

O EMPREGO DE LIPASES COMO AGENTES DE RESOLUÇÃO CINÉTICA DE ENANTIÔMEROS EM SÍNTESE ORGÂNICA: ASPECTOS GERAIS SOBRE A INFLUÊNCIA DO SOLVENTE

Valentim Emilio Uberti Costa* e Hermes Luís Neubauer de Amorim

Instituto de Química - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Av. Bento Gonçalves, 9500 - 91501-970 - Campus do Vale - Porto Alegre - RS

Recebido em 16/7/98; aceito em 6/1/99

THE USE OF LIPASES AS AGENTS OF KINETIC RESOLUTION OF ENANTIOMERS IN ORGANIC SYNTHESIS: GENERAL ASPECTS OF SOLVENT'S INFLUENCE. In organic synthesis, lipases are the most frequently used biocatalysts. They are efficient stereoselective catalysts in the kinetic resolution of a wide variety of chiral compounds. The discovery that enzymes possess catalytic activity in organic solvents has made it possible to address the question of reaction medium influence on enzymatic specificity. Perhaps the most exciting and significant development in this emerging area is the discovery that enzyme specificity, in particular enantioselectivity, can be affected by changing from one organic solvent to another. This article discusses the scope and possible mechanistic models of this phenomenon in hydrolases, specially lipases, as well as directions of future research in the area.

Keywords: lipase enantioselectivity; solvent; mechanistic models.

INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas isoladas na transformação de compostos orgânicos é conhecida a mais de 100 anos¹. Entretanto, foi somente a partir da segunda metade da última década que o verdadeiro potencial que estes biocatalisadores representam em síntese orgânica começou a ser explorado. Durante este período, um grande número de reações catalisadas por enzimas foram desenvolvidas e tornaram-se familiares aos químicos orgânicos. Uma das principais contribuições deste tipo de metodologia biossintética tem sido na obtenção de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos, geralmente intermediários ou produtos finais de rotas sintéticas estereocontroladas².

Apesar da generalização que este tema vem sofrendo, proporcionalmente pouco se sabe e se tem estudado sobre os fatores que determinam a especificidade da enzima durante uma determinada reação. A necessidade deste tipo de investigação está relacionada a dois fatores. O primeiro diz respeito ao fato de que se amplia rapidamente o espectro de estruturas de substratos com os quais se espera que as enzimas sinteticamente úteis sejam capazes de trabalhar. O segundo, está relacionado com a necessidade de se otimizar aquelas reações onde não são obtidos resultados satisfatórios.

Para o entendimento e otimização dos processos enzimáticos aqui salientados, há dois tipos de abordagens, que podem ser realizadas de forma independente ou integrada. Uma delas é de natureza teórica. Por exemplo, caso seja nossa intenção investigar se um determinado enantiômero de uma mistura racêmica vai ser reconhecido preferencialmente por uma enzima, há dois métodos, que envolvem estudo da dinâmica molecular (DM)³ e estudo de perturbação da energia livre de Gibbs (PEL)⁴ do sistema. Em um tipo de metodologia, mais simples, é possível colocar um dos enantiômeros no sítio ativo da enzima e fazer uma simulação da dinâmica molecular do sistema. Em outra simulação, o segundo enantiômero é colocado no sítio. Posteriormente, é feita a análise das interações (por exemplo, número de pontes de hidrogênio) dos enantiômeros nas diferentes simulações. Outro tipo de estudo teórico, consiste em colocar um dos enantiômeros no sítio ativo e, após, lentamente transformá-lo no outro enantiômero. Durante esta transformação, a perturbação

na energia livre do sistema é avaliada. Em geral, estas formas de abordagem teórica estão limitadas ao conhecimento prévio da estrutura tridimensional da enzima estudada.

Outra abordagem está baseada no estudo metodológico de uma determinada enzima ou sistema. Este tipo de avaliação empírica é útil para a obtenção de informações e, além disso, pode ser empregada diretamente na otimização do processo investigado. Nos últimos anos, diferentes técnicas foram aperfeiçoadas ou desenvolvidas para o estudo e otimização de biotransformações, como, por exemplo, imobilização^{5a}, modificação enzimática por engenharia genética^{5b} ou via interação não-covalente (*imprinting*)^{5c}, reincubação do produto ou do substrato^{5d}, inibição enantiosseletiva^{5e}, modificação do substrato^{5f}, mapeamento do sítio ativo^{5g}, estudo da variação do solvente (*solvent engineering*)^{5h} e estudo da variação dos doadores acila em reações de transesterificação⁵ⁱ. Destas, a técnica que utiliza o estudo da variação do solvente é a que apresenta menor custo, maior flexibilidade e velocidade na execução.

A influência do solvente tem sido principalmente observada nas transformações enantiosseletivas⁶⁻¹⁶. A origem deste efeito pode ser assim resumida: em se tratando resolução cinética de enantiômeros, por exemplo, a discriminação deve ser feita pela enzima entre dois substratos que diferem somente no arranjo espacial de seus átomos. Exceto naqueles casos onde um dos enantiômeros simplesmente não é reconhecido pela enzima, a eficiência enantiosseletiva desta, para uma determinada reação, dependerá essencialmente do arranjo estrutural do sítio ativo, de forma que este reconheça preferencialmente um dos enantiômeros. Em uma aproximação simples, como a estrutura tridimensional de uma enzima depende das interações das cadeias laterais da proteína entre si e com o ambiente, nestes casos é possível esperar que a influência do meio (solvente) seja um dos fatores determinantes da enantiosseletividade desta. Neste caso, a principal pergunta é, como *precisamente* o solvente determina o perfil enantiosseletivo das reações catalisadas por enzimas? Ou seja, de um modo prático, o emprego de um solvente específico irá aumentar, diminuir ou não influenciará a enantiosseletividade de determinada reação enzimática? Em decorrência de que, necessariamente, as (bio)transformações devem ser conduzidas em algum meio

(ambiente), surgiram na literatura, nos últimos, anos vários trabalhos tentando elucidar as questões impostas por este tema. Neste artigo, são revisados e discutidos os principais aspectos que estão relacionados com a influência do solvente sobre a enantiosseletividade de hidrolases, principalmente lipases.

LIPASES

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Em seu ambiente natural, estas enzimas possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos ácidos graxos correspondentes e glicerol. Além das funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia, principalmente na indústria do óleo e dos alimentos¹⁷, e em síntese orgânica, na preparação de compostos enantiomericamente enriquecidos^{2b,c}.

As lipases representam um grupo de biocatalisadores acessíveis e de baixo preço que, em geral, são flexíveis quanto a sua especificidade. A diferença mais importante entre as “verdadeiras” lipases e outras hidrolases, como as esterases, são as interações físico-químicas com seus substratos. Em contraste com as esterases, que apresentam atividade de Michaelis-Menten normal, ou seja, a atividade da esterase aumenta conforme a concentração do substrato [S] aumenta, até um limite por saturação, as lipases não apresentam atividade enquanto seus substratos estão presentes na solução em estado monomérico. Contudo, quando a concentração do substrato está próxima ou ultrapassa o seu limite de solubilidade, ocorre um rápido aumento na atividade da lipase. A razão pela qual uma lipase não hidroliza substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima (a concentração micelar crítica, CMC), porém somente em concentração acima desta, é chamada de *ativação interfacial*. O mecanismo de ativação interfacial está associado a mudanças conformacionais na enzima.

Existem duas metodologias biossintéticas que podem ser empregadas na resolução de compostos racêmicos através de lipases e outras hidrolases. Por exemplo, conforme o esquema apresentado na Figura 1, o álcool ROH* e o acetato ROAc* opticamente enriquecidos podem ser obtidos através de transesterificação enzimática entre ROH racêmico e acetato de vinila, seguida de hidrólise química ou, alternativamente, através de esterificação química seguida de hidrólise enzimática. Em ambos os casos, a resolução enantiomérica é realizada na etapa biocatalítica. Dependendo da enzima, substrato e condições experimentais utilizadas, podem ser obtidos diferentes enantiômeros de ROH* e ROAc* através do emprego das duas técnicas.

