# MODELAMIENTO DE COMPLEJOS DE MICHAELIS ENTRE LA LIPASA B DE *Candida antarctica* Y EL (*R,S*)-ATENOLOL. ANÁLISIS COMPARATIVO: AUTODOCK4.2 y VINA.

WENDY LOREING LLANOS CRUZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2016

# MODELAMIENTO DE COMPLEJOS DE MICHAELIS ENTRE LA LIPASA B DE *Candida antarctica* Y EL (*R,S*)-ATENOLOL. ANÁLISIS COMPARATIVO: AUTODOCK4.2 y VINA.

WENDY LOREING LLANOS CRUZ

Trabajo de grado presentado para optar al título de

Química

Directora
Dra. MARTHA CECILIA DAZA ESPINOSA
Bióloga

Codirector
Dr. MARKUS HANS OLIVER DOERR
Químico

Codirector
Dr. ANDRÉS MAURICIO ESCORCIA CABRERA
Químico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2016

*"No temas, porque yo estoy contigo; no desmayes, porque yo soy tu Dios que te esfuerzo; siempre te ayudaré, siempre te sustentaré con la diestra de mi justicia".*

*Isaías 41:10*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser quien me ha guiado hasta donde estoy y ha llenado mi vida de bendiciones.

A mis padres por su amor, su apoyo y comprensión en todo momento. Junto con mi familia que me han apoyado y hemos compartido hermosos momentos y risas.

A los profesores Martha Daza y Markus Doerr por la oportunidad de trabajar en el GBQT y compartir sus conocimientos en la realización de este proyecto.

Las personas llegan a nuestra vida por una razón, por una estación o para toda la vida … Y quiero agradecer a Dios por poner a personas como Gonzalo, Jhonatan, Sergio, Edison, Felipe y Jessyka en mi camino. Quizá, algunos sólo llegaron por una razón a mi vida, pero poco a poco se convirtieron en una estación y aunque puedo pasar semanas y meses sin hablar con algunos, sé que hacen parte de mi vida y puedo contar con ellos.

A Andreita por siempre estar dispuesta a escucharme y ayudarme en cualquier cosa que fuera necesaria. A mis compañeros del GBQT, por todas las ayudas brindadas para resolver mis inquietudes, y porque más que ser simples compañeros aprendimos que somos una pequeña familia que no solo se dedica a la investigación.

Y finalmente solo queda mencionar una frase que me gusta mucho: "Solo con el corazón se puede ver bien; lo esencial es invisible para los ojos” - Antoine de Saint-Exupéry. Y en la vida muchas veces nos sucede así, sin tratar de entender las cosas solo nos quedamos con lo que vemos.

## TABLA DE CONTENIDO


INTRODUCCIÓN ..... 18

1. MARCO TEÓRICO ..... 22
1.1. Estereoquímica ..... 22
1.2. Resolución cinética ..... 23
1.2.1. Resolución cinética enzimática ..... 23
1.3. Atenolol ..... 24
1.4. Lipasas ..... 24
1.5. *Candida antarctica* ..... 25
1.5.1. Lipasa B de Candida antarctica ..... 25
1.6. Complejos de Michaelis (MCCs) ..... 28
1.7. Acoplamiento molecular (Molecular Docking) ..... 29
1.7.1. AutoDock4 ..... 30
1.7.2. AutoDock Vina ..... 32
1.7.3. Similitudes y diferencias entre AutoDock4 y Vina ..... 33
1.8. Funciones de puntuación ..... 36
1.8.1. Función de puntuación de AutoDock4.2 ..... 37
1.8.2. Función de puntuación de Vina ..... 39

2. METODOLOGÍA ..... 41
2.1. Preparación de la estructura de CalB acetilada (AcCalB). ..... 41
2.2. Formación de los complejos de Michaelis entre AcCalB y el (*R,S*)-atenolol ..... 42
2.3. Selección de los MCCs ..... 43
2.4. Análisis de los MCCs entre AcCalB y el (*R,S*)-atenolol ..... 44

