

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA Tese
DEFENDIDA EM 13/11/95 POR RICARDO DE SOUZA PEREIRA
E APROVADA PELA COMISSÃO JULGADORA.

Nelson Durán

07/11/95

TESE DE DOUTORADO

"Fermento Biológico de Padaria (*Saccharomyces cerevisiae*): Aspectos Bioquímicos e Morfológicos e a Influência deles em Síntese Orgânica Assimétrica."

Candidato: Ricardo de Souza Pereira

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Campinas, São Paulo

1995



UNIDADE	IQ
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	P414F
V.	
TEMP.	26.508
PREC.	667/96
	0 0 x
PREC.	88.11,00
DATA	17/02/96
Nº CPD	

CM 000 82495-8

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

Pereira, Ricardo de Souza

P414f Fermento biológico de padaria (*saccharomyces cerevisiae*) : aspectos bioquímicos e morfológicos e a influência deles em síntese orgânica assimétrica / Ricardo de Souza Pereira. -- Campinas, [SP : s.n.], 1995.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Síntese orgânica assimétrica. 3. Microscopia de força atômica. I. Durán Caballero, Nelson Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título

Este trabalho é dedicado em memória da minha mãe, Anísia Maria de Souza Pereira, que tanto lutou para que eu pudesse estudar, e que deu-me seu apoio no início deste trabalho. Em memória de meu pai, Wilson Pereira, apesar de tantos encontros e desencontros. À Cássia Helena, pelo carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por iluminar meu caminho e dar-me forças e esperanças para continuar.

Ao Prof. Dr. Nelson Durán por sua valiosa orientação e pelo exemplo de seriedade como pesquisador.

Ao Prof. Dr. Washington Luís Tafuri e ao Prof. Elísio Evangelista por acreditarem em mim em meus primeiros passos.

À Prof^a. Dr^a. Nilce C. Meirelles pela colaboração e pela troca de idéias.

Ao Prof. Dr. Vitor Baranauskas pelo uso do microscópio de força atômica.

À Alice pela ajuda indispensável no início deste trabalho.

Aos amigos, Inês Juliana, Armando Semedo Mendes, William e Carlos Augusto Martinazzo por seus sinceros laços de amizade e atenção.

Aos amigos Roger, Daniel, Márcia, Sônia, Valderez, André, Patrícia, Ângela, Cristina, Mariza e Mauro pelo apoio e amizade.

À Bibliotecária Célia Maria Ribeiro por sua amizade e colaboração técnica.

Aos demais colegas do Laboratório de Química Biológica pelo incentivo e amizade.

Aos funcionários e amigos dos Departamentos de Química Orgânica e Bioquímica que direta ou indiretamente deram-me seu apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Gostaria de agradecer à Sr. e Sra. Jair e Catarina Martinazzo, ao Sr. Álvaro e Sra. Bruna Giardini, aos amigos Dr. Ney Omar Batalha Gomes (*in memorian*) e Dr. Salvador Geraldo Ferrari pela ajuda e compreensão dada nestes últimos anos, sem os quais eu não teria conseguido terminar este trabalho. À minha professora do primeiro ano primário, Onísia Maria Guimarães, por ensinar-me a ler e escrever. À Dona Helena, pelas longas horas de conversa.

Gostaria também de agradecer à Senhorita Maggie Machado Valadão e ao Prof. Dr. Fred Yukio Fujiwara pela ajuda na correção do inglês dos trabalhos que foram enviados para publicação e à Profa. Maria das Dores Pereira pelas correções gramaticais da língua portuguesa deste trabalho e da revisão que foi submetida para publicação.

GLOSSÁRIO DAS SIGLAS USADAS NO TEXTO:

NAD(P)H.....representação de que existem moléculas de NADPH e NADH no meio.

NADH.....nucleotídeo de adenina na forma reduzida.

NADPH.....nucleotídeo de adenina fosfato na forma reduzida.

NAD(P)⁺.....representação de que existem moléculas de NADP⁺ e NAD⁺ no meio.

NAD⁺.....nucleotídeo de adenina na forma oxidada.

NADP⁺.....nucleotídeo de adenina fosfato na forma oxidada.

F.P.....fermento biológico de padaria

M.F.A.....microscopia de força atômica

nm.....nanômetros (10^{-9} metros)

Å.....Angstrons (10^{-7} metros)

N.....Newton (unidade de força)

nN.....nanoNewtons (10^{-9} Newtons)

ACAC.....acetoacetato

E.C.enzymes commission

RESUMO

Fermento biológico de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) está se tornando um importante reagente para síntese orgânica assimétrica. Entretanto, em muitas ocasiões, existem problemas com a reprodutibilidade experimental que são, em geral, devido às diferentes origens do fermento biológico de padaria. A fim de explicar estas diferenças, a redução de NAD(P)^+ foi medido no interior destas células vivas. O método pode selecionar células com melhor poder redutor em um curto período de tempo. A variação na redução de NAD(P)^+ no interior das células com fatores externos, tais como pH e temperatura, foi medida. Os resultados mostram que cepas japonesas e holandesas são sensíveis a estes fatores e as brasileiras não. Outro aspecto estudado foi a adição de compostos que inibem algumas desidrogenases e seus efeitos na produção de NAD(P)H e o possível mecanismo de ação deles.

A medida de NAD(P)H é um bom método para identificar um tipo de célula mais adequada para usar em biotransformações, conseguindo um resultado mais reprodutível.

Foram feitas imagens no microscópio de força atômica (MFA) das cepas de fermento biológico de padaria. As imagens, obtidas de amostras não fixadas

e não cobertas, são reprodutíveis com alto contraste e alta resolução (a nível de nanômetros). Moléculas da superfície polissacarídica da parede celular foram micrografadas e a distância entre átomos medida. O modo de preparar as amostras foi fácil e simples, sugerindo que MFA é uma ferramenta útil neste tipo de análise.

ABSTRACT

Baker's yeast is becoming an important reagent for organic synthesis. However, in many occasions, there are problems with the experimental reproducibility which in general are due to the different origins of baker's yeasts. In order to explain these differences, NAD(P)⁺ reduction inside intact living cells from different strains were measured. The method can select cells with better reduction power in a short period of time. The variation in the production of NAD(P)H in the interior of these living cells with external factors such as temperature and pH was measured. The results show that Japanese and Dutch strains are sensible to these factors and Brazilian strains are not. Another aspect studied was the effect of compounds known to inhibit some dehydrogenases and their effects on NAD(P)H production and the possible mechanism of action of them.

The measuring of NAD(P)H is a good method to identify one type of cell more adequate to use in biotransformations getting a result more reproducible.

The strains of baker's yeast were imaged with an atomic force microscope (AFM). The images of uncoated and non-fixed samples were reproducible with high-contrast and nanometer-resolution. Molecules from the

polysaccharide surface of the cell wall were pictured and the distance of atoms was measured. The preparation of samples was easy, suggesting that AFM is an useful tool in these type of analysis.

ÍNDICE

Dedicatória.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Agradecimentos Especiais.....	iv
Glossário das siglas utilizadas no texto.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	viii
PARTE I.....	1
I. 1. Introdução.....	2
I. 1.1. Importância da Quiralidade.....	2
I. 1.2. Sínteses Assimétricas.....	7
I. 1.3. Biotransformação.....	11
I. 1.4. Objetivos.....	34
I. 2. Materiais e Métodos.....	35
I. 3. Resultados e Discussão.....	41

PARTE II

II. 1. Introdução.....	62
II. 1.1. O Microscópio de Força Atômica.....	62
II. 2. Resultados e Discussão.....	66
 REFERÊNCIAS.....	 80
ANEXOS.....	97

PARTE I

Saccharomyces cerevisiae e seu uso em sínteses assimétricas

I. 1. Introdução

I. 1.1. Importância da Quiralidade

I. 1.2. Sínteses Assimétricas

I. 1.3. Biotransformação

I. 1.4. Objetivos

I. 2. Materiais e Métodos

I. 3. Resultados e Discussão

I. 1. INTRODUÇÃO

I. 1.1. 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 interação (Greenberg, 1979). Para o último é obrigatoriamente necessário que a substância tenha um certo grau de volatilidade, para que na forma gasosa possa encontrar receptores que estimule 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 láctico (Morrison & Boyd, 1990), 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

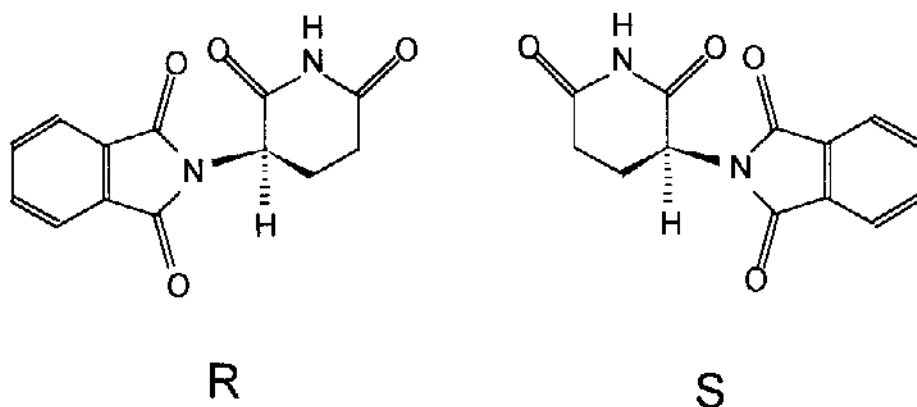
de tumor foi mais significativa pelo "l" do que pelo "d", existindo a evidência que a resposta biológica a cristais sólidos enantiomorfos pode diferir (Ebbesen, 1991). Diante desta informação, pode-se concluir que deva existir receptores específicos nas membranas das células (ou em organelas no seu interior) que são ativadas (ou sensibilizadas) pela atuação dos cristais de uma determinada conformação, levando a transmissão de mensagens errôneas e ao aparecimento do tumor (Ebbesen, 1991).

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 (Fig. 1) que foi a primeira droga quiral em que estas propriedades foram descobertas. Um dos enantiômeros causa defeitos de má formação do feto, enquanto que 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 gravidez (Stinson, 1994).

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 mercado (Stinson, 1994).

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 (ver figura 1).



TALIDOMIDA

Figura 1

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 AIDS (Stinson, 1994). 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 humano (Stinson, 1994).

Na figura 3 foram colocados outros dois exemplos de fármacos que são vendidos na forma racêmica. No caso da carnitina é necessário ter sempre um

estereoisômero puro. Porém, isto não é verificado a nível comercial (Bare *et al.*, 1991; Stinson, 1992), sendo que a maioria dos medicamentos se encontram na forma racêmica, devido a separação desta mistura não ser simples (Stinson, 1992) (Ver Fig. 3). Nos Estados Unidos, cerca de 20% das drogas comercializadas estão na forma de um enantiômero puro (Stinson, 1994):

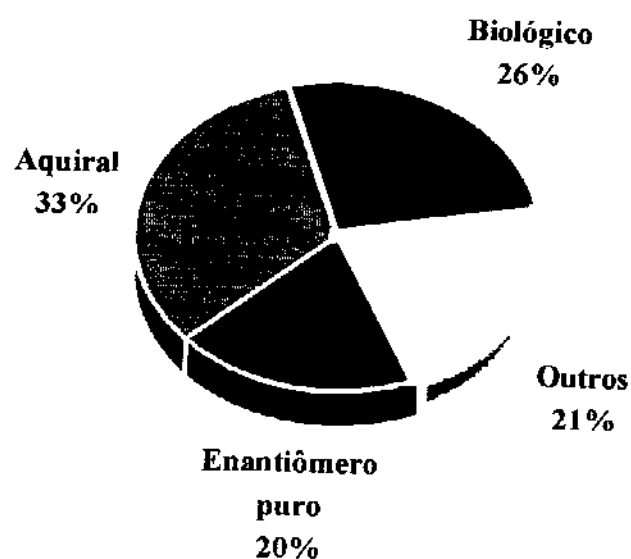
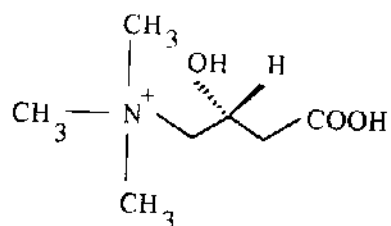
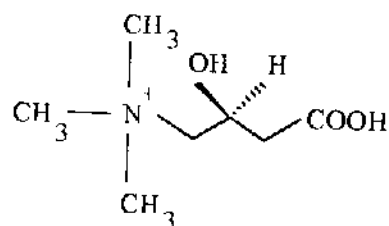


Figura 2

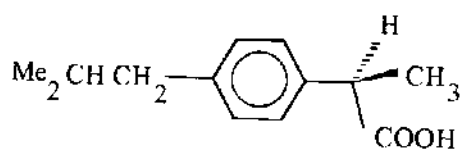


L - (R) - CARNITINA
(USADA NAS DESORDENS
MUSCULARES E DOENÇAS DO CORAÇÃO)

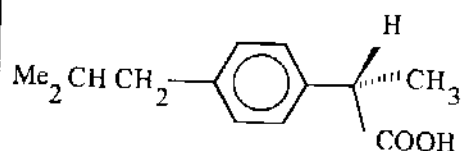
NOMES COMERCIAIS:
L - CARNITINA (LABOTANICK DO BRASIL)
ENZIVITAL (FARMASA)
NUTRIMAIZ (BIOLAB)
APETIBÊ (LUPER)



D - (S) - CARNITINA
(TÓXICA)



R (-) IBUPROFENO
(INATIVO)



S (+) IBUPROFENO
(ANTI-INFLAMATÓRIO)

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

Figura 3

Outro exemplo interessante é o da alteração de sabor quando uma substância apresenta quiralidade, conforme ilustrado para asparagina na figura 4 (Ariens, E.J., 1988; Chen, C.S. & Sih, C.J., 1989):

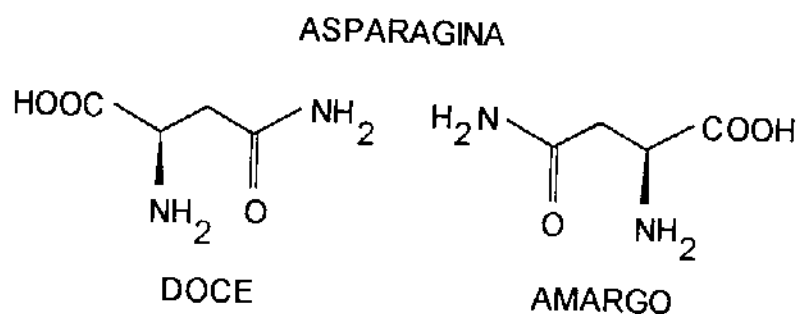


Figura 4

I. 1.2. Sínteses Assimétricas:

A redução de uma carbonila pró-quiral por boriidreto de sódio, produz uma mistura racêmica de alcoóis quirais. Isto é visto na figura 5 (Bare *et al.*, 1991):

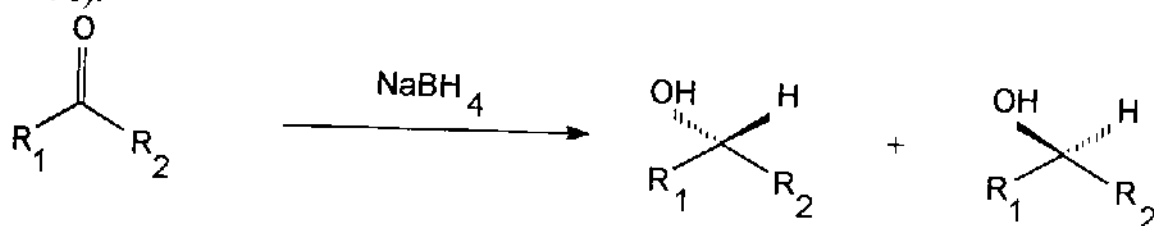


Figura 5

Sendo R_1 diferente de R_2 .

É freqüente produzir uma mistura racêmica e então separar os enantiômeros por métodos físicos (Creagh *et al.*, 1994). Por exemplo, membranas líquidas

contendo éteres coroa quirais têm resolvido enantiômeros de DL-fenilglicina (Yamaguchi *et al.*, 1985). Entretanto, aplicações industriais desta tecnologia tem sido limitada devido ao longo tempo gasto (Creagh *et al.*, 1994).

Outra grande área em desenvolvimento para produção de fármacos quirais puros é a separação da mistura racêmica por métodos de cromatografia líquida (Stinson, 1994). 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 econômica (Stinson, 1994). 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 escala (Stinson, 1994).

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 natureza empírica (Bosnik *et al.*, 1981; Kagan *et al.*, 1982).

Além dos organometálicos existem catalisadores altamente estereoespecíficos: são as enzimas, que hoje estão despontando 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 desidrogenases substituem o boriidreto de sódio (Na BH_4) na reação da figura 5. 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 (5 mg = 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 na figura 6 (Stinson, 1992). 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 uma membrana seletiva e passa para o

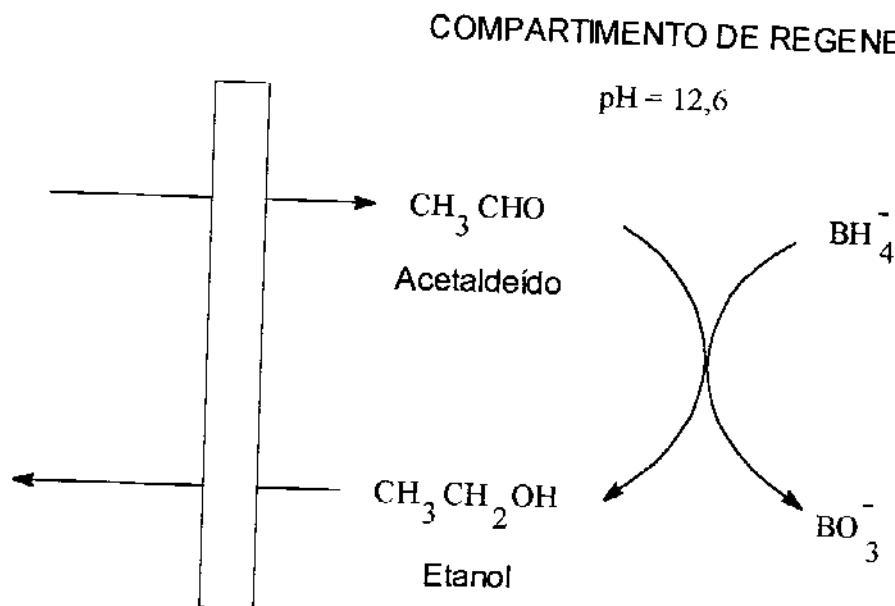
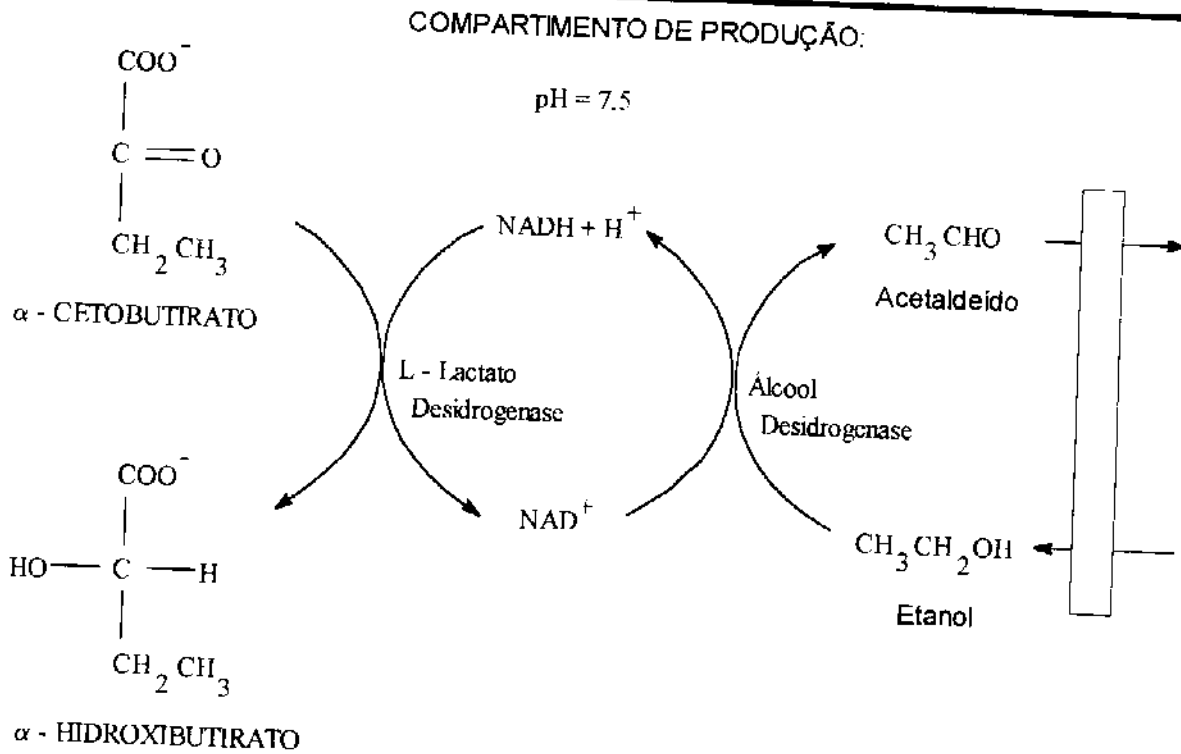


Figura 6

"compartimento de regeneração" onde é reduzido novamente a etanol por boridreto (Stinson, 1992). Se o NADH não fosse reciclado desta maneira, a fabricação deste sinton 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 microorganismos invasores.

1.1.3. Biotransformação:

Uma alternativa eficaz e barata aos catalisadores acima 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 anos (Ward & Young, 1990; Czuk. & Glanzer, 1991; Fantin *et al.*, 1994). 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. (Pereira, 1995b). O uso de microorganismos vivos íntegros para catalisar reações em química orgânica é denominado biotransformação (Präve *et al.*, 1987). Este conceito ainda abrange o uso de outros materiais biológicos: RNA (Prudent *et al.*, 1994), anticorpos (Pollack *et al.*, 1986; Schultz, 1989) ou enzimas isoladas (Präve *et al.*, 1987), 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: redução (Bare *et al.*, 1991), condensação (Long & Ward, 1989), ciclização (Medina *et al.*, 1988, Bujons *et al.*, 1988) e oxidação (Crumbie *et al.*, 1978; Gill *et al.*, 1988), 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 (Bare *et al.*, 1991; Weijers *et al.*, 1992; Mori, 1989) (ver figuras 7 a 9):

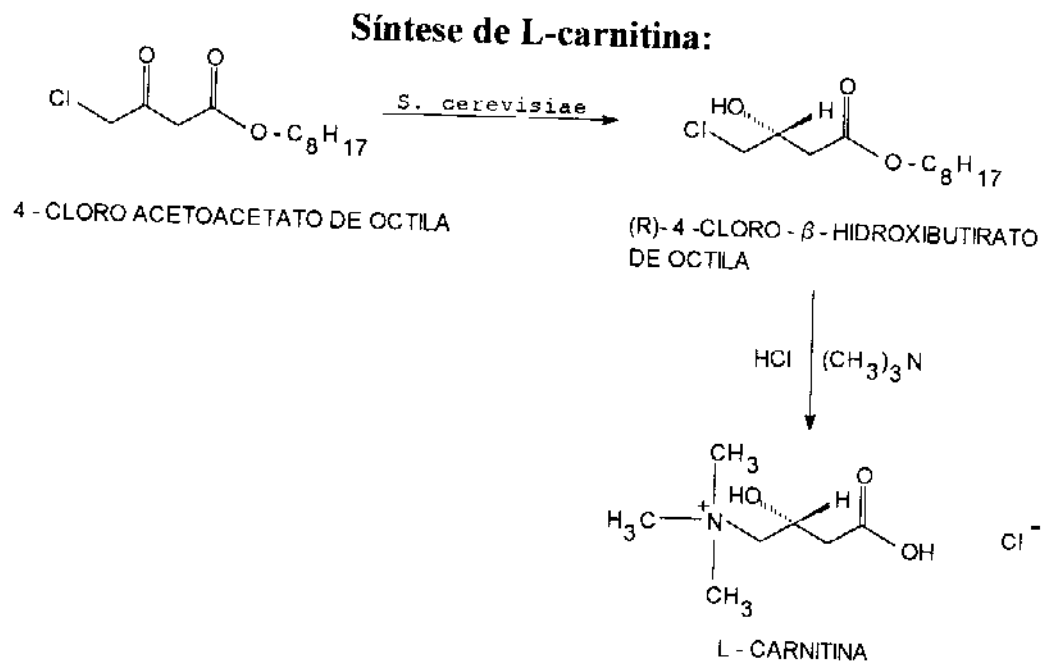


Figura 7

Síntese de Epoxipropano:

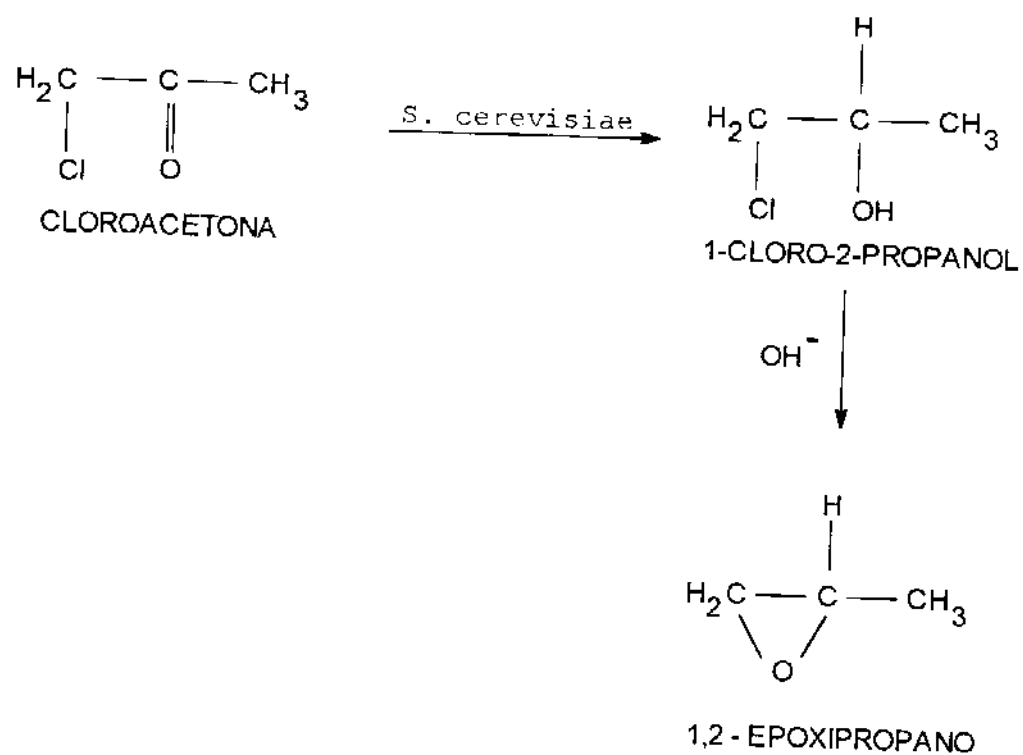
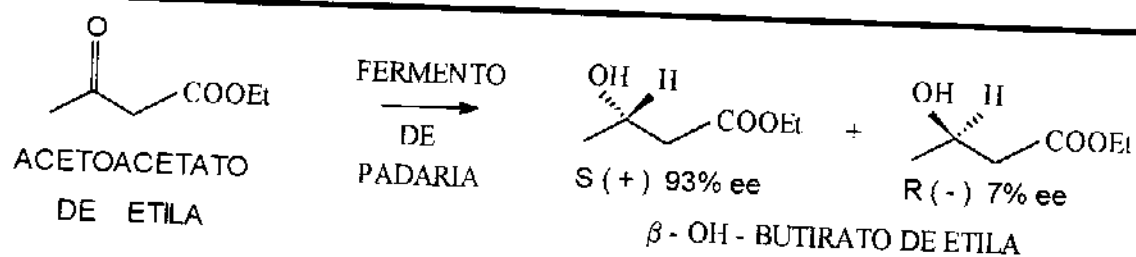


Figura 8



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

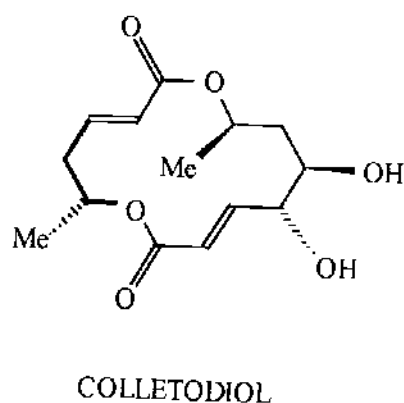
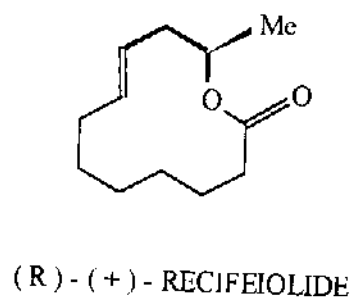
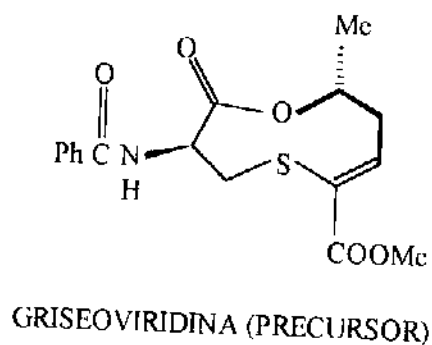
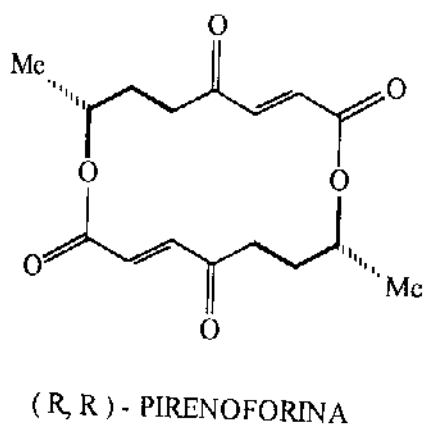
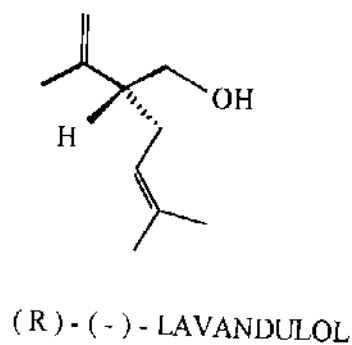
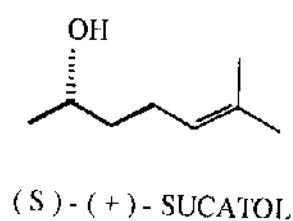