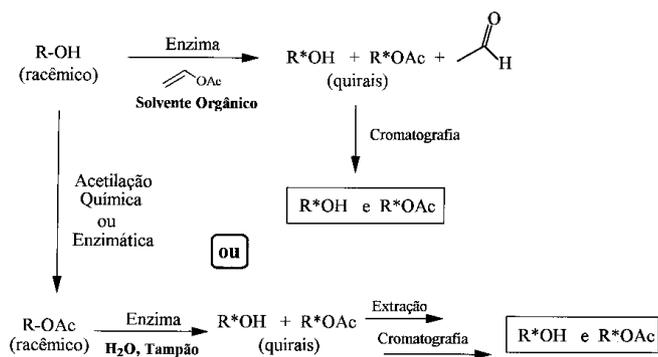


Figura 1. Alternativas biossintéticas que podem ser empregadas na resolução enantiomérica ou esterificação direta de um álcool através de hidrolases.

Na Figura 2 é mostrado o mecanismo geral para reação de transesterificação de um álcool catalisada por uma lipase de *Humicola lanuginosa*. Dois estados de transição diferentes estão

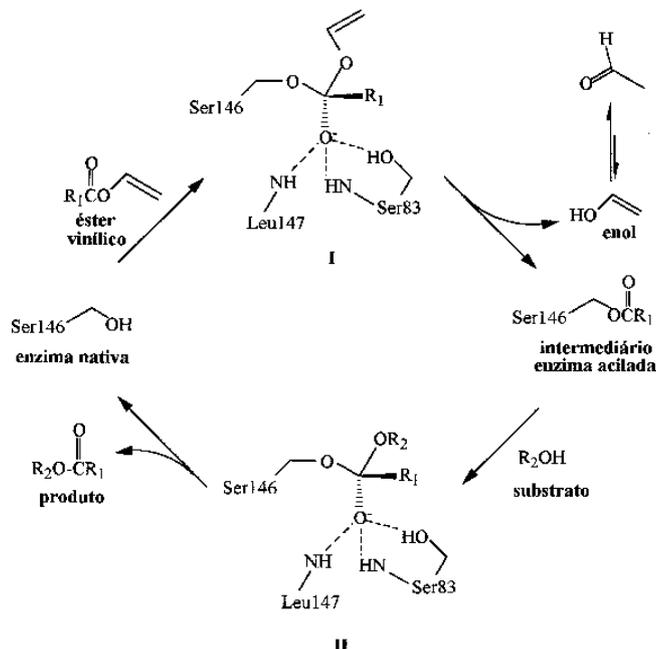


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de uma reação de transesterificação entre um álcool em um éster vinílico catalisada por uma lipase de *Humicola lanuginosa*. Baseado em Holquist et al.¹⁹.

envolvidos no rearranjo de ligações que ocorre durante o processo catalítico. O primeiro estado de transição (I) é gerado durante a transformação do complexo de Michaelis-Menten entre a enzima e o doador acila (éster vinílico) em uma espécie intermediária denominada enzima acilada. Normalmente, são empregados ésteres vinílicos como doadores acila. Nestes casos, o enol formado após a acilação do resíduo reativo da tríade catalítica é rapidamente transformado em seu tautômero (acetaldeído), que é mais estável, e volátil. Esta estratégia desloca o equilíbrio da reação na direção dos produtos por impedir uma possível competição nucleofílica entre o álcool formado nesta etapa e o substrato. Reações de transesterificação realizadas com excesso de doador acila (éster vinílico) e em solventes orgânicos anidros são irreversíveis. O segundo estado de transição (II) ocorre quando a espécie intermediária enzima-acilada é clivada pelo álcool R₂OH, formando um éster como produto. Nos estados de transição I e II, a carga negativa gerada sobre o oxigênio após o ataque nucleofílico, é estabilizada através de ligações de hidrogênio pelos resíduos Ser83 e Leu147, que formam o bolsão do oxianion na lipase de *Humicola lanuginosa*¹⁸.

As lipases são especialmente estáveis em solventes orgânicos^{20,21}. A facilidade com que estas enzimas aceitam uma variedade de substratos não-naturais e de tamanhos diversos, sugere que a espinha dorsal polipeptídica é flexível e pode adotar diferentes conformações. Como consequência, a baixa barreira de energia que é necessária para que ocorram mudanças conformacionais dificulta a modelagem e a previsão das interações estereoquímicas para este grupo de biocatalisadores²². Outra característica das lipases é de que as esterificações por elas catalisadas em solventes orgânicos são frequentemente mais enantiosseletivas que as reações hidrolíticas correspondentes em água²³.

O fato de que muitas enzimas mantêm atividade catalítica em solventes orgânicos não possui explicação simples. A hipótese correntemente aceita é de que, quando a enzima é colocada em um solvente orgânico anidro, esta é cineticamente congelada no estado nativo. Isto ocorre em parte devido a baixa constante dielétrica do meio, que produz uma maior efetividade nas forças eletrostáticas responsáveis pela manutenção da estrutura enzimática^{12,21}.

Uma maior compreensão sobre os mecanismos de ação de lipases foi obtida a partir da resolução da estrutura cristalina de várias destas enzimas. Até o momento, foram caracterizadas as estruturas tridimensionais das lipases pancreática humana²⁴, do cavalo²⁵, e do porco²⁶, além de lipases fúngicas de *Rhizomucor miehei*²⁷, *Geotrichum candidum*²⁸, *Humicola lanuginosa*²⁹, *Penicillium camembertii*²⁹, *Rhizopus delemar*²⁹, *Candida rugosa*³⁰ (preliminarmente conhecida como *Candida cylindracea*), *Candida antarctica*³¹ e de lipases bacterianas de *Pseudomonas glumae*³², *Chromobacterium viscosum*³³ e *Pseudomonas cepacea*³⁴.

ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS SOBRE A INFLUÊNCIA DO SOLVENTE NA ENANTIOSELETIVIDADE DE UMA BIOTRANSFORMAÇÃO

Em uma biotransformação, os substratos e os estados de transição gerados durante o processo catalítico deverão ser ligados por interações múltiplas não-covalentes com a superfície da enzima. Como consequência, a força de todas estas interações será fortemente dependente da distância e dos ângulos de interação da enzima com o substrato, resultando na formação de um sítio de ligação altamente seletivo. A discriminação entre dois enantiômeros é realizada pela enzima através de um sítio catalítico, contendo três pontos de ligação com o substrato, onde será gerado um intermediário tetraédrico, como, por exemplo, na Figura 3. Qualquer impedimento estérico devido a arquitetura ou conformação da estrutura enzimática poderá auxiliar a enzima a diferenciar estruturas semelhantes durante o processo de interação com o substrato.

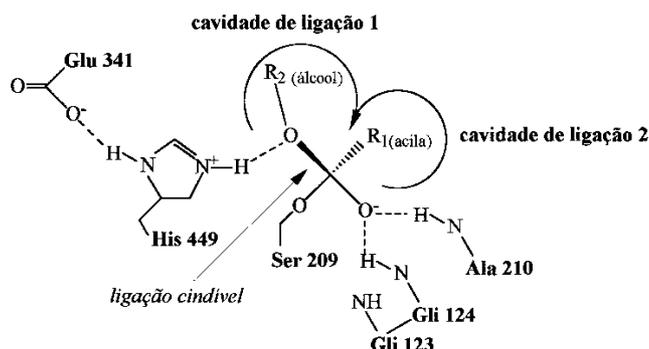


Figura 3. Representação esquemática de um possível complexo tetraédrico enzima-substrato para uma reação de hidrólise de um éster ou transesterificação de um álcool catalisada por uma lipase de *Candida rugosa*. Baseado em Cygler, M. et al.³⁵

A resolução cinética de um álcool ou éster catalisada por lipase envolve a formação e colapso de diferentes pares de intermediários diastereoisoméricos enzima-substrato, relacionados aos dois enantiômeros. Assim, o estado de transição que determinará a enantiosseletividade de uma enzima ocorre durante a formação ou colapso do primeiro intermediário formado na etapa lenta. Para os casos onde a condição de irreversibilidade é obedecida, a enantiosseletividade da biotransformação dependerá somente da diferença de energia ($\Delta\Delta G^\ddagger$) entre os estados de transição dos complexos ativados Enz-S e Enz-S^* , conforme a relação de energia livre estabelecida na Figura 4.

