Seebach, D.; Sutter, M. A.; Weber, R. H.; Zuger, M. F.; *Org. Synth.* (1984), **63**, 1.
39. Sorrilha; A. E. P. M.; Marques, M.; Joekes, I.; Morán, P. J. S.; Rodrigues J. A. R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1992), **2**, 191.
40. Chibata, I.; Tosa, T.; Sato, T.; *Appl. Microbiol.* (1974), **27**, 878.
41. Zyla, K.; *J. Ind. Microbiol.* (1994), **13**, 30.
42. Vives, C.; Casas, C.; Gòdia, F.; Solà, C.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1993), **38**, 467.
43. Jayasinghe, L. Y.; Smallridge, A. J.; Trehwella, M. A.; *Tetrahedron Lett.* (1993), **34**, 3949.
44. Ghatarae, A. S.; Bell, G.; Halling, P. J.; *Biotechnol. Bioeng.* (1994), **43**, 331.
45. Pereira, R. S.; Parizotto, N. A.; Baranauskas, V.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* (1995), in press.
46. Nakamura, K.; Kawai, Y.; Nakajima, N.; Ohno, A.; *J. Org. Chem.* (1991), **56**, 4778.
47. Ushio, K.; Ebara, K.; Yamashita, T.; *Enzyme Microb. Technol.* (1991), **13**, 834.
48. Mackworth, J. F.; *Biochem. J.* (1948), **42**, 82.
49. Corey, E. J.; Link, J. O.; *Tetrahedron Lett.* (1990), **31**, 601.
50. Pereira, R. S.; Bertocchi, A. P. F.; Vercesi, A. E.; *Biochem. Pharmacol.* (1992), **44**, 1795.

Publicação financiada pela FAPESP