3. RESULTADOS ..... 46
3.1. Conformaciones de AcCalB seleccionadas ..... 46
3.2. MCCs entre la AcCalB y el (*R,S*)-atenolol ..... 47
3.3. Interacciones de contacto cercano y puentes de hidrógeno de los MCCs entre AcCalB y el (*R,S*)-atenolol. ..... 51
3.4. Modos de unión de los MCCs entre la AcCalB y el (*R,S*)-atenolol ..... 54
3.5. Comparación entre los MCCs obtenidos con las confomaciones de AcCalB en el acoplamiento con los programas AutoDock4.2 y Vina [14] ..... 55
3.5.1. Energía libre de unión y población obtenida ..... 55
3.5.2. Interacciones de contacto cercano ..... 57
3.5.3. Modos de unión de los MCCs obtenidos con AutoDock4.2 y los obtenidos con Vina ..... 59

4. CONCLUSIONES ..... 62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 63
BIBLIOGRAFÍA ..... 68
ANEXOS ..... 72

# ÍNDICE DE FIGURAS

*Figura 1. Estructura de los enantiómeros del atenolol en su forma R- (derecha) y S- (izquierda).* 18
*Figura 2. Mecanismo de las reacciones catalizadas por lipasas.* 19
*Figura 3. Sitio activo de CalB. Los residuos seleccionados en representación licorice son los residuos de la triada catalítica de CalB. La representación surf muestra los residuos con los que interacciona el sustrato: En color azul el bolsillo hidrofóbico grande. En color amarillo el bolsillo hidrofóbico mediano.* 27
*Figura 4. Mecanismo de reacción catalítico de la lipasa B de Candida antarctica.* 28
*Figura 5. Formación de los complejos de Michaelis entre CalB y el (R,S)-atenolol durante el proceso catalítico de la reacción.* 29
*Figura 6. Explicación del uso de mapa de rejillas.* 31
*Figura 7. Gráfica con el valor de RMSD para las conformaciones de enlace del ligando predichas dependiendo de la cantidad de enlaces rotables presentes en la molécula. AutoDock4 (+ rojas) y Vina (x verdes).* 35
*Figura 8. Resumen de las fracciones de predicción de los complejos con RMSD < 2Å para AutoDock4 y Vina.* 35
*Figura 9. Explicación de la evaluación de las interacciones del campo de fuerza en AutoDock4.2.* 37
*Figura 10. Puentes de hidógeno a, d, e y f (color rojo) necesarios para que la reacción de acilación catalizada por CalB se lleve a cabo.* 42
*Figura 11. Dimensiones del tamaño de caja utilizados en el acoplamiento con las conformaciones de AcCalB, Ace01 y Ace03. La de la izquierda fue la utilizada con la conformación Ace01 y a la derecha con la conformación Ace03.* 43
*Figura 12. Puentes de hidrógeno (color rojo a, b, c, d, e y f) formados en los MCCs entre acCalB y el (R,S)-propranolol.* 44
*Figura 13. Modos de unión del (R,S)-atenolol en el sitio activo de CalB. La imagen de la izquierda muestra el modo de unión I y la imagen de la derecha el modo de unión II.* 45
*Figura 14. Superposición de las conformaciones AcCalB. AcCalB representada en su estructura secundaria. Los residuos de la triada catalítica y el hueco oxianiónico en representación licorice y para las conformaciones Ace01 en azul, Ace02 en rojo y Ace03 en verde.* 46
*Figura 15. Átomos de los residuos aminoacídicos (de la tríada catalítica y el hueco oxianiónico) involucrados en la formación de los puentes de hidrógeno para llevarse a cabo la reacción catalítica para las conformaciones Ace01 en azul, Ace02 en rojo y Ace03 en verde.* 47
*Figura 16. Átomos del (R,S)-atenolol numerados para ver los átomos involucrados en los puentes de hidrógeno formados.* 51
*Figura 17. Ejemplo de las interacciones de contacto cercano (mostradas en esferas color gris) y los puentes de hidrógeno (izquierda y de color verde) formados en algunos de los MCCs entre el grupo amida del (R,S)-atenolol y los residuos Glu188 e Ile189.* 52
*Figura 18. Ejemplo de las interacciones de contacto cercano (mostradas en esferas de color gris) y los puentes de hidrógeno (izquierda y de color verde) formados en algunos de los MCCs entre el grupo hidroxilo del (R,S)-atenolol y la Sea105, His224 y Ala282.* 53
*Figura 19. Ejemplos de los modos de unión de los MCCs obtenidos para el (R)-atenolol (arriba) y para el (S)-atenolol (abajo) con las conformaciones de AcCalB, Ace01 y Ace03.* 54

