

## *Seleção de microorganismos com ação sobre compostos carbonilados gerando alcoóis quirais*

<sup>1,2</sup>Jean Ricardo Labes & <sup>1</sup>Renato Wendhausen

1. 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](mailto:renato@furb.br)

2. Bolsista programa PIBIC/FURB – 2006-2007.

---

**Resumo:** Nos últimos anos, o uso da biotransformação tem sido considerado um avanço na obtenção de substâncias enantiomericamente puras. O princípio geral desta técnica consiste na utilização de enzimas ou microorganismos em particular leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, provenientes do fermento de pão ou de linhagens purificadas (sp.). Os métodos que envolvem a utilização de biocatalises são em geral de baixo custo, pois envolvem condições suaves de temperatura e pressão e ainda geram afluentes de baixo ou nenhuma toxicidade. Trabalhos recentes mostram que a imobilização de microorganismos em crisotila, um argilo mineral de superfície hidroxilada, é capaz de promover boas biotransformações. O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo da biorredução do acetoacetato de etila por células de *Saccharomyces cerevisiae* sp. das linhagens CCT-3174, CCT-0294 CCT-0472, *Cândida oleophila* sp. CCT-7394 e células de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes do fermento de pão. Sendo utilizadas nas formas imobilizadas e livres. Os produtos das biotransformações foram quantificados e identificados por espectros de infravermelho, apresentando a banda característica de álcool em torno de 3500cm<sup>-1</sup>. Foi observada a biorredução do acetoacetato com todas as linhagens testadas. Os melhores rendimentos químicos foram obtidos com microorganismos provindos do fermento de pão, alcançando 25%.

**Palavras-chave:** biotransformação, *Saccharomyces cerevisiae*, biorredução, acetoacetato de etila, crisotila.

---

### 1. Introdução

A biocatálise está relacionada às transformações de compostos através do metabolismo dos seres vivos. Estas biotransformações ocorrem com alta especificidade e eficiência por serem catalisadas por enzimas.

As enzimas são constituídas basicamente de L-amino ácidos ligados covalentemente numa seqüência definida. A estrutura denominada de sítio ativo é formada de uns poucos amino ácidos, e tem o papel de se ligar diretamente ao substrato e catalisar a reação específica de uma determinada enzima. A forma espacial como o substrato se liga à enzima, determina a formação de um estereoisômero como único produto. As vantagens do uso de biotransformações sobre transformações químicas convencionais tem sido discutida na literatura <sup>1</sup>.

Muitos fatores foram levados em conta na escolha do biocatalisador (enzimas isoladas, células inteiras, organelas etc.). Por exemplo, se o produto desejado é convertido através de uma seqüência enzimática e

não da atuação de uma única enzima, é conveniente utilizar um microrganismo que possua essa seqüência em seu metabolismo (ex. Produção de etanol via fermentação de glicose por *Saccharomyces cerevisiae*), pois a presença de várias enzimas colocadas para reagir de forma aleatória podem resultar em reações colaterais que dificultam a separação do produto desejado. Uma relação de vantagens e desvantagens na utilização de enzimas ou células, está sumarizada na Tabela 1 <sup>2</sup>.

A exigência de compostos enantiomericamente puros cresceu muito nas últimas décadas, levando a uma intensa pesquisa na área de biocatálise <sup>3,4,5</sup>. A área de fármacos quirais em especial, tem desenvolvido projetos que ganharam maturidade a nível industrial <sup>6,7,8</sup>. A redução de cetonas pró quirais intermediada por biocatalisadores é um dos meios mais usados para se obter compostos quirais enantiomericamente enriquecidos<sup>9</sup>. Neste processo estão implicadas as desidrogenases que são enzimas dependentes da coenzima

NADH ou NADPH. A coenzima, cuja estrutura pode ser vista na Figura 1, é responsável pela adição do hidreto à carbonila, com alta estereoespecificidade. O cofator possui dois hidrogênios diastereotópicos com a mesma capacidade de serem transferidos. A estrutura da enzima implicada no processo e, portanto, sua ligação ao substrato, determina o hidrogênio a ser transferido a uma determinada face do substrato.