Em seu ambiente natural as lipases são ativadas por uma interface lipídio-água onde a fase apolar é formada pelos próprios substratos³⁷. Em geral, o aumento da atividade de uma lipase está associado ao aumento da área da interface (ou concentração do substrato na interface)³⁸. O mecanismo de catálise enzimática em solventes orgânicos, onde a enzima permanece

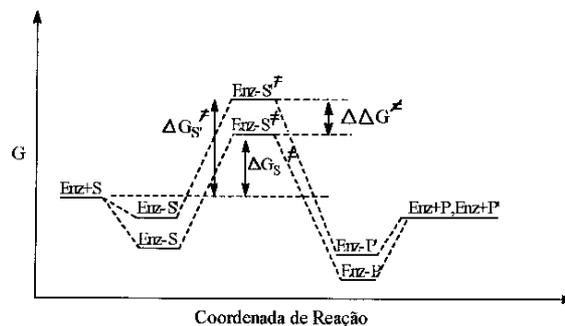


Figura 4. Diagrama de energia livre para um processo hipotético enantiosseletivo³⁶.

insolúvel, obedece um modelo de catálise interfacial, mostrado na Figura 5^{38a,22}. Este modelo representa a ação da enzima sobre dois enantiômeros competidores S e S' e assume que a etapa catalítica é irreversível. Desde que as propriedades ativas de superfície dos dois enantiômeros são idênticas, a razão k_s/k_d é constante e independe das concentrações relativas dos enantiômeros na interface. Como consequência, a etapa onde a enzima penetra na interface adquirindo uma nova conformação Enz^* não participa do processo de discriminação do biocatalisador pelo enantiômero. Assim, a enantiosseletividade de uma bioconversão irreversível em solventes orgânicos anidros obedecerá um processo homocompetitivo clássico, descrito pela equação 1.

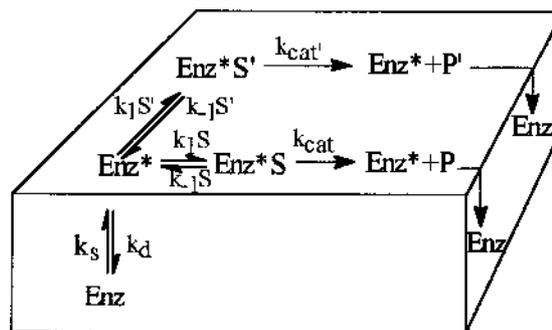


Figura 5. Modelo de mecanismo para catálise interfacial enzimática.

$$\frac{\ln([S]/[S_0])}{\ln([S']/[S'_0])} = E \frac{(k_{cat}/K_m)s}{(k_{cat}'/K_m)s'} \quad (1)$$

Na equação 1, k_{cat}/K_m representa a constante de velocidade aparente de segunda ordem para a reação entre uma enzima e um substrato em uma concentração infinitamente pequena; k_{cat} é a constante catalítica, K_m é a constante de Michaelis e E é a razão enantiomérica^{5d}, um parâmetro quantitativo e qualitativo da enantiosseletividade do sistema. Embora a qualidade do produto da resolução de um racemato seja caracterizada pelo excesso enantiomérico, a razão enantiomérica (E) significa um parâmetro muito importante. Um valor elevado de E para um dado par enzima-substrato é essencial para o sucesso de uma resolução cinética, já que isto assegura não apenas um excesso enantiomérico elevado, mas também um rendimento proporcionalmente alto^{1,5d}. Para propósitos práticos, um valor de E abaixo de 10 para qualquer biotransformação torna-a inviável como um processo enantiosseletivo. Por outro lado, este pode ser considerado bom se estiver situado entre aproximadamente 10 e 30 e, acima disto, excelente. Os valores de $E > 200$ não podem ser precisamente atribuídos como consequência das incertezas intrínsecas aos métodos analíticos de determinação do

excesso enantiomérico (por exemplo, RMN, HPLC ou CG). Acima deste patamar, uma pequena variação no excesso enantiomérico do produto ou substrato provoca um significativo aumento no valor numérico de E. Dependendo do tipo de estudo realizado, a enantiosseletividade de biocatalisadores têm sido também expressa através da razão entre as velocidades iniciais, $n_S/n_{S'}$, ou razão entre as constantes de especificidade, $(k_{cat}/K_m)_S/(k_{cat}/K_m)_{S'}$, para os dois enantiômeros competidores. A relação entre os termos cinético, termodinâmico e a enantiosseletividade (E) de uma biotransformação é dada pela equação 2.

$$E = \frac{(k_{cat}/K_m)_S}{(k_{cat}/K_m)_{S'}} = e^{\frac{\Delta\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (2)$$

Para a energia de ligação enzima-substrato (Enz-S e Enz-S'), na Figura 3) há a contribuição de vários componentes. No caso de reações enantiosseletivas irreversíveis, a magnitude de $\Delta\Delta G^\ddagger$, que será a medida da discriminação da enzima pelos enantiômeros, deve possuir um componente espacial e outro eletrônico, relacionados exclusivamente a enzima, já que durante o estado de transição o substrato é removido do solvente. Portanto, as enzimas que possuem barreiras energéticas baixas para transições conformacionais, isto é, enzimas que possuem um comportamento do tipo encaixe induzido (*induced-fit*)³⁹, como as lipases, devem sofrer alterações no seu perfil enantiosseletivo em solventes com características físico-químicas diferentes, já que a capacidade de mobilidade conformacional e a conformação desta deverão experimentar variações. As enzimas que possuem conformações mais rígidas (isto é, barreiras de energia elevadas para a quebra das ligações não-covalentes), não devem passar por grandes transformações conformacionais ao adotarem a conformação catalítica ativa. Estas enzimas, que não seguem um modelo do tipo encaixe induzido (*non induced fit*), devem sofrer um grau menor de influência do solvente no seu potencial enantiosseletivo.

COMO O SOLVENTE INFLUENCIA A ENANTIOSSELETIVIDADE DE LIPASES?

A magnitude do efeito do solvente sobre a enantiosseletividade das lipases pode ser ilustrada a partir de em um recente trabalho, realizado por Kaminska¹⁵ e colaboradores. Foi realizado um estudo sobre o efeito do solvente na enantiosseletividade da reação de transesterificação entre 1-(2-fúril)-etanol (**1**) e acetato de vinila, catalisada pela lipase do pâncreas do porco (PPL) e pela lipozima IM (uma lipase de *Rizhomucor miehei* imobilizada) (Equação 3). Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 1. Nas reações em que foi empregada a PPL como biocatalisador, dentre os 8 solventes utilizados, a enantiosseletividade (E) para a reação variou entre 5, quando a reação foi conduzida em cicloexano, a 266, para a reação que foi conduzida em THF. Quando a mesma reação foi catalisada pela lipozima IM, dentre os 10 solventes utilizados, a enantiosseletividade (E) variou entre 50, quando a reação foi conduzida em tolueno, a 106, para a reação que foi conduzida em clorofórmio. Estes resultados mostram que houve uma forte dependência da enantiosseletividade das enzimas em função do solvente empregado. Além disso, pode-se também observar que as lipases apresentaram comportamento distinto, sendo que a PPL foi consideravelmente mais influenciada pela variação do solvente.

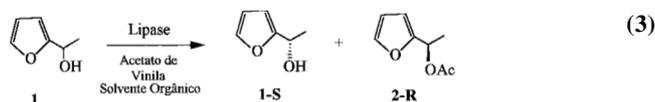


Tabela 1. Influência do solvente na enantiosseletividade da reação de transesterificação entre **1** e acetato de vinila catalisada pela lipase do pâncreas do porco (PPL) e pela lipozima IM¹⁵.

