

Estudo da biorredução de cetonas pró-quirais conduzida em sistemas bifásicos em biorreatores

¹ Aline Luiza Salomon* & ² Renato Wendhausen

1. Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau – FURB, Rua São Paulo, 1500, Blumenau - 89010-971. linisalomon@gmail.com

2. Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau – FURB, Rua São Paulo – 1500, Blumenau, CEP 89010-971. renato@furb.br

* Bolsista programa PIBIC/CNPq – 2006-2007

Resumo: O uso de solventes orgânicos em processos biocatalíticos esta se tornando cada vez mais utilizado, devido a uma série de vantagens como promover uma maior concentração do substrato e ainda diminuir o volume reacional. Entretanto este processo é limitado ao fato dos solventes orgânicos apresentarem em geral uma ação tóxica sobre os biocatalisadores, especialmente células vivas levando a uma desativação do biocatalisador. Em trabalho recentemente publicado, ligado a este projeto, foi obtida a biorredução da 4-aminoacetofenona em uma mistura de heptano/água, mostrando boa manutenção da viabilidade celular. Solventes com Log de P entre 1 e 5 são considerados os mais tóxicos para células. A imobilização de biocatalisadores em suporte adequado apresenta ainda as vantagens de facilidade de separação do meio reacional e produtos com excessos enantioméricos superiores aos mesmos trabalhos com células livres. Este trabalho teve como objetivo selecionar o solvente mais compatível com *Saccharomyces cerevisiae* CCT 3174 e testar a atividade redutora desta linhagem imobilizada em crisotila em sistema bifásico sobre a 4-aminoacetofenona em biorreatores. Os resultados mostraram como solvente mais adequado o n-heptano por razões praticas e econômicas, mostrando a capacidade de redução da 4-aminoacetofenona em sistemas bifásicos com no máximo 30% de solvente orgânico. O produto da biorredução 4-(1)-aminofeniletanol foi identificado por espectroscopia de infravermelho.

Palavras-chave : biocatálise em sistemas bifásicos, biotransformação, biorredução.

1. Introdução

A produção biotecnológica de produtos químicos por biocatálise é geralmente um processo limpo sem formação de subprodutos e com isso diminui o impacto ambiental de muitos poluentes que podem ser gerados em processo químicos convencionais. As cetonas pró-quirais geram álcoois quirais por biotransformação, os quais são excelentes compostos para serem utilizados em síntese orgânica devido a sua versatilidade química e facilidade de conversão para outras classes de compostos. Para esta biotransformação podem ser empregadas as enzimas oxirredutases. No entanto, esta classe de enzimas necessita do cofator NADH que pode encarecer o processo, pois mesmo que as enzimas sejam reutilizadas, estes cofatores geralmente têm preços elevados e necessitam ser repostos após cada reação.

Para o uso em processos de redução enantiosseletivas, os microrganismos geralmente são mais adequados, pois estes possuem o complexo enzimático necessário a recuperação do cofator NADH. Os microrganismos mais comuns para esta biotransformação são células de *Saccharomyces cerevisiae* sp. ou de fermento de pão comercial. No entanto, a bioconversão de substratos orgânicos em meio aquoso, que é normalmente o meio mais comum para os biocatalisadores, é em geral dificultado pelo fato dos substratos serem pouco solúveis neste meio. O uso de um solvente orgânico insolúvel em água nestes sistemas está se tornando cada vez mais utilizado, devido a uma série de vantagens, bem como promover uma maior concentração do substrato e ainda diminuir o volume reacional (menores reatores)¹. Trabalhos relacionados a esta área tem sido publicados desde o início dos anos 80². Entretanto, este processo é limitado ao fato