**Tabela 1** - Vantagens e desvantagens no uso de enzimas isoladas ou células inteiras como sistema biocatalítico.

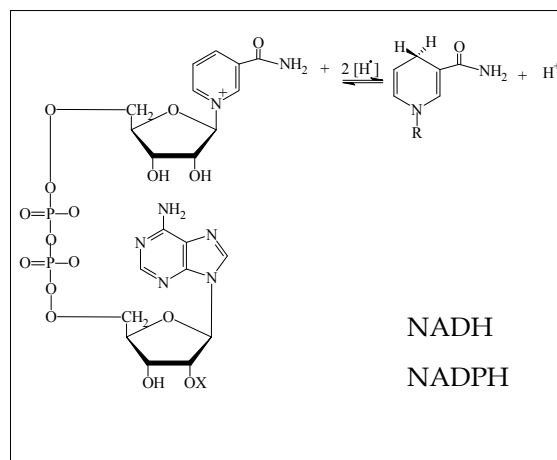
| Sistema          | Vantagens   | Desvantagens  |
|------------------|---|---|
| Células inteiras | - Baixo custo.<br>- Co-fatores presentes.<br>- Possuem várias enzimas.  | - Requer grande controle microbiológico.<br>- O processo envolve grandes quantidades de água para extração de produtos. |
| Enzimas isoladas | - Aparatos simples.<br>- Processo fácil de controlar e monitorar.<br>- Produz apenas a reação desejada.<br>- Solventes e co-solventes bem tolerados.<br>- Fácil de separar produtos | - Alto custo.<br>- Requerem muitas vezes adição de co-fatores.  |

As enzimas podem ser usadas na forma purificada ou extrato cru, ou ainda fazendo parte de células inteiras (leveduras). Os dois sistemas mais usados são células de *Saccharomyces cerevisiae* de fermento de pão comercial e alcooldehidrogenases purificadas. O uso de enzimas purificadas, no entanto, implica no alto custo do cofator que está na faixa de US\$ 500 por ml de NAD a US\$ 200.000 por ml de NADPH<sup>10</sup>. Este cofator pode ser regenerado<sup>11</sup>, mas este processo é igualmente caro e de difícil controle.

A utilização de *Saccharomyces cerevisiae* para síntese assimétrica tem sido explorada continuamente<sup>12</sup>. A grande vantagem deste sistema é a capacidade de regeneração do cofator NADH através do próprio metabolismo celular. O fermento de pão em especial é de baixo custo e muito disponível no mercado, fácil de manusear e é capaz de converter uma grande variedade de substratos não naturais<sup>13,14</sup>.

O problema da utilização de fermento de pão, entretanto, é que as células, geralmente providas de várias linhagens, possuem em geral várias desidrogenases com diferentes interações com o

substrato. Isto pode levar a uma diminuição do excesso enantiomérico obtido, além da formação de produtos secundários indesejáveis<sup>15</sup>.



**Figura 1** - Estrutura da nicotinamida adenina dinucleotídeo.

Nakamura e colaboradores tem estudado um maior controle estereoquímico nas biorreduções com fermento de pão, através de modificação nas condições reacionais<sup>16</sup>. Os métodos mais eficientes estão entre o uso de meios não convencionais<sup>17,18</sup> (solventes orgânicos), controle de temperatura e Ph<sup>19</sup> adição de certos inibidores específicos<sup>20</sup> a imobilização das células em suporte apropriado<sup>21,22</sup>. Trabalhos com redução por células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato e celite<sup>23</sup> 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<sup>24,25</sup> como suportes, obtiveram igualmente aumentos no excesso enantiomérico acrescidos de um substancial aumento no rendimento químico.

A crisotila é um argilomineral, originado a partir de rochas ultrabásicas ou de calcário dolomítico, via transformações hidrotermais<sup>26</sup> Sua fórmula química é  $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$ , apresentando a forma de um silicato lamelar. Sua estrutura consiste de uma camada de sílica tetraédrica (tridimita) coberta com uma camada de hidróxido de magnésio (brucita) como pode ser visto na Figura 2. Como estas duas camadas possuem dimensões diferentes, ocorre uma distorção na estrutura levando ao encurvamento da camada composta brucita tridimita, com os componentes tetraédricos do lado de dentro da curvatura.