*Figura 20. Ejemplo de las interacciones de contacto cercano (mostradas en esferas de color gris) y los puentes de hidrógeno (izquierda y de color verde) formados en algunos de los MCCs entre el grupo amida del (R,S)-atenolol y los residuos Glu188 e Ile189.* ..... *57*
*Figura 21. Modos de unión para los programas AutoDock4.2 (arriba) y Vina (abajo) para el (R)-atenolol. ADOR3 Y OR6 están orientados en modo de unión I y ADOR16 y OR1 se orientan en modo de unión II.* ..... *60*
*Figura 22. Modos de unión para los programas AutoDock4.2 (arriba) y Vina (abajo) para el (S)-atenolol. ADOS3 Y OS3 están en modo de unión I y ADOS10 y OS6 se ubican en modo de unión II.* ..... *61*

# ÍNDICE DE ESQUEMAS

*Esquema 1. Clasificación de los isómeros. ..... 22*

# ÍNDICE DE GRÁFICAS

*Gráfica 1. Población de los MCCs para las conformaciones Ace01 y Ace03 de AcCalB con el criterio de distancias b y c ≤ 4Å. La población del enantiómero R se muestra en color azul y del enantiómero S en color morado.* ..... *49*
*Gráfica 2. Promedio de la energía libre de unión para la población de los MCCs simulados con las diferentes conformaciones de AcCalB (Ace01 y Ace03). La población del enantiómero R se muestra en color azul y del enantiómero S en color morado.* ..... *50*
*Gráfica 3. Promedio de la energía libre de unión para la población de los MCCs obtenidos con el programa AutoDock4.2 y Vina. La población del enantiómero R se muestra en color azul y del enantiómero S en color morado.* ..... *56*
*Gráfica 4. Población de los MCCs, que cumplen con los criterios de selección con los programas de acoplamiento AutoDock4.2 y Vina. La población del enantiómero R se muestra en color azul y del enantiómero S en color morado.* ..... *57*

# ÍNDICE DE TABLAS

*Tabla 1. Valores de las distancias (Å) de los puentes de hidrógeno en las conformaciones de Ace01, Ace02 y Ace03. La distancia a (Asp187:OD2···Hsd224:HD1), la distancia d (Sea105:OE···Gln106:HN), la distancia e (Sea105:OE···Thr40:HG1) y la distancia f (Sea105:OE···Thr40:HN).* ..... *47*
*Tabla 2. MCCs entre las conformaciones Ace01 y Ace03 de AcCalB y el (R,S)-atenolol obtenidos según los criterios de selección. Entre paréntesis se indica el modo de unión del sustrato.* ..... *48*
*Tabla 3. Población de MCCs para cada criterio de selección (distancias b y c ≤ 4Å y RMSD entre 0Å a 0,5Å) para las conformaciones Ace01 y Ace03. En paréntesis se muestra el modo de unión del sustrato.* ..... *49*
*Tabla 4. Promedio y desviación estándar de los valores de la energía libre de unión (kcal/mol) para los MCCs obtenidos con las diferentes conformaciones de AcCalB y el (R,S)-atenolol.* ..... *50*
*Tabla 5. Promedio y desviación estándar de la energía libre de unión para los MCCs obtenidos con el programa AutoDock4.2 y Vina. Se muestra la población de MCCs obtenida que cumple con los criterios de selección en los dos programas. Los modos de unión se indican entre paréntesis.* ..... *55*