E	Lipozima IM		Solvente	PPL		E
	[%]ee 1-S	[%]ee 2-R		[%]ee 1-S	[%]ee 2-R	
83	46	96	THF	30	>99	266
82	59	96	hexano	8	70	86
57	79	92	cicloexano	6	66	5
50	71	92	tolueno	18	94	39
94	22	97	CH ₂ Cl ₂	8	>99	214
106	48	97	CHCl ₃	12	>99	225
64	>99	87	CCl ₄	14	>99	227
70	92	90	benzeno	-	-	-
83	35	97	dioxano	26	>99	258
69	71	94	iso-octano	-	-	-

O efeito do solvente sobre a enantiosseletividade de lipases vem sendo objeto de estudo de vários grupos de pesquisa⁶⁻¹⁶. Embora seja conhecido que o solvente afeta a especificidade das lipases em biotransformações enantiosseletivas, a racionalização dos mecanismos destes efeitos e o estabelecimento de modelos que permitam antecipar o comportamento de um determinado sistema ainda é incipiente. Como conseqüência, os métodos de otimização que empregam a técnica de variação do solvente ainda são empíricos, em geral baseados no conhecimento de sistemas semelhantes ou na escolha arbitrária de um determinado solvente. As principais abordagens que têm sido propostas para a elucidação dos mecanismos de influência do solvente no comportamento enantiosseletivo de biotransformações são apresentadas a seguir.

Variação conformacional induzida por solvente

Embora hajam estudos anteriores^{6,40-42}, o primeiro modelo dinâmico de sítio ativo, elaborado com a finalidade de racionalizar o efeito das características físico-químicas do solvente e da estrutura do substrato sobre a enantiosseletividade de reações catalisadas por lipases em solventes não aquosos, foi proposto em 1991, por Fitzpatrick e Klibanov⁴³. Estes autores procuraram estabelecer um modelo que permitisse prever a enantiosseletividade da subtilisina (uma serino-proteinase de *Bacillus licheniformis*) em função do solvente na reação de transesterificação entre o álcool 1-fenil-etanol (**3**) e butirato de vinila (Equação 4). Neste estudo, foi observada uma correlação entre o aumento da enantiosseletividade da subtilisina e a diminuição do momento de dipolo e da constante dielétrica dos solventes empregados (Tabela 2). Este resultado foi interpretado com base no efeito do solvente sobre a mobilidade conformacional da proteína, segundo o modelo de sítio ativo apresentado na Figura 6. Neste, o enantiômero *S* do substrato é ligado à enzima segundo uma geometria denominada Modo Produtivo, onde o grupo fenila, mais volumoso, ocupa a cavidade maior e o grupo metila a cavidade pequena. Já o enantiômero *R* necessita, para reagir, ocupar o sítio de ligação conforme um Modo Não-Produtivo, isto é, com o grupo fenila ocupando a cavidade menor e o grupo metila ocupando a cavidade maior, sendo que, para que esta aproximação ocorra, este deverá encontrar um impedimento estérico maior do que o encontrado pelo enantiômero *S*. A eficiência enantiosseletiva deste processo depende da rigidez do sítio ativo. Quando a flexibilidade da proteína aumenta (devido ao aumento da constante dielétrica do solvente), o impedimento estérico exerce menor influência, permitindo um aumento na reatividade do enantiômero *R*, o que, como conseqüência, diminui a enantiosseletividade da enzima. Foi observado que a enantiosseletividade da subtilisina

obedeceu, na série de solventes empregados, uma correlação inversa e linear conforme o aumento do momento de dipolo e da constante dielétrica dos solventes empregados. Por outro lado, não foi encontrada nenhuma correlação entre a enantioselectividade e a hidrofobicidade dos mesmos solventes. O modo suposto de ligação de **3** no sítio ativo da subtilisina foi posteriormente comprovado por estudos de modelagem molecular⁴⁴.

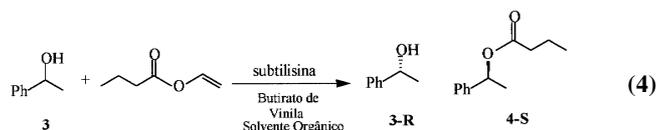


Tabela 2. Enantioselectividade da subtilisina na reação de transesterificação de **3** em vários solventes orgânicos. Valores de momento de dipolo e constante dielétrica não foram apresentados no artigo⁴⁵. ^aEnantiômero R; ^benantiômero S.

Solvente	k_{cat}/K_M , $M^{-1}min^{-1}$ S^a	R^b	Enantioselectividade $(k_{cat}/K_M)_S/(k_{cat}/K_M)_R$
1,4-dioxano	170	2,8	61
benzeno	13	0,24	54
trietilamina	330	6,9	48
THF	230	5,8	40
piridina	43	1,4	31
DMF	1,4	0,16	9
nitrometano	16	3,3	5
N-metil-acetamida	1,3	0,38	3
acetona	48	16	3

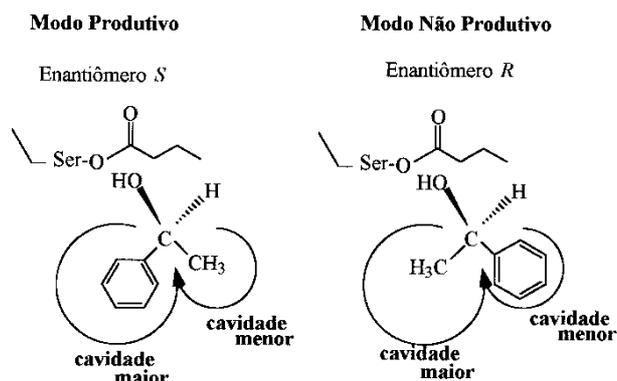
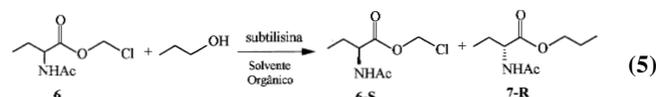


Figura 6. Representação esquemática para os modos de ligação dos enantiômeros R e S do álcool sec-feniletanol (**3**) e o sítio da subtilisina acilado⁴³.

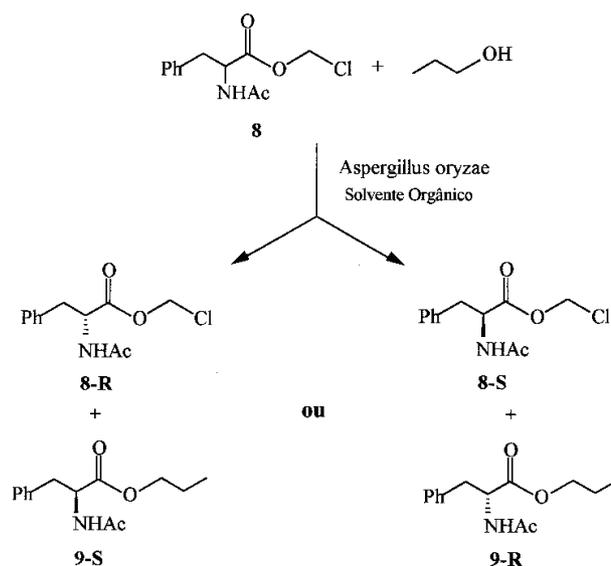
Hidrofobicidade do solvente

Em geral, o efeito da hidrofobicidade do solvente sobre a enantioselectividade de biotransformações tem sido analisado em termos de partição, ou das moléculas de água presentes nas cavidades do sítio ativo⁴⁰, ou dos grupos funcionais do substrato⁴⁵. Sakurai et al.⁴⁰ observaram uma correlação linear entre a diferença de energia livre de ativação ($\Delta\Delta G^\ddagger$) para a reação de transesterificação entre o éster *N*-acetil-2-cloroetil-alanina (**6**) e propanol, catalisada pela *subtilisina* em 13 solventes orgânicos, e o logaritmo do coeficiente de partição em água-octanol destes ($\log P$). Para este sistema, foi verificada uma relação inversa entre o valor de $\Delta\Delta G^\ddagger$, e conseqüentemente da enantioselectividade, e a hidrofobicidade dos solventes empregados, expressa em valores de $\log P$. Esta dependência foi interpretada como sendo derivada da maior dificuldade encontrada no deslocamento de moléculas de água, presentes na cavidade hidrófoba do sítio de ligação da enzima, em solventes hidrófobos durante o processo de ligação enzima-substrato. A força condutora deste processo surge do deslocamento das moléculas de água que

estão presentes dentro da cavidade hidrófoba do sítio de ligação da enzima, sendo que, como conseqüência, em solventes hidrófobos ele é termodinamicamente menos favorecido do que em solventes hidrófilicos. Se enantiômero lento (menos reativo) precisa, para reagir, estar ligado ao sítio ativo de uma forma "incorreta", conseqüentemente ele deverá deslocar algumas moléculas de água a menos que o enantiômero rápido (mais reativo). Neste caso, em solventes hidrófobos o enantiômero rápido sofre, proporcionalmente, uma maior diminuição na sua reatividade do que o enantiômero lento. O efeito disto é a diminuição da enantioselectividade da reação.