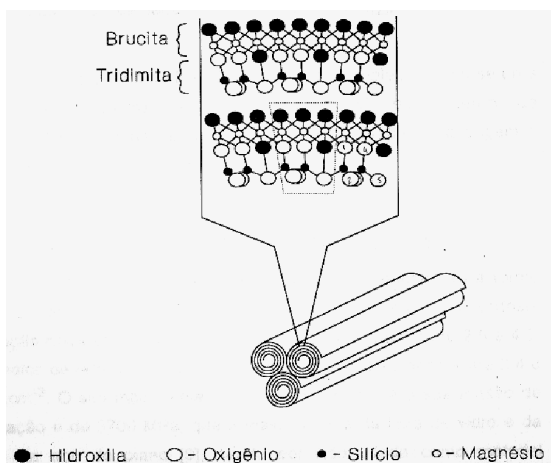


Figura 2 - Estrutura da crisotila.

Como consequência desta curvatura, a lamela dupla se enrola, conferindo a crisotila uma morfologia tubular ou fibrosa, onde a parte externa é constituída pelo hidróxido de magnésio, formando o chamado "tapete de hidroxilas".

A crisotila tem sido usada há muito tempo na indústria de fibrocimento em grande escala. Recentemente, entretanto, tem sido estudado o seu aproveitamento como suporte para catalisadores inorgânicos na oxidação de compostos orgânicos e reações de alquilação de Friedel-Crafts<sup>27,28</sup>

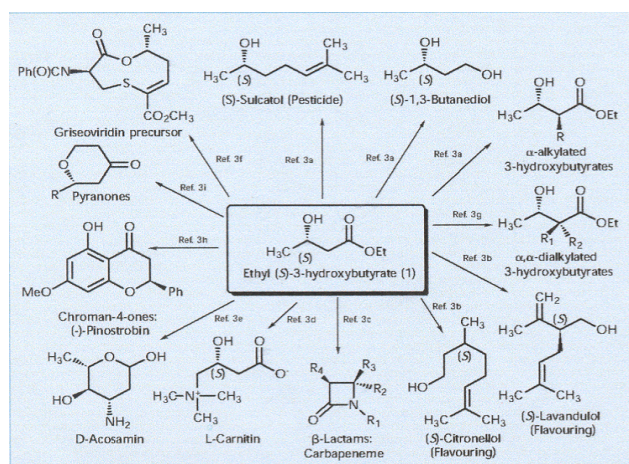


Figura 3- Aplicação industrial do etil-(S)-3-hidroxi-butarato de etila<sup>40</sup>.

Também tem sido utilizada como suporte para biocatalisadores<sup>29</sup> (células e enzimas) em processos de fermentação alcoólica<sup>30,31</sup>, biorreduções<sup>32,33</sup>, hidrólise da sacarose<sup>34</sup>, como suporte para reatores de empacotamento<sup>35</sup> e em biocatálise em sistemas bifásicos com solventes orgânicos<sup>36</sup>. Estes estudos são baseados no fato da crisotila apresentar uma grande área superficial (14 m<sup>2</sup>/g), uma alta densidade de sítios básicos (sítios de Lewis: 3,8.10<sup>-17</sup> OH.m<sup>-2</sup>) e um potencial zeta positivo entre pH 3 e 12. Além disto a crisotila é um material de baixo custo e extremamente abundante na crosta terrestre.

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo da biorredução do acetoacetato de etila por células de *Saccharomyces cerevisiae* sp. das linhagens CCT-3174, CCT-0294 CCT-0472, *Cândida oleophila* sp. CCT-7394 e células de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes do fermento de pão. Sendo utilizadas nas formas imobilizadas e livres. O composto acetoacetato de etila (precursor) foi selecionado devido a sua potencial aplicação na forma reduzida 3-(S) hidroxi-butarato de etila (Composto 1 da Figura 3) como produto de partida para uma série de compostos de interesse industrial<sup>40</sup> como pode ser visto na Figura 3.

## 2. Material e Métodos

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

### - Microorganismos

Os microorganismos utilizados foram: *Saccharomyces cerevisiae* sp. das linhagens CCT-3174, CCT-0294 CCT-0472, *Cândida oleophila* sp. CCT-7394 e células de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes do fermento de pão. As linhagens foram fornecidas na forma liofilizadas em ampolas, pela Fundação Tropical de Pesquisas André Toselo de Campinas/SP e tratadas como descrito a seguir.