Figura 9

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 (E.C. = 1.1.1.1). Pelo fato destas enzimas estarem localizadas no interior do microorganismo o composto químico a ser transformado 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). Um teste de viabilidade celular (para verificar se as células estão vivas) pode ser feito através da medida do consumo de oxigênio usando um eletrodo de oxigênio tipo Clark (Pereira, 1995 a, b). As enzimas reduzem o substrato utilizando como cofator NADH (nicotinamida adenina 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) (Voet & Voet, 1990) (ver figura 10):

MECANISMO DE REDUÇÃO DA L(S) LACTATO DESIDROGENASE:

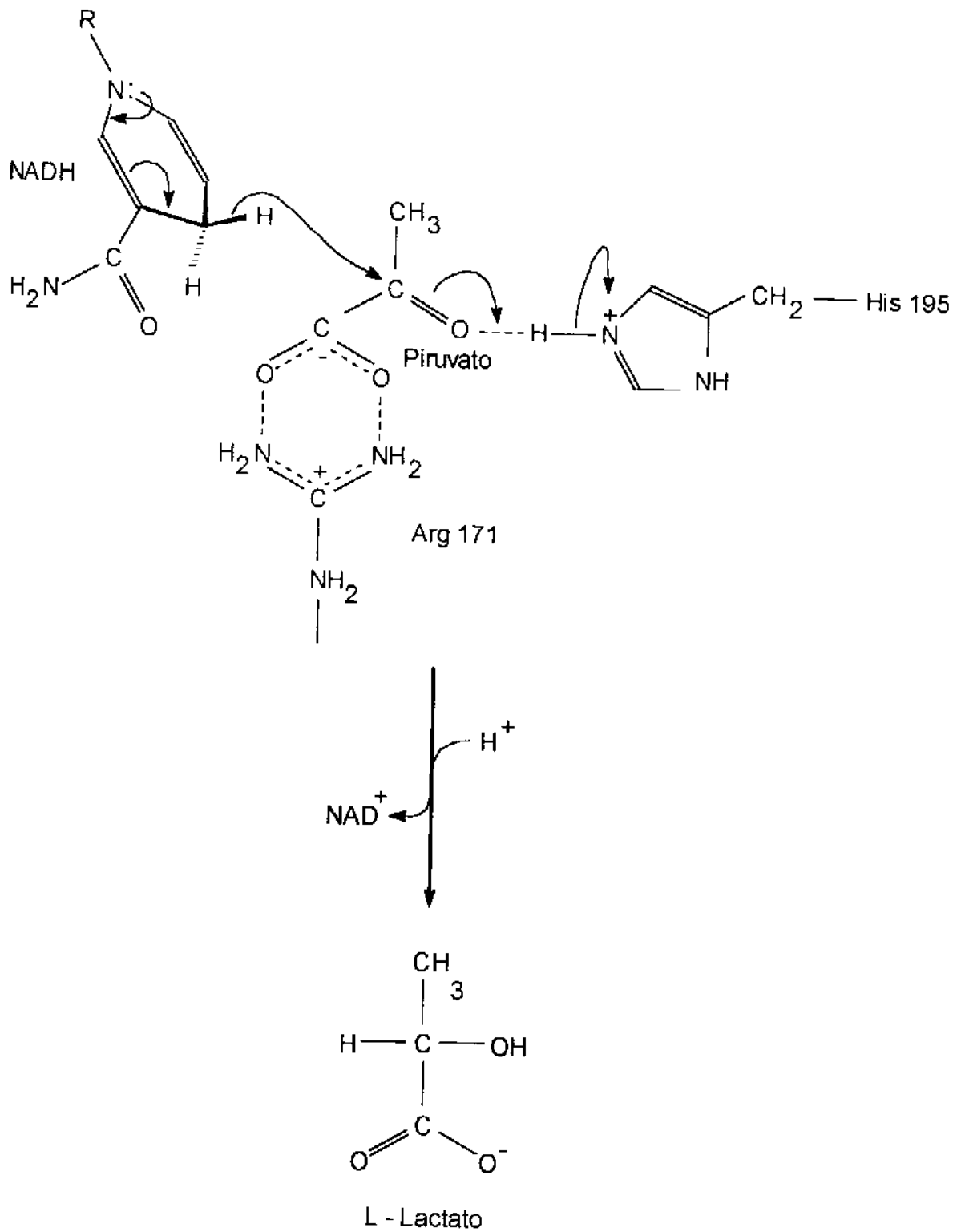


Figura 10

Nota-se que o piruvato, que é o substrato natural desta enzima, é muito semelhante ao acetoacetato (difere apenas por um CH_2). A enzima atua sobre o substrato artificial devido ele ser semelhante ao substrato natural, e o mecanismo de ação para ambos provavelmente são semelhantes (Pereira, 1995b). A álcool desidrogenase depende de íons zinco e é por isto que alguns pesquisadores adicionam zinco ao meio com *S. cerevisiae* (MacLeod, 1964). O seu mecanismo é o seguinte (Voet & Voet, 1990):

MECANISMO DE REDUÇÃO DA ÁLCOOL DESIDROGENASE:

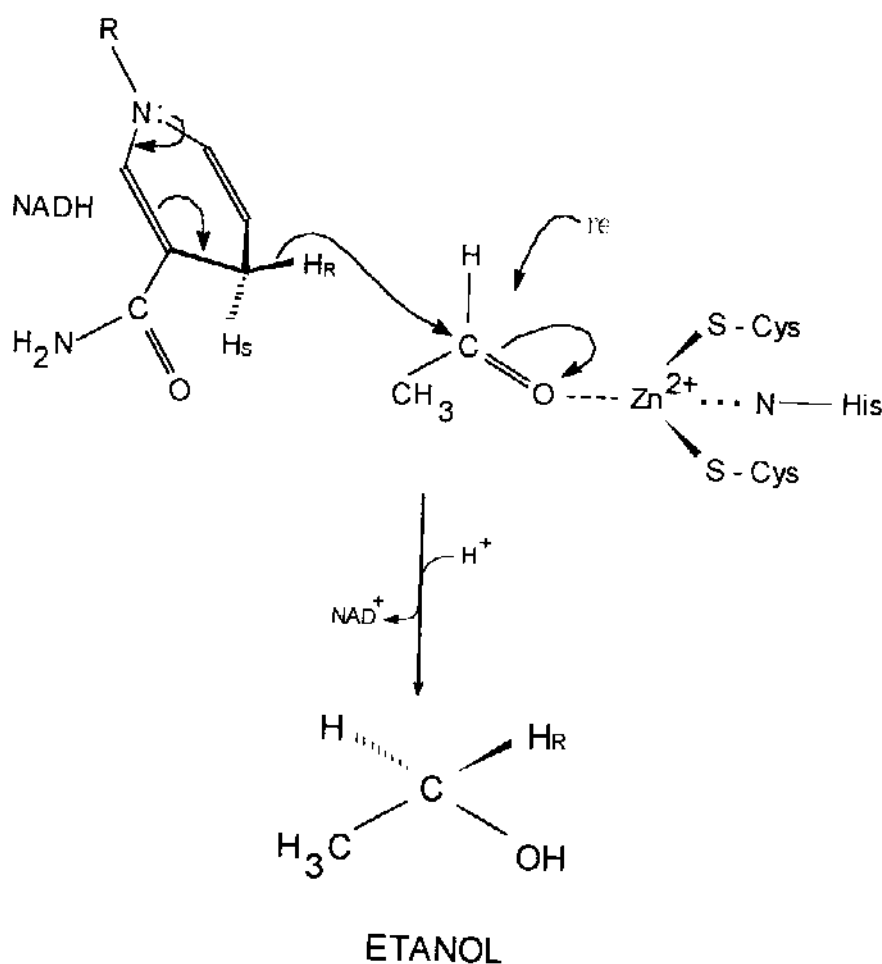


Figura 11

a2) Redução de dupla ligação:

Além das reações de redução de carbonilas que são várias (Czuk & Glänzer, 1991), as desidrogenases no interior do fermento de padaria reduzem duplas ligações produzindo centros quirais como exemplificado (Präve *et al.*, 1987) a seguir:

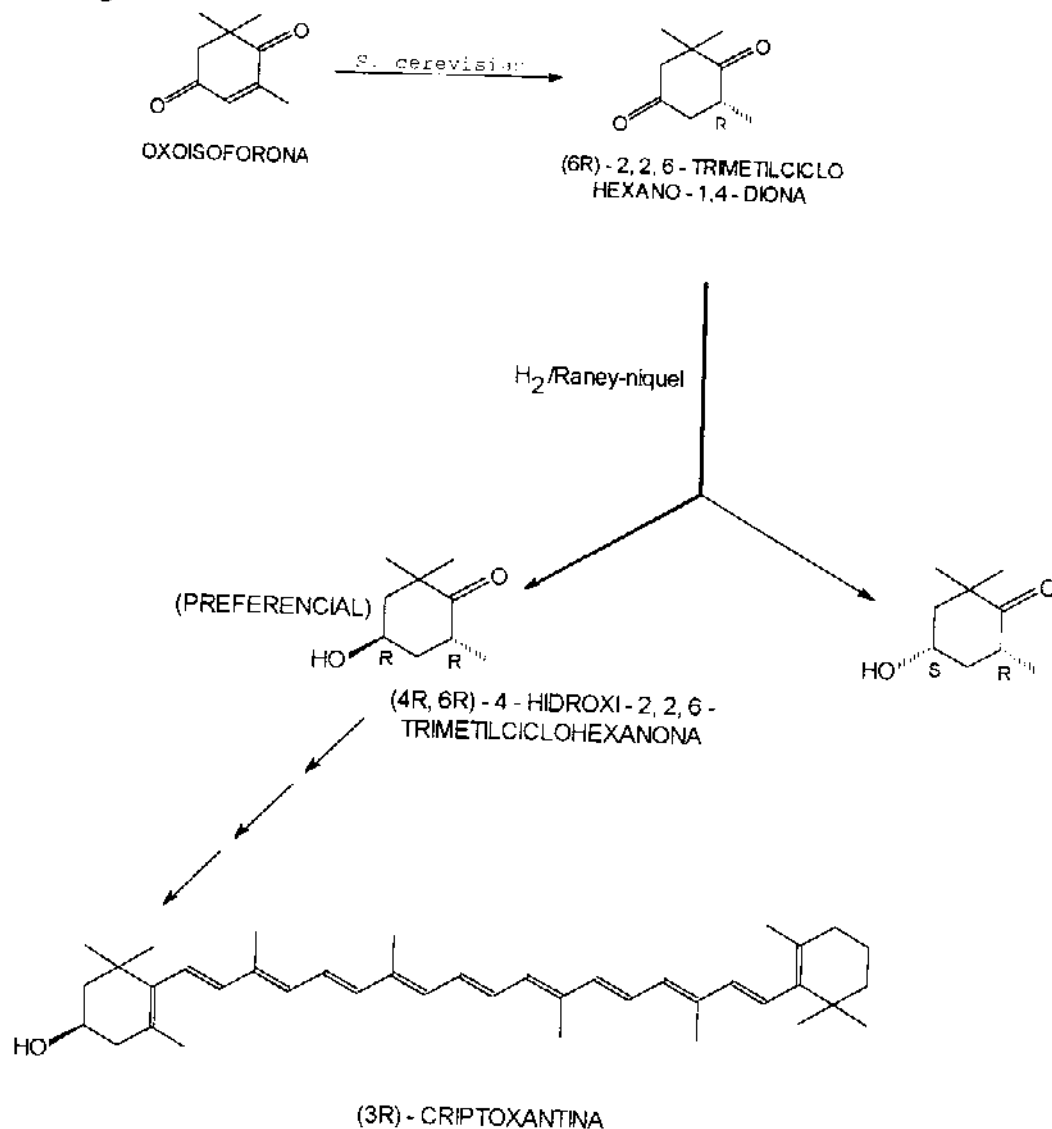


Figura 12

Na síntese de aminoácidos (Utaka *et al.*, 1989):

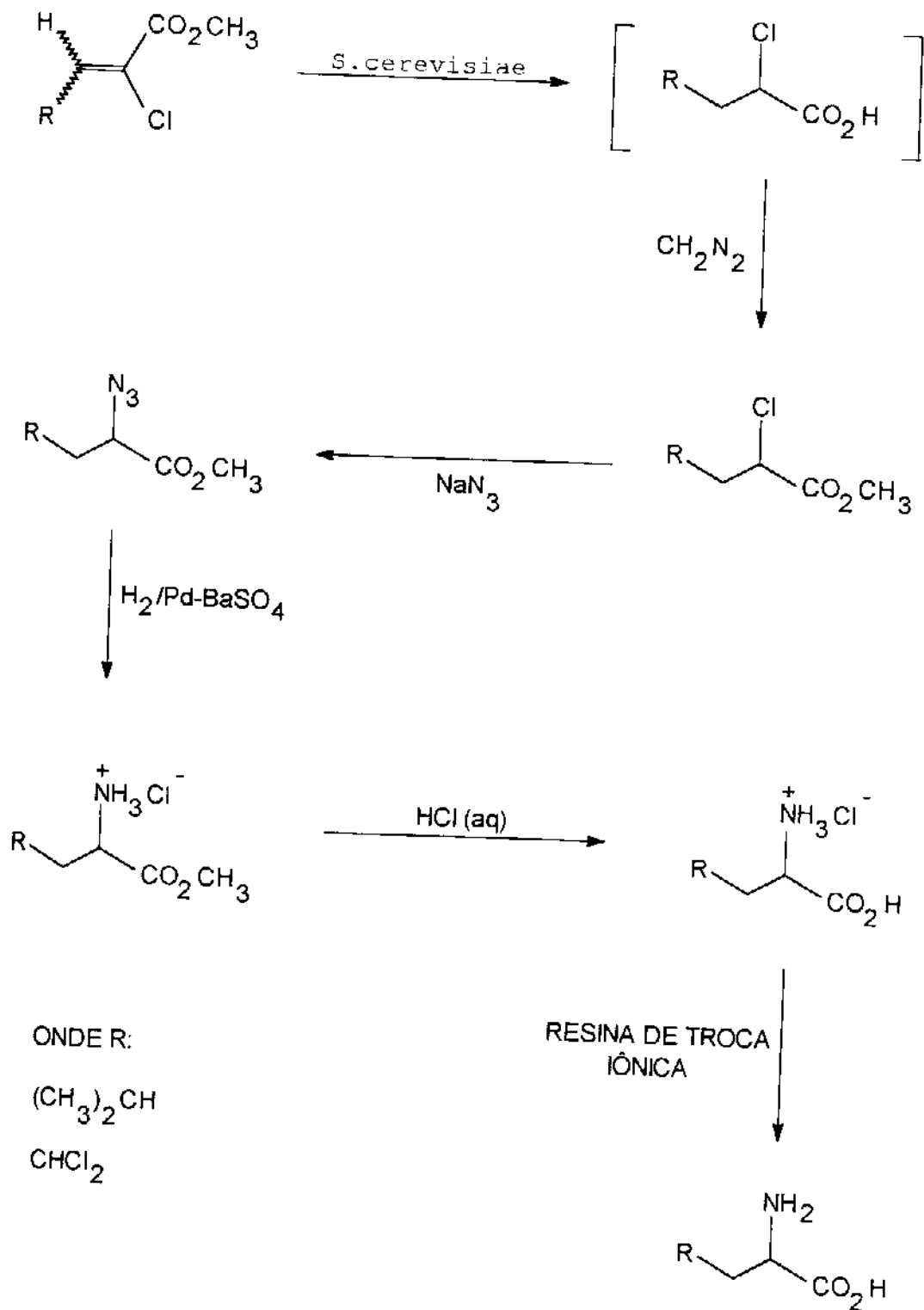


Figura 13

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 enantiomérico (Utaka *et al.*, 1989).

B) Reações de Condensação:

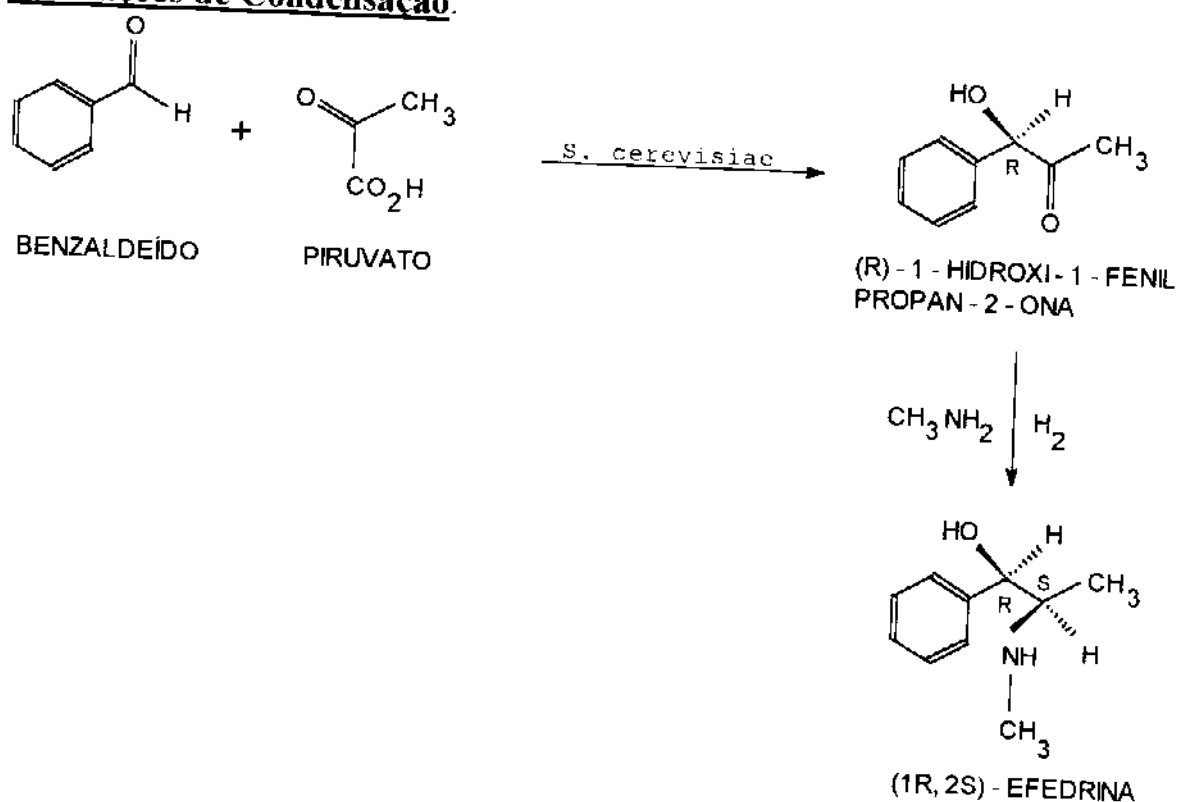


Figura 14

Esta síntese (figura 14) tem utilidade industrial e é uma patente alemã de 1930 (Hilderbrandt & Klavehn, 1930). A efedrina tem importância no tratamento da asma, hipotensão e congestão nasal (Goodman & Gilman, 1991).

A enzima que supõe-se que atue nesta reação é a piruvato descaboxilase (E.C. = 4.1.1.1) (Crout *et al.*, 1991), o principal cofator da enzima é a tiamina pirofosfato (forma coenzimática da vitamina B₁), sendo ela que promove a ocorrência da reação, como mostrado na figura 15 (Crout *et al.*, 1991):

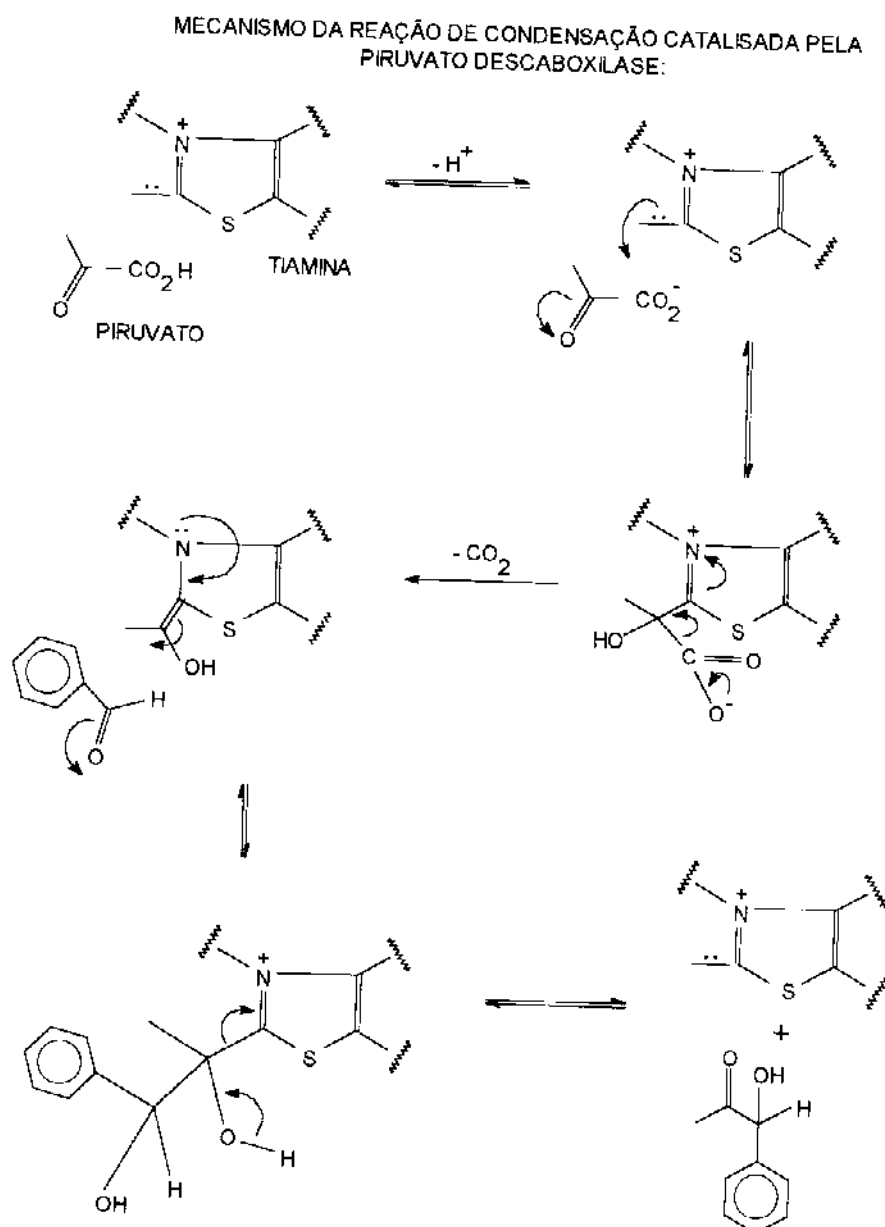


Figura 15

Além deste existem outros tipos de compostos que são condensados pela enzima piruvato descarboxilase como exemplificado a seguir na figura 16 (Crout *et al.*, 1991):

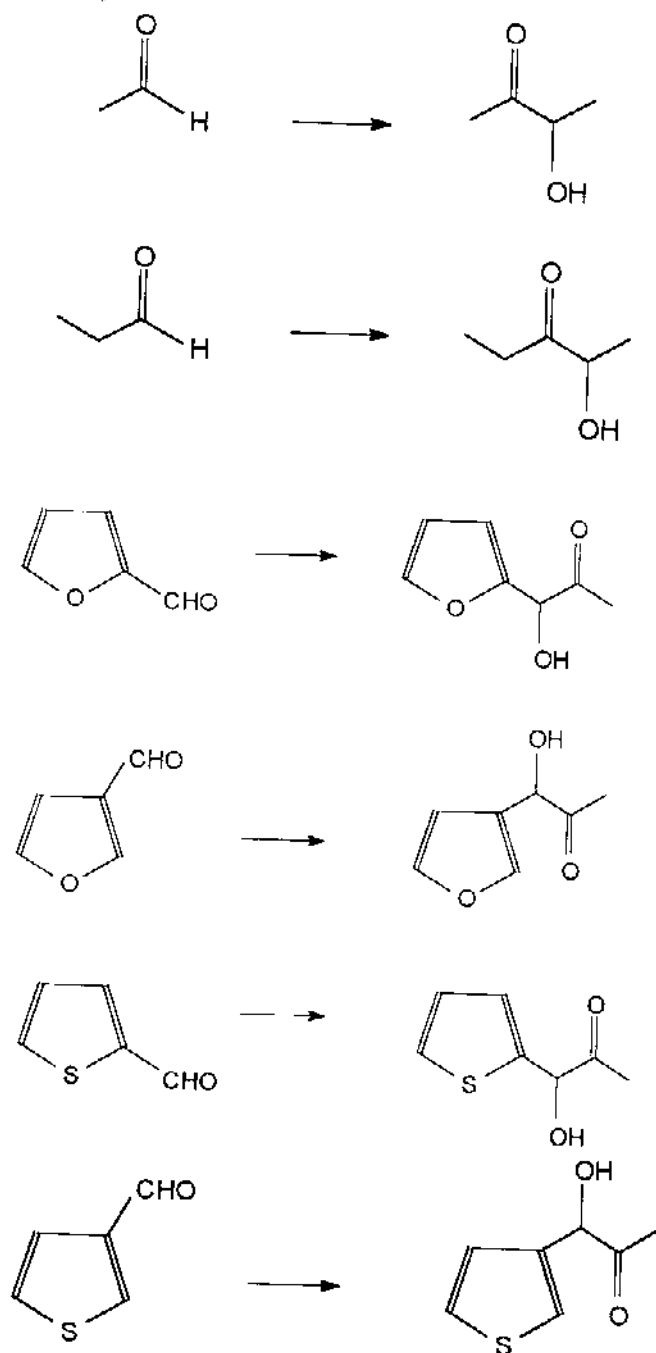


Figura 16

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

C) Reações de Ciclização:

Uma das reações mais interessantes de ciclização, usando fermento biológico de padaria, é a catalisada pela 2,3 óxido de esqualeno lanosterol ciclase (E.C. = 5.4.99.7) (Medina & Kyler, 1988; Bujons et al, 1988):

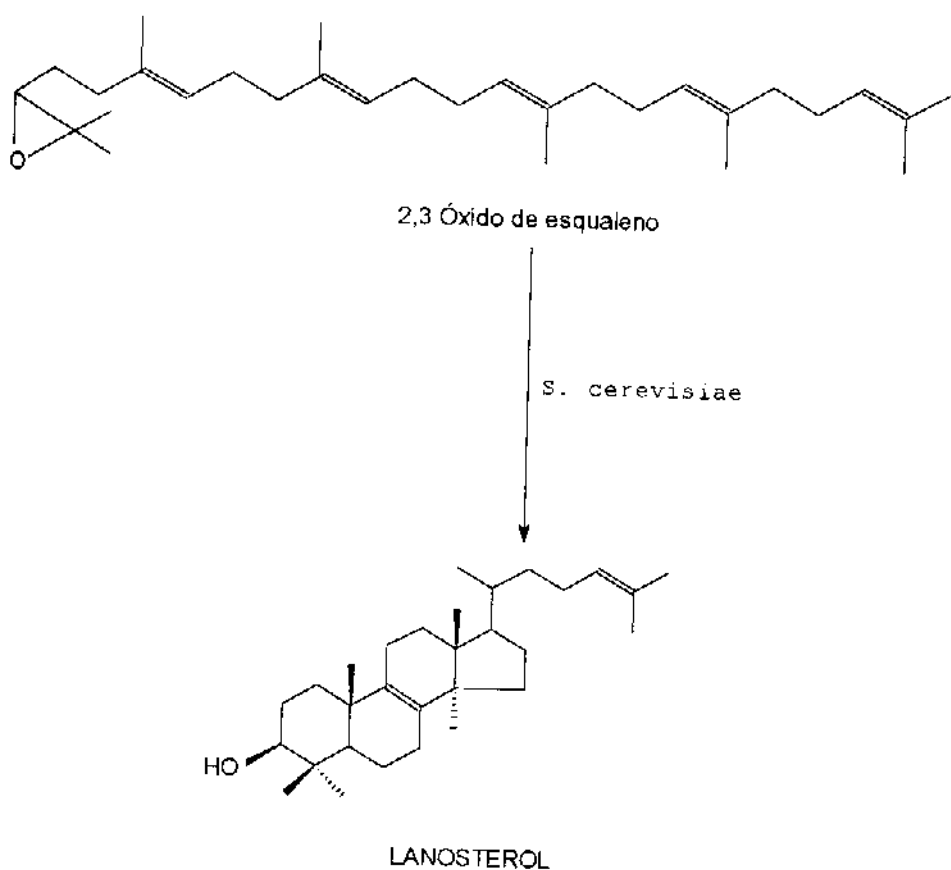


Figura 17

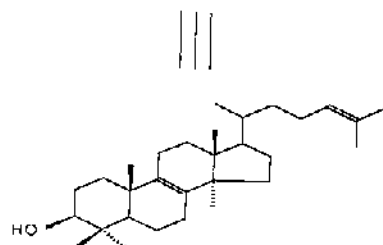
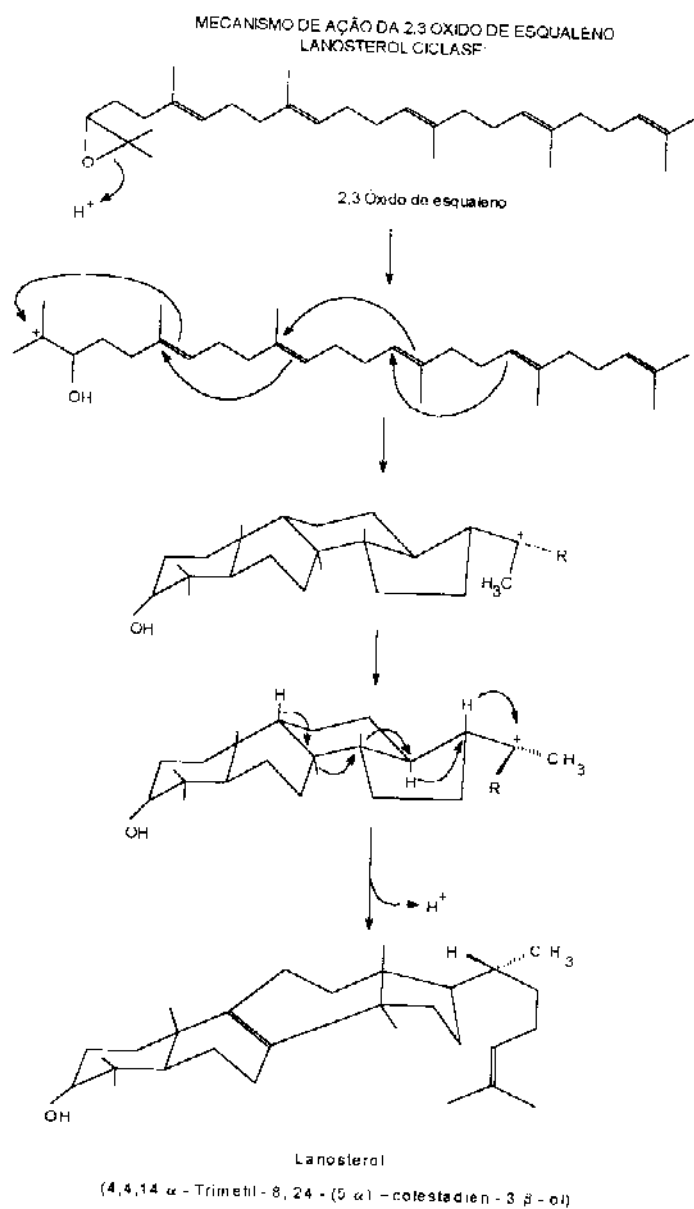


Figura 18

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, respectivamente (Cunningham, 1978).