Dependendo das características estruturais e dos grupos funcionais ligados ao carbono quiral, este tipo de fenômeno pode estar associado aos efeitos de partição dos grupos funcionais do próprio substrato⁴⁵. Por exemplo, na reação de transesterificação entre *N*-acetil-2-cloroetil-fenilalanina (**8**) e propanol, catalisada por *Aspergillus oryzae* (Esquema 1), Tawaki e Klibanov⁴⁵ observaram uma reversão completa da enantioselectividade da enzima, induzida a partir da mudança do solvente. Conforme pode ser observado na Tabela 3, enquanto que em solventes hidrófilicos, como acetona e DMF, o enantiômero S de **8** é mais reativo que o enantiômero R, foi observada uma inversão na ordem de reatividade destes em solventes hidrófobos, como tolueno e tetracloreto de carbono.



Esquema 1

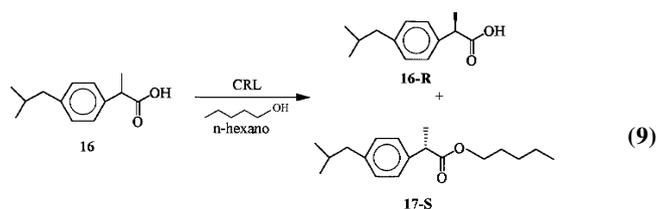
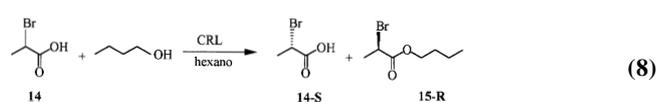
Este efeito foi racionalizado segundo um modelo de afinidade entre os grupos do substrato e solvente (Figura 7). Neste, o Modo Produtivo de ligação (que favorece a conversão do substrato) representa a situação onde o grupo hidroxila do resíduo serina (Ser) da tríade catalítica está em posição adequada para o ataque nucleofílico sobre o carbono carbonílico de **8**. Conforme aumenta a hidrofobicidade do solvente, a parte hidrófoba (grupo benzila) de **8** sofre partição para fora do sítio ativo. Este modo favorece a reatividade do enantiômero R. Em solventes hidrófilicos, o grupo benzila é trocado por um grupo menos lipofílico, sendo que a geometria que a molécula deve adotar neste caso favorece a reatividade do enantiômero S.

Tabela 4. Efeito da adição de água sobre a enantiosseletividade da reação de transesterificação entre **14** e butanol catalisada por uma lipase de *Candida rugosa* (CRL)⁴².

Quantidade de água adicionada(%)	Velocidade inicial $\mu\text{mol.h}^{-1}(\text{mg})^{-1}$	Conversão(%)	e.e. de 15-R (%)	E
0,00	0,69	44,5	80	17
0,05	1,3	47,5	85	29
0,075	4,0	43	90	39
0,125	6,1	42	95	81

Tabela 5. Efeito da adição de água sobre a enantiosseletividade da reação de transesterificação entre **16** e pentanol catalisada por uma lipase de *Candida rugosa* (CRL)⁴⁷.

Quantidade de água adicionada (mmol)	conversão(%)	e.e. de 17-S (%)	E
0,0	42	99	>100 (429)
1,0	24	98	>100 (133)
2,5	17	90	23
5,0	13	88	17



Fitzpatrick e Klivanov⁴³, verificaram que, na reação de esterificação do álcool **3** por butirato de vinila em dioxano (Equação 4), a enantiosseletividade da *subtilisina* diminuiu significativamente pela adição de água, como pode ser observado na Tabela 6. Quando a mesma reação foi realizada em acetonitrila, a adição de 0,4% (v/v) de água produziu efeito contrário, elevando a enantiosseletividade.

Tabela 6. Efeito da adição de água sobre a enantiosseletividade da reação de transesterificação entre **3** e butirato de vinila catalisada pela *subtilisina* da Carlsberg⁴³.

Quantidade de água adicionada (%)	Solvente	Enantiosseletividade V_R/V_S
0,0	dioxano	50
0,2	dioxano	18
0,4	dioxano	14
0,0	acetonitrila	3,6
0,4	acetonitrila	5,4

Nas enzimas, há uma pequena camada de hidratação que atua como componente primário do microambiente enzimático, servindo de tampão entre a superfície da enzima e o ambiente. Em reações conduzidas em ambientes não aquosos, a interação entre os solventes orgânicos e as moléculas de água ligadas à enzima controla a atividade enzimática²¹. Sabe-se que solventes que sejam capazes de subtrair esta água estrutural provocam a inativação da enzima⁴⁹. Uma característica preponderante das lipases em meio anidro é a rigidez conformacional adquirida⁵⁰,

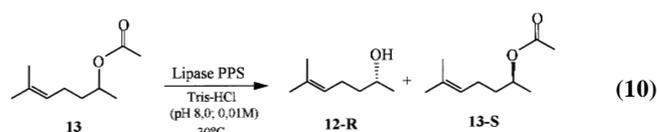
conseqüência de fortes interações de natureza eletroestática⁵¹. De acordo com a lei de Coulomb, a força destas interações é inversamente proporcional a constante dielétrica, que é particularmente alta para água em relação aos solventes orgânicos. No caso de enzimas ativas em solventes orgânicos, a água pode atuar como lubrificante, fazendo ligações com os grupos funcionais da proteína, assim atenuando a rigidez e, como conseqüência, a capacidade de discriminação, do sítio ativo. Esta pode ser uma explicação para os casos em que há queda na enantiosseletividade por adição de água^{43,48}. Outra possibilidade, surge do fato que, dependendo da concentração, a água presente pode atuar de forma a aumentar significativamente a velocidade da reação reversa. Nesta situação, a enantiosseletividade da reação cai abruptamente após o enantiômero rápido ter alcançado o equilíbrio^{23a}. Em trabalho sobre a irreversibilidade de reações de transesterificação em solventes orgânicos na presença de excesso de ésteres vinílicos, Höberg e colaboradores⁵² observaram que a presença de água pode promover uma segunda reação de acilação do sítio ativo, a partir do acetato formado pelo enantiômero mais reativo. Este fenômeno causa uma diminuição no valor de E apenas para a reação do substrato. O mecanismo pelo qual a reversibilidade se processa não foi esclarecido.

Nos casos em que há o aumento da enantiosseletividade da enzima devido a adição de água, não foram encontrados modelos na literatura consultada que estabeleçam um mecanismo específico ou geral para tal propriedade. A diferença de comportamento encontrada para a CRL pode ser indicativo da existência de mais de uma forma de ligação do substrato com a superfície da lipase. Esta possibilidade está de acordo com trabalho recente de modelagem molecular, que indicou a existência de dois modos possíveis de ligação para ácidos carboxílicos substituídos na posição 2, no sítio ativo da CRL53.