### - Reativação

- Preparação dos meios nutrientes e meios de manutenção dos microorganismos (YMA) extrato de malte 3 g/L, Extrato de Levedura 3 g/L, Peptona 5g/L, D-glucose 10g/L e Agar 20 g/L.
- Colocação dos meios em placas de petri e tubos de agar inclinados (slants)
- Abertura das ampolas e reativação dos microorganismos liofilizados.
- Inoculação dos microorganismos reativadas nos meios de manutenção.

### - Inóculo

Foi produzido com uma solução de peptona bacteriológica 5 g/L, D-glucose 10 g/L, extrato de malte 3 g/L e extrato de levedura 3 g/L. Foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 120<sup>o</sup> C e introduziu-se as células de leveduras para crescimento.

### - Meio de crescimento

O meio de crescimento foi realizado com uma solução de peptona bacteriológica 5 g/L, D-

glucose 10 g/L, extrato de malte 3 g/L e extrato de levedura 3 g/L. O meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 120° C. Após esfriar foi introduzido as células que estavam no inoculo.

-Desenvolvimento do microorganismo 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 microorganismo reativado
- Manutenção dos meios inoculados em incubadora 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.

- Imobilização das células

Em 6 erlenmeyers de 250 ml foram dispersos 1 grama de crisotila em 100 ml de água sob agitação magnética por 30 minutos. Os erlenmeyers foram vedados com algodão e então autoclavados a 120° C por 20 minutos. Após resfriamento dos mesmos foi adicionada a cada erlenmeyer em torno de 1 grama de células previamente crescidas como descrito acima. O sistema foi então mantido sob agitação orbital em chaquer rotatório a 130 RPM durante 1 hora a 25° C. As células assim imobilizadas foram passadas assepticamente por peneira tyler 250 e então mantidas sob refrigeração por no máximo 4 horas antes de serem utilizadas nas biotransformações descritas a seguir.

- Preparo do meio de biotransformação

Em um erlenmeyer, foi colocado em torno de 0,5g do precursor (acetoacetato de etila) 2g de glicose ou sacarose como fonte de carbono juntamente com 200mL de água destilada. O sistema foi submetido à agitação magnética por 20 minutos para se obter o máximo de dispersão do precursor. O sistema foi então devidamente fechado com algodão e autoclavado por 20 minutos a 120° C. Logo após o resfriamento, foi adicionada a crisotila contendo o microorganismo descrito no item anterior. O erlenmeyer com todo o meio preparado foi colocado em banho tesmostatizado com agitação orbital com temperatura controlada de 28°C e agitação de 100 rpm, por um período de 24h.

- Processos de extração/purificação

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) utilizando um funil de separação em forma de pêra. Foi utilizado o éter etílico para evitar a formação de emulsão que pode dificultar o processo de extração, devido a seu baixo ponto de ebulição (35°C), tornando sua remoção extremamente fácil. Foram feitas extrações com pelo menos três porções de solvente.

Após a extração no funil de separação, a solução etérea foi seca com MgSO<sub>4</sub>. Após filtração dos resíduos de MgSO<sub>4</sub> a mistura foi submetida a um evaporador rotatório para se eliminar o solvente obtendo-se desta forma o extrato bruto da biotransformação.

- Caracterização dos Compostos obtidos

Os compostos obtidos foram caracterizados por técnicas de infra vermelho em equipamento marca Shimadzu modelo Prestige 21. O excesso enantiomérico foi determinado por rotação óptica em polarímetro Carl Zeiss da Polamat e comparado com dados da literatura.

- Cálculo do Rendimento Químico

O rendimento químico foi calculado tendo como base a massa inicial de precursor e a massa de produto formado.