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 sequência de migrações do íon-hidreto e grupo metila, os quais culminam na formação da ligação olefinica entre C(8) e C(9) (Cunningham, 1978).

D) Reações de Oxidação:

Estas não geram centros assimétricos como as anteriores. Elas ocorrem por simples reversão das reações de redução, como mostrado no mecanismo esquematizado a seguir (Rawn, 1989):

MECANISMO DE AÇÃO DA LACTATO DESIDROGENASE (TIPO II):

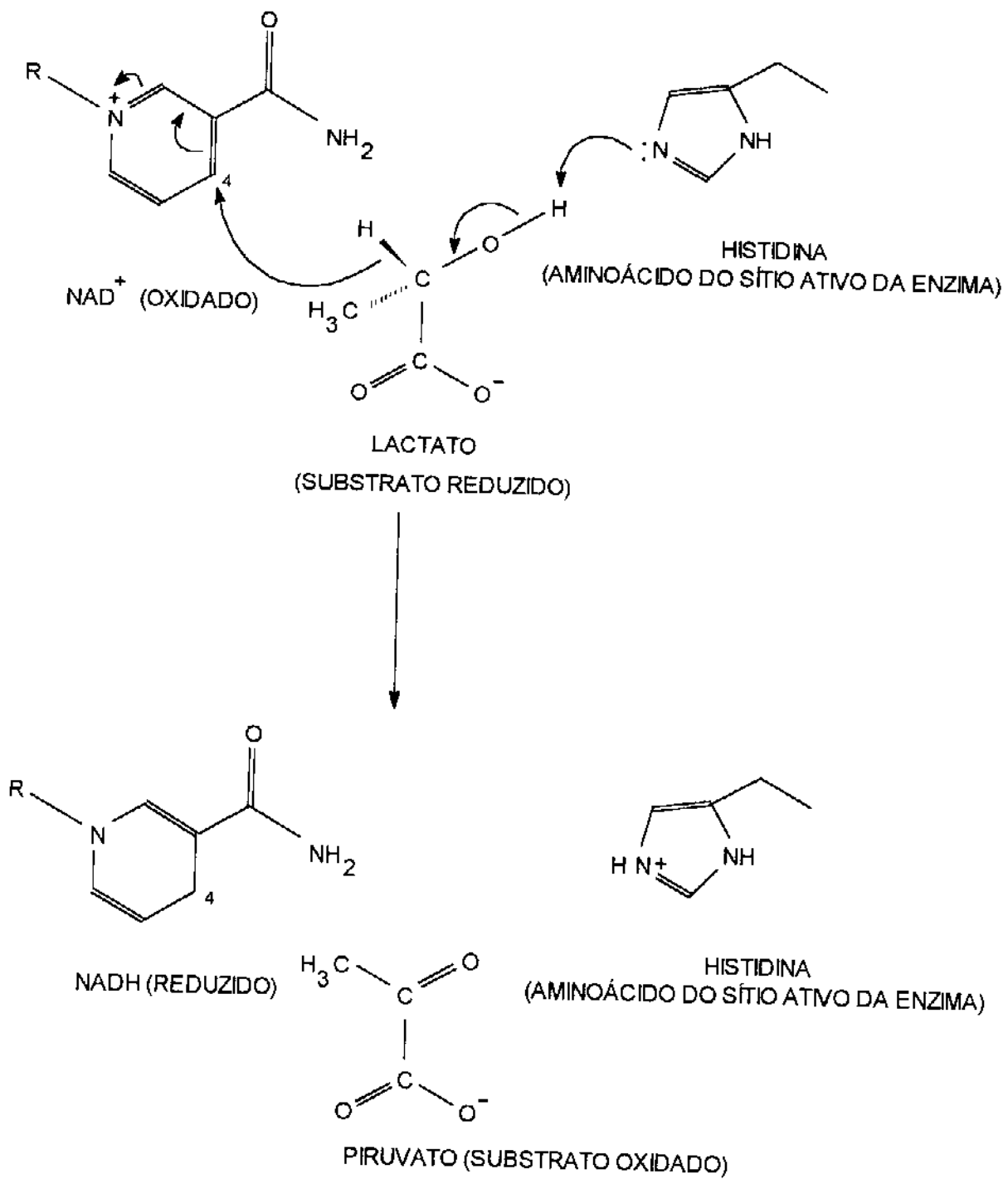


Figura 19

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

- a) tipo I: faz redução;
- b) tipo II: faz oxidação (Nikolova & Ward, 1991).

Dos tipos de reações que o *S. cerevisiae* pode executar, apenas as de redução têm 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 (Pereira, 1995b):

a.1) Método com adição de açúcar: Este método é baseado no procedimento descrito por Seebach e colaboradores (1984). Pode-se introduzir uma modificação que é a introdução de uma pequena quantidade de ZnSO_4 (MacLeod, 1964), quando se quer aumentar a atividade da enzima álcool desidrogenase, (que produz isômeros R) e que é zinco dependente (como visto

no mecanismo de ação desta enzima) (Voet & Voet, 1990). Para isto, preparar em separado a seguinte composição:

- 1) 20 g de fermento de padaria dissolvido em 10ml de água;
- 2) 10 g de D-glicose em 38 ml de água ;
- 3) 0,0128 g de sulfato de zinco (se houver a necessidade de produção de isômeros R, do contrário não adicionar - Pereira, 1995b) em 1,3 ml 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 com 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 reutilizadas (Sorrilha *et al.*, 1992; Pereira, 1995 b).

B) Forma imobilizada: As células de fermento são previamente imobilizadas (fixas) num suporte. Existem diversos tipos de suporte: crisotila 5 RL (Sorrilha *et al.*, 1992), montmorilonita K10 (Sorrilha *et al.*, 1992), poliacrilamida (Chibata *et al.*, 1974; Zyla, 1994) e alginato de cálcio (Vives *et al.*, 1993). 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 é então purificado através de cromatografia de coluna. As células não morrem neste processo e podem ser reutilizadas (Sorrilha *et al.*, 1992).

O melhor processo de imobilização é com gel de poliacrilamida. Este método é dado a seguir (Chibata *et al.*, 1974; Zyla, 1994):

2 gramas de células secas são dissolvidas em 10 ml de água. Em seguida são misturadas com 16 ml de uma solução contendo 8.8 g de acrilamida e 0,6 g de N,N' - metilenebisacrilamida. 1ml de solução de persulfato de amônio e 20 μ l 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 (Chibata *et al.*, 1974; Zyla, 1994)

Vantagens de utilização do *S. cerevisiae* em biotransformação (Pereira, 1995b):

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

Limitações do processo:

- 1) 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: dodecanol (Bare *et al.*, 1991));
- 2) Cada fabricante de fermento usa cepas (linhagens) próprias e isto pode dificultar a reprodutibilidade de experimentos feitos em outros países (Pereira, 1995a). Cada cepa produz quantidades diferentes de NADH (Pereira, 1995a) e isto faz com que o rendimento químico (que é diretamente proporcional à

produção de NADH) seja alterado (Pereira, 1995a). Para contornar este problema, torna-se necessário dosar os nucleotídeos de piridina (NADH) no interior destas células, para que a reprodutibilidade de experimentos não seja comprometida (Pereira, 1995a).

Para exemplificar, se mudarmos o tipo de cepa, ocorre também alteração no excesso enantiomérico (Weijers *et al.*, 1992) Um experimento interessante foi feito por Weijers e colaboradores que usaram as cepas CBS 1242 e CBS 1394 de *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo 74% e 98% de excessos enantioméricos, respectivamente, na biotransformação da cloroacetona em condições iguais de reação (Weijers *et al.*, 1992);

3) 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) (Voet & Voet, 1990) e a Lactato desidrogenase (produz isômeros S) (Cunningham, 1978). 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 alílico (Nakamura *et al.*, 1991), cloroacetato de etila (Nakamura *et*

al., 1991), e ácido acético (Ushio *et al.*, 1991). Existem outros, algumas vezes mais eficientes, descobertos na década de 40 (Mackworth, 1948), mas que só recentemente (e acidentalmente) foram usados em reações com fermento de padaria (Sorrilha *et al.*, 1992). Eles são dados a seguir, juntamente com seu poder de inibição da enzima álcool desidrogenase de fermento (Mackworth, 1948):

Composto	Concentração	Inibição (%)
Cloroacetofenona	0, 33 mM	85
Bromoacetofenona	0, 33 mM	100
Iodo acetato de etila	0, 16 mM	85
Iodo acetato de etila	0, 33 mM	100
Cloropierina	0, 33 mM	100

O tempo para ocorrer a inibição é maior que 60 minutos para a maioria deles (Mackworth, 1948).

A cloroacetofenona é um inibidor da álcool desidrogenase, porém não inibe a ação da lactato desidrogenase (Mackworth, 1948) que atua sobre ela transformando-a no seu correspondente álcool quiral (Sorrilha *et al.*, 1992) (ver figura 20):

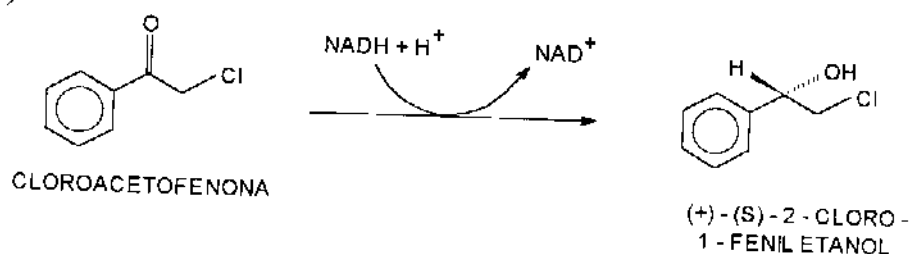


Figura 20

Esta reação foi executada há aproximadamente três anos atrás e o excesso enantiomérico era alto (97%) (Sorrilha *et al.*, 1992).

O (+)-(S)-2-cloro-1-feniletanol é usado como sinton (bloco construtor) para a síntese de fármacos quirais (Corey & Link, 1990).

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.

OBJETIVOS

- 1- Padronizar o método de dosagem de NAD(P)H no interior de células integras de *Saccharomyces cerevisiae*;
- 2- Descobrir quais são as melhores cepas comerciais, em função da compreensão do seu mecanismo bioquímico, para se trabalhar em biotransformação, variando fatores externos como pH e temperatura e verificando o consumo de oxigênio por estas células;
- 3- Adicionar substâncias, que são conhecidas por aumentar o excesso enantiomérico, e propor um possível mecanismo bioquímico para elas a partir dos resultados obtidos;
- 4- Padronizar o preparo de células que possuem parede celular para microscopia de força atômica (MFA);
- 5- Diferenciar através de MFA diferentes cepas de *S. cerevisiae* usadas em biotransformação.

I. 2. MATERIAIS E MÉTODOS

I. 2.1. Oxidação e Redução de NAD(P)H

I. 2.2. Materiais Biológicos

I. 2.3. Medidas de Captação de Oxigênio

I. 2.4. Compostos Químicos

I. 2.5. Microscopia de Força Atômica

I. 2. MATERIAIS E MÉTODOS:

I. 2.1. OXIDAÇÃO E REDUÇÃO DE NAD(P)H:

Medidas de redução e oxidação de nucleotídeos de piridina foram monitoradas usando o par de comprimento de onda 340 e 370 nm. Todos os experimentos foram conduzidos usando um espectrofotômetro SLM Aminco DW 2000. Este aparelho passa dois comprimentos de onda diferentes, na mesma amostra, ao mesmo tempo. O primeiro comprimento de onda (340 nm), corresponde à faixa de absorção de nucleotídeos de piridina na forma reduzida. O segundo (370 nm), tem a função de "descontar" a suspensão de células do meio. Um espectrofotômetro comum não conseguiria fazer tais medidas, pois não é possível lhe acrescentar um segundo comprimento de onda diferente ao mesmo tempo (Wolkowicz & Mc Millin-Wood, 1980; Pereira, 1995a; Pereira & Durán, 1995).

Observação: O espectrofotômetro da BECKMAN, modelo DU-640B possui esta propriedade de duplo comprimento de onda. Ele tem a vantagem de ser 9 vezes mais barato que o SLM Aminco DW 2000, porém não é tão preciso.

I. 2.2. MATERIAIS BIOLÓGICOS:

As cepas comerciais de fermento de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) foram obtidas de: Fermipan (Holanda), Itaiquara (Brasil), Nishin Seifun Co. (Japão) e Fleischmann (Brasil). As suspensões estoques foram preparadas adicionando 1.0 g de fermento seco e 3.5 g de fermento cru à 10 ml de água sob agitação à temperatura ambiente. Para se saber as proporções de fermento seco e cru, as células foram contadas num microscópio óptico (Carl Zeiss) usando uma câmara de Neubauer. A câmara de Neubauer é uma lâmina especial de microscopia óptica que serve para contar células. Através de um cálculo matemático simples podemos saber o número de células por cm^3 de suspensão. No caso deste trabalho não foi necessário a realização deste cálculo, pois a contagem do número de células dentro da câmara era suficiente para se saber a proporção delas em cada amostra. Foi pesado 1 g de fermento (seco ou cru) e dissolvido em 10 ml de água bidestilada e deionizada. Daí foi separada uma alíquota de $20\mu\text{l}$ e diluída em $980\mu\text{l}$ de água (diluição de 50x). Quando colocada no microscópio esta última suspensão mostrou-se ainda com muitas células o que impossibilitava a contagem. Então desta última foi separada uma alíquota de $20\mu\text{l}$ e diluída novamente em $980\mu\text{l}$ de água bidestilada e deionizada novamente (diluição de 100x diluição total: 10.000) vezes. Depois de feitas tais diluições foi separada uma alíquota de $20\mu\text{l}$ e colocada na câmara de Neubauer.

I. 2.3. - MEDIDAS DE CAPTAÇÃO DE OXIGÊNIO:

Consumo de oxigênio foi medido com um eletrodo tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.) em uma câmara de vidro termostatizada de 1.0 ml, equipada com um agitador magnético.

I. 2.4. - COMPOSTOS QUÍMICOS:

Acetoacetato de lítio foi obtido da Sigma Chemical Co. Os outros reagentes foram obtidos da Merck Co. A água era bidestilada e deionizada.

I. 2.5 - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA:

O instrumento utilizado nos experimentos de MFA foi um Nanoscope II, da Digital Co., que foi operado no modo por contacto, na forma repulsiva, utilizando cantilever com ponta piramidal (200 μm), e é interfaciado a um computador com um monitor para o comando tanto das partes mecânicas da cabeça como dos sensores ópticos, e um outro monitor para a aquisição das imagens que podem ser capturadas, armazenadas e tratadas por um poderoso software para a aquisição de informações estatísticas precisas a respeito destas imagens. As imagens foram filtradas para remover linhas de scan (varredura). Os valores de força do scan variaram entre 7 a 14 nN.

Um cantilever bastante delicado, contendo uma ponta fina e microscópica (ambos de Si_3N_4) é utilizado como sensor de força, e atua entre o átomos mais externos de sua ponta e os da superfície sob investigação. A flexão do cantilever no sentido vertical para cima será proporcional à intensidade da força de repulsão. Pode-se fazer o registro das deflexões do cantilever utilizando-se de medidas ópticas (Yang *et al.*, 1993). Um laser de diodo, um espelho, e um fotodiodo de duas segmentações são os elementos de detecção de nível óptico. O feixe do laser, refletido numa cobertura de ouro da superfície do cantilever é direcionado por um espelho ao fotodetector, que possui dois seguimentos verticalmente posicionados. Os movimentos do cantilever são amplificados pelo braço longo que o sustenta, e as variações dos sinais nestes detectores são proporcionais aos deslocamentos verticais da sua ponta.

Preparo das amostras para o MFA: Foram pesados 1g de fermento seco ou 3,5 g de fermento cru e dissolvendo as células em 10 ml de água ultra-pura. Da suspensão resultante foram retirados 10 μl que foram colocados sobre uma laminula de 0,5 cm X 0,5 cm.

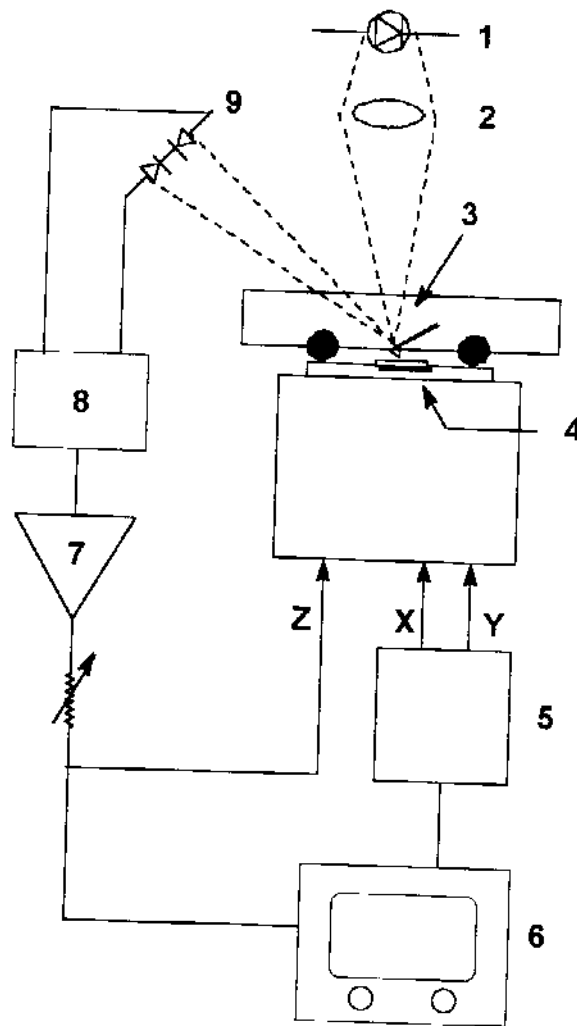


Figura 21

Figura 21: Princípio de trabalho do microscópio de força atômica. Os componentes são: 1, laser de diodo; 2, lente de focalização; 3, cantilever; 4, amostra; 5, tradutor XY; 6, monitor; 7, amplificador; 8, divisor/multiplicador; 9, fotodetector (Yang *et al.*, 1993).

I. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A redução de nucleotídeos de piridina oxidados [NAD(P)⁺] por células de fermento de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) está representado na Fig. 22A e Fig. 22B. O painel A representa as cepas comerciais da Holanda e Japão e o painel B, as cepas brasileiras.

Com a finalidade de assegurar que todos os experimentos continham o mesmo número de células (correção da estequiometria), as células foram contadas usando uma câmara de Neubauer. Os resultados da contagem para o fermento cru e fermento seco estão representados na figura 22A e 22B, respectivamente. Baseado nestes dados foram pesados 1g de fermento seco e 3,5 g de fermento cru para a realização dos experimentos subsequentes.

Glicose não estava presente no meio de reação, levando as células a degradarem seu glicogênio interno, o qual pode suprir glicose por 10 a 12 horas (Slaughter & Nomura, 1992; Pereira, 1995a; Pereira & Durán, 1995). Cepas comerciais de fermento biológico de padaria, quando adicionadas à água iniciam a redução de suas formas oxidadas de NAD(P)⁺. Esta redução continua até que um estado de equilíbrio seja alcançado (Fig. 23A). Para verificar a oxidação de NAD(P)H intracelular, acetoacetato de lítio foi adicionado no meio de reação (inset da Fig. 23A e 23B). Nos pontos de adição, a absorbância cai porque NAD(P)H está sendo oxidado, e o acetoacetato adicionado transformado em β -hidroxibutirato através das desidrogenases internas do *S. cerevisiae* (inset da

Fig 23A). Percebe-se no inset da Fig. 23B que não ocorre oxidação de NAD(P)H e por esta razão, as cepas brasileiras, nestas condições, têm um poder de redução para acetoacetato baixo em relação às cepas holandesas e japonesas.

	3	4	3	6
	4	5	5	7
	9	4	5	8
	6	5	6	6

	9	7	8	5
	4	5	7	6
	3	4	4	5
	4	5	6	6

	6	3	7	8
	5	6	6	5
	5	4	4	5
	3	9	4	6

	6	5	9	4
	5	8	6	6
	10	4	7	4
	5	3	4	6

Figura 22A

Figura 22A: Desenho esquemático da câmara de Neubauer mostrando os resultados da contagem das células de fermento biológico de padaria cru.

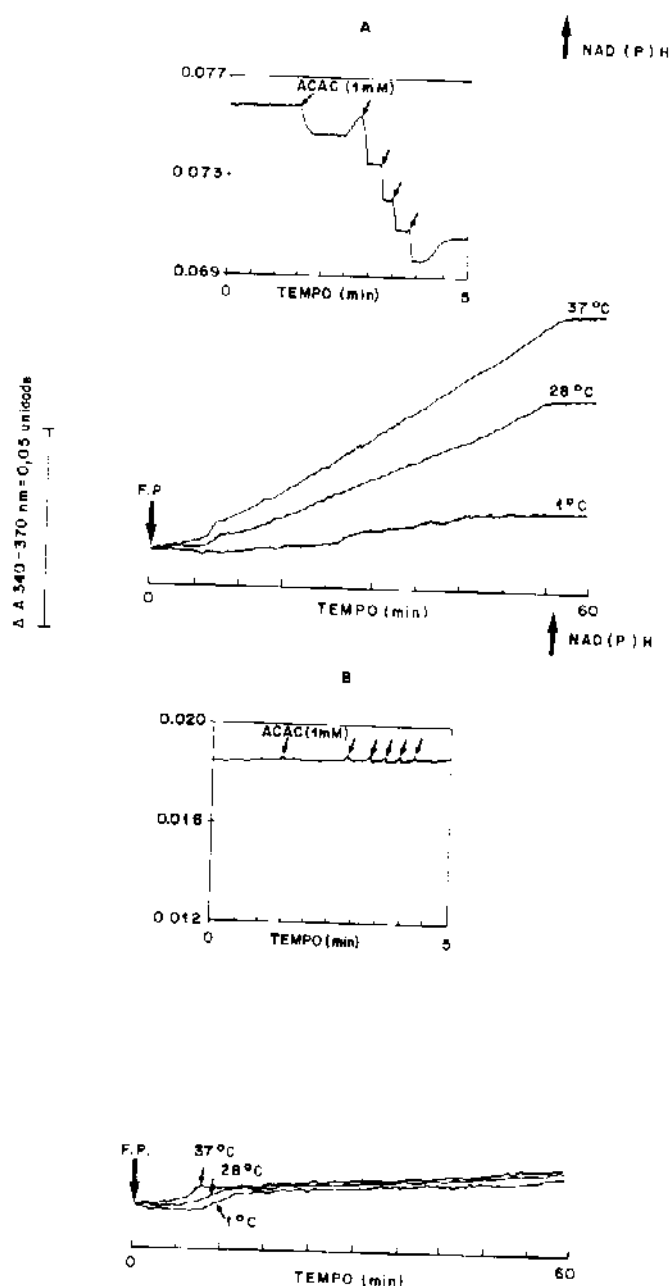


Figura 23: Influência da temperatura na redução de nucleotídeos de piridina existentes no interior de células vivas de fermento de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*). Fermento de padaria (F.P., 2,3 mg/ml) foi adicionado à água bidestilada e deionizada onde indicado (pH = 6.0). Painel A: cepas comerciais da Holanda e do Japão; Painel B: cepas comerciais do Brasil.

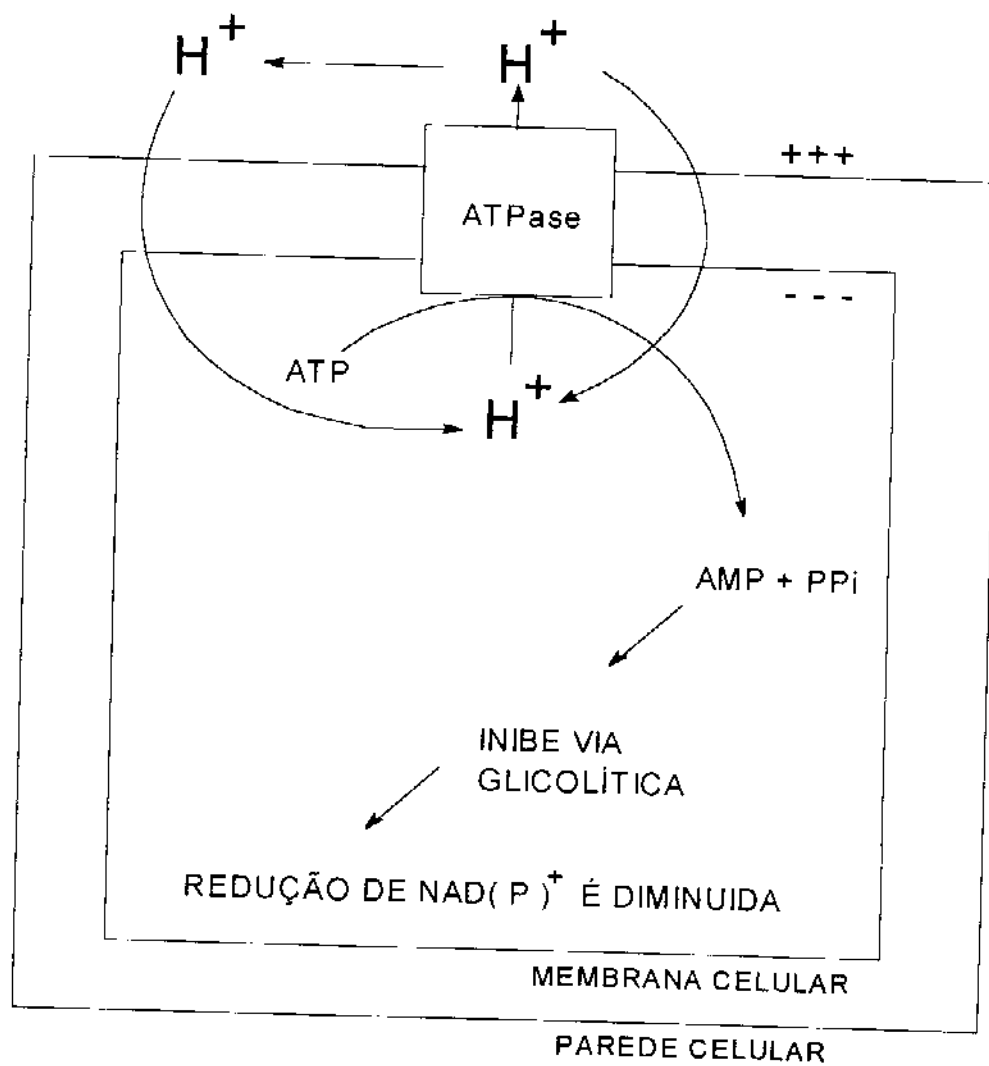
No quadro ("inset"): Oxidação de NAD(P)H por múltiplas adições de acetoacetato de lítio 1mM (ACAC).

É válido mencionar que acetoacetato (e outros substratos) podem induzir um estresse oxidativo na célula viva, quando toda a reserva de formas reduzidas de nucleotídeo de piridina é usada (oxidada) (Pereira *et al.*, 1992; Pereira, 1995a; Pereira & Durán, 1995). Da Fig. 23A, conclui-se que para se obter bons resultados em biotransformação, é melhor fazer adições de substratos depois de uma hora de incubação, para as células poderem alcançar o estado de equilíbrio na redução dos nucleotídeos de piridina.

Para cepas comerciais da Holanda e do Japão, a redução é dependente de temperatura (a redução de NAD(P)^+ é semelhante nestas duas). Interessante notar que as cepas brasileiras não são sensíveis a estes fatores externos como mostrado na Fig. 23B. Para explicar a sensibilidade de temperatura destas células, foi proposto que existam moléculas (um tipo de "termossensor biológico") na superfície polissacarídica da parede celular que são responsáveis por este fenômeno (Pereira, 1995a). Aparentemente estes "termossensores" não estão presentes nas células das cepas brasileiras (Fig. 23B) (Pereira, 1995a).