dos solventes orgânicos apresentarem em geral uma ação tóxica sobre os biocatalisadores, especialmente células vivas levando a uma desativação do biocatalisador. As bioconverções em sistemas multifásicos dependem da escolha do solvente mais adequado para o sistema biocatalítico. Os principais critérios a considerar na seleção de um solvente orgânico são apresentados na tabela abaixo, e incluem critérios físico-químicos, biológicos, de segurança, logística e econômicos. Do ponto de vista físico-químico, os aspectos mais importantes são a capacidade de extração (coeficiente de participação) e solubilização de substratos e/ou produtos pelo solvente orgânico, e as suas propriedades que vão determinar a facilidade de separação das fases e a transferência de massa. O solvente orgânico deve ser química e termicamente estável, não deve formar de emulsões em meio aquoso, por forma a facilitar a separação de fases, a sua viscosidade deve ser reduzida, de forma a facilitar a transferência de massa, e não ser degradado pelo biocatalisador. Do ponto de vista de segurança, o solvente orgânico não deve apresentar toxicidade ambiental nem ser prejudicial para a saúde, e não ser inflamável. Em termos logísticos, a sua disponibilidade deverá ser elevada e a sua reciclagem deve ser possível. Em termos econômicos, o seu custo deve ser baixo. O critério biológico, toxicidade do solvente orgânico para o biocatalisador é, de todos estes, o que se apresenta mais restritivo. Em trabalho recentemente publicado, ligado a este projeto, foi obtida a biorredução da 4-aminoacetofenona em uma mistura de heptano/água, mostrando boa manutenção da viabilidade celular ^{4,5}.

Tabela 1 - Critérios para a seleção do solvente orgânico.

Físico Químico	- Capacidade para solubilização do substrato e do produto; - Coeficiente de partição Log 8 - logaritmo de coeficiente de participação; - Densidade; - Pontos de fusão e de ebulição; - Tensão Superficial; - Viscosidade.
Biológicos	- Toxicidade para o biocatalisador.
Segurança	- Toxicidade; - Inflamabilidade.
Logísticos	- Facilidade de obtenção; - Eliminação de resíduos.
Econômicos	- Custo.

A imobilização dos biocatalisadores em suporte apropriado tem demonstrado a capacidade de diminuir e até eliminar este efeito de toxicidade do solvente, uma vez que o suporte pode criar um microambiente protetor capaz de manter a atividade do biocatalisador⁶. Em trabalho recente

(Wendhausen 2005) foi utilizada a crisotila, um argilo mineral de superfície hidroxilada, como suporte para a imobilização de *Micobacterium* NRRL B-3805 utilizada em sistema bifásico, mostrando excelente manutenção da viabilidade celular ⁷.

A imobilização de biocatalisadores em suporte adequado apresenta ainda as vantagens de facilidade de separação do meio reacional possibilidade de reutilização do biocatalisador e ainda a possibilidade de trabalhos em regime contínuo em biorreatores adequados. Muitos métodos para a imobilização de biocatalisadores têm sido desenvolvidos apresentando vantagens e desvantagens em suas aplicações. Os métodos mais eficientes estão entre o uso de meios não convencionais, bifásicos^{8,9} com a incorporação de solventes orgânicos, controle de temperatura e pH adição de certos inibidores específicos^{10,11}, e a imobilização das células em suporte apropriado^{12,13}. Trabalhos com redução por células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato e celite¹⁴ obtiveram produtos com excessos enantioméricos superiores aos mesmos trabalhos com células livres. Os autores propõem um aumento nas velocidades individuais de reação das oxiredutases presentes no fermento de pão. Sistemas usando crisotila natural ativada e montmorilonita ^{15,16} como suportes, obtiveram igualmente aumentos no excesso enantiomérico acrescidos de um substancial aumento no rendimento químico.

Nos últimos anos, boa parte das pesquisas sobre células imobilizadas tem se centrado sobre técnicas de imobilização e a caracterização do sistema imobilizado. Mais recentemente, com a possibilidade de aplicação destas técnicas em processos industriais, o “design” de reatores capazes de levar a cabo o processo tem se tornado fundamental ¹⁷. A escolha do tipo de reator depende de muitos fatores e requer conhecimento prévio do processo específico em que vai ser utilizado, uma vez que a natureza da reação impõe requerimentos particulares. Liberação de gases inibição pelo produto ou reagente, desprendimento de calor, etc..