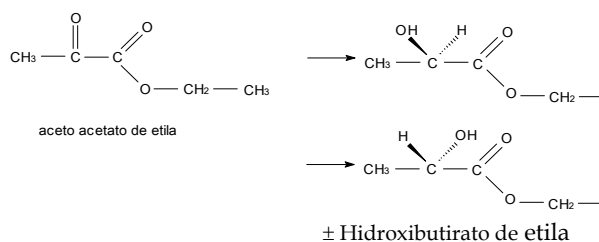
- Avaliação das células imobilizadas após a biotransformação

As células imobilizadas após a biotransformação foram retiradas do meio fermentado por filtração e então analisadas quanto à massa de células remanescente, viabilidade celular, análise microscópica e reutilização das mesmas numa etapa semelhante de biotransformação como descrita acima, apenas utilizando as mesmas células e avaliando a capacidade destas em realizar a biotransformação.

### 3. Resultados e Discussão

O precursor abaixo foi testado com os microorganismos já mencionados com finalidade de obtenção do hidroxibutirato de etila.

Todos os microorganismos testados foram eficazes na biorredução do acetoacetato de etila. Ocorreram algumas variações de rendimento como mostra a tabela a seguir.



**Tabela 2** – Rendimentos obtidos para as biorreduções com células livres.

| Microorganismo                | Precursor             | Rendimento(%) |
|-------------------------------|-----------------------|---------------|
| <i>Saccharomyces</i> CCT-0294 | Acetoacetato de etila | 5 - 10        |
| <i>Saccharomyces</i> CCT-3174 | Acetoacetato de etila | 5 - 10        |
| <i>Saccharomyces</i> CCT-0472 | Acetoacetato de etila | 5 - 10        |
| <i>Cândida</i> CCT-7394       | Acetoacetato de etila | 15 - 20       |
| Fermento biológico            | Acetoacetato de etila | 20 - 30       |

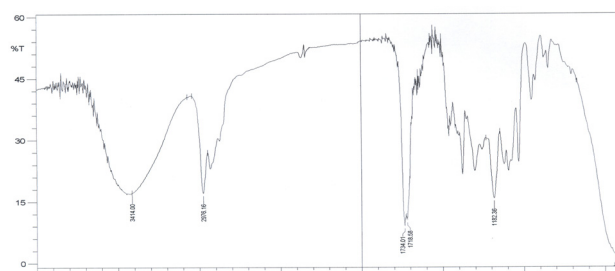
O menor rendimento encontrado para o sistema com células imobilizadas pode estar relacionado a limitações difusionais oferecida pelas células imobilizadas.

**Tabela 3** – Rendimentos obtidos para as biorreduções com células imobilizadas.

| Microorganismos               | Precursor             | Rendimento(%) |
|-------------------------------|-----------------------|---------------|
| <i>Saccharomyces</i> CCT-0294 | Acetoacetato de etila | 3 - 5         |
| <i>Saccharomyces</i> CCT-3174 | Acetoacetato de etila | 3 - 5         |
| <i>Saccharomyces</i> CCT-0472 | Acetoacetato de etila | 5 - 10        |
| <i>Cândida</i> CCT-7394       | Acetoacetato de etila | 5 - 10        |
| Fermento biológico            | Acetoacetato de etila | 10 - 15       |

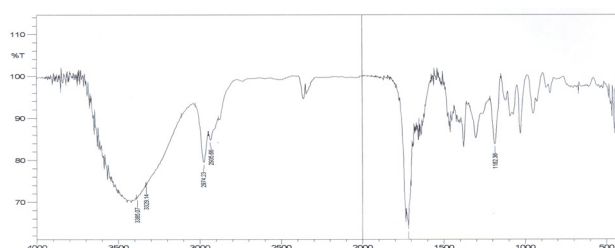
Foi alcançado um rendimento superior com o fermento de pão em células livres, pois foram utilizadas quantidades superiores de células no meio de biotransformação.

O espectro de infravermelho desse precursor demonstrou a biorredução e, logo a formação do álcool cuja banda de deformação axial de O-H ligada a carbono secundário pode ser vista em torno de 3500 cm<sup>-1</sup> (Figuras 4 e 5)



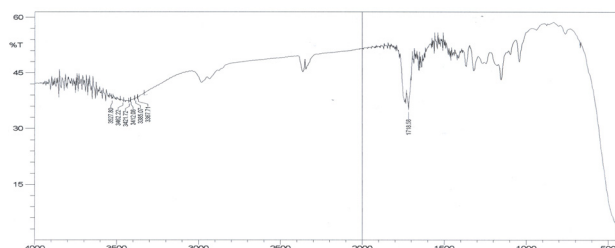
**Figura 4** – Espectro de infravermelho para fermento biológico com células livres.