# ÍNDICE DE ANEXOS

*Apéndice A* ..... *73*
*Detalles computacionales - Parámetros CHARMM para la serina acetilada (SEA)* ..... *73*
*Apéndice B* ..... *77*
*Tablas complementarias a la sección de resultados.* ..... *77*
*Apéndice C* ..... *84*
*Imágenes complementarias de los MCCs obtenidos con el programa AutoDock4.2 y Vina en los diferentes modos de unión.* ..... *84*

## RESUMEN

**TÍTULO:** MODELAMIENTO DE COMPLEJOS DE MICHAELIS ENTRE LA LIPASA B DE *Candida antarctica* Y EL (*R,S*)-ATENOLOL. ANÁLISIS COMPARATIVO: AUTODOCK4.2 y VINA.*

**AUTORA** Wendy Loreing Llanos Cruz**

**PALABRAS CLAVES:** Lipasa B de *Candida antarctica*, Atenolol, AutoDock4.2, Acoplamiento molecular.

**DESCRIPCIÓN:** El acoplamiento molecular (Molecular Docking) se puede utilizar para analizar detalles de los mecanismos de reacción catalizados por enzimas. En el Grupo de Bioquímica Teórica, el acoplamiento molecular se ha utilizado para el estudio de los complejos entre la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) y el propranolol. Este aminoalcohol se usa como medicamento contra la hipertensión y se vende como mezcla racémica. Uno de los dos isómeros presenta efectos colaterales. De ahí la importancia de contribuir a comprender el mecanismo de la acilación de los enantiómeros de aminoalcoholes catalizado por CalB. En este trabajo de grado para optar al título de Química se realizó un estudio comparativo de los complejos entre CalB y el (*R,S*)-atenolol obtenidos utilizando los programas AutoDock4.2 y Vina. El (*R,S*)-atenolol es otro aminoalcohol utilizado como antihipertensivo. Los complejos de Michaelis entre CalB y el (*R,S*)-atenolol se modelaron utilizando un enfoque rígido. Para el análisis se tuvo en cuenta la población de complejos de Michaelis obtenida con cada programa, la energía libre de unión, los modos de unión del (*R,S*)-atenolol en el sitio activo de CalB y las interacciones no covalentes entre el sustrato y la enzima. Los resultados de este estudio indican que los complejos de Michaelis (MCCs) obtenidos con Vina tienen una energía libre de unión mayor que los obtenidos con AutoDock4.2. Con ambos programas se obtiene un número de MCCs similar y dos tipos de modos de unión del atenolol en el sitio activo de CalB. Esto permite concluir que tanto Autodock4.2 como Vina pueden utilizarse de manera indistinta para predecir la formación de complejos de Michaelis entre la lipasa B de *Candida antarctica* y los aminoalcoholes (*R,S*)-atenolol y (*R,S*)-propranol.


---

* Trabajo de grado

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directores: Martha Daza, Markus Doerr, Andrés Escorcia.

## ABSTRACT

**TITLE:** MODELING OF MICHAELIS COMPLEXES BETWEEN *Candida antarctica* LIPASE B AND (*R,S*)-ATENOLOL. COMPARATIVE ANALYSIS: AUTODOCK4.2 AND VINA.*

**AUTHOR:** Wendy Loreing Llanos Cruz**

**KEYWORDS:** *Candida antarctica* lipase B, Atenolol, Autodock4.2, molecular docking.

**DESCRIPTION:** Molecular docking can be used to analyze details of the reaction mechanisms catalyzed by enzymes. In the Grupo de Bioquímica Teórica, molecular docking has been used for the study of the complexes between *Candida antarctica* lipase B (CalB) and propranolol. This amino alcohol is used to treat hypertension and is sold as a racemic mixture. One of the two isomers present side effects. Hence the importance of contributing to understand the mechanism of the acylation of this amino alcohol catalyzed by CalB. (*R,S*)-atenolol is another amino alcohol used as an antihypertensive drug. In this work a comparative study of the Michaelis complexes between atenolol and CalB was performed using two different molecular docking programs: AutoDock4.2 and AutoDock Vina. Using molecular docking, the Michaelis complexes (MCCs) between atenolol and CalB have been investigated employing a completely rigid protein. The populations of MCCs, the free binding energy, the binding modes of (*R,S*)-atenolol in the active site of CalB and non-covalent interactions of the MCCs have been analyzed. The results indicate that the MCCs obtained with the Vina program are binding more strongly than MCCs obtained with AutoDock4.2 program. The populations of MCCs obtained with both programs are very similar and two binding modes of atenolol in the active site of CalB are obtained with AutoDock4.2 and Vina. These results suggest that AutoDock4.2 and Vina can be used interchangeably to predict the MCCs between CalB and the (*R,S*)-atenolol.