A maioria dos reatores atualmente em estudo para células imobilizadas são sistemas colunares contínuos tais como os de leito fixo e fluidizado. Na realidade tais sistemas impõem que o microrganismo esteja imobilizado, para prevenir lavagem das células sob as altas velocidades de diluição normalmente impostas a estes processos. Recentemente vem-se estudando a utilização da crisotila, um silicato magnésiano hidratado do grupo das serpentinhas, apresentando como

formula molecular $Mg_3(Si_2O_5)(OH)_4$, onde possui 43% de MgO , 44,1% de SiO_2 , 12,9 % de H_2O , como novo suporte para adsorção de biocatalisadores, analisando os possíveis efeitos biológicos induzidos por estas fibras. Moran e col¹⁸. tem estudado a imobilização de fermento de pão em crisotila e sua aplicação na redução enantiosseletiva de compostos carbonílicos como os azidopropiofenonas, obtendo os azidoálcoois syn e anti com bons rendimentos e bons excessos enantioméricos. Outros trabalhos que foram estudados utilizando fermento de pão imobilizados em crisotila são, a redução de fenilcetonas¹⁹; redução de α -haloacetofenonas e a síntese enantiosseletiva de (R)-(-)-1 feniletanolaminas. Trabalhos recentemente publicados e que merecem especial atenção nesta área tem sido os realizado por Wendhausen e col. que envolve a biorredução contínua de cetonas em biorreatores com fermento de pão imobilizado em crisotila em reatores de leite empacotado²⁰. O reator manteve estabilidade operacional por períodos superiores a trinta dias com manutenção de excessos enantioméricos superiores a 90%^{21,22}. Este trabalho teve como objetivo selecionar o solvente mais compatível com *Saccharomyces cerevisiae* CCT 3174 e testar a atividade redutora desta linhagem imobilizada em crisotila em sistema bifásico²³ sobre a 4-aminoacetofenona em biorreatores.

2. Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de pesquisa do Instituto de Pesquisas Tecnológicas da FURB.

2.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram *Saccharomyces cerevisiae* CCT 3174 fornecidos na forma liofilizada em ampolas, pela Fundação André Toselo de Campinas SP e foram tratados como descrito a seguir.

2.1.1 Reativação

- Preparação dos meios nutrientes e meios de manutenção dos microrganismos (YMA) extrato de malte 3 g/L Extrato de Levedura 3 g/L Peptona 5g/L Agar 1 g/L
- Colocação dos meios em placas de petri e tubos de agar inclinados (slants)
- Abertura das ampolas e reativação dos microrganismos liofilizados.
- Inoculação dos microrganismos reativadas nos meios de manutenção.

2.1.2 Desenvolvimento do microrganismo para obtenção de massa celular.

- Preparação dos meios de crescimento – extrato de levedura 3 g/L extrato de malte 3 g/L e sacarose 10 g/L
- Inoculação dos meios de crescimento com o microrganismo reativado
- Manutenção dos meios inoculados em incubadora de rotação orbital por 24 horas a 28°C com posterior repique para uma quantidade maior de meio e manutenção nas mesmas condições por mais 24 horas.
- Centrifugação das suspensões de células obtidas.

2.1.3 Determinação da massa de células obtida

O volume do meio de crescimento foi centrifugado obtendo-se aproximadamente 20mL de massa hidratada. Três amostras de 0,2mL da suspensão de células obtidas foram colocadas em um pedaço de papel alumínio previamente pesados e seco por 24 horas a 100°C. A partir da massa seca foi estimada a massa de célula hidratadas levando-se em conta um conteúdo celular de 70% de água. O restante foi reservado para o uso do meio de biotransformação.

2.2 Purificação e ativação da crisotila natural

2.2.1 Jateamento

Amostras de aproximadamente 5g de crisotila foram colocadas sobre uma peneira Tyler 250 mesh e jateadas com água durante 15 minutos, para a eliminação das impurezas. O material resultante foi secado em estufa por 24 horas a 100°C.

2.2.2 Sonicação

A ativação foi feita submetendo-se uma suspensão de 120 g crisotila em 2 L de uma solução tampão de ácido acético / acetato de sódio equimolar a $3,3 \cdot 10^{-2}$ M, a um campo de ultra-som de 25 KHz por 40 minutos. A mistura foi filtrada em peneira Tyler 250 mesh, e secada por 24 horas em estufa a 100°C.