Na Fig. 24, estas reações de redução foram analisadas variando o pH externo (de 1 a 9), e foi descoberto que em pH baixo as células não reduzem bem os nucleotídeos de piridina. Este fenômeno pode ser atribuído à extrusão de prótons através da ATPase (Loureiro-Dias & Santos, 1990). Estas células estão energizadas (ou seja, estão respirando e consumindo O_2), conseqüentemente uma carga negativa é observada no seu interior. Os prótons

do ácido entram na célula devido a um potencial de membrana (interior da célula tem carga negativa em relação ao meio externo) e a um gradiente químico (concentração maior de prótons no meio extracelular) (ver esquema I). O meio intracelular torna-se ácido, ativando a ATPase (Eraso & Gancedo, 1987). Esta enzima é responsável pela extrusão de prótons. Este fenômeno implica na depleção de ATP (gasto pela enzima para expulsar os prótons) e acúmulo de AMP, este último inibe a fosforilação de glicose (Loureiro-Dias & Santos, 1990) (ver esquema I). Como consequência, a via glicolítica e das pentoses fosfato, que são as vias de produção de NAD(P)H, estão inibidas como observado na Fig. 24A. Interessante é que as cepas brasileiras não são sensíveis às variações de pH. É possível que estas cepas não tenham ATPase em suas membranas, ou mesmo se ela está presente, está inativa nestas condições. É válido notar que quando o pH externo é mudado de seis unidades, o pH interno nestas células varia somente 1.4 unidade (Slavík, 1982; De La Peña *et al.*, 1982).



Esquema I

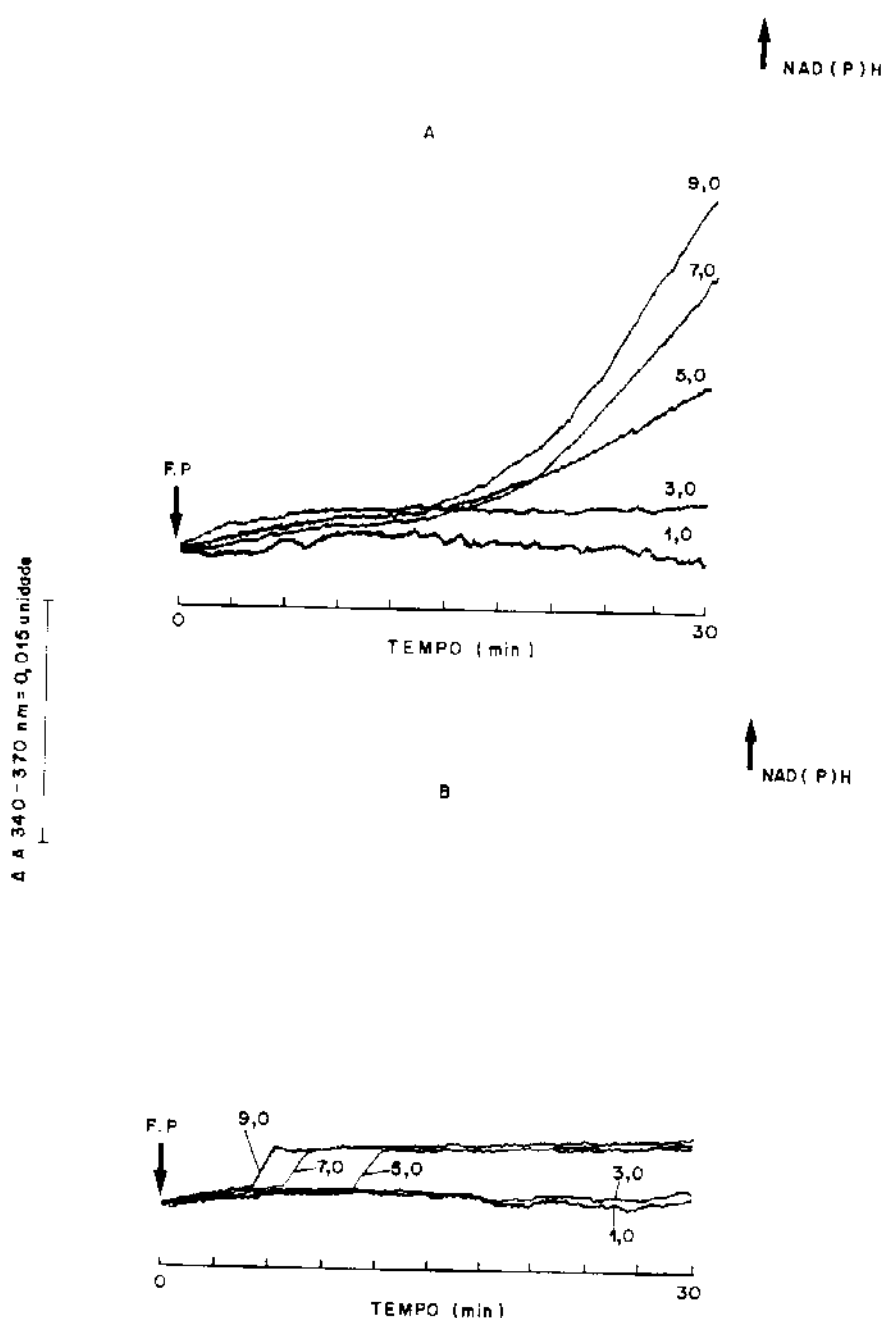


Figura 24: Efeito de pH na redução dos nucleotídeos de piridina existentes em células vivas de fermento de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*). Fermento de padaria (F.P., 2.3 mg/ml) foi adicionado ao meio de reação com pH apropriado. A temperatura do experimento foi mantida a 20°C durante o período de observação. A) cepas comerciais da Holanda e do Japão; B) cepas comerciais do Brasil.

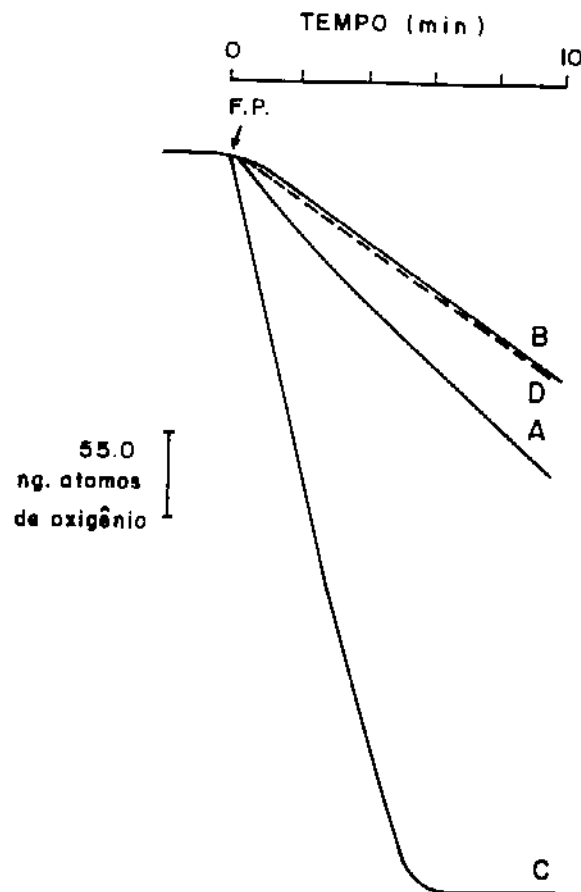
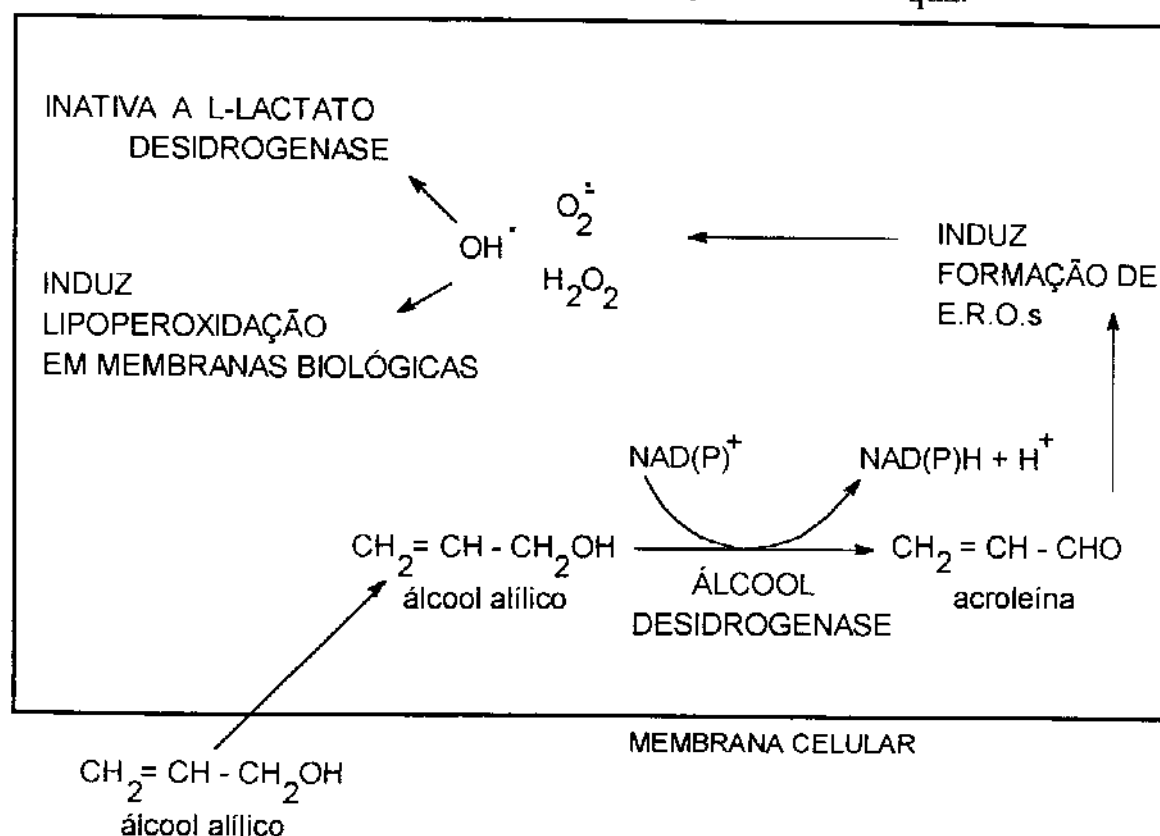


Figura 25: Consumo de oxigênio por cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*. Fermento de padaria (F.P., 2.3 mg/ml) foi adicionado à água bidestilada e deionizada (pH = 6.0, temperatura = 20°C). a) Fermipan (Holanda); b) Itaiquara (Brasil); c) Nishin Seifun Co. (Japão) e d) Fleischmman (Brasil).

O consumo de oxigênio está ligado à redução de nucleotídeos de piridina. Eles são reduzidos na via glicolítica, via das pentoses fosfato e no ciclo de Krebs (Rawn, 1989). Fig. 25 mostra que células japonesas consomem altas quantidades de oxigênio, mostrando que estas células têm um metabolismo aeróbico muito mais ativo do que os outros tipos de células estudadas aqui. A cepa holandesa reduz a mesma quantidade de NAD(P)H do que a japonesa, mas o consumo de oxigênio é mais baixo. Isto significa que a redução está sendo feita principalmente através da via anaeróbica. Este consumo de oxigênio pelas células brasileiras é muito baixo e conseqüentemente a redução dos nucleotídeos de piridina também. Como conseqüência, o metabolismo destas células é lento. Em termos práticos (uso em síntese orgânica), a célula que possui altas quantidades de NAD(P)H, reduzirá um substrato mais rapidamente. Isto é visto ao comparar os dois insets presentes na Fig. 23 (adição de acetoacetato de lítio). No segundo quadro ("inset"), acetoacetato de lítio não causou nenhuma oxidação detectável de NAD(P)H.

Álcool alílico (um provável inibidor da enzima L-lactato desidrogenase, usado por Nakamura e colaboradores, 1987; 1991; Pereira, 1995a; 1995b) foi adicionado nos experimentos da Fig. 26. Este composto químico é transformado em acroleína pela ação da enzima álcool desidrogenase (ver esquema II) (Pereira, 1995a; Schauenstein & Esterbauer, 1979). Acroleína

induz lipoperoxidação em membranas biológicas, através da produção de espécies reativas de oxigênio (E.R.O.s., ver esquema II) (Jaeschke *et al.*, 1987). Estas espécies de oxigênio podem inativar a enzima L-lactato desidrogenase (Darnet *et al.*, 1993) e se elas estão em altas concentrações, podem oxidar os resíduos SH de proteínas presentes em membranas de organelas (Pereira, 1995a; Pereira *et al.*, 1992; Pereira & Hermes-Lima, 1995) e de células (Pascoe & Reed, 1989). Isto produz uma alteração na homeostase de células e organelas, provocando perda da viabilidade celular (Pascoe & Reed, 1989). Para evitar isto, as células têm que ter um bom mecanismo de defesa antioxidante o qual é



Esquema II

constituído por enzimas tais como catalase e superóxido dismutase (Pereira, 1995a).

Fig. 26A mostra que adições crescentes de álcool alílico causam um decréscimo na redução de NAD(P)^+ nas cepas holandesas e japonesas. Por outro lado, este fenômeno é invertido com as cepas brasileiras (Fig. 26B). Provavelmente nesta última exista um bom mecanismo de defesa antioxidante, como mencionado acima. Para isto deverá ser medido posteriormente a atividade da catalase e superóxido dismutase destas células. Como observado, a produção de NAD(P)H na cepas brasileiras é mais eficiente que as holandesas e japonesas, nestas condições. Isto pode ser explicado baseado no fato de que quando álcool alílico é transformado em acroleína, uma molécula de NAD(P)^+ é reduzida (Schauenstein & Esterbauer, 1979) (ver esquema II). Na Fig. 26A isto provavelmente também ocorreu, mas a toxicidade da acroleína inativou uma boa parte da população de células devido, provavelmente, a estas não possuírem enzimas antioxidantes (Pereira, 1995a).

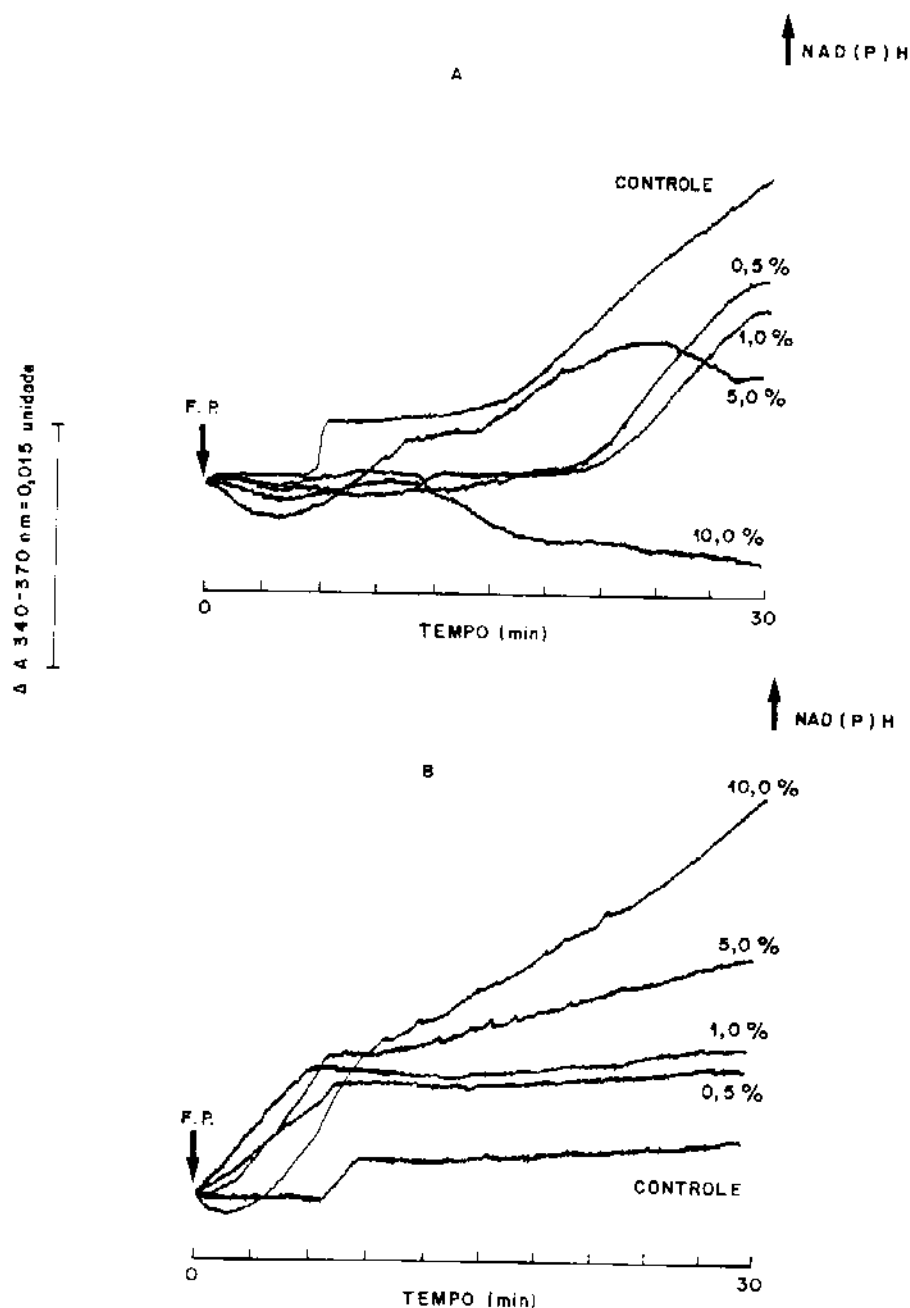
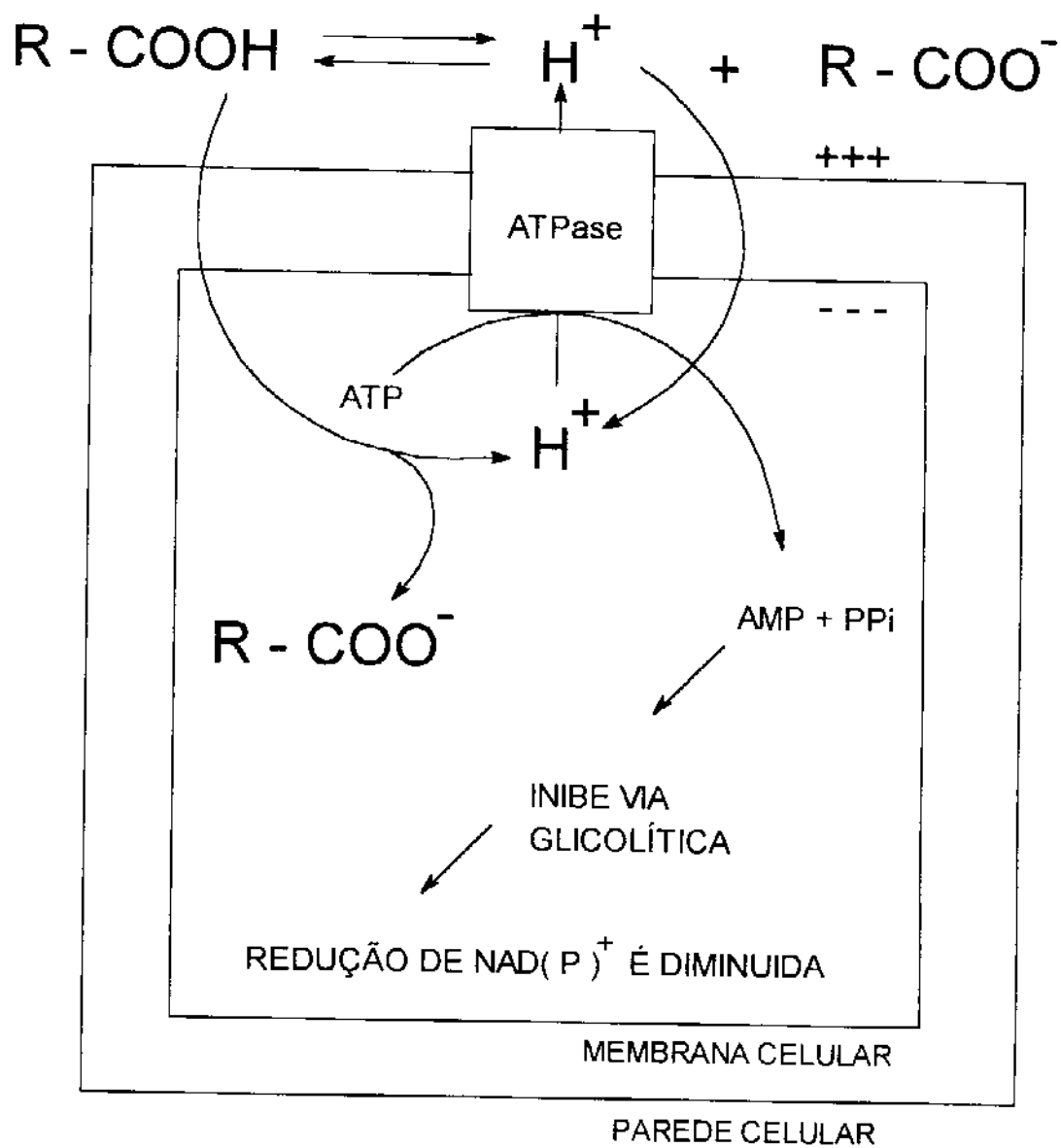


Figura 26: Influência de álcool alílico na redução de NAD(P)^+ dentro de células vivas de *Saccharomyces cerevisiae*. Fermento de padaria (F.P., 2.3 mg/ml) foi adicionado à água bidestilada e deionizada ($\text{pH} = 6.0$, temperatura = 20°C) contendo álcool alílico nas concentrações indicadas. A) cepas comerciais da Holanda e Japão; B) cepas comerciais do Brasil.

Outro aditivo testado foi ácido acético (Fig. 27). Acredita-se que este ácido melhora o excesso enantiomérico devido inibir o sítio ativo de determinadas enzimas de *S. cerevisiae* (Ushio *et al.*, 1991). O aumento da concentração de ácido acético faz a redução de NAD(P)^+ diminuir (Fig. 27A e 27B). O mecanismo para explicar isto pode ser o mesmo para a Fig. 24, quando o pH extracelular é baixo (ver esquema III). Medidas de pH intracelular feitas através de ressonância magnética nuclear de fósforo 31, de células de *S. cerevisiae* antes e depois da adição de ácido acético, mostram que este e outros ácidos orgânicos diminuem o pH intracelular (Pampulha & Loureiro-Dias, 1989)(ver esquema III). Destas informações, é possível extrapolar que o ácido acético age como um seletor de enzimas devido a alterar o pH intracelular. Isto faz mais sentido do que dizer que este ácido iniba os sítios ativos das enzimas. Alguns destas enzimas foram isolados de *S. cerevisiae* e sabe-se que alguns são inativados em determinadas faixas de pH (Nakamura *et al.*, 1991)



Esquema III

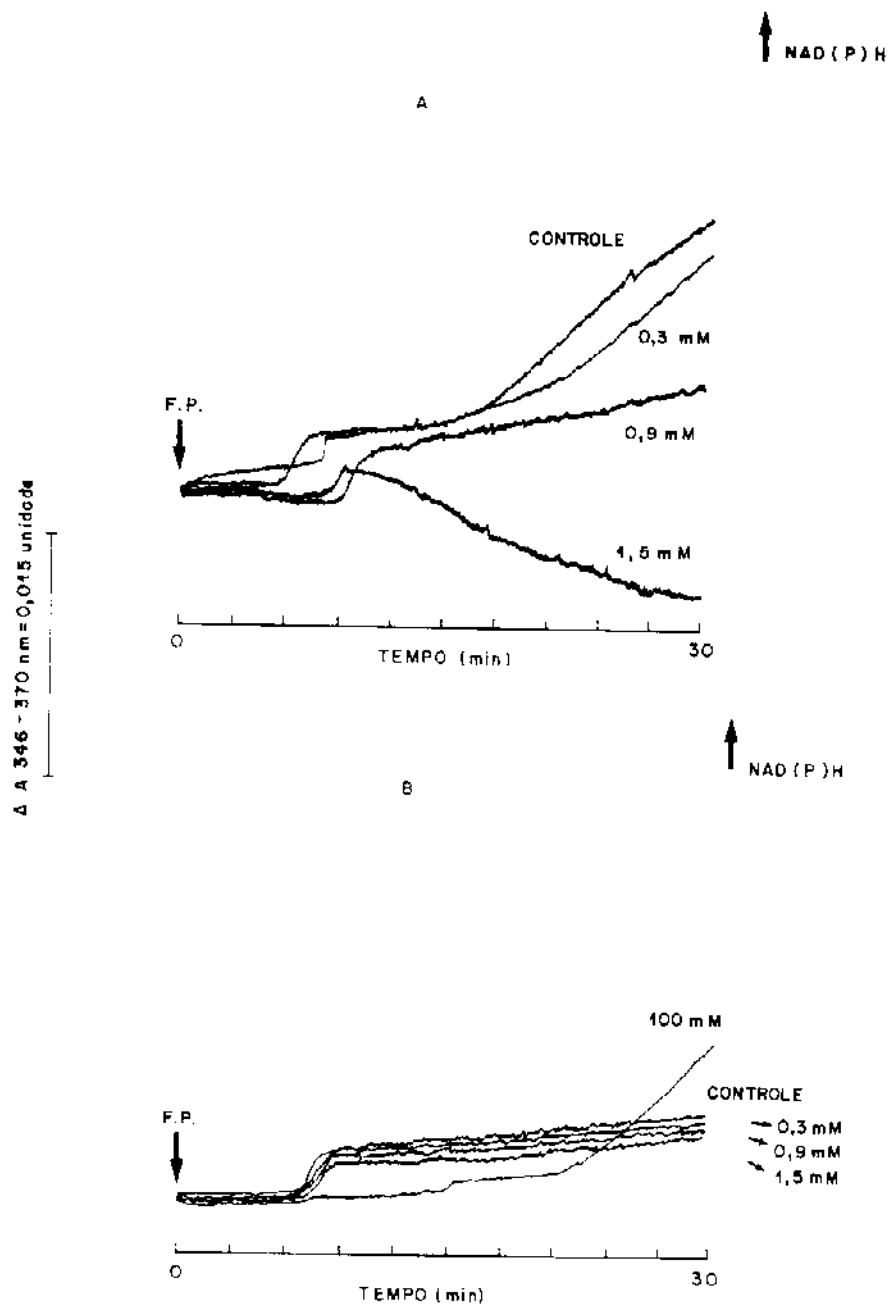


Figura 27: Influência da adição de ácido acético na redução de NAD(P)^+ dentro de células vivas de *Saccharomyces cerevisiae*. Fermento de padaria (F.P., 2.3 mg/ml) foi adicionado à água bidestilada e deionizada (pH = 6.0, temperatura = 20°C) contendo ácido acético nas concentrações descritas.

Um outro grande problema nas reações feitas com fermento de padaria é a solubilidade dos compostos orgânicos a serem biotransformados (Pereira, 1995a; 1995b). Compostos com capacidade detergente tais como dodecanol têm sido usados para melhorar esta solubilidade (Bare *et al.*, 1991; Pereira, 1995a). Entretanto, detergentes e emulsificantes são geralmente muito venenosos para as células vivas. Decanol foi adicionado no meio de reação contendo fermento de padaria. Fig. 28A e 28B mostram que todos os tipos de células reagem da mesma maneira. Baixas concentrações de decanol melhoram redução de NAD(P)^+ , ao passo que altas concentrações têm um efeito tóxico (uma provável ação detergente na membrana lipídica ocorreu) (Pereira, 1995a).

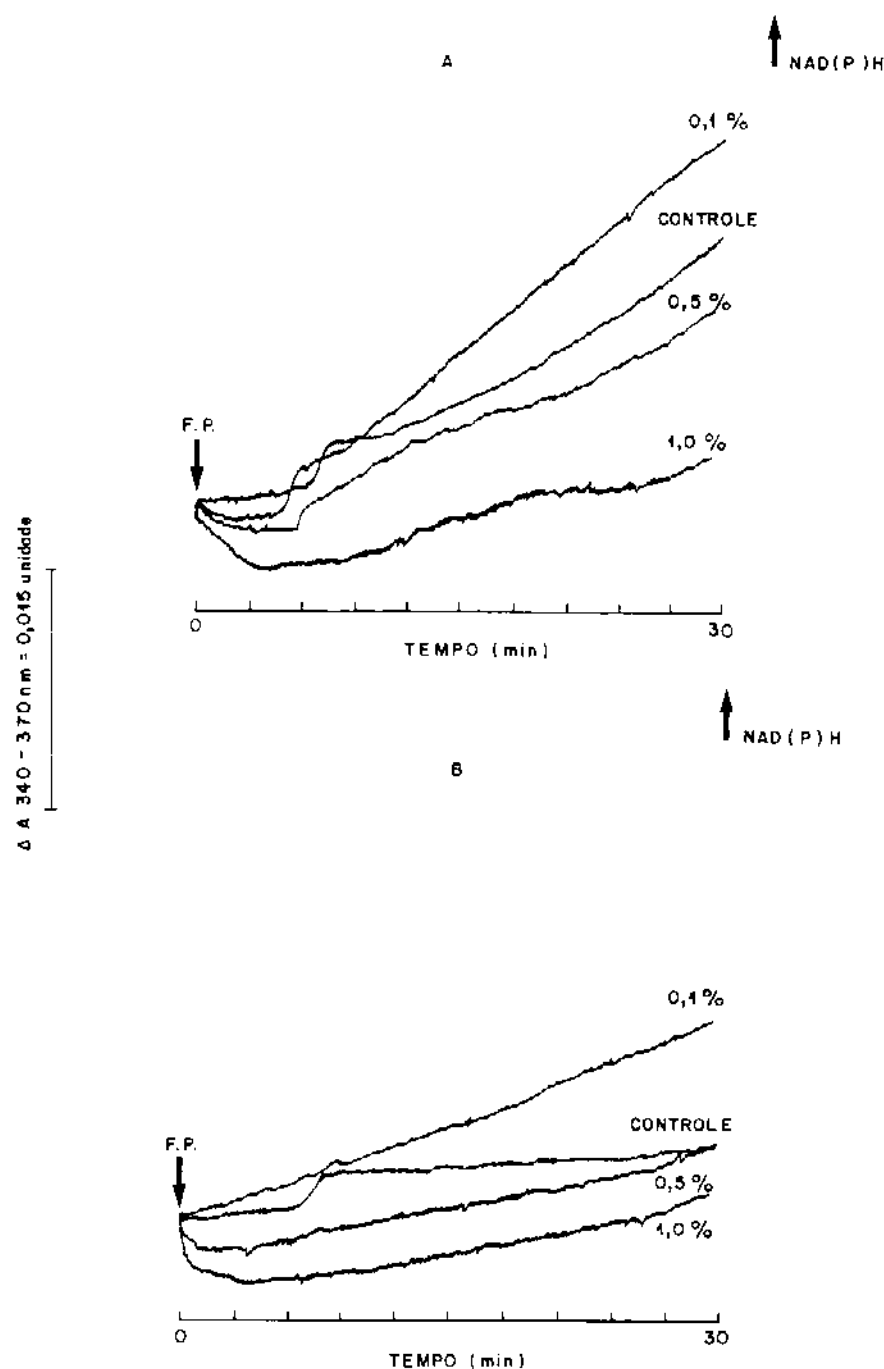


Figura 28: Efeito da adição de decanol na redução de NAD(P)^+ dentro de células vivas de *Saccharomyces cerevisiae*. Fermento de padaria (F.P., 2.3 mg/ml) foi adicionado  água bidestilada e deionizada (pH = 6.0, temperatura = 20°C) contendo decanol nas percentagens indicadas. A) cepas comerciais da Holanda e Japão; B) cepas comerciais do Brasil.