---

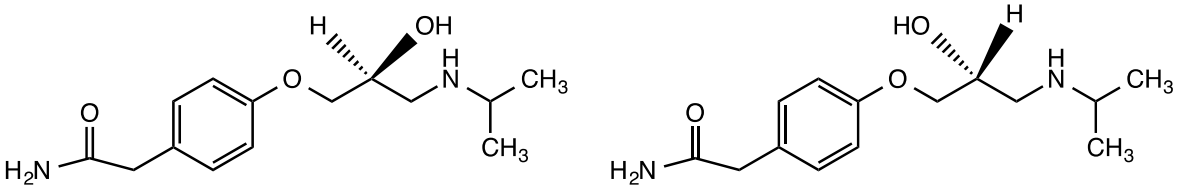
* Bachelor Thesis.


** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directores: Martha Daza, Markus Doerr, Andrés Escorcia.

## INTRODUCCIÓN

El atenolol (Figura 1) es un fármaco β-bloqueante utilizado en tratamientos de enfermedades cardiacas y de hipertensión [1, 2]. Normalmente se comercializa en forma de mezcla racémica. Al enantiómero *S*-atenolol se le atribuye la acción terapéutica, mientras que el enantiómero *R*-atenolol presenta efectos no deseados[2].

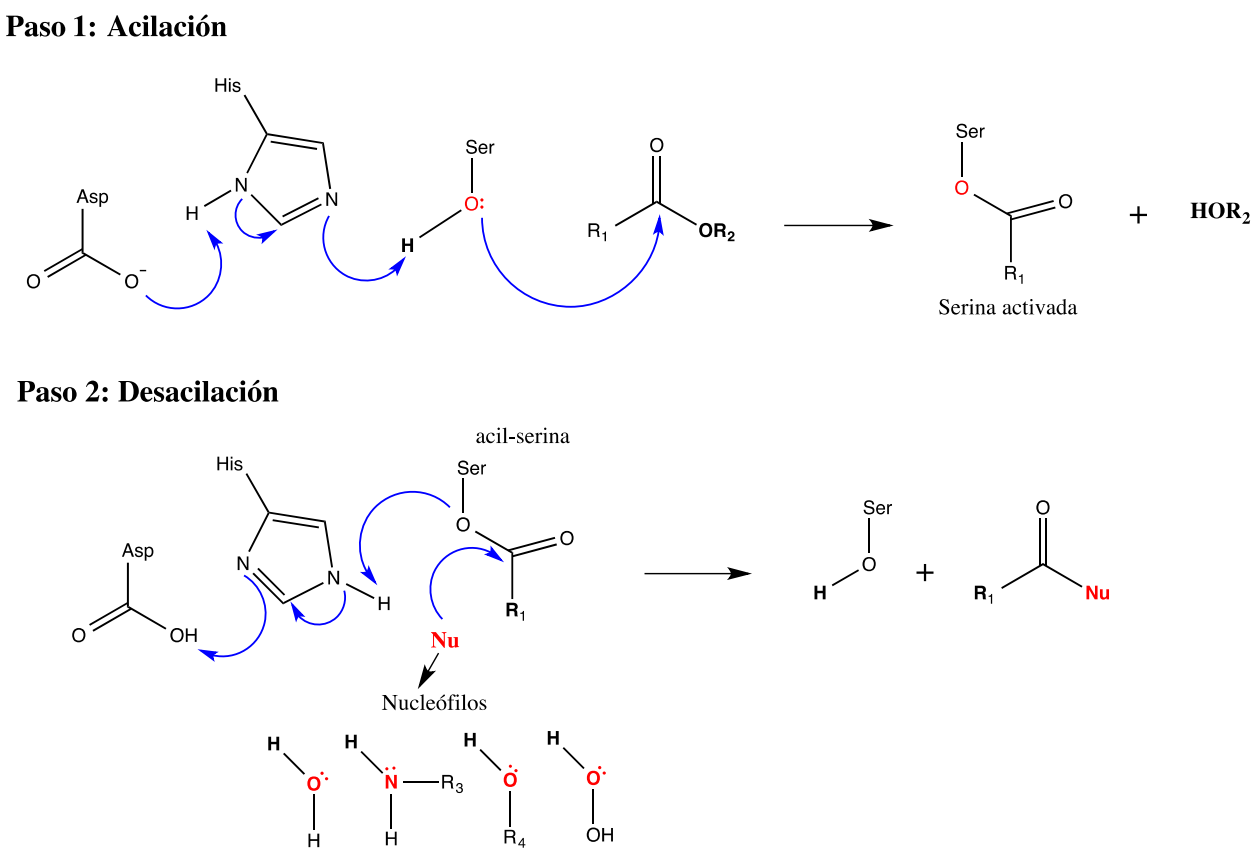
Figura 1. Estructura de los enantiómeros del atenolol en su forma *R*- (derecha) y *S*- (izquierda).