2.3 Imobilização dos microrganismos

Foram esterilizados 300 mL de meio de crescimento com 2 g de crisotila. Após resfriamento, foi disperso um inóculo dos microrganismos previamente crescidos, permanecendo em banho termostático a 30°C durante 48 horas para crescimento e imobilização dos microrganismos. Após este tempo, a crisotila contendo os microrganismos imobilizados foi

filtrada sobre peneira tyler 250 resultando num complexo crisotila/células.

2.4 Preparo do biorreator

Utilizou-se um reator cilíndrico de modo batelada equipado com agitador magnético e a temperatura regulada através de banho termostático com circulação externa. O complexo crisotila/células obtido do item anterior foi adicionado ao meio de biotransformação contido no bioreator e o volume ajustado para 150 mL.

2.5 Seleção de solventes compatíveis com os microrganismos

Os microrganismos na forma livre, foram testados em reações de fermentação na presença de uma segunda fase orgânica com o meio utilizado para a obtenção de massa celular. Foram testados os solventes: n-hexano, n-heptano, hexanol, octanol, decanol. A proporção de solvente foi variada de 10 a 30%. Após 24 de incubação em incubadora de rotação orbital a 30°C, os meios foram inoculados em placas de petri e avaliados segundo a viabilidade e crescimento celular após contato com o solvente. Foi feita uma curva de calibração²⁴ para a análise de consumo de glicose baseada no método DNS (WENDHAUSEN, 1998)²⁴ com leituras em espectrofotômetro de UV, a 600nm.

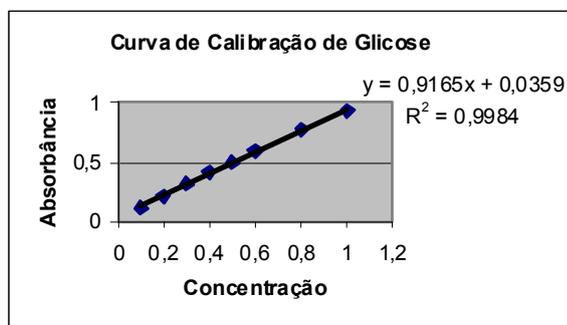


Figura 1: curva de calibração de glicose pelo método DNS.

2.6 Preparo do meio de biotransformação para as bioeduções

O meio de biotransformação foi composto por Glicose 5 g/L e aproximadamente 0,2g do precursor. O precursor testado foi a 4-aminoacetofenona. Os sistemas bifásicos foram formados por um dos solventes orgânicos em diferentes proporções e o mesmo meio de biotransformação citado acima. Os meios aquoso e bifásico foram adicionados no biocatalisador livre ou imobilizado com uma concentração celular em torno de 40 g/L (de células hidratadas). Os sistemas assim formados foram

colocados em incubadora de rotação orbital por 72 horas a 30°C e 210 rpm.

2.7 Processos de extração

O meio fermentado obtido do item anterior foi submetido a um processo de extração com solvente orgânico através da pêra de separação, que consiste em uma separação direta, envolvendo 2 líquidos (caldo fermentado x solvente). O solvente utilizado foi o éter etílico, devido a seu baixo ponto de ebulição (35°C), tornando sua remoção extremamente fácil. Foram feitas extrações com três porções de 15mL de solvente.

Após a extração no funil de separação, a solução etérea foi secada com $MgSO_4$ e filtrada para eliminar os resíduos. A mistura foi submetida a evaporador rotatório para eliminar o solvente obtendo-se desta forma o extrato bruto da biotransformação.

2.8 Caracterização dos compostos obtidos

Os compostos obtidos foram caracterizados por técnicas de cromatografia em camada delgada. Foram realizados também, espectroscopia de infra-vermelho em equipamento marca Shimadzu modelo Prestige 21. Os excessos enantioméricos dos produtos obtidos foram determinados em cromatografo gasoso Shimadzu GC 14B equipado com coluna quiral modelo Beta Dex 120 da marca Supelco.