CONCLUSÃO DA PARTE I:

Pelos resultados aqui encontrados, conclui-se que os diversos fermentos biológicos comerciais existentes pertencem a cepas diferentes. Por esta razão, para se repetir resultados de um outro laboratório (principalmente do exterior), é obrigatório usar a mesma cepa, ou seja, células com as mesmas características bioquímicas. Na falta destas, a dosagem de NAD(P)H se faz necessária, pois através deste método podemos conseguir uma amostra de células que se aproxime do que queremos. Através desta dosagem podemos saber quando devemos adicionar o substrato a ser biotransformado (nos resultados da fig. 23A, depois de uma hora de incubação). Pode-se saber também se uma determinada célula é ou não sensível à temperatura e outros fatores que podem aumentar ou diminuir o tempo de catálise.

PARTE II

II. 1. Introdução

II. 1.1. O Microscópio de Força Atômica

II. 2. Resultados e Discussão

II. 3. Conclusões

II. 1. INTRODUÇÃO

II. 1.1 O Microscópio de Força Atômica:

A idéia do desenvolvimento de uma sonda para varredura e obtenção de imagens de superfícies não condutoras, levou à criação do microscópio de força atômica (MFA), cinco anos após o aparecimento do microscópio de tunelamento (Binning *et al.*, 1986).

Quando a sonda da ponta se aproxima dos átomos da camada mais externa da superfície de uma dada amostra, a sobreposição das nuvens eletrônicas provoca o surgimento de uma força repulsiva forte, e que é proporcional à densidade eletrônica total (Dejarguin, 1987; Israelachvili, 1985).

São estas forças atrativas e repulsivas que podem ser detectadas nos experimentos de varredura de forças. A sondagem destas forças nas diferentes regiões de uma dada superfície pode fornecer muitas informações sobre sua topografia, bem como de outras propriedades (Dejarguin, 1987; Israelachvili, 1985).

Existem basicamente dois tipos de microscopia de força: a microscopia de força atômica por contato e por não contato, que têm como base as interações repulsivas e atrativas respectivamente.

Ainda que a MFA foi desenvolvida como consequência do sucesso da microscopia de tunelamento, o conhecimento acumulado sobre as forças

atuantes entre superfícies poderá vir a ser útil para o desenvolvimento da MFA. Estudos das interações mecânicas sempre foi um campo bastante pesquisado, onde os resultados experimentais e modelos teóricos têm se acumulado nos últimos 40-50 anos.

O mais importante é mencionar que os resultados teóricos são bastante concordantes com os dados obtidos experimentalmente. Num aparelho de força que foi desenvolvido em 1980, foi extensivamente estudada (Dejarguin, 1987) a dependência da força com a distância entre objetos macroscópicos. Foram detectadas forças atrativas da ordem de 10^{-8} N a distâncias de separação que vão desde centenas de nanômetros até menos de 30 nm. Com o intuito de superar as dificuldades experimentais, foram utilizadas microbalanças com "feedback" para a detecção de forças atrativas. Desta forma foram obtidas as forças de adesão em diferentes materiais que mostram boa concordância com as previsões teóricas (Dsyaloshinskii *et al.*, 1961).

Os resultados obtidos pela MFA por contato apresentam melhor resolução do que os por não-contato, e o registro das variações das forças repulsivas é tão simples quanto o das forças atrativas. O microscópio operando no modo por contato têm bastante analogia com um profilômetro, instrumento utilizado para medidas da topografia de superfícies (Israelachvili *et al.*, 1972)

Entretanto as maiores vantagens do MFA estão relacionadas com a sua sensibilidade a forças menores, entre a ponta do sensor e a superfície, e a sua

alta precisão na avaliação de corrugações verticais das superfícies sondadas. As forças obtidas pelas sondas na MFA são de três a quatro ordens de grandeza menores que as obtidas pelos profilômetros, que são sensíveis às forças da ordem de 10^{-5}N . Isto permite que materiais com relativamente baixos limites de deformação plástica possam ser examinados de forma não destrutiva através da MFA por contacto. A variedade de materiais moles, tais como os biológicos, podem ser ampliadas quando as medidas de MFA são realizadas em meio líquido. Devido à forte dependência das forças repulsivas com a distância, as corrugações das superfícies podem ser detectadas com precisão através desta técnica. A resolução vertical da MFA é maior do que a obtida por microscopia eletrônica de varredura ou por interferometria óptica (Israelachvili *et al.*, 1972).

Os registros de topografias de superfícies, em escala atômica, são propriedade única dos MFA por contacto e tunelamento, que aumentaram as possibilidades dos métodos microscópicos nos últimos anos.

Superfícies monotonicamente achatadas, como por exemplo a mica, o grafite e materiais lamelares em geral, podem ser examinados com sucesso por MFA, em escala atômica (Albrecht & Quate, 1987; Binnig *et al.*, 1987). No presente momento, a resolução da MFA por contacto é próxima da obtida por microscopia de tunelamento. Comparações de imagens obtidas pelas duas técnicas numa mesma amostra poderão ser muito úteis para estudos tanto da topografia como da estrutura eletrônica de superfícies.

Com o rápido desenvolvimento de instrumentos comerciais de MFA e a expansão de suas aplicações a materiais diferentes, tais como biológicos e, inclusive, células vivas, têm sido encontradas várias dificuldades experimentais para aplicação desta técnica.

Os principais problemas estão relacionados com o controle da força aplicada à amostra durante as medidas, nos diferentes ambientes, e também devido à geometria da sonda. Como resultado, o surgimento de artefatos experimentais têm sido inevitáveis. No presente momento, uma cuidadosa escolha das condições experimentais e das sondas mais apropriadas é um passo extremamente importante para a utilização da MFA com sucesso.

II. 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

II. 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figuras de 29 a 33 apresentam micrografias de 4 cepas de fermento padaria, (*Saccharomyces cerevisiae*) feitas com um microscópio de força atômica (MFA). Estas imagens foram reprodutíveis (mesmo quando geradas em outro MFA de marca diferente (TOPOMETRIX TMX 2000) e elas eram as mesmas quando o scan foi repetido. Este instrumento foi escolhido porque este tipo de células podem ser vistas sem o uso dos métodos convencionais de fixação usados obrigatoriamente em microscopia eletrônica (Pereira *et al.*, 1995). Um dos métodos mais comuns usados para preparar biomoléculas para MFA é a imobilização do biomaterial (Roberts *et al.*, 1994). Embora as amostras pudessem ser imobilizadas através de atração eletrostática (Pereira *et al.*, 1995; Roberts *et al.*, 1994) sobre um suporte bem barato como a crisotila (Sorrilha *et al.*, 1992), não foi escolhido nenhum destes métodos. As amostras foram apenas secas por cerca de 6 horas em uma estufa a 28°C. Um ponto a destacar é que as células não são mortas durante o período de observação, o que é comum em microscopia eletrônica. Outro ponto importante é que o MFA pode gerar fotos em escala atômica, o que é impossível para os microscópios eletrônicos. Apesar destas vantagens a microscopia de força atômica tem vários problemas para se conseguir imagens de células íntegras, devido à deformação que a amostra sofre pela ponta de varredura do microscópio (Yang *et al.*, 1993).

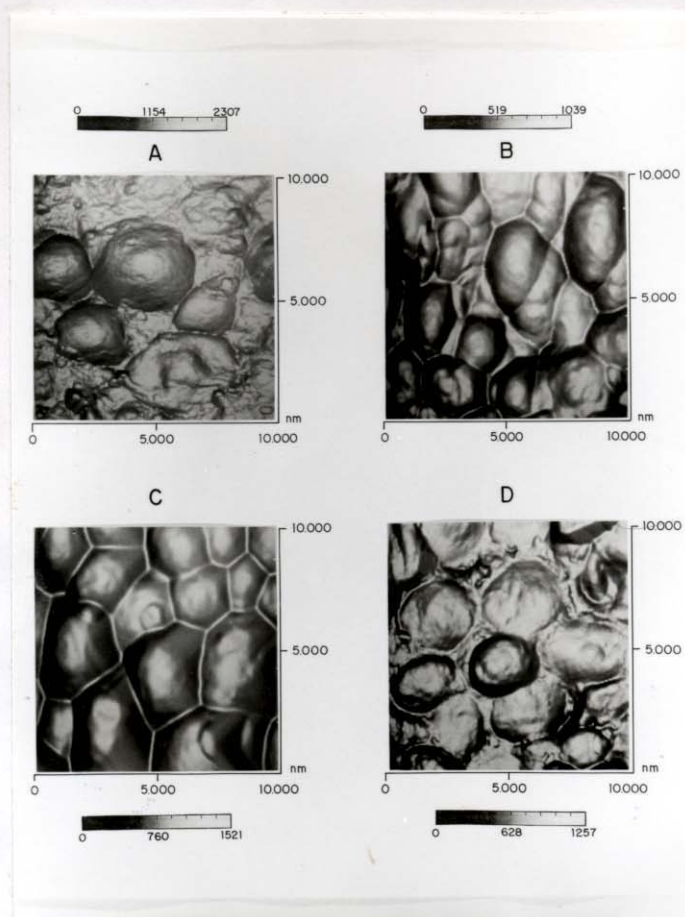


Figura 29: Micrografias de força atômica tridimensionais de superfície mostrando diferentes aspectos morfológicos entre cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*. O pH da água usada era de 6.0.

A) Fermipan (Holanda);

B) Itaiquara (Brasil);

C) Nishin Seifun Co. (Japão);

D) Fleischmman (Brasil).

Este problema pode ser solucionado quando são usados métodos que dão certa rigidez à membrana das células vivas (amostra) (Yang *et al.*, 1993), ou então, quando são usadas células que possuem parede celular. A parede celular dá uma certa rigidez natural à amostra (Brady *et al.*, 1994), conseqüentemente não é necessário usar métodos que tornem a amostra rígida (Yang *et al.*, 1993), tornando possível as imagens de alta resolução como mostradas neste trabalho (sem necessidade de fixação).

As imagens obtidas são consistentes com aquelas obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Dziezak, 1987), incluindo tamanho e forma.

Figs. 29 e 30 mostram que estas células possuem diferenças morfológicas marcantes. Nota-se uma alta população celular nestas fotos devido ao preparo da amostra e à necessidade de que quanto mais densidade populacional tivéssemos mais fácil seria a localização do objetivo.

Figuras 29A a 29D e 30A a 30D mostram que estas células têm aspectos morfológicos distintos provavelmente devido pertencerem a cepas diferentes.

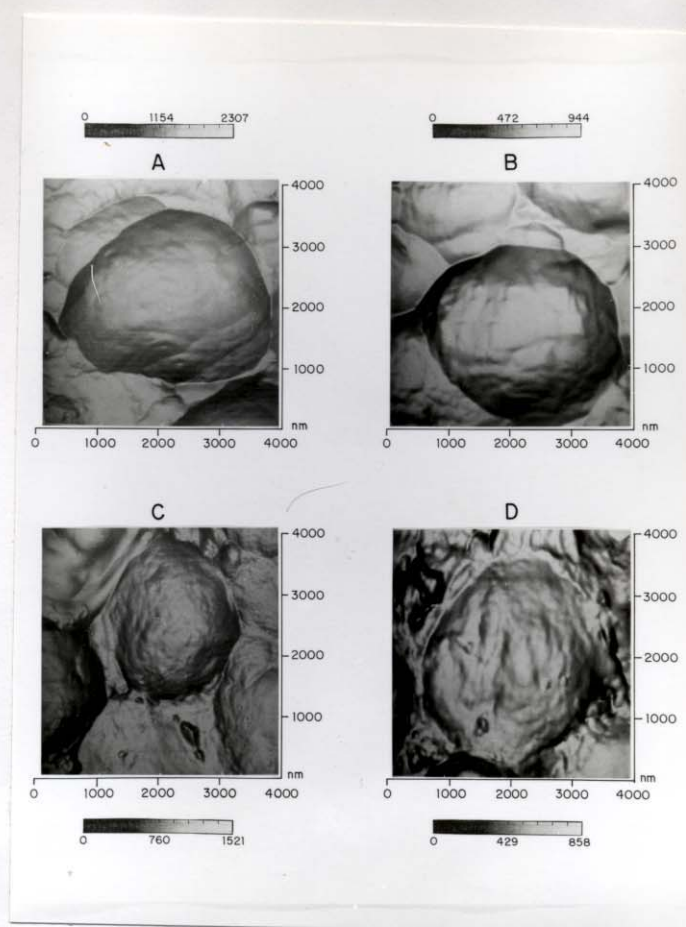


Figura 30: Micrografias de força atômica tridimensionais de superfície mostrando diferentes aspectos morfológicos entre cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*. O pH da água usada era de 6.0.

A) Fermipan (Holanda);

B) Itaiquara (Brasil);

C) Nishin Seifun Co. (Japão);

D) Fleischmman (Brasil).

Em todas as fotografias os paines A e C representam cepas holandesa e japonesa, respectivamente, e painel B e D cepas brasileiras.

A superfície externa destas células são constituídas de polissacarídeos tais como mananas e glicanas (Phaff, 1977), proteínas, quitosano e quitina (Brady & Duncan, 1994) que não permitem a passagem de moléculas vindas do meio externo. Outro ponto é que esta membrana sendo rígida, o fenômeno de exo- ou endocitose não deva ocorrer, e portanto o influxo de substrato seja feito através dos poros existentes na parede celular (Fig. 31A, 31C e 31D). O diâmetro destes poros variam de célula para célula e este fato pode exercer uma importante influência na velocidade das reações quando biotransformações são feitas. Os poros das cepas japonesas e holandesas são cerca de 3 e 4 vezes maiores, respectivamente, do que aqueles das cepas brasileiras. Conseqüentemente, o influxo de substrato deve ser na mesma proporção. Este pode ser um dos fatores, além da produção de NAD(P)H, que contribue para que as cepas holandesas e japonesas tenham maior poder de redução do que as cepas brasileiras como observado na parte I deste trabalho (Pereira, 1995a; Pereira *et al.*, 1995).

Todas as micrografias da Fig. 32 são da cepa japonesa. As figuras 32A e 32B mostram que a cepa japonesa tem uma superfície rugosa e que pode-se notar uma protuberância que é uma provável comunicação da molécula de ATPase com o meio extracelular, ou então, um "termossensor biológico" que

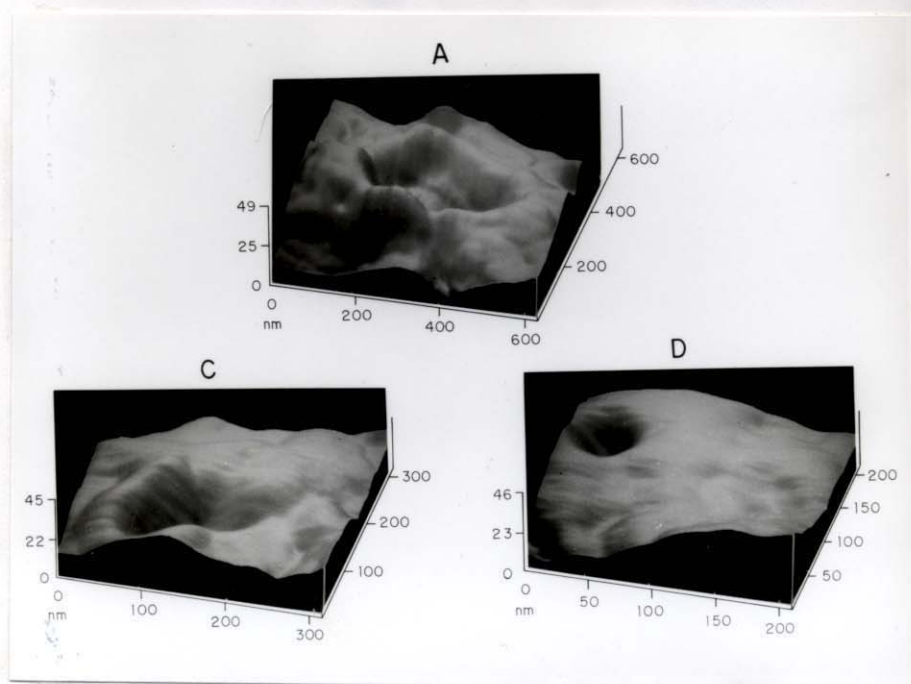


Figura 31: Micrografias de força atômica mostrando poros na parede celular polisacarídica de cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*.

A) Fermipan (Holanda);

B) Nishin Seifun Co. (Japão);

C) Fleischmman (Brasil).

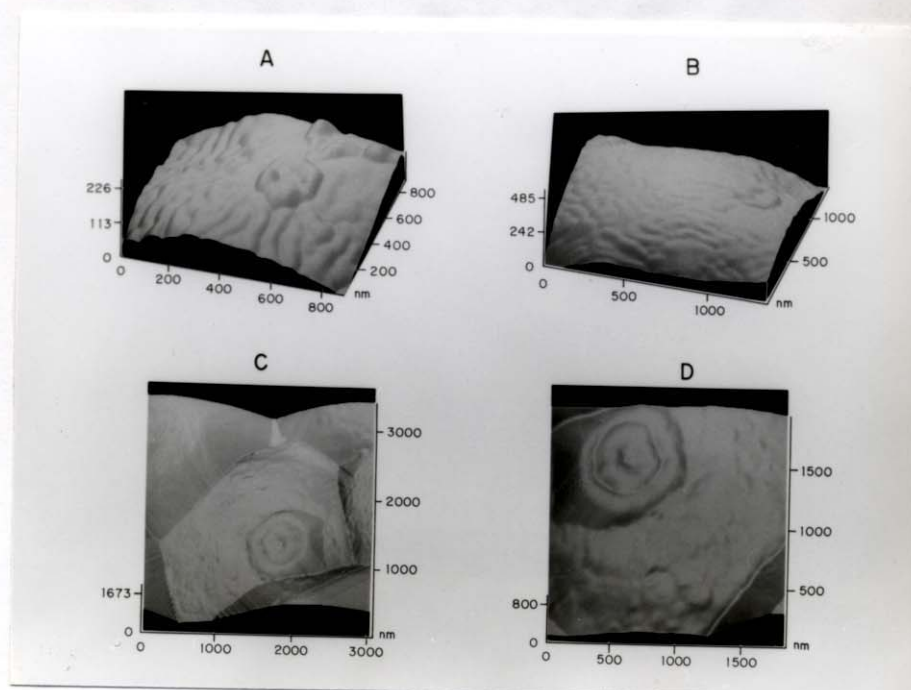


Figura 32: Micrografias de força atômica tridimensionais da superfície da cepa comercial japonesa de *Saccharomyces cerevisiae*, obtidas de Nishin Seifun Co.

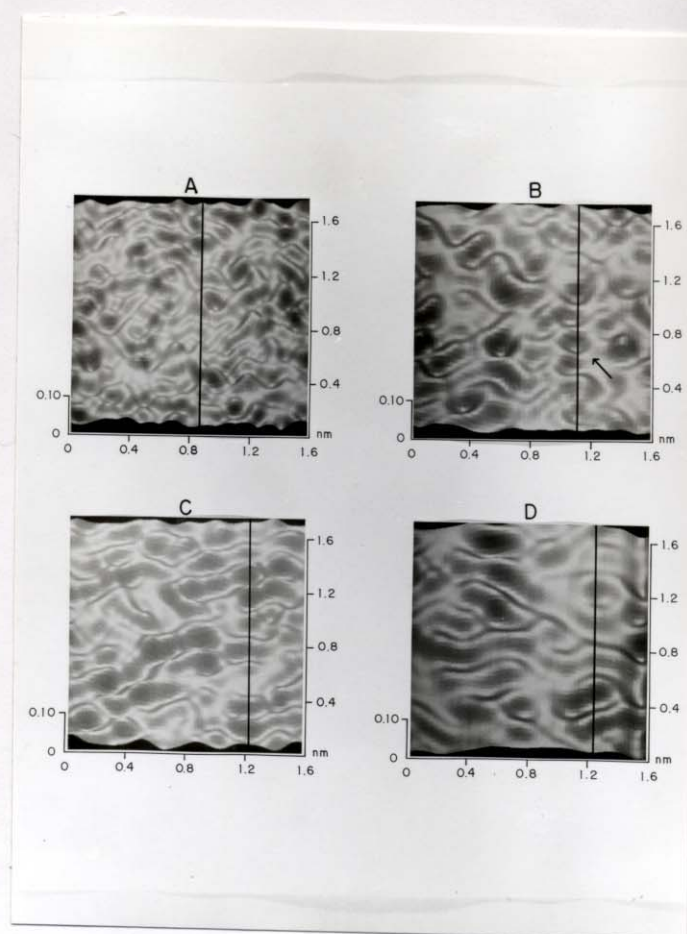


Figura 33: Micrografias de força atômica mostrando moléculas de polissacarídeos na parede celular de cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*.

A) Fermipan (Holanda);

B) Itaiquara (Brasil);

C) Nishin Seifun Co. (Japão);

D) Fleischmman (Brasil).

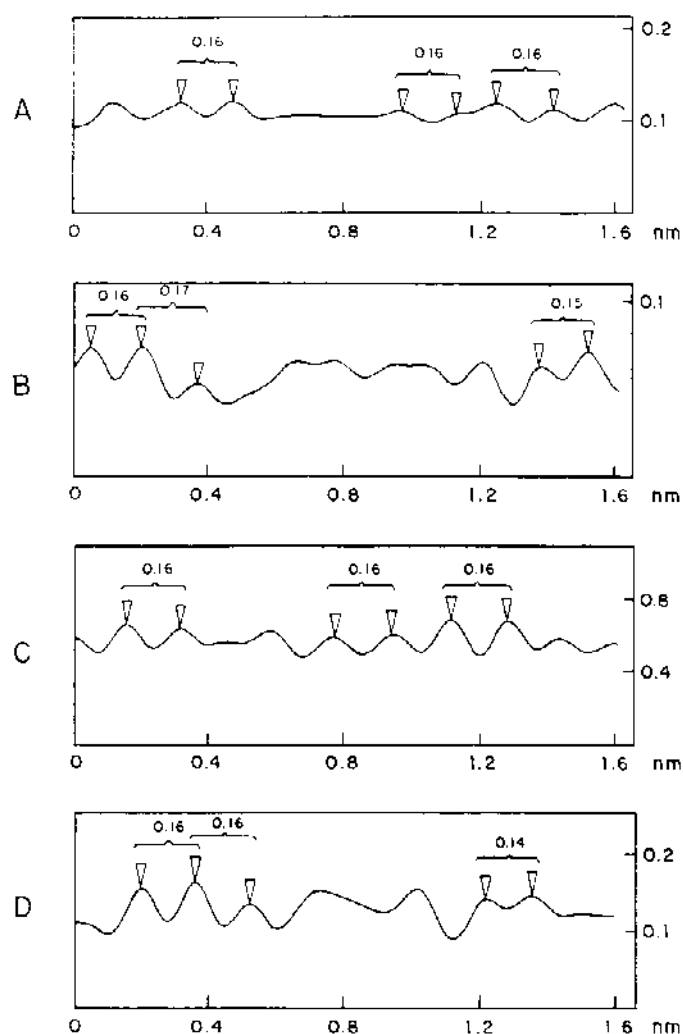


Figura 34: Medida da distância entre átomos na superfície da parede celular de células de *Saccharomyces cerevisiae*, usando MFA.

A) Fermipan (Holanda);

B) Itaiquara (Brasil);

C) Nishin Seifun Co. (Japão);

D) Fleischmman (Brasil).

faz estas células sentirem variações de temperatura no meio extracelular como postulado anteriormente (Pereira, 1995 / ver parte I deste trabalho). Na Fig 32C e 32D, descobriu-se uma rugosidade que pode ser uma provável cicatriz de brotamento, quando esta micrografia é comparada com aquelas feitas com microscopia eletrônica de varredura (Dziedzic, 1987). Esta cicatriz de brotamento pode ser um pouco diferente daquela mostrada pela microscopia eletrônica, porque elas vêm de diferentes cepas de *S. cerevisiae*.

Os resultados da figura 33 mostram que carboidratos são candidatos interessantes para serem estudados pela microscopia de força atômica. O tamanho e forma destas estruturas podem ser difíceis de serem determinadas por métodos biofísicos convencionais (Morris, 1994; Pereira *et al.*, 1995). Até o presente momento existe um número limitado de estudos de polissacarídeos com MFA (Morris, 1994; Pereira *et al.*, 1995). A membrana externa da parede celular da célula de *S. cerevisiae* consiste de manana, polímero de monômeros do açúcar manose, ligado a proteínas (Brady *et al.*, 1994). Figura 33A a 33D apresentam micrografias a nível atômico. Em todos os painéis, notam-se estruturas fechadas que, provavelmente, são moléculas de açúcares ($0.1 \text{ nm} = 1 \text{ \AA}$). Particularmente, na figura 33B, a estrutura fechada, indicada pela seta, aproxima-se uma "conformação de cadeira", como é conhecido anéis de 6 membros em sua conformação mais estável em bioquímica e química orgânica (Nyburg, 1961; Pereira *et al.*, 1995).

Um dos mais sérios problemas para fazer imagens em alta resolução no ar, como as apresentadas aqui, é a contaminação da ponta (Yang *et al.*, 1993). Este problema é eliminado quando a amostra está imersa em líquidos (Yang *et al.*, 1993). É possível que a contaminação da ponta não estivesse presente nestes experimentos porque as células da amostra têm tendência a reter água devido às hidroxilas presentes nos polissacarídeos da parede celular e a temperatura usada foi branda (28°C) e tempo de secagem pequeno (cerca de 6 horas). As células estavam hidratadas e continuavam a crescer e dividir. Isto foi notado quando as amostras foram retiradas do MFA, depois de 24 horas e foi observado que o cantilever foi perdido porque estava aderido entre células da amostra (devido a esta ter crescido em altura). Com um microscópio óptico, foi visto que a amostra também tinha aumentado em tamanho, provando que as células estavam se dividindo.

Nas figuras 34A a 34D, foi medida a distância entre dois átomos adjacentes presentes na parede celular destes micróbios. Uma distância média de 0.16 nm (=1.6 Å), que é coerente com os resultados de difração de raios X para ligação simples carbono-carbono que é 1.53Å (Nyburg, 1961).

CONCLUSÃO DA PARTE II:

Estes resultados foram um grande passo na área de microscopia de força atômica, pois através de um preparo simples de amostras podemos fazer micrografias de células vivas que contenham parede celular (fato considerado inédito até o presente momento). Podemos também fazer estudos morfométricos em cepas de células vivas da mesma espécie, o que não é possível com um microscópio eletrônico de varredura. Além disso, o estudo da disposição tridimensional dos átomos (e a distância entre eles) da parede celular é outra grande possibilidade aberta com o presente trabalho.

CONCLUSÃO GERAL:

Os resultados desta parte da tese confirmam a hipótese inicial que estas células pertenceriam a cepas diferentes e que como consequência deveriam ter aspectos morfológicos diferentes como observado nas fotos geradas pelo microscópio de força atômica. Alguns aspectos como diâmetro dos poros, podem exercer influência direta na velocidade das reações de biotransformação executadas com estas células. Assim, a técnica de MFA associada com medidas bioquímicas apresentadas na PARTE I podem ser usadas para identificar um tipo de célula mais adequada para um tipo de reação de biotransformação, obtendo-se assim resultados mais reprodutíveis.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS:

- Albrecht, T.R. & Quate, C.F. (1987), Atomic resolution imaging on a non-conductor by atomic force microscopy. *J. Appl. Phys.*, **62**, 2599.
- Ariens, E.J. (1988), Stereospecificity in Bioactive Agents , Elsevier, Amsterdam, pp 39 .
- Bare, G., Jacques, P.H., Hubert, J.B., Rikir, R. & Thonart, P.H. (1991), Bioconversion of a L-carnitin precursor in a one-or two-phase system. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **28/29**, 445-456.
- Binning, G., Gerber, Ch., Stoll, E., Albrecht, T.R. & Quate, C.F. (1987), Atomic resolution with atomic force microscope. *Europhys. Lett.*, **3**, 1281.
- Binning, G., Quate, C.F. & Gerber Ch. (1986), Atomic Force Microscopy. *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 930 - 933.
- Bosnik, B. and Fryzuk, M.D. (1981), Topics in Inorganic and Organometallic Stereochemistry, Geoffroy, G. I., ed., Wiley, New York, p. 119.

- Brady, D. & Duncan, J.R. (1994), Binding of heavy metals by the cell walls of Saccharomyces cerevisiae. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 633 - 638.
- Brady, D., Stoll, A.D., Starke, L. and Duncan, J.R. (1994), Chemical and enzymatic extraction of heavy metal binding polymers from isolated cell walls of Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 297-302.
- Bujons, J., Guajardo, R. & Kyler, K.S. (1988), Enantioselective enzymatic sterol synthesis by ultrasonically stimulated baker's yeast. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 604-606.
- Chen, C.S.; Sih, C.J. (1989), General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 695.
- Chibata, I.; Tosa, T; Sato, T. (1974), Immobilized aspartase-containing microbial cells: preparation and enzymatic properties. *Appl. Microbiol.*, **27**, 878-885.
- Corey, E.J.; Link, J.O. (1990), The first enantioselective syntheses of pure R- and S-isoproterenol. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 601-604.