Para o mesmo fermento, células imobilizadas em crisotila não demonstraram o mesmo rendimento. Mas evidenciaram uma ótima biorredução.



**Figura 5** – Espectro de infravermelho para fermento biológico com células imobilizadas.

A biotransformação foi realizada, pois a banda característica de álcool ficou bastante evidenciada quando comparamos com o espectro do precursor padrão, (Figura 6).



**Figura 6** – Espectro de infravermelho para aceto acetato de etila (padrão).

Segundo BORZANI (2001), as medidas de massa de matéria celular seca têm sido mais utilizadas para verificar o crescimento celular microbiano, pois fornecem dados precisos e proporcionais à quantidade de biomassa. Este tipo de procedimento é realizado quando não é necessário determinar o número preciso de microrganismos presentes.

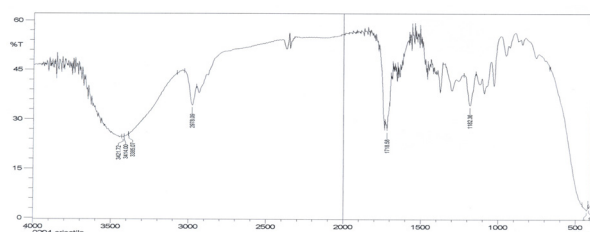
Com o propósito de avaliar o crescimento celular das linhagens *Cândida oleophila* e *Saccharomyces cerevisiae*, foi calculado o peso seco das células em meio imobilizado conforme tabela abaixo.



**Tabela-4.** Determinação dos pesos secos com microorganismos imobilizados.

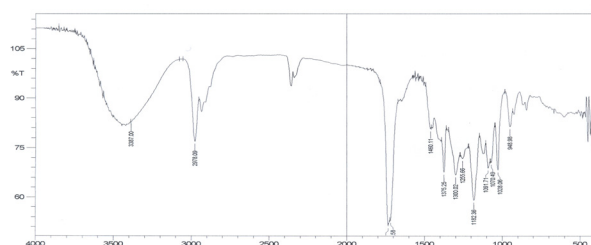
| Microorganismos                          | Massa Celular (g/L) |
|--|---------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT-0294 | 11,92               |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT-3174 | 12,91               |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT-0472 | 10,9                |
| <i>Cândida oleophila</i> CCT-7394        | 11,05               |

Os espectros de infravermelho confirmam as biorreduções das linhagens supra citadas.

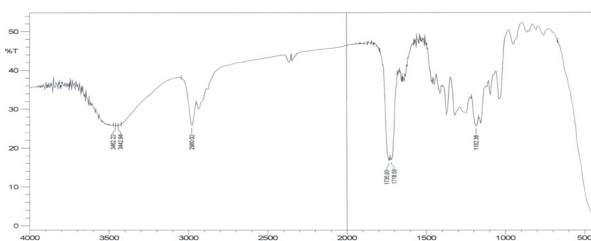


**Figura 7-** Espectro de infravermelho com *Saccharomyces cerevisiae* CCT-0294.

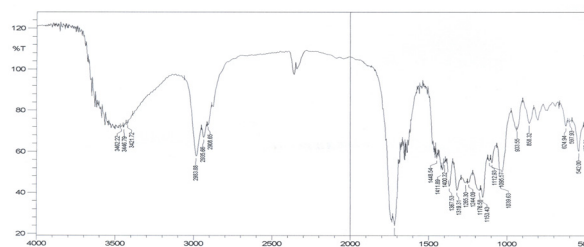
Foram obtidos resultados positivos para as linhagens *Saccharomyces cerevisiae*, *Cândida oleophila* e fermento biológico. No entanto não foram obtidos resultados satisfatórios de rendimento para as linhagens CCT.



**Figura 8-** Espectro de infravermelho com *Saccharomyces cerevisiae* CCT-3174.



**Figura 9-** Espectro de infravermelho com *Saccharomyces cerevisiae* CCT-0472.



**Figura 10 -** Espectro de infravermelho com *Cândida oleophila* CCT-7394.

## 4. Conclusão

A metodologia utilizada para a biorredução do acetoacetato mostrou-se eficiente na obtenção de álcoois quirais.