3. Resultados e Discussão

Para o teste de seleção de solventes os microrganismos em meio de crescimento YMA, foram colocados em contato com uma segunda fase orgânica. Os solventes testados foram : n-hexano, n-heptano, hexanol, octanol, decanol. Ao decorrer de 24h, 48h e 72h as absorbâncias dos meios de crescimento foram lidas em espectrofotômetro de UV, a 600nm:

Tabela 2: Leituras das absorbâncias em espectrofotômetro a 600nm.

Solvente	Log de P	Após 24h	Após 48h	Após 72h
1-hexanol	1,8	0,0506	0,0491	0,0322
1-octanol	3,0	0,0685	0,0787	0,0426
n-hexano	3,5	0,0645	0,2074	0,1287
n-heptano	4,0	0,0814	0,3319	0,3220
1-decanol	4,0	0,1025	0,3401	0,4530
Meio YMA	-	0,1244 (1:10)	0,1447 (1:10)	0,1691 (1:10)

Como se pôde observar, a toxicidade do solvente ao microorganismo está diretamente relacionada ao seu *Log* de P. Os solventes com *Log* de P igual ou maior que 3,5 apresentam viabilidade, e quando o *Log* de P é igual ou maior que 4,0 há crescimento das células.

Em seguida, amostras da parte aquosa do meio bifásico foram repicadas em placa de petri para verificar se haveria crescimento dos microrganismos após o contato com o solvente. Observou-se o desenvolvimento de colônias nas placas correspondentes aos solventes:

Tabela 4: Crescimento e viabilidade de microorganismo após contato com meio orgânico.

Solvente	Crescimento	Viabilidade
1-hexanol	ND	ND
1-octanol	ND	ND
n-hexano	ND	+
n-heptano	+	+
1-decanol	+	+

Apesar de ter-se observado maior tolerância ao 1-dodecanol, o heptano foi considerado um solvente mais adequado devido a facilidade de eliminação após biotransformação. Além disso, o heptano é um solvente de baixo custo.

Tendo escolhido o solvente mais adequado, os microrganismos foram imobilizados em crisotila tratada com solução tampão aceto-acetato (pH 4,5). Observou-se que este suporte natural oferece uma proteção às células, diminuindo assim os efeitos tóxicos do solvente, aumentando a eficiência da fermentação.

Tabela 4: Resultados da concentração celular de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 3174.

Micro-organismos	Aliquota para análise de massa seca (mL)	Peso do papel (g)	Peso do papel + células secas em estufa (g)	Massa hidratada no meio de biotransformação (g/L)
CCT 3174	0,2	0,0364	0,0408	21,9
CCT 3174	0,2	0,0398	0,0439	20,5
CCT 3174	0,2	0,0394	0,0436	21,0

Quanto à quantidade de precursor utilizada nas biotransformações, foram adicionados 0,2g de 4-aminoacetofenona em proporções de 10%, 20% e 30% de n-heptano. Após ultrasonar por 10

minutos, esta fase foi adicionada ao meio com células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 3174 e 2g de glucose completado para 150 mL de água destilada. A biotransformação foi conduzida em reator batelada cilíndrico, sob agitação magnética constante e temperatura ajustada a 30°C por banho termostático.

A concentração de células presentes nas biotransformações foram feitas através da determinação da massa seca, retirando-se alíquotas de 0,2 mL e deixando durante 24h em estufa a 80°C.

A massa seca média de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada é de 21,13g/L, considerando que as células hidratadas possuem 70% de água, a média mássica de células hidratadas presentes nos meios de biotransformação foi de 49,30g/L. Foram realizadas cromatografias em camada delgada, utilizando como eluente uma mistura 1:1 de acetato de etila / hexano. Na tabela a seguir são demonstrados os RFs dos produtos obtidos nas biotransformações com microrganismos livres e imobilizados em crisotila, utilizando-se as proporções de 10, 20 e 30% de solvente:

Tabela 5: Índices de retenção (RF) do produto obtido na biotransformação em meio bifásico utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae* CCT 3174.