- Creagh, A.L., Hasenack, B.B.E., Van der Padt, A., Sudhölter, E.J.R. & Van't Riet K. (1994), Separation of amino-acid enantiomers using micellar-enhanced ultrafiltration. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 690 - 698.
- Crout, D.H.G.; Dalton, H.; Hutchinson, D.W.; Miyagoshi, M. (1991), Studies on pyruvate decarboxylase: acyloin formation from aliphatic, aromatic and heterocyclic aldehydes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1329-1334.
- Crumbie, R.L., Deol, B.S., Nemorin, J.E., & Ridley, D.D. (1978), *Aust. J. Chem.*, **31**, 1965-1980.
- Csuk, R. & Glänzer, B.I. (1991), Baker's yeast mediated transformations in organic chemistry. *Chem. Rev.*, **91**, 49 - 97.
- Cunningham, E.B. (1978), *Mechanisms of Metabolism*, Mc-Graw-Hill, New York, pp 526.
- Darnet, S., Thomas, D. & Legoy, M. (1993), Use of enzymatic oxygen scavangers to prevent lactate dehydrogenase inactivation by oxygen radicals. *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 8-12.

Dejarguin, B.V., Churacv, N.V. & Muller, V.M. (1987), Surface Forces, Nauka.

De La Peña, P., Barros, F., Gascón, S., Ramos, S., & Lazo, P. S. (1982), The electrochemical proton gradient of Saccharomyces. The role of potassium. *Eur. J. Biochem.*, **123**, 447-453.

Dsyaloshinskii, I.E., Lifshitz, E.M. & Pitaevskii (1961), The general theory of van der Waals forces. *Adv. Phys.*, **10**, 165.

Dziezak, J.D. (1987), Yeasts and yeast derivatives: definitions, characteristics, and processing. *Food Technol.*, **41**, 104 - 121.

Ebbesen, P. (1991), Chirality of quartz. Fibrosis and tumour development in dust inoculated mice. *Eur. J. Cancer Prev.*, **1**, 39 - 41.

Eraso, P., & Gancedo, C. (1987), Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *Febs Lett.*, **224**, 187-192.

- Fantin, G., Fogagnolo, M., Guerzoni, M.E., Medici, A., Pedrini, P., & Poli, S. (1994), Stereochemical control in baker's yeast redox biotransformations of aryl methyl ketones and carbinols. *J. Org. Chem.*, **59**, 924 - 925.
- Ghatorae, A.S.; Bell, G.; Halling, P.J. (1994), Inactivation of enzymes by organic solvents: new technique with well-defined interfacial area. *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 331-336.
- Gill, G., Ferre, E., Barre, M., & Le Petit, J.(1988), Reduction of allenic alcohols by Saccharomyces cerevisiae. *Tetrahedron Lett.*, **29**, 3797.
- Goodman, L.S.; Gilman, A. (1991), As Bases Farmacológicas da Terapêutica, Guanabara Koogan, 8a. ed., pp 140 .
- Greenberg, M.J. (1979), Dependence of odor intensity on the hydrophobic properties of molecules. A quantitative structure odor intensity relationship. *J. Agric. Food Chem.* , **27**, 347 - 352.
- Hilderbrandt, G.; Klavehn, W. (1930), *Ger. Pat.* , 548.459.

- Israelachvili, J.N., (1985), Intermolecular and surface forces. Acad. Press, London, .
- Israelachvili, J.N. & Tabor, D. (1972), The measurements of van der Waals dispersion forces in the range of 1.5 to 130 nm. *Proc. Royal Soc. London A*, **19**, 331.
- Jaeschke, H., Kleinwaechter, C., & Wendel, A. (1987), The role of acrolein in allyl alcohol-induced lipid peroxidation and liver cell damage in mice. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 51-57.
- Jayasinghe, L.Y., Smallridge, A.J. & Trehwella, M.A. (1993), The yeast mediated reduction acetoacetate in petroleum ether. *Tetrahedron Lett.*, **34**, 3949-3950.
- Kagan, H., Wilkinson, G., and F. G. A. (1982), Comprehensive Organometallic Chemistry, Abel, E. W., ed., Pergamon, Oxford, vol. 8, p.463.
- Long, A & Ward, O.P. (1989), Biotransformation of benzaldehyde by Saccharomyces cerevisiae: characterization of the fermentation and toxicity effects of substrates and products. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 933-941.

- Loureiro-Dias, M.C., & Santos, H. (1990), Effects of ethanol on Saccharomyces cerevisiae as monitored by *in vivo* ^{31}P and ^{13}C nuclear magnetic resonance. *Arch. Microbiol.*, **153**, 384-391.
- Mackworth, J. F. (1948), The inhibition of thiol enzymes by lachrymators. *Biochem. J.*, **42**, 82-90.
- MacLeod, R.; Prosser H.; Fikentscher, L.; Lanyi, J.; Mosher, H.S. (1964), Asymmetric reductions. XII. Stereoselective ketone reductions by fermenting yeast. *Biochemistry*, **3**, 838-846.
- Medina, J.C. & Kyler, K.S. (1988), Enzymatic cyclization of hydroxylated surrogate squalenoids with baker's yeast. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4818-4821.
- Mogren, H., Hedenskog, G., & Hofsten, A. (1973), The influence of heat processing and mechanical desintegration on yeast for single-cell protein. *Physiol. Plant.*, **29**, 82-91.

-
- Mori, K. (1989), Synthesis of optically active pheromones. *Tetrahedron*, **45**, 3233-3298.
- Morris, V.J. (1994), Biological applications of scanning probe microscopies. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **61**, 131-185.
- Morrison, R. & Boyd, R. (1990), Química Orgânica, In "Estereoquímica", 9ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian. pp. 159.
- Nakamura, K., Inoue, K., Ushio, K., Oka, S., & Ohno, A. (1987), Effect of allyl alcohol on reduction of β -keto esters by baker's yeast. *Chem. Lett.*, **4**, 679-682.
- Nakamura, K., Inoue, K., Ushio, K., Oka, S., & Ohno A. (1988), Stereochemical control on yeast reduction of α -keto esters, reduction by immobilized baker's yeast in hexane. *J. Org. Chem.*, **53**, 2589-2593.
- Nakamura, K., Kawai, Y., Nakajima, N., & Ohno, A. (1991), Stereochemical control of microbial reduction 17. A method for controlling the enantioselectivity of reductions with baker's yeast. *J. Org. Chem.*, **56**, 4778-4383.

- Nakamura, K., Ushio, K., Oka, S., & Ohno, A. (1984), Stereochemical control in yeast reduction. *Tetrahedron Lett.*, **25**, 3979-3982.
- Naoshima, Y., Maeda, J., & Munakata, Y. (1992), Control of the enantioselectivity of the bioreduction with immobilized baker's yeast in, a hexane solvent system. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **6**, 659-660.
- Nikolova, P. & Ward, O.P. (1991), Production of L-Phenylacetyl carbinol by biotransformation: product and by-product formation and activities of the key enzymes in wild-type and ADH isoenzyme mutants of Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 493-498.
- Nyburg, S.C. (1961), X-Ray Analysis of Organic Structures. In "Fibrous Macromolecular substances. Academic Press New York and London. p. 338-393.
- Pampulha, M.F., & Loureiro-Dias, M.C. (1989), Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 547-550.

- Pascoe, G.A., & Reed, D.J. (1989), Cell calcium, vitamin E, and the thiol redox system in cytotoxicity. *Free Rad. Biol. Med.*, **6**, 209-224.
- Pereira, R.S. (1995)a, Baker's yeast: some biochemical aspects and their influence in biotransformations. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **55**, (1), 000-000, Edição de outubro de 1995, no prelo.
- Pereira, R.S. (1995)b, Fermento biológico de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) e Seu Uso em Sínteses Assimétricas. *Quím. Nova*, **18**, 452 -459.
- Pereira, R.S. (1995)c, Lipoperoxidation: the role of Ca^{2+} and protection by calcinine. *Eur. J. Drug Metab. Ph.* , no prelo.
- Pereira, R.S., Bertocchi, A.P.F. & Vercesi, A.E. (1992), Protective effect of trifluoperazine on the mitochondrial damage induced by Ca^{++} plus prooxidants. *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 1795-1801.
- Pereira, R.S. & Hermes-Lima, M. (1995), Can trifluoperazine protect mitochondria against reactive oxygen species? *Eur. J. Drug Metab. Ph.* , no prelo.

- Pereira, R.S., Parizotto, N.A. & Baranauskas, V. (1995), Observation of baker's yeast strains used in biotransformation by atomic force microscopy. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, no prelo.
- Peters, J., Zelinski, T., & Kula, M. (1992), Studies on the distribution and regulation of microbial keto ester reductases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 334-340.
- Phaff, H.J. (1977), Enzymatic yeast cell wall degradation. *Adv. Chem. Ser.*, **160**, 244 - 245.
- Pollack, J.W.; Jacobs, J.W. & Schultz, P.G. (1986), Selective chemical catalysis by an antibody. *Science*, **234**, 1570-1573.
- Präve, P., Faust, U., Sittig, W. & Sukatsch, D.A. (1987), Fundamentals of Biotechnology, VCH publishers, Weinheim; 563 - 600.
- Prudent, J.R., Uno T. & Schultz, P.G. (1994), Expanding the scope of RNA catalysis. *Science*, **264**, 1924 - 1927.

Rawn, D. (1989), *Biochemistry*, International Edition, 265 - 287. Neil Petterson Publishers.

Roberts, C.J., Williams, P.M., Davies, M.C., Jackson, D.E. and Tendler, S.J.B. (1994), Atomic force microscopy and scanning tunnelling microscopy: refining techniques for studying biomolecules. *Tibtech*, **12**, 127-132.

Schauenstein, E., & Esterbauer, H. (1979), Formation and properties of reactive aldehydes In: *Submolecular Biology and Cancer*, 225-244. Ciba Foundation Series 67, Excerpta Medica, Amsterdam.

Schultz, P.G. (1989), Catalytic antibodies. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 1283.

Seebach, D.; Sutter, M.A.; Weber, R.H.; Zuger, M.F. (1984), Yeast reduction of ethyl acetoacetate: (S)-(+)-ethyl 3 hydroxybutanoate. *Org. Synth.*, **63**, 1-9.

Slaughter, J.C., & Nomura, T. (1992), Intracellular glycogen and trehalose contents as predictors of yeast viability. *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 64-67.

-
- Slavík, J. (1982), Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes. *Febs Lett.*, **140**, 22-26.
- Sorriha; A. E. P. M.; Marques, M.; Joekes, I.; Morán, P. J. S.; Rodrigues J. A. R. (1992), Reduction of phenylketones by immobilized baker's yeast. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2**, 191-196.
- Stinson, S.C. (1992), Chiral drugs. *Chem. Eng. News*, **70**, 46-79.
- Stinson, S.C. (1994), Chiral drugs. *Chem. Eng. News*, **72**, 38-72.
- Tsai, S. & Wei, H. (1994), Effect of solvent on enantioselective esterification of naproxen by lipase with trimethylsilyl methanol. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 64 - 68.
- Ushio, K., Ebara, K., & Yamashita, T.(1991), Selective inhibition of R-enzymes by simple organic acids in yeast-catalysed reduction of ethyl 3-oxobutanoate. *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 834-839.
- Utaka, M.; Konishi, S.; Mizuoka, A.; Ohkubo, T.; Sakai, T.; Tsuboi, S.; Takeda, A. (1989), Asymmetric reduction of the prochiral carbon-carbon

- double bond of methyl 2-chloro-2-alkenoates by use of fermenting baker's yeast. *J. Org. Chem.*, **54**, 4989-4992.
- Van der Shaft, P.H., ter Burg, N., Van der Bosch, S. & Cohen, A.M. (1992), Microbial production of natural δ -decalactone and δ -dodecalactone from the corresponding α,β -unsaturated lactones in massoi bark oil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 712 - 716.
- Vives, C.; Casas, C.; Gòdia, F.; Solà, C. (1993), Determination of the intrinsic fermentation kinetics of Saccharomyces cerevisiae cells immobilized in Ca-alginate beads and observations on their growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 467-472.
- Voet, D; Voet J.G. (1990) Biochemistry, John Wiley & Sons, pp 445 .
- Ward, O.P., & Young, C.S. (1990), Reductive biotransformations of organic compounds by cells or enzymes of yeast. *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 482-493.

-
- Weijers, C.A.G.M.; Litjens, M.J.J.; de Bont, J.A.M. (1992), Synthesis of optically pure 1,2-epoxypropane by microbial asymmetric reduction of chloroacetone. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , **38**, 297-300.
- Wolkowicz, P.E. , & Mc Millin-Wood, J. (1980), Dissociation between mitochondrial calcium ion release and pyridine nucleotide oxidation. *J. Biol. Chem.*, **255**, 10348-10353.
- Yamaguchi, T., Nishimura, K., Shimbo, T. & Sugiura, M. (1985), Enantiomer resolution of aminoacids by a polymer-supported liquid membrane containing a chiral crown ether. *Chem. Lett.* 1549-1552.
- Yang, J., Tamm, L.K., Somlyo, A.P. & Shao, Z. (1993), Promises and problems of biological atomic force microscopy. *J. of Microscopy*, **171**, 183 - 198.
- Young, C.S. & Ward, O.P. (1991), Studies of the reductive biotransformation of selected carbonyl compounds by whole cells and extracts of baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 1280.

- Zhou, B.N., Gopalan, A.S., VanMiddlesworth, F., Shieh, W.R., & Sih, C. J. (1983), Stereochemical control of yeast reductions. 1. Asymmetric synthesis of L-carnitine. *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 5925-5926.
- Zyla, K. (1994), Phytate dephosphorylation by free and immobilized cells of Sacharomyces cerevisiac. *J. Ind. Microbiol.*, **413**, 30-34.

ANEXOS

ANEXOS

ATIVIDADES ACADÊMICAS DURANTE O DOUTORADO:

-Consultor da revista científica: "Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology - UNITED STATES OF AMERICA".

-Docência na disciplina de pós-graduação: "Enzimas e Microorganismos na Síntese de Fármacos Quirais" (período de março a julho de 1994). - Instituto de Química - UNICAMP.

Campinas - S.P.

Publicação de trabalho científicos:

1) Fermento Biológico de Padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) e Seu Uso em Sínteses Assimétricas".

Ricardo de Souza Pereira

"Química Nova" - BRASIL, Vol. 18, número 5, pp. 452- 459 (Edição de setembro-outubro de 1995).

2) "Baker's Yeast: Biochemical Aspects and Their Influence in Biotransformations."

Ricardo de Souza Pereira

Applied Biochemistry and Biotechnology - U.S.A., Vol. 55, número 1, 000-000, Edição de outubro de 1995.

3) "Observation of Baker's Yeast Used in Biotransformation by Atomic Force Microscopy."

Ricardo de Souza Pereira; Nivaldo Antônio Parizotto and Vitor Baranauskas..

Applied Biochemistry and Biotechnology - U.S.A. *in press*.

4) "Biochemical influence of ferric and cupric ions on *Saccharomyces cerevisiae* strains used in asymmetric organic synthesis."

Ricardo de Souza Pereira and Nelson Durán

Aceito para publicação no "Biotechnology Letters".

5) "Protective Effect of Safranin on the Mitochondrial Damage Induced by Fe(II) Citrate Complex."

Roger F. Castilho; **Ricardo de Souza Pereira**

Submetido para publicação no "European Journal of Pharmacokinetics and Drug Metabolism" - SCOTLAND

6) "Lipoperoxidation: The Role of Calcium and Protection by Calcinine".

Ricardo de Souza Pereira

(Short Communication) - Submetido para publicação no "European Journal of Pharmacokinetics and Drug Metabolism" - SCOTLAND

7) "Can Trifluoperazine protect mitochondria against reactive oxygen species-induced damage?"

Ricardo de Souza Pereira and Marcelo Hermes-Lima

(Short Communication) - Submetido para publicação no "European Journal of Pharmacokinetics and Drug Metabolism" - SCOTLAND

8) "A morphological study using atomic force microscope on *Saccharomyces cerevisiae* cells treated with heavy metals."

Ricardo de Souza Pereira, Omar Teschke and Nelson Durán

Manuscrito em preparação (será submetido para o "Journal of Microscopy")

Apresentação de trabalhos em congresso:

- "Primeiro Congresso Internacional de Farmacêuticos" - 20 a 24 de maio de 1995. Apresentação dos trabalhos

1) "Baker's Yeast: Biochemical Aspects and Their Influence in Biotransformations"

2) "Observation of Baker's Yeast Strains Used in Biotransformation by Atomic Force Microscopy".

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.

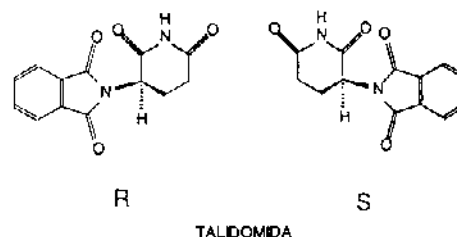
Apesar da quiralidade ser conhecida desde o século passado, quando Louis Pasteur olhando ao microscópio óptico separou mecanicamente cristais com formas isoméricas de ácido láctico², somente há poucos anos tem-se notado a sua imensa importância em termos de interação com materiais biológicos. Uma grande 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 que 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

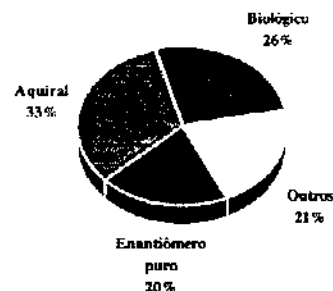
nos membros dos fetos, chamada de focomelia, quando tomada nos três primeiros meses de gravidez. A maioria dos países retirou a talidomida do mercado⁴.

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.

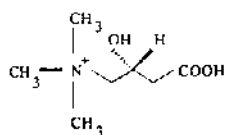


Este relato não é apenas um esforço da indústria farmacêutica para vender um sedativo, pois foi descoberto que esta droga também inibe replicação do vírus da AIDS⁴. Porém em 1984, cientistas da Universidade de Münster, Alemanha, descobriram que cada enantiômero racemiza em pH fisiológico em tubos de 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.

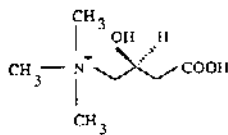
Nos Estados Unidos, cerca de 20% das drogas comercializadas estão na forma de um enantiômero puro⁴, fato que não é observado no Brasil com frequência:



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

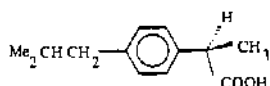


L - (R) - CARNITINA
(USADA NAS DESORDENS
MUSCULARES E DOENÇAS DO CORAÇÃO)

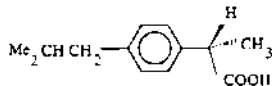


D - (S) - CARNITINA
(TÓXICA)

NOMES COMERCIAIS:
L - CARNITINA (LABOTANICK DO BRASIL)
ENZVITAL (FARMASA)
NUTRIMAZ (BIOLAB)
APETTRÉ (LIPPER)



R (-) IBUPROFENO
(INATIVO)

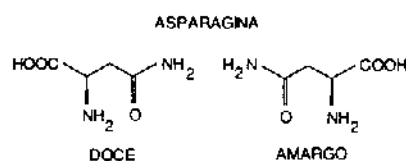


S (+) IBUPROFENO
(ANTI-INFLAMATÓRIO)

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

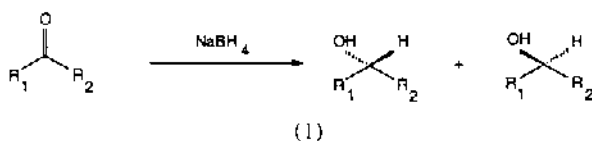
No caso da carnitina é necessário ter sempre um estereoisômero puro.

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

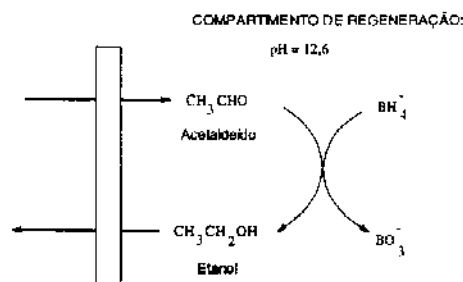
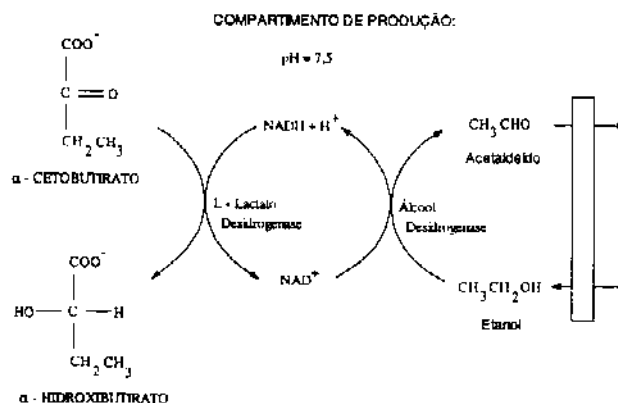
inviabiliza economicamente o processo de grande escala⁴.

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 despontando 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 - hidroxibutirato, 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

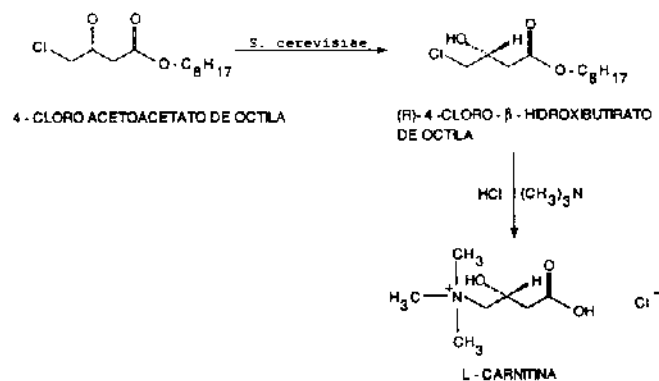
Uma alternativa eficaz e barata aos catalisadores anteriormente citados é o fermento biológico de padaria, que é um microorganismo vivo cujo nome científico é *Saccharomyces cerevisiae* e que teve seu uso intensificado em sínteses assimétricas nos últimos anos¹³⁻¹⁵. Fica entendido aqui que não é o uso 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.

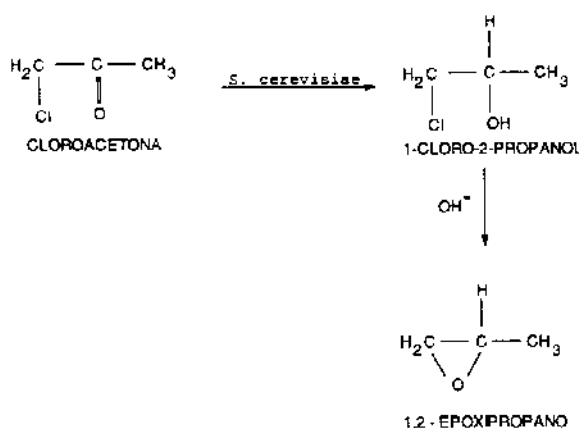
a. Reações de Redução

a.1 Redução de carbonilas^{6, 26, 27}

Síntese de L-carnitina:

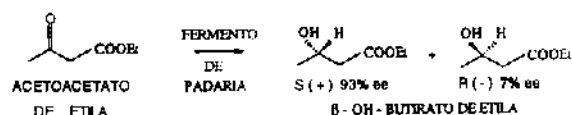


Síntese de epoxipropano:

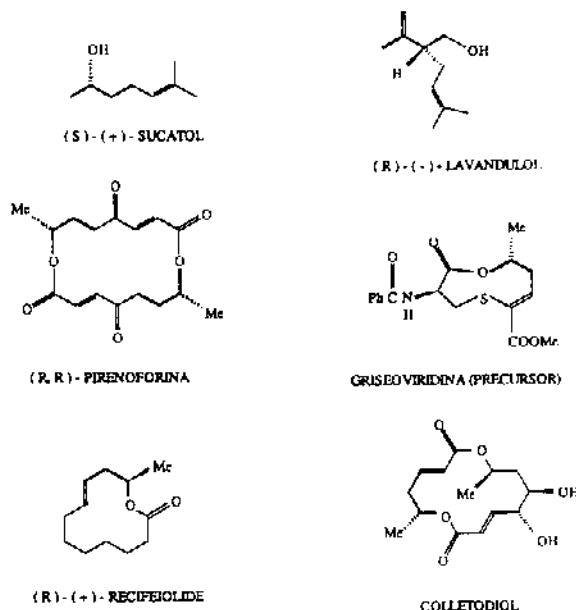


É interessante notar que ocorre geração de um centro assimétrico nas moléculas reduzidas. Estas reações são catalisadas por enzimas (no interior da célula do fermento) pertencentes à classe das desidrogenases. Estas enzimas são a L (S) Lactato desidrogenase (E.C. = 1.1.1.27) e a álcool desidrogenase

Síntese de β-OH-butirato de etila:

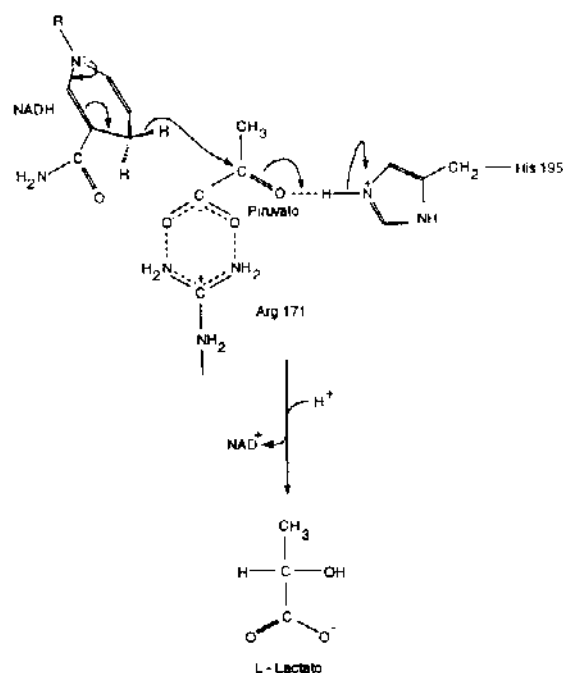


COMPOSTOS NATURAIS SINTETIZADOS A PARTIR DO β-OH-BUTIRATO DE ETILA:



(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

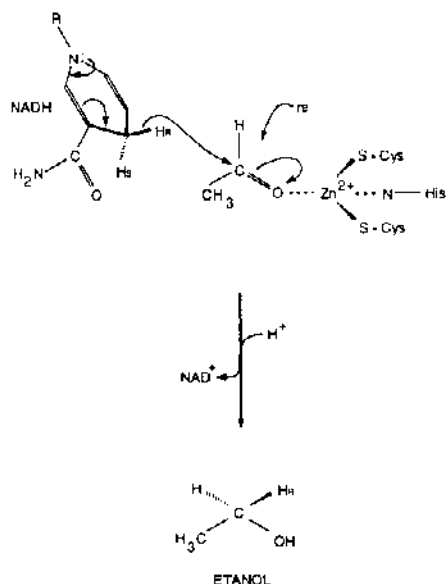
MECANISMO DE REDUÇÃO DA L(S) LACTATO DESIDROGENASE:



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.

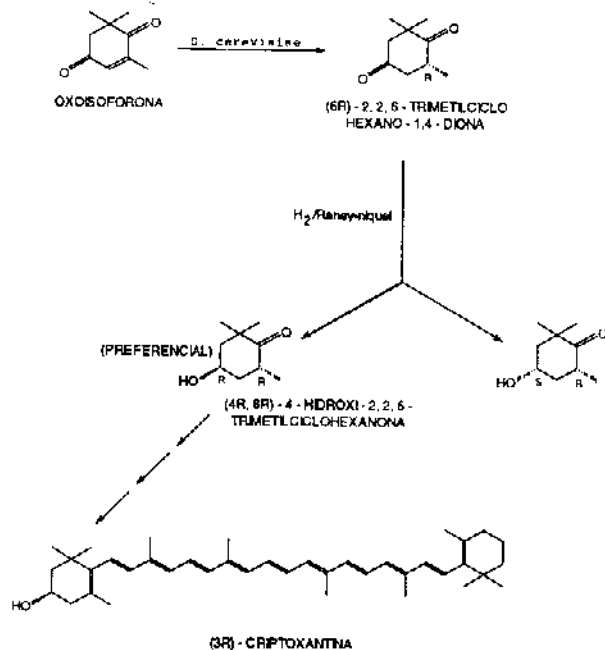
Nota-se que o piruvato, que é o substrato natural desta enzima, é muito semelhante ao acetoacetato (difere apenas por um CH_2). A enzima atua sobre o substrato artificial devido ele ser semelhante ao substrato natural, e o mecanismo de ação para ambos, provavelmente, são semelhantes. A álcool desidrogenase 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:

MECANISMO DE REDUÇÃO DA ÁLCOOL DESIDROGENASE:

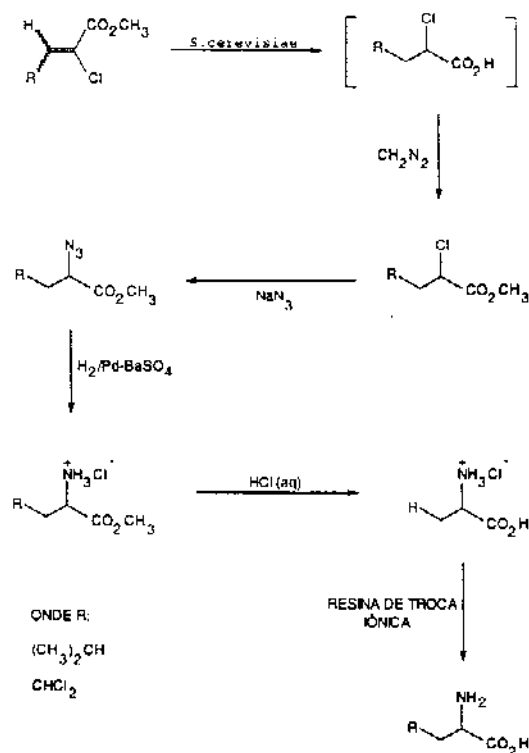


a.2 Redução de dupla ligação

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:



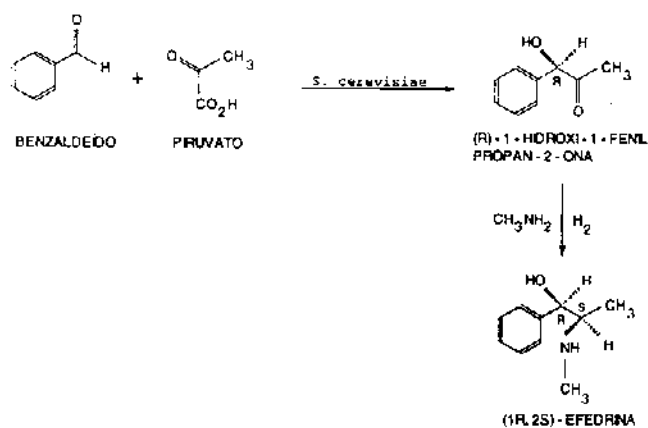
Na síntese de aminoácidos³¹:



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

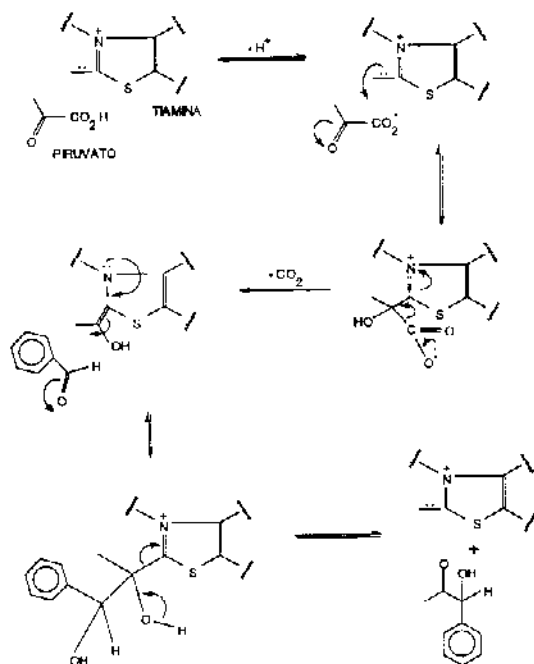
Síntese de efedrina:



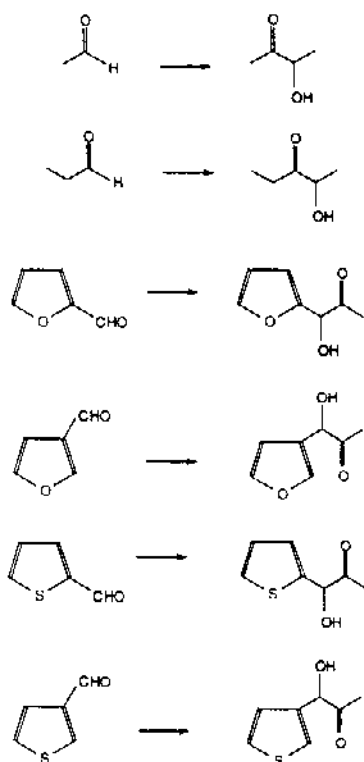
Esta síntese tem utilidade industrial e é uma patente alemã de 1930³². A efedrina tem importância no tratamento da asma, hipotensão e congestão nasal³³.