Adição de solventes orgânicos em reações de hidrólise

Em trabalho recente, Kinoshita e Ohno⁵⁴ estudaram o efeito da adição de solventes orgânicos na reação de hidrólise de 2-acetóxi-6-metil-5-hepteno (acetato do sulcatol; **13**) catalisada pela lipase PPS, uma lipase de *Pseudomonas cepacea* (Equação 10). Conforme pode ser observado na Tabela 7, os solventes adicionados alteram o perfil enantiosseletivo da reação através de diferentes formas. Por exemplo, a adição de hexano, embora tenha aumentado a enantiosseletividade devido ao efeito de inibição sobre enantiômero **S**, diminuiu a reatividade de ambos os enantiômeros. Por outro lado, 2,2-dimetilbutano, um solvente com característica semelhante a do hexano, foi ativador dos dois enantiômeros, sem alterar a enantiosseletividade. A adição de

ciclopentano aumentou a enantiosseletividade da lipase PPS elevando a reatividade do enantiômero **R** e diminuindo a reatividade do enantiômero **S** enquanto que, a adição de ciclohexano, apesar da pequena diferença de tamanho no anel, provocou efeito inverso no comportamento da enzima. Embora o mecanismo não esteja claro, estes resultados são indicativo de que a principal forma de influência do solvente no comportamento enantiosseletivo da enzima decorreu de interações moleculares entre sítios particulares da lipase e moléculas do solvente. Evidência recente de que isto pode ocorrer, foi obtida após a resolução da estrutura cristalina da lipase do pâncreas do porco (PPL), a partir do complexo lipase-colipase-(éter mono-octil-tetraetileno-glicólico, EMTG)²⁶. Foi observado que, no cristal do complexo, uma molécula de EMTG, um detergente não iônico, foi incorporada ao sítio ativo da enzima durante a cristalização. A presença do detergente foi responsável pela alteração da orientação de um dos resíduos da tríade catalítica, His264. A importância desta observação está relacionada a resultados obtidos em outro trabalho³⁵: a análise de estruturas tridimensionais de análogos de estado de transição enzima-inibidor para a hidrólise de ésteres metínicos, demonstrou que a enantiosseletividade da CRL para estes substratos decorre da destruição de uma ponte de hidrogênio entre o anel imidazólico da histidina da tríade catalítica e o enantiômero lento do substrato. Pode-se concluir que, em certos casos, a forma de influência mais importante do solvente sobre a enantiosseletividade de lipases, decorre da atuação deste como molécula individual, e não como ambiente de solução.



Influência da tampa das lipases nos processos seletivos

As lipases existem dentro de um amplo espectro de tamanhos e pesos moleculares. Em geral, as semelhanças entre as suas seqüências de amino-ácidos estão limitadas a curtas extensões localizadas em torno ao sítio ativo. Todas lipases, com exceção das lipases pancreáticas, possuem um único domínio. Estas enzimas compartilham um padrão conformacional comum, denominado conformação α/β de hidrolase, onde está situada a tríade catalítica (Ser-His-Asp/Glu)^{55,56}. Este arranjo, existente também nas esterases e outras enzimas relacionadas, consiste de estruturas β paralelas, flanqueadas em ambos os lados por hélices α . Uma das características mais conservadas nas lipases é o cotovelo nucleofílico, uma aguda curvatura g contendo o resíduo nucleofílico serina, posicionado entre uma estrutura β e uma hélice α .

Os aspectos básicos sobre os mecanismos de catálise das lipases, incluindo o processo de ativação interfacial, foram elucidados a partir da resolução das estruturas tridimensionais

de várias destas enzimas, na forma nativa e/ou na forma de complexo enzima-inibidor. Estudos realizados demonstraram a existência de duas conformações principais, denominadas forma fechada (inativa)^{24,27} e forma aberta (ativa)^{57,58}. Na conformação fechada, o sítio ativo está totalmente oculto sob um curto segmento helicóide, formado por um ou mais *loops*, denominado tampa (*lid*) ou aba (*flap*). Na conformação aberta, a tampa é deslocada para fora do sítio ativo, deixando-o totalmente acessível ao solvente e substrato. Neste movimento, o lado hidrófobo da tampa fica totalmente exposto, expandindo consideravelmente a superfície não polar do sítio ativo. Na lipase de *Rhizomucor miehei*, por exemplo, durante o processo de ativação, a espinha dorsal da tampa é deslocada um pouco mais que 7 Å, expandindo em aproximadamente 750 Å² a área hidrófoba da superfície da enzima⁵⁹. A ativação da lipase decorre da estabilização da superfície não polar do sítio ativo, gerada pelo movimento da tampa, através do contato deste com um ambiente apolar (interface lipídica)⁵⁷. Além da desobstrução espacial e da formação da superfície hidrófoba, o movimento da tampa é fundamental para que um dos resíduos responsáveis pela formação do oxianion (Ser82) adquira uma conformação favorável para estabilização do intermediário tetraédrico⁵⁷. O mecanismo verificado para este processo sugere que, durante a ativação, ocorre um movimento rígido do corpo da tampa na lipase de *Rhizomucor miehei*. Neste tipo de movimento, a maioria das cadeias principais e laterais voltam a posição original após o rearranjo conformacional⁵⁷. Conforme foi demonstrado para a lipase pancreática humana (HPL)⁵⁸, os arranjos estruturais que ocorrem durante a reorganização da tampa são muito diferentes daqueles que ocorrem na lipase de *Rhizomucor miehei*. Na HPL, assim como nas lipases de *Candida rugosa*³⁰ e *Pseudomonas cepacea*³⁴, durante este processo há modificação na estrutura secundária destas enzimas. Nestes casos, não ocorre um movimento de corpo rígido.

Nas lipases, a localização topológica, comprimento e complexidade envolvida no movimento da tampa, depende da família e tamanho da enzima⁶⁰. Em muitos casos, os rearranjos envolvidos estão diretamente relacionados com a criação de uma geometria adequada para formação do bolsão do oxianion e/ou geração de uma superfície própria para contatos específicos com o substrato. Estes dois processos estão intimamente envolvidos na capacidade de discriminação da enzima por moléculas diferentes, ou seja, seletividade. A despeito do progresso alcançado na elucidação dos mecanismos de ativação interfacial de diferentes lipases⁶⁰, baseado principalmente em estudos de raio-X, ainda existem lacunas na correlação entre atividade enzimática e as propriedades da interface. Os dados de difração de raio-X fornecem informação importante, mas predominantemente estática, sobre as estruturas das proteínas. Em solução, o movimento da enzima pode ser bastante complexo. Em particular, a forma com que a enzima aproxima-se do substrato e as interações da enzima com a interface tem papel importante no processo de ativação e reconhecimento. É interessante notar que, embora tenha sido demonstrado que o solvente pode alterar a especificidade⁶¹, quimiosseletividade⁶²,

Tabela 7. Efeito do solvente orgânico adicionado na reação de hidrólise de **13** catalisada pela lipase PPS de *Pseudomonas cepacea*.
^aSolventes adicionados a uma concentração de 16mg/ml (concentração limite para manter o sistema como uma dispersão)⁵⁴.

Solvente Adicionado ^a	10 ² k _R (h ⁻¹)	10 ² k _S (h ⁻¹)	E
nenhum	2,57±0,12	2,05±0,12	12,5±0,4
hexano	1,89±0,05	0,83±0,01	22,8±0,6
2,2-dimetil-butano	3,52±0,15	2,67±0,22	12,9±0,6
ciclopentano	2,91±0,09	1,16±0,08	24,8±1,4
ciclohexano	2,01±0,09	2,22±0,11	9,0±0,2
benzeno	0,67±0,05	0,21±0,03	31,1±3,3
diisopropil éter	2,92±0,08	1,47±0,07	19,7±0,6

regiosseletividade^{5h}, seletividade proquiral⁶³, esterosseletividade⁴⁴ e estereoespecificidade⁶⁴ das lipases e outras hidrolases, existem vários dados que indicam a independência do mecanismo de ação e estrutura enzimáticas do solvente¹². Por exemplo: (a) o emprego do método de Hammett na análise da clivagem de vários fenil-acetatos *para*-substituídos, catalisada pela subtilisina em água e em diferentes solventes orgânicos, revelou que a estrutura do estado de transição para a acilação da enzima é independente do solvente; (b) estudos cinéticos de efeitos isotópicos indicaram que o estado de transição para a desacilação da subtilisina acilada não muda com o solvente; (c) estudos de RMN em estado sólido revelaram que a única rede de ligações de hidrogênio existente na tríade catalítica da proteinase *a*-lise, é mantida intacta tanto em octano como em acetona; (d) foram observadas estruturas indênticas para cristais da subtilisina obtidos em água e em acetonitrila.