Os microorganismos provenientes do fermento biológico foram os que apresentaram maior rendimento.

Os rendimentos superiores são aqueles em que as células estão livres.

Os espectros de infravermelho se mostraram mais consistentes para microorganismos imobilizados em crisotila.

## 5. Agradecimentos: PIBIC/CNPq.

## 6. Referências

- TRAMPER, J. Chemical versus biochemical conversion: when and how to use biocatalysts *Biotec. Bioeng.* 52 (2): 345-376, 1996.
- DAVIES, H. G., GREN, R. H., KELLY, D. R., ROBERTS, S. M. Biotransformations in preparative organic chemistry. 1ª ed. London, Academic Press, 268 p. 1989.
- CHEETHAM, P. S. J. Biotransformations: New routes to food ingredients. *Chem. and ind.* 7, 265-268, 1995.
- HGEDORN, S., KAPHAMMER, B. Microbial biocatalysis in the generation of the flavor and fragrance chemicals. *An. Rev. Microbiol.* 48, 773-800, 1994.
- KULLA, H. G. Enzymatic hydroxylation in industrial applications. *Chimia.* 45 (3): 81- 85, 1991.
- FEDERSEL, H. J. Drug chirality-scale-up, manufacturing, and control. *Chemtech.* 23 (12): 24-33, 1993.
- STINSON, S. C. Chiral drugs. *Chem. And Eng. News* 20, 38-70, 1997.
- CHAN, A. S. A new route to important chiral drugs. *Chemtech* 3 (3): 45-51, 1993.
- FABER, K. Biotransformations in organic chemistry. 3ª ed. Berlin, Springer Verlag, 160-187, 1997.
- WONG, C. H., WHITESIDES, G. M. Enzymes in synthetic organic chemistry. 1ª ed. Oxford, Pergamon, 1994.
- BRENELLI, E. C. S. Redução de alguns compostos carbonílicos derivados de fenil cetonas empregando-se fermento de pão. Tese de Doutorado, Campinas, SP, 1994.