Un método para resolver racematos es la resolución cinética enzimática utilizando lipasas. Las enzimas son catalizadores quirales y pueden distinguir los enantiómeros de una mezcla racémica [3]. Las lipasas son enzimas enantio-, quimio- y regioselectivas [4] en medios acuosos y en solventes orgánicos [5]. Las lipasas son catalizadores estereoselectivos eficientes en la resolución cinética de muchos compuestos quirales [6].

De acuerdo al mecanismo catalítico propuesto para las lipasas [5], la reacción consta de dos pasos (ver Figura 2). El primer paso es una acilación y el segundo paso es una desacilación. En el primer paso de la reacción un donador acilo realiza la acilación de la enzima. Luego de que la enzima ha sido acilada, ésta transfiere su grupo acilo a un nucleófilo, ya sea agua, un alcohol, una amina, un amino alcohol o un epóxido, dando como productos la regeneración de la enzima mediante su desacilación, y la obtención del producto acilado. Los aminoácidos que conforman la triada catalítica son Serina, Aspartato o Glutamato e Histidina. La reacción tiene lugar por medio de Complejos de Michaelis (conformaciones enzima-sustrato no covalentes en los que el sustrato se estabiliza en el sitio activo de la enzima, MCC) e intermediarios tetraédricos (ver Figura 4) hasta completar la reacción.

Figura 2. Mecanismo de las reacciones catalizadas por lipasas.




Tomado de referencia 5 con modificaciones hechas por la autora.

Para mejorar la comprensión del proceso de la resolución cinética a nivel atómico se puede utilizar el modelado molecular. El modelado molecular se utiliza con frecuencia para racionalizar los resultados experimentales y provee información sobre la geometría y la energía de interacción entre el catalizador y los enantiómeros que puede ser útil para el diseño de nuevos catalizadores [7]. El modelado molecular se ha convertido en una herramienta útil para mejorar la comprensión de las reacciones catalizadas por lipasas [8, 9], dando una idea de éstas en detalles que no son accesibles experimentalmente.

La lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) ha sido utilizada exitosamente para resolver mezclas racémicas de alcoholes secundarios o aminas secundarias. La combinación de la cinética enzimática con el modelado molecular, se ha utilizado

para construir un modelo de cómo los enantiómeros de alcoholes secundarios se unen al sitio activo de ésta enzima durante las reacciones de transesterificación [10] permitiendo encontrar de este modo estructuras que son la base para una investigación más detallada de la información.

Los métodos de modelado molecular son herramientas valiosas para obtener información sobre la geometría y la energía de interacción de los complejos enzima-sustrato. Con el fin de comprender los posibles mecanismos de reconocimiento quiral de algunos racematos se han realizado estudios de acoplamiento molecular (Molecular Docking). Esta técnica permite obtener los parámetros estructurales y la energía de interacción entre los complejos enzima-sustrato. Además, puede proporcionar información valiosa para explicar la selectividad enantiomérica de una enzima [7] aunque es necesario llevar a cabo un estudio completo de la reacción porque solo con el acoplamiento molecular no es suficiente.