Porcentagem de n-heptano no meio bifásico	RF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 3174 Imobilizados	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 3174 Livres
10%	Mancha do padrão	0,550	0,525
	Mancha 1	0,500	0,565
	Mancha 2	0,098	0,053
	Mancha do padrão	0,750	0,787
20%	Mancha 1	0,714	0,779
	Mancha 2	0,486	0,350
	Mancha do padrão	0,733	0,831
30%	Mancha 1	0,735	0,842
	Mancha 2	0,614	0,425

Foram realizados, ainda, espectros infra-vermelho dos produtos obtidos da biotransformação da 4-aminoacetofenona utilizando-se células imobilizadas. A Figura 2 apresenta um pico na região de 3000 cm⁻¹, caracterizando a 4-aminoacetofenona em sua forma pura, para que se possa comparar os demais espectros com este padrão de referência.

A Figura 3 apresenta o espectro Infravermelho em meio bifásico utilizando uma porcentagem de 10% de solvente, na qual pôde-se observar o não surgimento da banda de OH na região de 3500cm⁻¹.

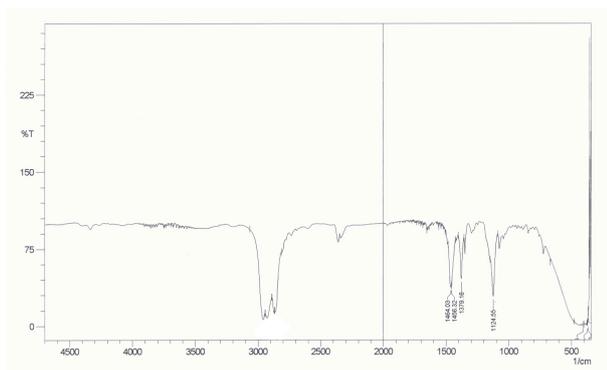


Figura 2: Espectro Infravermelho da 4-aminoacetofenona (padrão de referência).

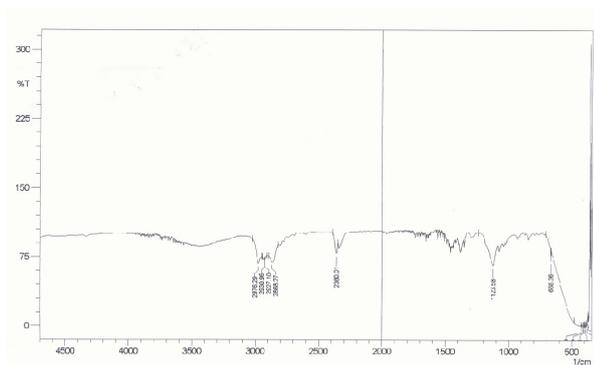


Figura 3: Espectro Infravermelho utilizando uma porcentagem de 10% de solvente.

A Figura 4 apresenta o espectro Infravermelho em meio bifásico utilizando uma porcentagem de 20% de solvente, na qual se pode observar uma banda de OH na região de 3500 cm^{-1} . A Figura 5 apresenta o espectro Infravermelho em meio bifásico utilizando uma porcentagem de 30% de solvente, na qual se pode observar uma banda de OH na região de 3500 cm^{-1} .

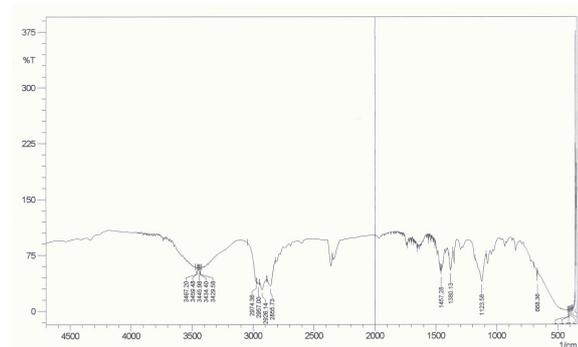


Figura 4: Espectro Infravermelho utilizando uma porcentagem de 20% de solvente.

Para as porcentagens de 20 e 30% de solvente testadas houve a redução do pico de NH_2 em 3000 cm^{-1} e o surgimento de uma banda de OH na região de 3500 cm^{-1} . Para a biotransformação

contendo 10% de solvente, não houve sinal de banda de OH.