A enzima que supõe-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 CONDENSAÇÃO CATALISADA PELA
PIRUVATO DESCARBOXILASE:



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

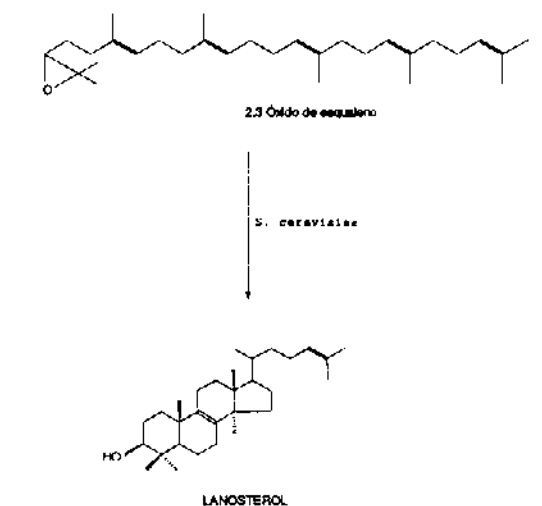


Deve-se entender que cada composto anteriormente mostrado está sendo condensado com uma molécula de piruvato.

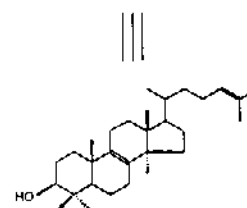
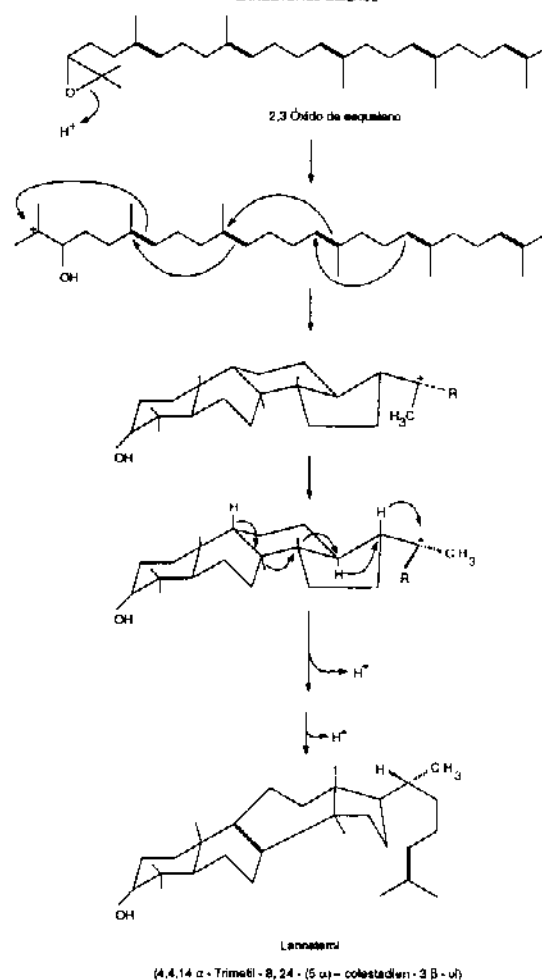
c. Reação de Ciclização

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:



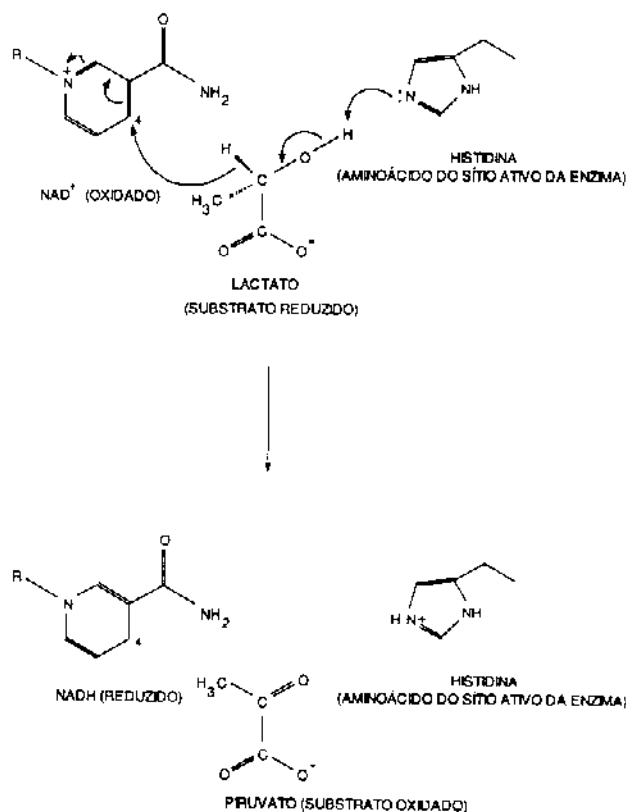
O mecanismo mostrado foi proposto no início de 1955 por Albert Eschenmoser e Leopold Ruzicka e demais colaboradores, em Zurique, e também por Gilbert Stork e Albert Burgstahler nas Universidades de Harvard e Columbia, respectivamente³⁵.

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 sequência 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 termostático 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 termostático 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 S RL³⁹, montmorilonita K10³⁹, poliacrilamida^{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 poliacrilamida. 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;

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

Limitações do processo

1. 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: dodecanol⁴³), 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.
2. 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;
3. 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 escalênica. 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:

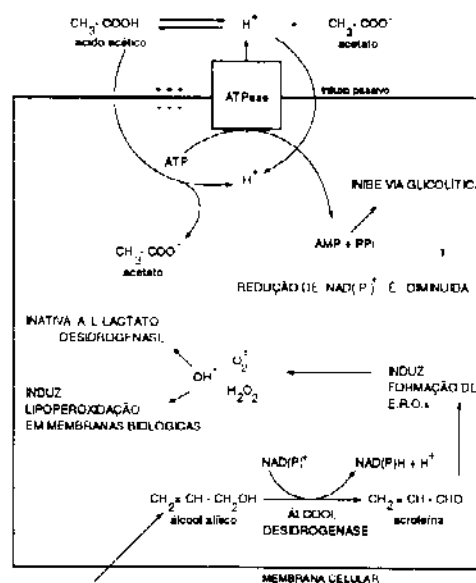


Esta reação foi executada há aproximadamente três anos atrás e o excesso enantiomérico era alto (97%)³⁹.

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 Riheiro 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

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

Publicação financiada pela FAPESP

©Copyright 1995 by Humana Press Inc.
All rights of any nature whatsoever reserved.
0273-2289/95/0501-0000\$00.00

AUTHOR:

PLEASE ANSWER ANY QUERIES THROUGHOUT MANUSCRIPT

Baker's Yeast:

**Some Biochemical Aspects
and Their Influence in Biotransformations**

RICARDO DE SOUZA PEREIRA

*Instituto de Química, Biological Chemistry Laboratory,
Universidade Estadual de Campinas, CP.6154,
Campinas CEP 13084-970, SP, Brazil*

Received August 2, 1994; Accepted October 24, 1994

ABSTRACT

Baker's yeast is becoming an important reagent for organic synthesis. However, on many occasions, there are problems with the experimental reproducibility, which in general is the result of the different origins of baker's yeasts. In order to explain these differences, NAD(P)⁺ reduction inside intact living cells from different strains was measured. The method can select cells with better reduction power in a short period of time.

Index Entries: Biotransformation; *Saccharomyces cerevisiae*; pH; NAD(P)H; temperature; enantiomeric excess.

* Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

Applied Biochemistry and Biotechnology

000

Vol. 55, 1995

000

Pereira

Reduction Power of Baker's Yeast

000

INTRODUCTION

The use of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in organic synthesis involving reactions, such as condensation (1), oxidation (2,3), reduction (4-6), and cyclization (7,8), is increasing (9). In the majority of cases, a chiral carbon is produced, that is responsible for the interest in these microorganisms for synthesis, together with other advantages, such as their low cost, nontoxic nature, ease of manipulation, and availability. The reduction reactions are catalyzed by intracellular enzymes (dehydrogenases) in these living cells (9,10) aided by the reduced form of pyridine nucleotides [NAD(P)H] (11). The former are highly stereospecific; in other words, they can produce an unique stereoisomer (12,13). Based on this rationale, *S. cerevisiae* would be a "perfect" reagent if its enzymes had the same conformation. Unfortunately, this is not true. There are several dehydrogenases, with opposite conformations, that compete for the artificial substrate. In order to solve this problem, some researchers have added compounds that inhibit enzymes of one conformation (12,14). This method has proven to be efficient and improves the enantiomeric excess, but in some cases, results in low yields (15).

Another problem faced by organic chemists is to repeat experiments made elsewhere. To try to explain this problem, baker's yeasts from different origins were studied. The variation in the production of NAD(P)H in the interior of these living cells with external factors, such as temperature and pH, was measured. Another aspect studied was the effect of compounds known to inhibit some dehydrogenases and their effects on NAD(P)H production.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Lithium acetoacetate was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and the other reagents used were of analytical grade. Water was double-distilled and deionized using a Barnstead D3750.

NAD(P)H Oxidation Reduction

Pyridine nucleotide oxidation-reduction changes were monitored using the wavelength pair 340 and 370 nm. All experiments were conducted using an SLM Aminco DW 200 split and dual-wavelength spectrophotometer as previously described (16).

Biological Materials

The baker's yeast strains (*S. cerevisiae*) were obtained from Fermipan (Holland), Itaiquara (Brazil), Nishin Seifun Co. (Japan), and Fleischman (Brazil). The stock suspensions were prepared by adding 1.0 g dry and 3.5 g raw baker's yeast to 10 mL water with stirring at room temperature. The cells were counted in a optical microscope (Carl Zeiss) using a Neubauer chamber.

Oxygen Uptake Measurements

Oxygen consumption was measured with a Clark-type electrode (Yellow Springs Instruments Co.) in a 1.0-mL thermostated glass chamber equipped with magnetic stirring.

RESULTS AND DISCUSSION

The reduction of oxidized pyridine nucleotide [NAD(P)⁺] by baker's yeast is presented in Fig. 1A,B. The former presents the Dutch and Japanese strains and the latter the Brazilian strains.

In order to assure that all experiments contained the same number of cells (correction of the stoichiometry), cells were counted using a Neubauer chamber.

Since glucose is not present in the reaction medium, the cells degraded their internal glycogen, which can supply glucose for 10–12 h (17). Commercial baker's yeast strains (*S. cerevisiae*) when added to water initiate the reduction of the oxidized forms of NAD(P)⁺. This reduction continues until a steady state is reached (Fig. 1A). To verify the NAD(P)H oxidation, lithium acetoacetate was added to the medium (inset of Fig. 1). The absorbance falls because NAD(P)H is being oxidized and the acetoacetate transformed into β -hydroxybutyrate through internal *S. cerevisiae* dehydrogenases. It is worthwhile mentioning that acetoacetate (and others substrates) can induce an oxidative stress in living cells when the reserve of the reduced form of pyridine nucleotide is consumed. For a good performance in biotransformations, the addition of substrates after 1 h of incubation is necessary for the cells to reach a steady state in the reduction of the pyridine nucleotides, as observed in Fig. 1A.

For commercial strains from Holland and Japan, the reduction is dependent on temperature. Surprisingly, the Brazilian strains are not sensitive to this external factor, as depicted in Fig. 1B. To explain the cells' temperature sensitivity, this author proposed that molecules that act as "biological thermosensors" are present in the polysaccharide membrane surface. These "thermosensors" are not present in cells of the Brazilian strains (Fig. 1B).

Figure 2 shows the dependence of these reduction reactions on the external pH (from 1 to 9). At lower pH, the cells are not good reducers of [NAD(P)⁺]. This phenomenon can be attributed to the extrusion of protons by ATPase (18). These cells are energized. Consequently, a net negative charge in the cell interior is observed that results in the transport of protons to the inside. The internal medium turns acid, which induces ATPase activity (19). This enzyme is responsible for protons extrusion. This phenomenon results in ATP depletion and accumulation of AMP, which inhibits phosphorylation of glucose (18). As a consequence, the glycolysis and pentose phosphate pathway, which are the paths that produce NAD(P)H, are inhibited as observed in Fig. 2A (pH = 1 and 3). Interestingly, the Brazilian strains are not sensitive to the variations of pH. Possibly, these strains do not have ATPase in their membranes, or if presented, it is inactive under these conditions. It is noteworthy that when the external pH is varied 6 U, the internal pH in these cells varies by only 1.4 U (20,21).

FIG 1

FIG 2

Figure 3 shows that Japanese cells consume high quantities of oxygen, showing that these cells have an aerobic metabolism more active than those of the other cell types studied here (line c). The Dutch strain reduces the same quantities of NAD(P)H as the Japanese strain, but the consumption of O_2 is lower (line a). This indicates that the reduction occurs mainly through an anaerobic pathway. The O_2 consumption by Brazilian cells is very low (lines b and d), and consequently, their reduction of pyridine nucleotide is also low. As a consequence, their metabolism is slow. In practical terms, the cell with high quantities of NAD(P)H will reduce a substrate more rapidly. This is seen by comparing the two insets presented in Fig. 1 (addition of lithium acetoacetate). As can be seen in the second inset, lithium acetoacetate did not cause any detectable oxidation of NAD(P)H.

FIG 3

Allyl alcohol (a probable inhibitor of the L-lactate dehydrogenase, used by Nakamura and coworkers [12,14]) was added in experiments shown in Fig. 4. This substrate is transformed to acrolein by the action of the alcohol dehydrogenase (232). Acrolein induces lipoperoxidation at biological membranes through reactive oxygen species (ROS) production (23). These oxygen species can inactivate L-lactate dehydrogenase (24) and, if present in higher concentrations, can oxidize the thiol proteins present at organelles (25) and cell membranes (26) (Scheme 1). This produce a homeostasis alteration of the cells and organelles, and a loss of cell viability (26). To avoid this, the cells need a good antioxidant defense mechanism that is made up of such enzymes as catalase and superoxide dismutase.

FIG 4

SCH 1

Figure 4A shows that additions of allyl alcohol cause a decrease in the reduction of NAD(P)⁺ in the Dutch and Japanese strains. On the other hand, this phenomenon is inverted with Brazilian strains (Fig. 4B). Presumably, the latter has a good defense mechanism as mentioned above. The large increase in the production of NAD(P)H by the Brazilian strains observed may be the result of the fact that when allyl alcohol is transformed into acrolein, 1 mol of NAD⁺ is reduced (22) (Scheme 1). This probably also occurs in the other strains, but the toxicity of acrolein destroys a great deal of cells owing to the absence of these antioxidant enzymes.

Another additive tested was acetic acid (Fig. 5). Acetic acid is believed to improve the enantiomeric excess owing to an inhibition of the active site of selective intracellular enzymes in *S. cerevisiae* (15). The increase of acetic acid concentration makes the reduction of NAD(P)⁺ decrease (Fig. 5A and B). The mechanism for explaining this is believed to be the same as that for Fig. 2, when the external pH is low (Scheme 1). Measurements in another laboratory of the internal pH through ³¹P NMR of cells before and after acetic acid addition found that this and other organic acids diminish internal pH (27). From this, it is possible to extrapolate that acetic acid acts as a "selector" of enzymes owing to diminished internal pH. Some enzymes isolated from *S. cerevisiae* can act better in one range of pH than others (12).

FIG 5

The principle problem in reactions conducted with baker's yeast is the solubility of the organic compounds to be biotransformed. Compounds with detergent capacity, such as dodecanol, have been used to improve this solubility. However, detergents and emulsifiers are generally very poisonous for living cells. Decanol was added in the reaction medium containing baker's yeast. Figure 6 (A and B) shows that all cells react in the way. Low concentrations of decanol improve NAD(P)⁺ reduction, whereas high concentrations have a toxic effect (detergent action in membrane lipids).

FIG 6

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fundacao de Amparo à Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). I thank Professor Nelson Duran for critical reading of the manuscript, Ailton Ramos for the illustrations, Célia Maria Ribeiro for technical support, and Yoshiko Yamauchi for the commercial Japanese strain.

REFERENCES

1. Long, A. and Ward, O. P. (1989), *Biotechnol. Bioeng.* **34**, 933-941.
2. Crumbie, R. L., Deol, B. S., Nemorin, J. E., and Ridley, D. D. (1978), *Aust. J. Chem.* **31**, 1965-1980.
3. Gill, G., Ferre, E., Barre, M., and Le Petit, J. (1988), *Tetrahedron Lett.* **29**, 3797-3798.
4. Nakamura, K., Ushio, K., Oka, S., and Ohno, A. (1984), *Tetrahedron Lett.* **25**, 3979-3982.
5. Naoshima, Y., Maeda, J., and Munakata, Y. (1992), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **6**, 659-660.
6. Jayasinghe, L. Y., Smallridge, A. J., and Trehwella, M. A. (1993), *Tetrahedron Lett.* **34**, 3949-3950.
7. Medina, J. C. and Kyler, K. S. (1988), *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 4818-4821.
8. Bujons, J., Guajardo, R., and Kyler, K. S. (1988), *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 604-606.
9. Ward, O. P. and Young, C. S. (1990), *Enzyme Microb. Technol.* **12**, 482-493.
10. Bare, G., Jacques, P. H., Hubert, J. B., Rikir, R., and Thonart, P. H. (1991), *Appl. Biochem. Biotechnol.* **28/29**, 445-456.
11. Zhou, B. N., Gopalan, A. S., VanMiddlesworth, F., Shieh, W. R., and Sih, C. J. (1983), *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 5925-5926.
12. Nakamura, K., Kawai, Y., Nakajima, N., and Ohno, A. (1991), *J. Org. Chem.* **56**, 4778-4783.
13. Peters, J., Zelinski, T., and Kula, M. (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 334-340.
14. Nakamura, K., Inoue, K., Ushio, K., Oka, S., and Ohno, A. (1987), *Chem. Lett.* **4**, 679-682.
15. Ushio, K., Ebara, K., and Yamashita, T. (1991), *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 834-839.
16. Wolkowicz, P. E. and McMillin-Wood, J. (1980), *J. Biol. Chem.* **255**, 10,348-10,353.
17. Slaughter, J. C. and Nomura, T. (1992), *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 64-67.
18. Loureiro-Dias, M. C. and Santos, H. (1990), *Arch. Microbiol.* **153**, 384-391.
19. Eraso, P. and Gancedo, C. (1987), *FEBS Lett* **224**, 187-192.
20. Slavik, J. (1982), *FEBS Lett* **140**, 22-26.
21. De La Pena, P., Barros, F., Gascón, S., Ramos, S., and Lazo, P. S. (1982), *Eur. J. Biochem.* **123**, 447-453.
22. Schauenstein, E. and Esterbauer, H. (1979), in *Submolecular Biology and Cancer*, Ciba Foundation Series 67, Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 225-244.
23. Jaeschke, H., Kleinwaechter, C., and Wendel, A. (1987), *Biochem. Pharmacol.* **36**, 51-57.
24. Darnet, S., Thomas, D., and Legoy, M. (1993), *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 8-12.
25. Pereira, R. S., Bertocchi, A. P. F., and Vercesi, A. E. (1992), *Biochem. Pharmacol.* **44**, 1795-1801.
26. Pascoe, G. A. and Reed, D. J. (1989), *Free Rad. Biol. Med.* **6**, 209-224.
27. Pampulha, M. E. and Loureiro-Dias, M. C. (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 547-550.

Fig. 1. Influence of temperature on the reduction of pyridine nucleotide by baker's yeast (*S. cerevisiae*). Baker's yeast (B.Y., 2.3 mg/mL) was added to double-distilled and deionized water, and pH of the medium was 6.0. (A) Commercial strains from Holland and Japan; (B) commercial strains from Brazil. Inset: Oxidation of NAD(P)H by multiple additions of lithium acetoacetate 1 mM (ACAC).

Fig. 2. Effect of pH on the reduction of pyridine nucleotide by baker's yeast (*S. cerevisiae*). Baker's yeast (B.Y., 2.3 mg/mL) was added to the reaction medium, and the pH adjusted under stirring. The temperature of the experiment was maintained at 20°C during the period of observation. (A) Commercial strains from Holland and Japan; (B) commercial strains from Brazil.

Fig. 3. Oxygen consumption by commercial strains of *S. cerevisiae*. Baker's yeast (B.Y., 2.3 mg/mL) was added to double-distilled and deionized water (pH = 6.0, temperature = 20°C). (A) Fermipan (Holland); (B) Itaiquara (Brazil); (C) Nishin Seifun Co. (Japan); and (D) Fleischmann (Brazil).

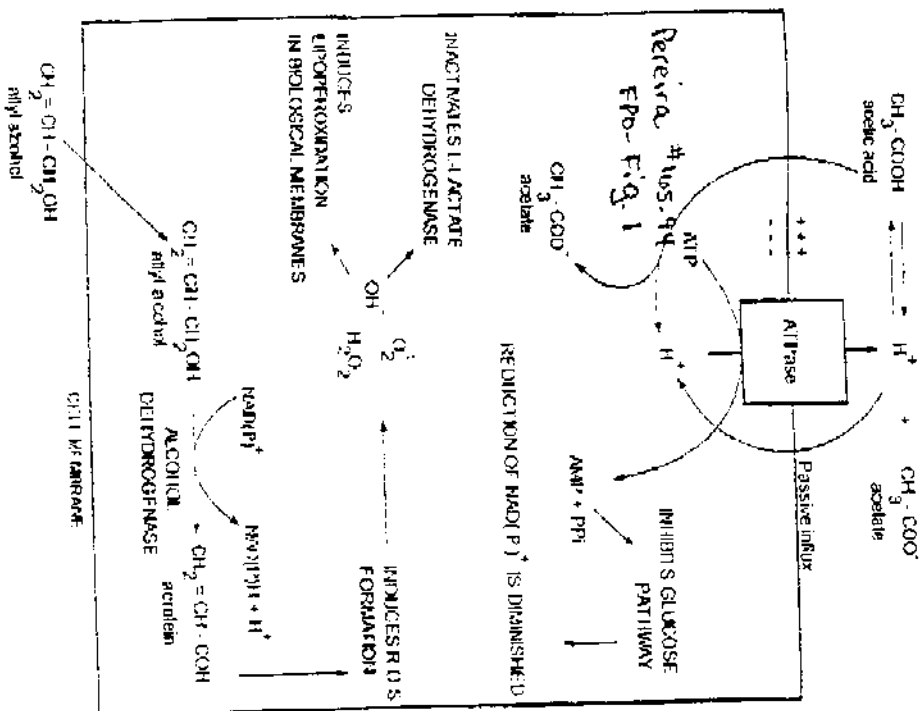
Fig. 4. Influence of allyl alcohol addition on the reduction of NAD(P)⁺ inside cells of *S. cerevisiae*. Baker's yeast (B.Y., 2.3 mg/mL) was added to double-distilled and deionized water (pH = 6.0, temperature = 20°C) containing allyl alcohol in the indicated percentages. (A) Commercial strains from Holland and Japan; (B) commercial strains from Brazil.

Fig. 5. Influence of acetic acid addition on the reduction of NAD(P)⁺ inside cells of *S. cerevisiae*. Baker's yeast (B.Y., 2.3 mg/mL) was added to double-distilled and deionized water (pH = 6.0, temperature = 20°C) containing acetic acid in the described concentrations.

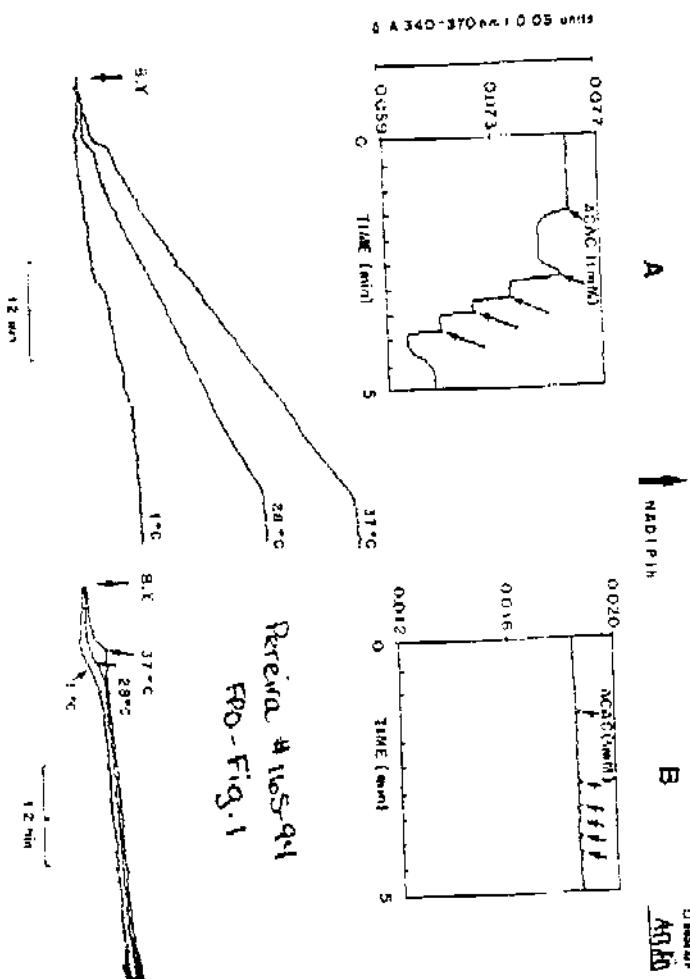
Fig. 6. Effect of decanol addition on the reduction of NAD(P)⁺ inside cells of *S. cerevisiae*. Baker's yeast (B.Y., 2.3 mg/mL) was added to double-distilled and deionized water (pH = 6.0, temperature = 20°C) containing decanol in the indicated percentages. (A) Commercial strains from Holland and Japan; (B) commercial strains from Brazil.

ABAB 55(1) (Pereira)—MSP No. 6—DISC 36—Scheme

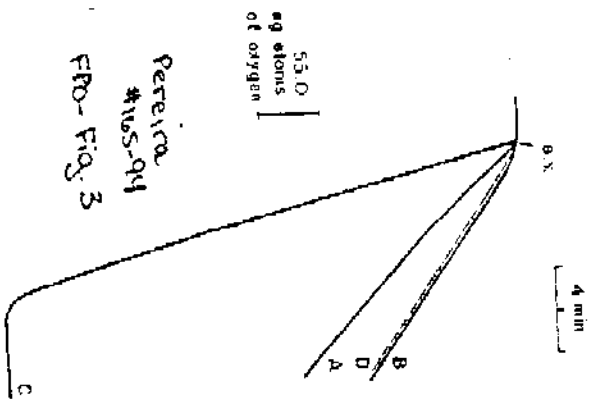
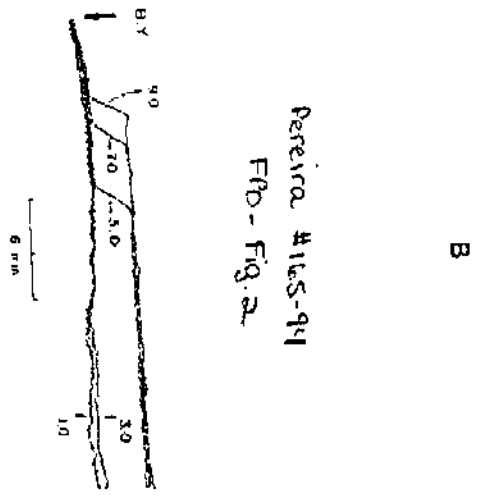
Scheme 1. A schematic illustration of the possible action mechanism of acetic acid on passive H⁺ influx and allyl alcohol on generation of ROS and inhibition of L-lactate dehydrogenase on *S. cerevisiae*.