Hay varios programas de acoplamiento molecular. A manera de ejemplo se mencionan: DOCK, SYBYL, AutoDock, AutoDock Vina, y GRAMM [11]. Algunos de éstos tienen licencias libres y otros son altamente costosos. Dos paquetes computacionales con software libre son AutoDock4 y AutoDock Vina (más conocido como Vina). AutoDock Vina es más rápido que AutoDock4 y mejora significativamente la precisión de la predicción de los modos de unión. Su velocidad es mejorada por paralelismo, ya que puede utilizar multihilos en máquinas de varios núcleos. Además, Vina calcula automáticamente los mapas de red y los resultados son agrupados sin que el usuario vea todo el proceso [12].

En el Grupo de Bioquímica Teórica de la UIS se ha estudiado la reacción de acilación del (*R,S*)-propranolol [8, 13] y el (*R,S*)-atenolol [14] con CalB utilizando dinámica molecular y métodos híbridos de mecánica molecular y mecánica cuántica (QM/MM) para comprender el mecanismo de enantioselectividad que tiene CalB por estos aminoalcoholes.

Los diferentes estudios de acoplamiento molecular que se han llevado a cabo, se han realizado con el programa Vina para modelar los MCCs. Con el ánimo de estudiar qué tanto dependen los resultados de los detalles del acoplamiento con cada programa (AutoDock4.2 y Vina) se propuso estudiar la reacción de acilación del (*R,S*)-atenolol catalizada por CalB con el programa AutoDock4.2 debido a que ya se estudió con el programa Vina y analizar si los resultados son muy diferentes entre ellos.

Para lograr esto, se modelaron los MMCs ente la enzima CalB y el (*R,S*)-atenolol utilizando el programa AutoDock4.2. Se utilizó un planteamiento análogo al planteamiento utilizado en el trabajo realizado con el programa Vina [14] para la reacción. Tanto la CalB como el (*R,S*)-atenolol recibieron un tratamiento rígido. Se analizó la población de MCCs obtenidos, la energía libre de unión, las interacciones entre el sustrato y el sitio activo de la enzima y los modos de unión del (*R,S*)-atenolol en el sitio activo de CalB. Finalmente se realizó un análisis comparativo de los resultados obtenidos con el programa AutoDock4.2 y los resultados reportados para el programa Vina realizado en un trabajo previo en el GBQT [14].

El contenido del libro se encuentra distribuido en 4 secciones. La primera sección corresponde a los conceptos importantes para comprender el desarrollo del trabajo de investigación. La segunda explica la metodología utilizada para llevar a cabo el acoplamiento molecular y la selección de los MCCs. La tercera el análisis y la discusión de los resultados obtenidos. Y por último, las conclusiones del trabajo. El trabajo cuenta con tres apéndices (Apéndice A, Apéndice B y Apéndice C) en los que se provee información complementaria de la metodología llevada a cabo, de los resultados obtenidos y de las imágenes de los MCCs obtenidos.

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en el III Congreso Colombiano de Biología Computacional y Bioinformática, Septiembre 16-18, Medellín, Colombia, 2015.

Loreing Llanos C., Martha C. Daza, Markus Doerr, Andrés M. Escorcia. "Modelamiento de complejos de Michaelis entre la lipasa B de *Candida antarctica* y el (*R,S*)-atenolol. Análisis comparativo: AutoDock4.2 vs Vina". III Congreso Colombiano de Biología Computacional y Bioinformática, Septiembre 16-18, Medellín, Colombia, 2015.

También se presentaron resultados en el I Encuentro Científico de la Facultad de Ciencias, Noviembre 25-26, Bucaramanga, Colombia, 2015.