Em vista destes fatos, no estudo das lipases, torna-se importante o exame do movimento dinâmico da tampa durante a interação da enzima com o substrato. Infelizmente, os movimentos dos loops peptídicos ocorrem em escalas de tempo que não permitem, até o presente momento, o emprego de métodos padrões de dinâmica molecular no estudo de modelos atômicos completos de proteínas⁶⁵. Neste campo, métodos alternativos, como dinâmica browniana (DB) e dinâmica essencial (DE), foram recentemente utilizados na investigação da dinâmica da tampa⁶⁵ e da lipase de *Rhizomucor miehei*⁶⁶, em diferentes solventes. Estes estudos indicaram que a enzima é ativada conforme diminui a constante dielétrica do solvente e a tampa é movida para fora do sítio ativo, através da estabilização da interação entre os resíduos Arg86 e Asp91⁶⁵. Na simulação realizada em hexanoato de metila, foi observado que uma molécula do éster penetrou na região de encaixe do sítio ativo⁶⁶. Este movimento foi orientado através de interações hidrófobas entre o substrato e os resíduos Pro100 e Pro101. Foi observado que a cadeia alquila da molécula do hexanoato de metila moveu-se para abaixo do resíduo Phe94, empurrando-o para cima. Possivelmente, este movimento foi responsável pela ativação da lipase, além de ter mudado significativamente a dinâmica da tampa. Estes resultados estão de acordo com trabalho preliminar realizado por Norin e colaboradores⁵⁰.

CONCLUSÕES

O solvente pode alterar a especificidade, quimiosseletividade, regiosseletividade, seletividade proquiral e enantiosseletividade das lipases e outras hidrolases. Vários modelos foram propostos para explicar a mudança da seletividade destas enzimas em função do solvente. Estes, foram baseados na alteração da flexibilidade conformacional do sítio ativo, na partição de grupos funcionais do substrato ou de moléculas de solvente para fora ou para dentro das cavidades do sítio ativo, e na estrutura do solvente. Dependendo do substrato, foram observados comportamentos diferentes para a mesma enzima. Nestes casos, foi sugerida a existência de mais de uma possibilidade de ligação do substrato com a superfície da enzima.

O evento primário da atividade catalítica das lipases é a ativação interfacial. Existem várias indicações de que a competência catalítica destas enzimas é governada principalmente pela interação entre a tampa do sítio ativo e o meio. Foi observado que os arranjos conformacionais que ocorrem durante a reorganização da tampa causam mudanças estruturais em setores da proteína responsáveis pela ligação do substrato e estabilização dos estados de transição dos intermediários de reação. Estes indicativos sugerem há forte influência da tampa na capacidade de discriminação da enzima por diferentes substratos. A dinâmica destas interações ainda não foi esclarecida. O fato de que o tipo de reorganização molecular, que ocorre devido

ao movimento da tampa, varia conforme a lipase, é sugestivo de que o solvente afeta estas enzimas segundo um mecanismo particular para cada uma delas.

Em resumo, a forma com que o solvente afeta a enantiosseletividade de lipases e outras hidrolases parece envolver a composição de uma série de fatores, interdependentes ou não, relacionados com a estrutura do substrato e com os diferentes níveis de interação entre a enzima e o microambiente ou ambiente de solução que a envolvem.

O ESTADO DA ARTE

Nos últimos anos, grande atenção tem sido voltada para os mecanismos que controlam o acessibilidade do substrato ao sítio ativo das enzimas. O grande número de estruturas tridimensionais de lipases nativas e de complexos enzima-inibidor foi responsável pelo melhor entendimento de como funcionam estes biocatalisadores a nível molecular. Contudo, muito pouco é conhecido sobre a dinâmica das interações destas enzimas, com a interface e com o substrato, sob a influência de um determinado solvente. A importância do emprego de métodos teóricos reside no fato de que é possível, através da observação de trajetórias de microssegundos, “ver” a dinâmica da região do sítio ativo em diferentes solventes. Por outro lado, muitos outros dados experimentais e estruturais ainda são necessários para a melhoria do entendimento sobre a especificidade das lipases.

A capacidade atual da ciência em fornecer respostas para as perguntas que estão sendo feitas em torno do tema aqui discutido, pode ser ilustrada a partir de dois trabalhos recentes. Foi observado que, durante a reação de transesterificação do sulcatol, realizada em diclorometano, houve o aumento da enantiosseletividade da lipase de *Pseudomonas cepacea* em função da conversão do substrato⁶⁷. Através das investigações experimentais realizadas e modelos teóricos analisados, os autores não obtiveram explicação para este fenômeno único. Em estudos realizados por nosso grupo, foi observado uma correlação entre o aumento da enantiosseletividade da lipase do pâncreas do porco (PPL), em reações de transesterificação, e o aumento da constante dielétrica e hidrofobicidade dos solventes empregados⁶⁸. Os resultados do estudo realizado foram indicativos de que a PPL possui comportamento enantiosseletivo diferente da maioria das lipases, sendo que não foi possível esclarecer a razão pela qual este fenômeno ocorre. Independente da abordagem utilizada, muitos detalhes moleculares da ação das lipases devem ser ainda determinados. Em particular, o entendimento dos mecanismos moleculares que determinam a seletividade enzimática em solventes orgânicos.

REFERÊNCIAS

1. Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3^a ed.; Springer-Verlag, Berlin, 1997.
2. (a) Sih, C. J.; Wu, S.-H. *Topics Stereochem.* **1989**, *19*, 63; (b) Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A.; *Chem. Rev.* **1990**, *92*, 1071; (c) Theil, F.; *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2203; (d) Stecher, H.; Faber, K.; *Synthesis* **1997**, *1*.
3. Van Gunsteren, W. F.; Berendesen, H. J. C.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 992.
4. Bell, C. D.; Harvey, S. C.; *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 6595.
5. (a) Goffic F. L.; Braun, J.; Bousquet, O. R.; *Tetrahedron Lett.* **1995**, *37*, 8195; (b) Mutter, M.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 639; (c) Ijiro, K.; Hatano, A.; Okahata, Y.; *Tetrahedron Asym.* **1995**, *6*, 1311; (d) Sih, C. J.; Girdaukas, G.; Fujimoto, Y.; Chen, C. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294; (e) Sih, C. J.; Guo, Z., W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6836; (f) Jones, J. B.; Werth; M. J.; Toone, E. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4946;