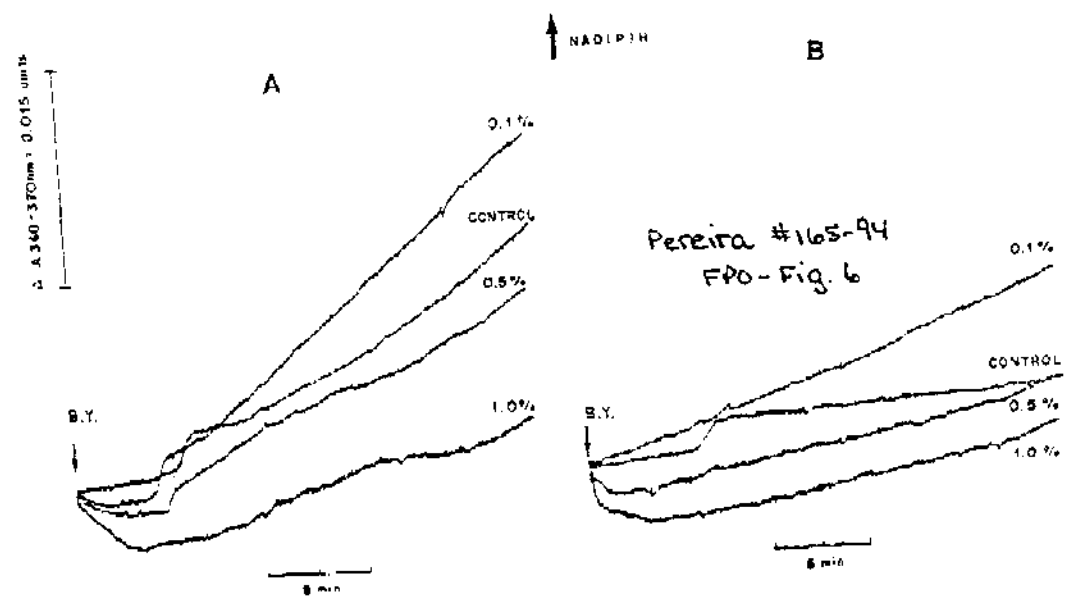
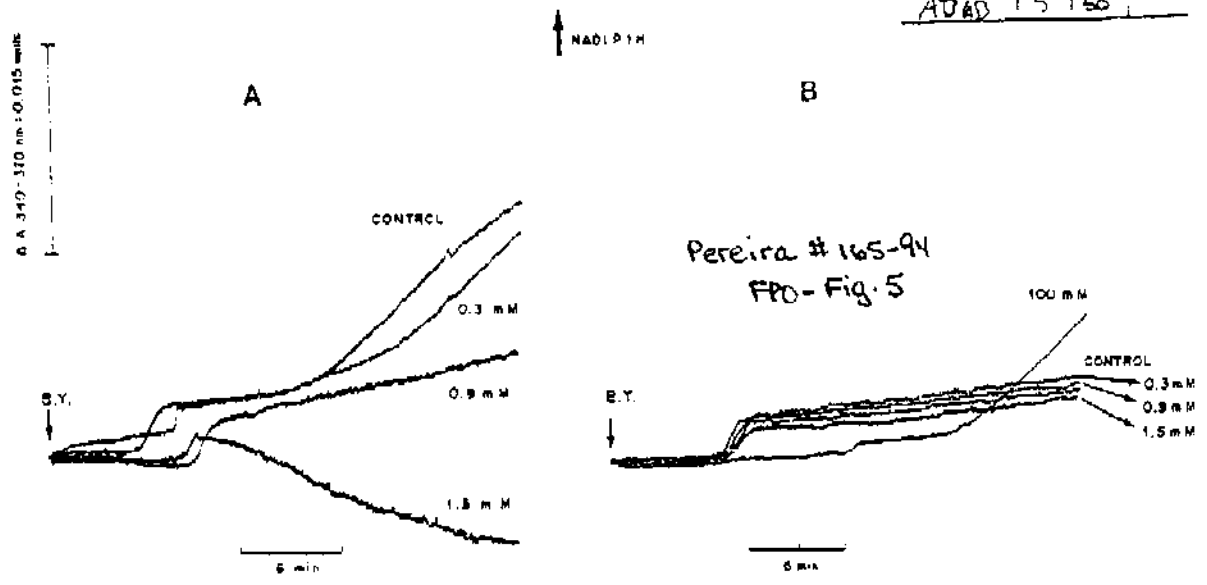
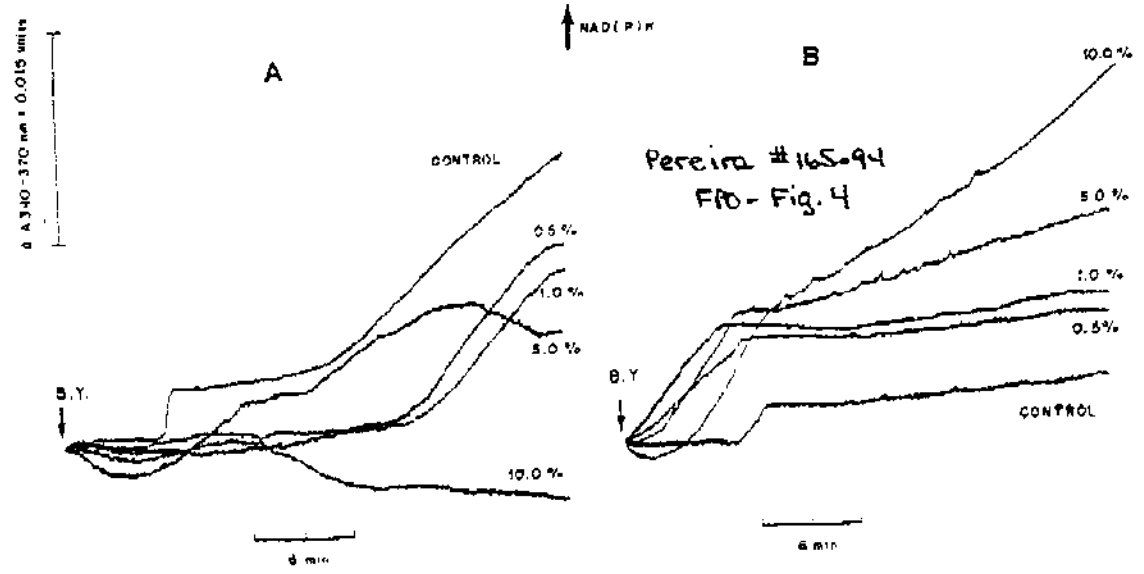
REVERA #145-94
FPO-Fig. 1
Page No. 1
Special Production



BIOGRAPH PRESS 2 Cur 2 Diagram
 October 2nd 1972
 Title: Pereira (115-44)
 U.S. Patent Figure % Page No.
 ABR 18 2 50 10



BIOGRAPH PRESS 2 Cur 2 Diagram
 October 2nd 1972
 Title: Pereira (115-44)
 U.S. Patent Figure % Page No.
 ABR 18 2 50 10



APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

Published by **HUMANA PRESS**, 999 Riverview Dr., Suite 208, Totowa, NJ 07512 (phone) 201-256-1699 (fax) 201-256-8341

Howard H. Weetall • Executive Editor • Chemical Sciences and Technology Laboratory • Biotechnology Division • National Institute of Standards and Technology • Gaithersburg • MD 20899 • 301-975-2628
Klaus Mosbach • Editor • Chemical Center • Lund Institute of Technology • PO Box 124 • S-22100 • Lund • Sweden
Isao Karube • Editor • Research Center for Advanced Science and Technology • University of Tokyo • 4-6-1 Komaba • Tokyo 153 • Japan
Melir Wilchek • Editor • Department of Biophysics • The Weizmann Institute of Science • Rehovot • Israel
John M. Walker • Reviews in Biotechnology Editor • University of Hertfordshire • Hatfield • Hertfordshire • UK
Anthony Sinskey • Book Review Editor • Massachusetts Institute of Technology • Cambridge • MA

May 30, 1995

Dr. Ricardo de Souza Pereira
Instituto de Quimica
Biological Chemistry Laboratory
Universidade Estadual de Campinas
CP.6154, Campinas CEP 13084-970
SP, Brazil

Title: Estimation of optimal concentrations of residual sugar and cell growth rate for a fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*.

Manuscript No. 179-95

Dear Dr. Pereira:

The enclosed manuscript has been submitted to the **JOURNAL OF APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY** for consideration for publication. I have chosen you as a reviewer because of your special competence in this area, and I hope that you will agree to serve as the editorial consultant for this article.

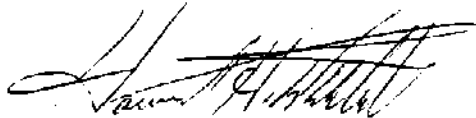
In order to facilitate the review process, I would appreciate your filling out the enclosed manuscript review form and returning it to me. Also, please indicate your criticisms and /or suggestions for revisions on the sheet provided. Specific comments on the significance of the paper, its appropriateness for the Journal, clarity of exposition, adequacy of research design and interpretation, etc., would be helpful.

The standardized forms are designed to facilitate your review of the manuscript and to help me in providing maximum feedback to the author(s). Please destroy the manuscript after your review.

IF YOU CANNOT FIND THE TIME TO REVIEW THIS MANUSCRIPT WOULD
YOU PLEASE ASK ONE OF YOUR SUBORDINATES OR COWORKERS TO

REVIEW THIS PAPER. IF NEITHER IS POSSIBLE, RETURN THE MS TO
ME IMMEDIATELY. Thank you for your help.

Sincerely,

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Howard H. Weetall', with a stylized, cursive script.

Howard H. Weetall
Executive Editor

BIOCHEMICAL INFLUENCE OF FERRIC AND CUPRIC IONS ON *Saccharomyces cerevisiae* STRAINS USED IN ASYMMETRIC ORGANIC SYNTHESIS.

RICARDO DE SOUZA PEREIRA* and NELSON DURÁN

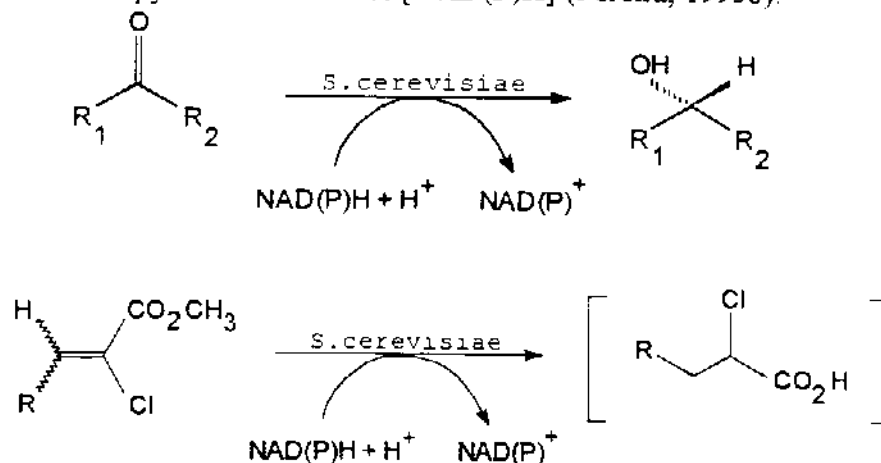
Biological Chemistry Laboratory, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP.6154, Campinas CEP 13084-970, SP, BRAZIL
PHONE: 55-(192)-397266; FAX: 55-(192)-393805

SUMMARY

The biochemical influence of Fe (III), Cu (II) in four commercial strains of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) was studied. Fe(III) and Cu(II) at concentration of 50 μ M induced an increase of NAD(P)⁺ reduction in a commercial Turkish strain, while in Chilean and Brazilian commercial strains, the presence of Fe(III) and/or Cu(II) diminished NAD(P)⁺ reduction presumably due to free radicals formation inside these living cells. Suprisingly, in the American strain, Fe(III) induced a decrease and Cu (II) an increase of NAD(P)⁺ reduction.

INTRODUCTION

Saccharomyces cerevisiae is an important reagent for asymmetric organic synthesis. Although, laboratory strains is sometimes used in these biotransformations (Weijers et al., 1992), organic chemists usually use commercial strains of *S. cerevisiae*, i.e., baker's yeast. These microbes are good at reducing pro-chiral ketones and pro-chiral double bonds to form asymmetric carbons as seen below (Pereira, 1995a; Pereira et al., 1995). In this process, these microorganisms use their ethanol and/or lactate pathways through their dehydrogenases (alcohol dehydrogenases and lactate dehydrogenases, respectively) aided by the reduced form of pyridine nucleotides [NAD(P)H] (Pereira, 1995b):



Although stereochemical control of the reactions catalyzed with yeast has been used for years (Pereira, 1995b), attempts to increase the yield (which is proportional to NAD(P)H molecules concentration) have not been taking place. Recently, it was found that NAD(P)⁺ reduction varies in commercial strains, that is, strains from different countries are

biochemically (Pereira, 1995a) and morphologically different, and this exert a great influence on final yields (Pereira et al, 1995).

Heavy metals such as iron and copper are accumulated by *S. cerevisiae* (Brady and Duncan, 1994 a, b) and for iron to penetrate inside these living cells, the presence of Cu (II) is necessary (Dancis et al., 1994; Klausner & Dancis, 1994). It is known that for yeast cells to acquire Fe(III), the reduction of ferric [Fe(III)] to ferrous [Fe(II)] form through NADH-dependent reaction is necessary (Chang and Fink, 1994). The aim of this work is the study of possible biochemical alterations produced by Fe(III) and Cu(II) in the reduction of pyridine nucleotides [NAD(P)H] (and their influence on yields in biotransformation reactions) in four commercial strains of *S. cerevisiae*.

MATERIALS AND METHODS

Biological Materials

The baker's yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae*) were obtained from Pakmaya (TURKEY), Gist Brocades (U.S.A.), Collico (CHILE) and Fleischmann (BRAZIL). The stock suspensions were prepared (Pereira 1995a), by adding 1.0 g dry baker's yeast to 10 ml ultra-pure water (double distilled and deionized) with stirring at room temperature (20°C). The cells were counted in an optical microscope (Carl Zeiss) using a Neubauer chamber. $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ and AgNO_3 were high purity grade.

NAD(P)H oxidation - reduction

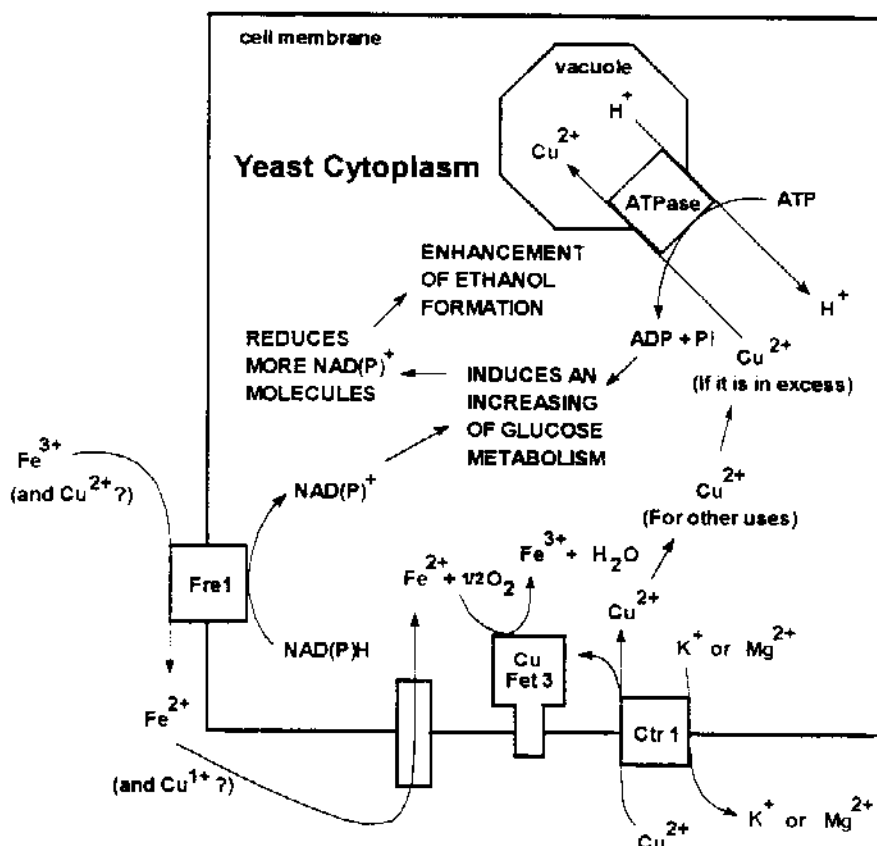
Pyridine nucleotide oxidation-reduction changes were monitored using the wavelength pair 340 and 370 nm. All experiments were conducted using an SLM Aminco DW 2000 split and dual wavelength spectrophotometer as previously described (Pereira, 1995a).

RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained for the reduction of oxidized pyridine nucleotide [NAD(P)⁺] by baker's yeast are presented in the Fig. 1A - D, and 2A - D.

Since glucose is not present in the reaction medium, the cells degrade their internal glycogen which can supply glucose for 10-12 hours (Slaughter and Nomura, 1992). Commercial dried baker's yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae*) when added to water initiate the reduction of the oxidized forms of NAD(P)⁺ (Fig. 1A-D and 2A-D).

Many prokaryotes and some eukaryotes cells transport iron into the cell by secreting chelators called siderophores that bind ferric ions to form soluble complexes. These ferric chelates are then taken up via high-affinity receptors (Chang and Fink, 1994). Accumulated experimental evidences suggest that organisms may be capable of acquiring iron (II) from the environment without the mediation of a siderophore (Klausner and Dancis, 1994). Iron uptake in *S. cerevisiae* involves at least two steps: reduction, through NAD(P)H (Klausner and Dancis, 1994), of ferric (Fe III) to ferrous (Fe II) ion extracellularly and transport of the reduced ions through the plasma membrane (Georgatsou and Alexandraki, 1994) (see scheme I).

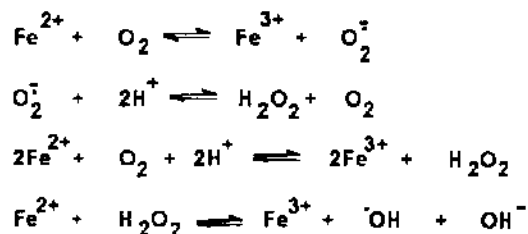


Scheme 1: A schematic illustration of the possible mechanism of Iron(III) and Cu(II) on NAD(P)^+ reduction on *S. cerevisiae* cells.

Fig. 1A, which presents the data for the Turkish strain, shows that when Fe^{3+} is present in reaction medium containing a suspension of *Saccharomyces cerevisiae*, these cells are capable of reducing oxidized pyridine nucleotide [NAD(P)^+] in an average above the normal. The cation is probably being reduced to iron (II) by Ferric Reductase (Fre1), which aided by the reduced forms of pyridine nucleotide [NAD(P)H] (see scheme 1). The latter in its oxidized form induces an increase of glycolysis to be "recharged" (reduced), or in others words, NAD(P)^+ accelerates the metabolism of these microbes.

Surprisingly, the reduction of NAD(P)^+ in American, Chilean and Brazilian strains is diminished when Fe(III) is added to the medium. It is possible to explain this with two theories:

1) Fe(II) is a lesive cation which induces free radical formation and at the concentration used, these types of cells may reached the "toxic point" and the cells suffer an oxidative stress as shown below (Minotti and Aust, 1987):



As a consequence, free radicals are destroying biological membranes and populations of the cells present in the sample are dying;

2) This Fe(III) concentration is not toxic but is consuming a great deal of NAD(P)H inside the microbes where Fe (III) is being reduced to Fe (II). The American, Chilean and Brazilian strains are not defective mutants with a high affinity for Fe (II) uptake since modification of NAD(P)⁺ reduction occurred which means that Fe (III) in the medium was uptaken by cells.

When Cu²⁺ is added to a cells suspension of Turkish and American *Saccharomyces cerevisiae* strains, NAD(P)⁺ reduction is greatly increased (Fig. 1A and 1B). This cation is uptaken by yeast through a specific transporter (this transporter is a protein encoded by the gene Ctr1). It is possible that this carrier may be an antiporter since data from recent experiments demonstrated that when Cu²⁺ is uptaken by *Saccharomyces cerevisiae*, K⁺ is released from the cells followed by Mg⁺⁺ (Brady and Duncan, 1994b). If the copper ions are in excess in yeast cytoplasm, this excess is drained by the vacuoles through H⁺-ATPase present (Eide et al, 1993). ATPase drains copper ions using an ATP molecule which is broken in ADP + Pi. The latter induces an increase of glucose metabolism (see scheme I).

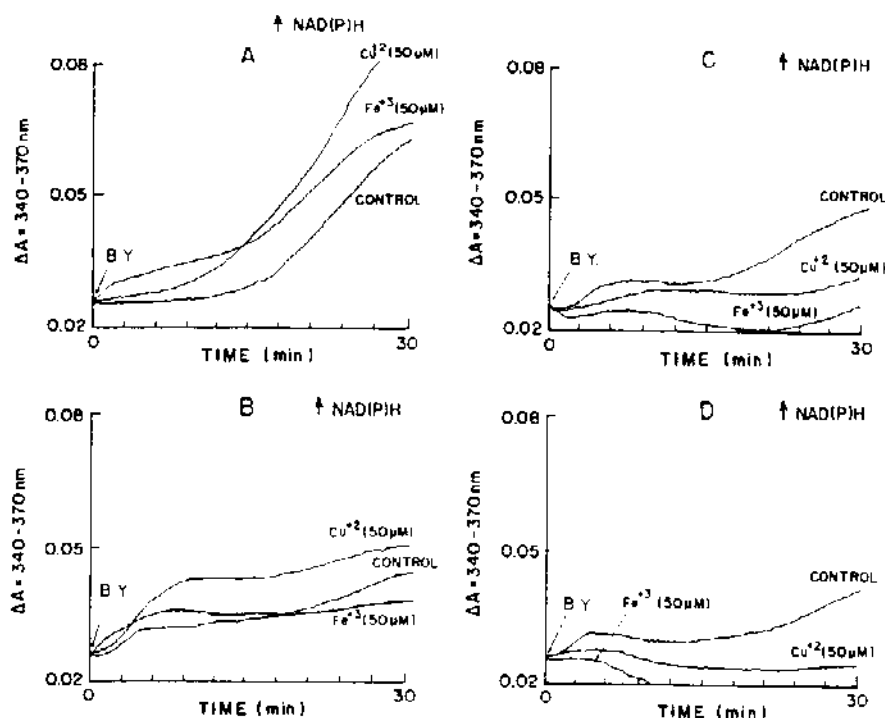
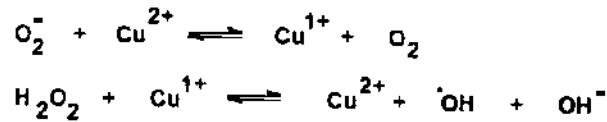


Figure 1: Influence of iron (III) or copper (II) on the reduction of pyridine nucleotide inside baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Baker's yeast (B.Y., 2.3 mg/ml) was added to double distilled and deionized water and the pH of the medium was 6.0.

A) Pakmaya (Turkey); B) Gist Brocades (U.S.A.); C) Collico (Chile) and D) Fleischman (Brazil).

It was demonstrated that the uptaking of Cu(II) can occur initially with a reduction through Frel (with an oxidation of NAD(P)H molecule-NAD(P)⁺ generated in this operation inducing an increasing of glucose metabolism) and then Cu(I) would be uptaken by microorganisms (Hassett and Kosman, 1995). Perhaps, the theory described above may explain the increase of NAD(P)H reduction in the Turkish strain.

Normally, treatment of *S. cerevisiae* cells with copper induces the activity of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) and catalase (Lapinskas et al., 1993). Both are antioxidant enzymes (destroy free radicals). The results of Fig. 1A and Fig. 1B suggest that in the Turkish and American strains, Cu(II) is inducing an increased activity of SOD and catalase. On the other hand, Chilean and Brazilian strains are affected in the presence of copper (Fig. 2C and 2D). One of the our hypothesis is that in these types of cells, Cu(II) does not regulate these enzymes. Another (and more probable) is that copper is inducing lipid peroxidation through reactive oxygen species formation as shown in the following reactions (Lapinskas et al, 1993):



Consequently, these types of cells does not have a good antioxidant defense. The third hypothesis is that H^+ -ATPase, responsible for detoxification of Cu^{2+} , is not present in the vacuoles of these cells.

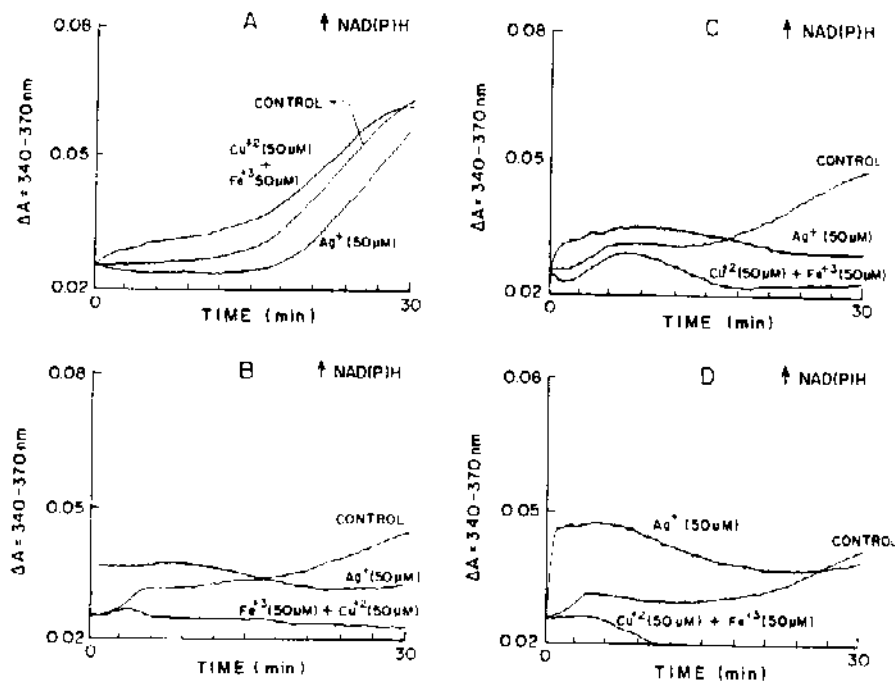


Figure 2: Influence of iron (III) and copper (II) on the reduction of pyridine nucleotide inside baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Baker's yeast (B.Y., 2.3 mg/ml) was added to double distilled and deionized water and the pH of the medium was 6.0. A) Pakmaya (Turkey); B) Gist Brocades (U.S.A.); C) Collico (Chile) and D) Fleischmman (Brazil).

The effects of Cu(II) added to the medium together with Fe(III) are shown in Fig. 2A-D, since copper ions induce the transcription of the gene of Ftr3 and for iron to

penetrate inside *S. cerevisiae*, the presence of Cu(II) is necessary (Dancis et al, 1994; Klausner and Dancis, 1994), we expected that the reduction of NAD(P)⁺ molecules would increase in the Turkish strain (Fig. 2A), but as observed for all strains, this did not occur. This may be due to the induction of free radicals by these heavy metals or consumption of NAD(P)H, or both.

Since Ag(I) ions have physico-chemical and electronic characteristics similar to copper but is not capable of generating reactive oxygen species by redox cycling (Ciriolo et al., 1994), the uptake of Ag (I) should have effects similar to copper ions. When we added silver ions at concentration of 50 μ M to the medium containing *S. cerevisiae*, the results were different from those obtained with copper, indicating that Ag(I) and Cu(II) have different physiological roles and their uptaking occur by different pathways.

Concentrations of 10 μ M and 25 μ M of Fe(III) and Cu(II), respectively, were tested but no significant increase of NAD(P)⁺ reduction occurred.

CONCLUSION

Fe(III) or Cu(II) can be use to induce certain strains of *Saccharomyces cerevisiae* cells to increase the yield of biotransformation reactions which depend directly on NAD(P)⁺ reduction.

Acknowledgements- This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank Professor Fred Yukio Fujiwara for his critical reading of the manuscript and Mr. Iveraldo Ribeiro for the drawings.

REFERENCES

- Brady, D. and Duncan, J.R. (1994a), *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 633 - 638.
- Brady, D. and Duncan, J.R. (1994b), *Biotechnol. Lett.*, **16**, 543-548.
- Brady, D., Stoll, A.D., Starke, L. and Duncan, J.R. (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 297-302.
- Chang, A. and Fink, G.R. (1994), *Current Biology*, **4**, 532-533.
- Ciriolo, M.R., Civitareale, P., Carri, M.T., Martino, A.D., Galiazzo, F. and Rotilio, G. (1994), *J. Biol. Chem.*, **269**, 25783-25787.
- Dancis, A., Yuan, D.S., Haile, D., Askwith, C., Eide, D., Moehle, C., Kaplan, J. and Klausner, R.D. (1994), *Cell*, **76**, 393-402.
- De Silva, D.M., Askwith, C. C., Eide, D and Kaplan, J. (1995), *J. Biol. Chem.*, **270**, 1098-1101.
- Eide, D. J., Bridgham, J. T., Zhao, Z. and Mattoon, J. R. (1993), *Mol. Gen Genet.*, **241**, 447-456.
- Georgatsou, E. and Alexandraki, D. (1994), *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3065-3073.
- Klausner, R.D. and Dancis, A. (1994), *FEBS Lett.*, **355**, 109-113.
- Kong, I.C., Hubbard, J.S. and Jones, W.J. (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 396-402.
- Minotti, G. and Aust, S.D. (1987), *Free Rad. Biol. Med.*, **3**, 379-387.
- Lapinskas, P., Ruis, H. and Cullota, V. (1993), *Current Genetics*, **24**, 388-393.
- Pereira, R.S. (1995a), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **55**, 000-000, *in press*.
- Pereira, R.S. (1995b), *Química Nova*, **18**, 000-000, *in press*.
- Pereira, R.S., Parizotto, N.A. and Baranauskas, V. (1995), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, *in press*.
- Slaughter, J.C., & Nomura, T. (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 64-67.
- Weijers, C.A.G.M.; Litjens, M.J.J.; de Bont, J.A.M.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1992), **38**, 297.