Comparando-se os produtos obtidos através de microrganismos livres encontrados na literatura (LEHMKUHL, 2006)²⁵ com os resultados aqui apresentados, pôde-se perceber uma semelhança nos resultados.

Foi realizada uma cromatografia gasosa utilizando uma coluna de separação quiral, mas não foi possível separar os isômeros com esta coluna, impossibilitando uma análise do excesso enantiomérico.

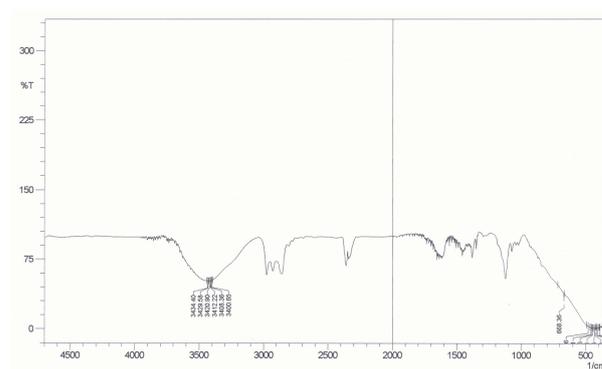


Figura 5: Espectro Infra-vermelho utilizando uma porcentagem de 30% de solvente.

4. Conclusão

Com relação ao estudo da viabilidade do microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* linhagem CCT 3174, o solvente n-heptano demonstrou ser o solvente mais adequado para o meio bifásico, devido a sua baixa toxicidade e facilidade eliminação após a biotransformação, demonstrando ainda uma manutenção da atividade biocatalítica positiva na proporção solvente/água 20 e 30% tanto para sistema com células livres quanto para imobilizadas. O sistema bifásico com n-heptano, mostrou-se eficaz para a biorredução da 4-aminoacetofenona comprovado espectrometria de infravermelho. Na proporção solvente/água 10% não houve sinal de atividade positiva na biorredução provavelmente pela pouca disponibilidade do precursor no sistema. A identificação do produto da biorredução foi realizada por espectrometria de infravermelho mostrando a banda do álcool 4-(1)-aminofeniletanol na faixa de 3500 cm^{-1} . Os experimentos conduzidos em biorreator mostraram uma otimização do processo, comprovada por um maior rendimento químico.