- (g) Ottolina, G.; Carrea, G.; Colonna, S.; Rückemann; *Tetrahedron Asym.* **1996**, *7*, 1123; (h) Hadfield, T. M.; Cote, G. L.; Haribansh, K. S.; *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1353; (i) Ema, T.; Maeno, S.; Takaya, Y.; Takashi, S.; Utaka, M.; *Tetrahedron Asym.* **1996**, *7*, 3, 625-628.
6. Kitagushi H.; Fitzpatrick, P. A.; Huber, J. E.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3094.
 7. Bovara, R.; Carrea, G.; Riva, S.; *Tetrahedron Asym.* **1991**, *2*, 931.
 8. Parida, S.; Dordick, J. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2253.
 9. (a) Mahmoudian, M.; Baines, B. S.; Lawrence, G. C.; *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 911; (b) Ueji, S.; Fujino, R.; Ōkubo, N.; Miyazawa, T.; Kurita, S.; Kitadani, M.; Muromatsu, A.; *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 163; (c) Bevinakatti, N. S.; Banerji, A. A.; Newadkar, R. V.; Mokashi, A. *Tetrahedron Asym.* **1992**, *3*, 1505; (d) Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C.; *Biotech. Bioeng.* **1987**, *30*, 81.
 10. (a) Parida, S.; Dordick, J. S.; *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3238; (b) Martins, J. F.; Nunes da Ponte, M.; Barreiros, S.; *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *42*, 465.
 11. Kamat, S. V.; Beckman, E. J.; Russel, A. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8845.
 12. Secundo, F.; Riva, S.; Carrea, G.; *Tetrahedron Asym.* **1992**, *3*, 267.
 13. (a) Wescott, C. R.; Klibanov, A. M.; *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1206*, 1; (b) Carrea, G.; Ottolina, G.; Riva, S.; *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 63; (c) Cipiani, A.; Cittadini, M.; Fringuelli, F.; *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7883; (d) Ranchoux, M.; Brunel, J. M.; Iacazio, G.; Bueno, G.; *Tetrahedron Asym.* **1998**, *9*, 581; (f) Forró, E.; Kanerva, L. T.; Fulop, F.; *Tetrahedron Asym.* **1998**, *9*, 513.
 14. Lemke, K.; Theil, F.; Kunath, A.; Schick, H.; *Tetrahedron Asym.* **1996**, *7*, 971.
 15. Kaminska, J.; Górnicka, I.; Sikora, M.; Góra, J.; *Tetrahedron Asym.* **1996**, *7*, 907.
 16. Wescott, C. R.; Noritomi, H.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10365.
 17. (a) Hoshino, T.; Yamane, T.; Shimizu, S.; *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 1459; (b) Hanson, M.; *Oils Fats Int.* **1990**, *5*, 29.
 18. Lawson, D. M.; Brzozowski, A. M.; Rety, S.; Verma, C.; Dodson, G. G.; *Protein Eng.* **1994**, *7*, 543.
 19. Holmquist, M.; Clausen, I. G.; Patkar, S.; Svendsen, A.; Hult, K.; *J. Protein Chem.* **1995**, *14*, 217.
 20. Klibanov, A. *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 141-144.
 21. Zaks A.; Klibanov, A. M.; *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3194-3201.
 22. Sih, C. J.; Chen, C. S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 695.
 23. (a) Chen, C. S.; Girdaukas, G.; Wu, S. H.; Sih, C. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *104*, 7294; (b) Yamamoto, K.; Nishioka, J.; Oda, Y.; Yamamoto, Y.; *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1717; (c) Bianchi, D.; Cesti, P.; Battistel, E.; *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5531.
 24. Winkler, F.K.; D'Arcy, A.; Hunziker, W.; *Nature* **1990**, *343*, 771.
 25. Bourne, Y.; Matinez, C.; Kerfelec, B.; Lombardo, D.; Chapus, C.; Cambillau, C.; *J. Mol. Biol.* **1994**, *238*, 709.
 26. Hermoso, J.; Pignol, D.; Kerfelec, B.; Crenon, I.; Chapus, C.; Fontecilla-Camps, J.; *C. J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18007.
 27. Brady, L.; Brzozowski, A. M.; Derewenda, Z. S.; Dodson, G.; Tolley, S.; Turkenburg, J. P.; Christiansen L.; Høge-Jensen, B.; Nørskov, L.; Thim, L.; Menge, U.; *Nature* **1990**, *343*, 767.
 28. Schrag, J. D.; Cygler, M.; *J. Mol. Biol.* **1993**, *230*, 575.
 29. Derewenda, U.; Swenson, L.; Green, R.; Wei, Y.; Dodson G. G.; Yamaguchi, S.; Haas, M. J.; Derewenda, Z. S.; *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 36.
 30. Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Smith, P.; Harrison, D.; Rubin, B.; Cygler, M. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12843.
 31. Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A.; *Structure* **1994**, *2*, 293
 32. Noble, M. E. M.; Cleasby, A.; Johnson, L. N.; Egmond, M. R.; Frenken, L. G. J.; *FEBS Lett.* **1993**, *331*, 123.
 33. Lang, D.; Schomburg, D.; *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 704.
 34. Kim, K. K.; Song, H. K.; Shin, D. H.; Hwang, K. Y.; Suh, S. W.; *Structure* **1997**, *5*, 173.
 35. Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R. J.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreqi, A. N.; Gupta, A. K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180.
 36. Lazló, P.; Novák, L.; *Selective Biocatalysis, A Synthetic Approach*; VHC, Weinheim, 1992.
 37. (a) Sarda, L.; Desnuelle, P.; *Biochim. Biophys. Acta* **1958**, *30*, 513; (b) Desnuelle, P.; *The Enzymes*, **1972**, *7*, 575; (c) Pieterston, W.A.; Vidal, J. C.; Volwerk, J. J.; Haas, G. H.; *Biochemistry* **1974**, *13*, 1455.
 38. (a) Verger, R.; Mieras, M. C.; Haas G. H.; *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 4023-4034; (b) Bernard, C.; Buc, J.; Piéroni, G.; *Lipids* **1996**, *31*, 261.
 39. Herschlag, D.; *Bioorg. Chem.* **1987**, *10*, 62.
 40. Sakurai, T.; Margolin, A. L.; Russel, A. J.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7236.
 41. Kanerva, L. T.; Vihanto, J.; Halme, M. H.; Lopenen, J. M.; Euranto, E.; *Acta Chem. Scand.* **1990**, *44*, 1032.
 42. Kitaguchi, H.; Itoh, I.; Ono, M.; *Chem. Lett.* **1990**, 1203.
 43. Fitzpatrick, P. A.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3166.
 44. Fitzpatrick, P. A.; Klibanov, A. M.; *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *40*, 735.
 45. Tawaki, S.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1882.
 46. Nakamura, K.; Takebe, Y.; Kitayama, T.; Ohno, A.; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4941.
 47. Nakamura, K. Kinoshita, M.; Ohno, A.; *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8799.
 48. Mustranta, A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *38*, 61.
 49. (a) Gorman, L. A.; Dordick, J. S.; *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *39*, 392; (b) Valivety, R. H.; Halling, P. J.; Macrae, A. R.; *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *118*, 218.
 50. Norin, M.; Haeffener, F.; Hult, K.; Edholm, O.; *Biophys. J.* **1994**, *67*, 584.
 51. Branden, C.; Tooze, J.; *Introduction to Protein Structure*, Garland, New York, 1991.
 52. Lundh, M.; Nordin, O.; Hendenstöm, E.; Högberg, H. E.; *Tetrahedron Asym.* **1995**, *6*, 2237.
 53. Holmquist, M.; Haeffner, F.; Norin, T.; Hult, K.; *Protein Sci.* **1996**, *5*, 83.
 54. Kinoshita, M.; Ohno, A.; *Tetrahedron* **1996**, *52*, 5397.
 55. Ollis, D. L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S. M.; Haral, M.; Remington, S. J.; Silman, I.; Schrag, J. D.; Sussman, J. L.; Verschuere, K. H.; Goldman, A.; *Protein Eng.* **1992**, *5*, 197.
 56. Schrag, J.; Cygler, M.; *Methods Enzymol.* **1997**, *284*, 85.
 57. Brzozowski, A. M.; Derewenda, U.; Derewenda, Z. S.; Dodson, G. G.; Lawson, D. M.; Turkenburg, J. P.; Bjorkling, F.; Høge-Jensen, B.; Patkar, S. A.; Thin, L.; *Nature* **1991**, *351*, 491.
 58. van Tilbeurgh, H.; Egloff M., P.; Matinez, C.; Rugani, N.; Verger, R.; Cambillau C.; *Nature* **1993**, *362*, 814.
 59. Derewenda, U.; Brzozowski, A. M.; Derewenda, Z. S.; Lawson, D. M.; *Biochemistry* **1992**, *31*, 1532.
 60. Schrag, J.; Cygler, M.; *Methods Enzymol.* **1997**, *284*, 3.

61. Wescott, C. R.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1629.
62. Tawaki, S.; Klibanov, A. M.; *Biocatalysis* **1993**, *8*, 3.
63. Terradas, F.; Teston-Henry, M.; Fitzpatrick, P. A.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 390.
64. Zandonella, G.; Haalck, L.; Spener, F.; Faber, K.; Paltauf, F.; Hermetter, A.; *Eur. J. Biochem.* **1995**, *231*, 55.
65. Peters, G. H.; Olsen, O. H.; Svendsen, A.; Wade, R. C.; *Biophys. J.* **1996**, *71*, 119.
66. Peters, G. H.; van Aalten D. M. F.; Edholm. O.; Toxvaerd, S.; Bywater, R.; *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2245.
67. Secundo, F.; Ottolina, G.; Riva; S.; Carrea, G.; *Tetrahedron Asym.* **1997**, *8*, 2167.
68. Artigo submetido para publicação.