12. SERVI, S. Bakers' yeast as a reagent in organic synthesis *Synthesis* 1-25, **1990**; b) SANTANIELLO, E., FERRABOSCHI, P., GRISENTI, P., MANZOCCHI, A. *Chem. Rev.* 92, 1071-1110, **1992**.
13. CSUK, R., GLÄNZER, B.I. Baker's Yeast mediated transformation in organic chemistry. *Chem. Rev.* 91(1): 49-97, **1991**.
14. TURNER, N. Biocatalytic reductions. *Chem. and Ind.* 15, 592-595, **1994**.
15. FANTIN, G., FOGAGNOLO, M., GUERZONE, M. E., MEDICE, A., PEDRINE, P., POLI, S. Stereochemical control in Bakers' yeast redox biotransformation of aryl methyl ketones and carbinols. *J. Org. Chem.* 59, 924-925 **1994**.
16. NAKAMURA, K. Stereochemical control in microbial reduction. *Synthesis* 389-398 **1992**.
17. NAKAMURA, K., INOUE, K., USHIO, K., OKA, S., OHNO. Stereochemical control in yeast reduction of  $\alpha$ -keto esters. Reduction by immobilized bakers' yeast in hexane. *J. Org. Chem.* 53, 2589-2593, **1988**.
18. NAKAMURA, K., KONDO, S., KAWAI, Y., OHNO, A. Reduction by bakers' yeast in benzene. *Tetrahedron Lett.* 32, 7075-7078, **1991**.
19. NAKAMURA, K., KAWAI, Y., OHNO, A. Effect of heat treatment on the diastereoselectivity in the reduction with bakers' yeast. *Tetrahedron Lett.* 32, 2927-2928, **1991**.
20. NAKAMURA, K., NAKAJIMA, N., KAWAI, Y., OHNO, A. Method for controlling the enantioselectivity of reduction with bakers' yeast. *J. Org. Chem.* 56, 4778-4783, **1991**.
21. NAKAMURA, K., HIGAKI, M., USHIO, K., OKA, S., OHNO, A. Reduction of  $\beta$ -ceto esters by immobilized bakers' yeast. *Tetrahedron Lett.* 26, 4213-4216, **1985**.
22. NAKAMURA, K., KAWAI, Y., OKA, S., OHNO, A. Reduction of  $\beta$ -ceto esters with bakers' yeast immobilized by magnesium alginate. *Tetrahedron Lett.* 30, 2245-2246, **1989**.
23. CHRISTEN, M., GROUT, D. H. G. Enzymatic reduction of beta-cetoesters using immobilized yeasts. Internacional conference on bioreactors and biotransformations. Gleneagles, Scotland, UK: 9-12, November **1987**.
24. MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R., JOEKES, I., BRENELLI E. C. S., LEITE, R. A. Reduction of  $\alpha$ -azidopropiophenone by immobilized baker's yeast. *Biocatalysis*, 9, 321-328, **1994**.
25. 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**.
26. PARIZOTTO JR., O. Crisotilas brasileiras: caracterização dos sítios superficiais por cromatografia inversa, microscopia de força atômica e espectroscopia no infravermelho. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, SP, **1995**.
27. PINHO, R. O., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S., JOÉKES, I. Chrysotile-Suported transition metal salts as Friedel-Crafts catalysts. *J. Braz. Chem. Soc.* 6 (4): 373-376, **1995**.
28. ZUCCHETTI, R., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S., JOEKES, I. MnO<sub>2</sub> suportado em crisotila brasileira. 8<sup>o</sup> Seminário Brasileiro de Catalise. 166-173, Nova Friburgo, RJ, 13 a 15 setembro **1995**.
29. PARIZOTTO JR., O. Crisotilas naturais brasileiras: ativação da superfície e aplicação na imobilização de biocatalisadores. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, SP, **1989**.
30. O. PARIZOTTO Jr., COMERLATO M. H., PEDROSO P. R., MORAN, P. J. S., CARVALHO, M., JOEKES I., Pat. BR PI8.903.849-5, **1989**.
31. JOEKES, I., MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R., WENDHAUSEN Jr., R., TONELLA, E. CASSIOLA, F. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized onto chrysotile fibers for ethanol production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* V. 73, 58-58, **1998**
32. BRENELLI, E. C. S., CARVALHO, M., OKamoto, M. T., MARQUES, M., MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R., SORRILHA, A. E. P. M. Enantioselective synthesis of (R)-(-)-1 phenyletanolamines using baker's yeast reduction of some  $\alpha$ -substituted methyl phenyl ketones. *Ind. J. Chem.* 31 B, 821-823, **1992**.
33. CARVALHO, M., OKAMOTO, M. T., MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R. Baker's yeast reduction of  $\alpha$ -haloacetophenones. *Tetrahedron.* 47 (12/13): 2073-2080, **1991**.
34. COMERLATO, M. H. Imobilização de enzimas no suporte crisotila. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, SP, **1995**
35. WENDHAUSEN, R., FREGONESI, A., MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R., JOEKES, I. TONELLA, E. *J. Biosc. And Bioeng.* 1, 48 - 52. **2001**
36. WENDHAUSEN Jr. R., FERNANDES, P., CRUZ, A., PINHEIRO, H. M., CABRAL, J. M. S. Chrysotile As A Support For Immobilization Of *Mycobacterium* Sp. Cells For Bioconversion Of  $\beta$ -Sitosterol In A Non Conventional Medium. BIOCOT 2002 1<sup>o</sup> Internacional Congress on Biocatalysis. Hamburg, Germany, 28-31 July, **2002**.
37. 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 de Doutorado, UNICAMP, Campinas, SP, **1998**.
38. WENDHAUSEN, R., A., MORAN, P. J. S., RODRIGUES, J. A. R., JOEKES, E. J. *Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5, 69-73 **1998**
39. WENDHAUSEN Jr. R., MORAN, P. J. S., JOÉKES, I., RODRIGUES, J. A. R. Continuous process for large-scale preparation of chiral alcohols with baker's yeast immobilized on chrysotile fibers. BIOTRANS'97 3<sup>o</sup> Internacional Symposium on Biocatalysis and Biotransformations. La Grande Motte (France) 22-26 september **1997**.
40. ROSEN, T. C., DAUSSMANN, T. Biorreduction forms optically active 3-hidroxiesters. *Speciality chemicals magazine*, 30-40, April 2004.