5. Agradecimentos: PIBIC/CNPq.

6. Referências

1. KAWAMOTO, T. KANDA, T. TANAKA, A. M. Preparation of an organic solvent-tolerant strain from baker's yeast Appl. **Microbiol. Biotechnol.** 55, 476-479, 2001.
2. LILLY, M. D. 2-Liquid-phase biocatalytic reactions. **Journal Of Chemical Technology And Biotechnology**, v. 32, p. 162-169, 1982.
3. DIAS, A. C. P., FERNANDES, P., CABRAL, J. M. S., PINHEIRO H. M. Isolation of a biodegradable sterol-rich fraction from industrial wastes. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 253-160, 2002.
4. WENDHAUSEN Jr, R., LEHMKUL, A. L., VIEIRA, M. R., CARLI, I. C., RISCH, D. H. Estudo de Leveduras Nacionais Imobilizadas na Redução de Derivados de Acetofenona. XXVI **Congresso Latinoamericano de Química**, Livro de Resumos, v. 1, p. QO309, 2004.
5. WENDHAUSEN Jr, R., RISCH, D. H., LEHMKUL, A.L. Redução da 4-Amino-Acetofenona Por *Saccharomyces cerevisiae* s. em sistema bifásico. XXVI **Congresso Latinoamericano de Química**, 2004, Salvador. Livro de Resumos. 2004. p. CT017.
6. LLANES, N., FERNANDES, P., LÉON, R., CABRAL, J. M. S., PINHEIRO, H. M. Conversion of β -sitosterol by *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 cells immobilized on Celite supports. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.11, p. 523-530, 2001.
7. WENDHAUSEN Jr. R., CRUZ, A., FRIGATO, M. E., PINHEIRO, H., FERNANDES, P., CABRAL, J. M. S. Chrysofile as a support for the immobilisation of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 cells for the bioconversion of beta-sitosterol in an organic-aqueous two-liquid phase system. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 32, p. 61-65, 2005.
8. NAKAMURA, K., INOUE, K., USHIO, K., OKA, S., OHNO Stereochemical control in yeast reduction of α -keto esters. Reduction by immobilized bakers' yeast in hexane. **Journal Of Organic Chemistry** 53, 2589-2593, 1988.
9. NAKAMURA, K., KONDO, S., KAWAI, Y., OHNO, A. Reduction by bakers' yeast in benzene. **Tetrahedron Letters** 32, 7075-7078, 1991.
10. NAKAMURA, K., KAWAI, Y., OHNO, A. Effect of heat treatment on the diastereoselectivity in the reduction with bakers' yeast. **Tetrahedron Letters** 32, 2927-2928, 1991.
11. NAKAMURA, K., NAKAJIMA, N., KAWAI, Y., OHNO, A. Method for controlling the enantioselectivity of reduction with bakers' yeast **Journal Of Organic Chemistry** 56, 4778-4783, 1991.
12. NAKAMURA, K., HIGAKI, M., USHIO, K., OKA, S., OHNO, A. Reduction of β -ceto esters by immobilized bakers' yeast. **Tetrahedron Lett.** 26, 4213-4216, 1985.
13. NAKAMURA, K., KAWAI, Y., OKA, S., OHNO, A. Reduction of β -ceto esters with bakers' yeast immobilized by magnesium alginate. **Tetrahedron Lett.** 30, 2245-2246, 1989.
14. CHRISTEN, M., GROUT, D. H. G. Enzymatic reduction of beta-cetoesters using immobilized yeasts. **International conference on bioreactors and biotransformations**. Gleneagles, Scotland, UK: 9-12, November 1987.
15. MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R., JOEKES, I., BRENELLI E. C. S., LEITE, R. A. Reduction of α -azidopropiophenone by immobilized baker's yeast. **Biocatalysis**, 9, 321-328, 1994.
16. SORRILHA, A. E. P. M., MARQUES, M., JOEKES, I., MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R. Reduction of phenylketones by immobilized bakers' yeast. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2 (2): 191-196 1992.
17. GÓDIA, F., CASAS, C., SOLÀ, C. Mathematical modelization of a packed-bed reactor performance with immobilized yeast for ethanol fermentation. **Biotech. Bioeng.** 30, 836-843, 1987.
18. MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R., JOEKES, I., BRENELLI E. C. S., LEITE, R. A. Reduction of α -azidopropiophenone by immobilized baker's yeast. **Biocatalysis**, 9, 321-328, 1994.
19. SORRILHA, A. E. P. M., MARQUES, M., JOEKES, I., MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R. Reduction of phenylketones by immobilized bakers' yeast. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2 (2): 191-196 1992.
20. WENDHAUSEN Jr, R., RISCH, D. H., HODAPP, M. J. Bioedução Da 4-Amino-Acetofenona Intermediada Por Células De *Saccharomyces cerevisiae* CCT 3174. Conduzida Em Regime Contínuo Em Biorreatores In: 28º Reunião anual da sociedade brasileira de química, 2005, Poços de Caldas, MG. p.042.
21. WENDHAUSEN, R., A., MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R., JOEKES, E. J. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 5, 69-73 1998.
22. WENDHAUSEN, R., Estudo Sobre Utilização De Crisotila Como Suporte De Células De *Saccharomyces Cerevisiae* Para Uso Em Processo Contínuo De Fermentação Alcoólica e Biorreduções. **Tese**, UNICAMP, Campinas, SP, 1998.
23. LEHMKUHL, A.L. Biorredução da 4-aminoacetofenona catalisada por células de *Saccharomyces Cerevisiae* sp. em sistema bifásico. **Dissertação**, FURB, Blumenau, SC, 2006.
24. SALOMON, A. L., RISCH, D. H., WENDHAUSEN, R. Seleção De Solventes Para Biocatálise Utilizando-Se Células De *Saccharomyces cerevisiae* CCT 3174, 30º **Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia, SP. 2007.