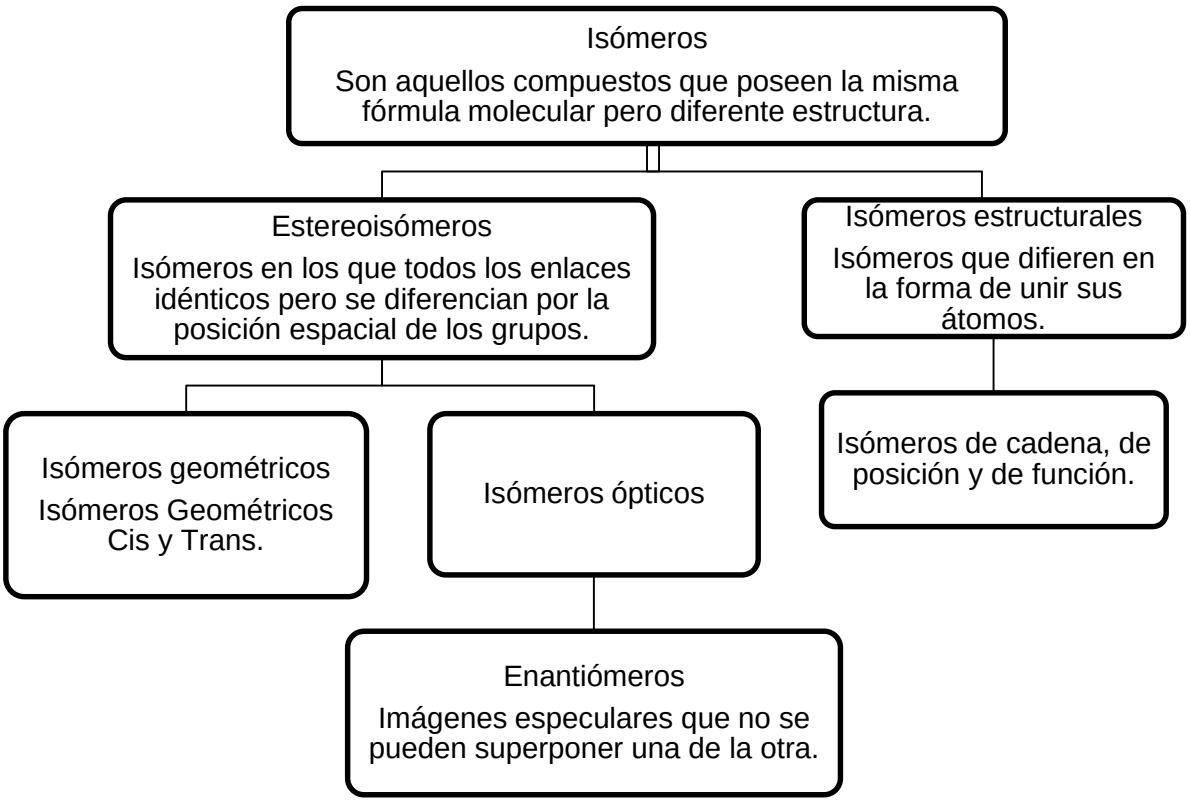
Loreing Llanos C., Andrés M. Escorcia, Markus Doerr, Martha C. Daza. "Modelamiento de complejos de Michaelis entre la lipasa B de *Candida antarctica* y el (*R,S*)-atenolol. Análisis comparativo: AutoDock4.2 y Vina". I Encuentro Científico de la Facultad de Ciencias, Noviembre 25-26, Bucaramanga, Colombia, 2015.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1. Estereoquímica

La estereoquímica es la rama de la química que estudia la estructura de los compuestos [15]. Es el estudio de los isómeros (Esquema 1).

Esquema 1. Clasificación de los isómeros.




Los enantiómeros poseen un átomo de carbono unido a cuatro grupos distintos llamado carbono asimétrico o quiral. Se diferencian porque uno de los enantiómeros produce rotación de la luz polarizada a la derecha (dextrógiro) y el otro a la izquierda (levógiro). Una forma de separar los enantiómeros es transformar la mezcla de enantiómeros en mezcla de diastereoisómeros por adición de un reactivo quiral y así ya es posible separarlos por métodos físicos [16]. Cuando una mezcla contiene cantidades iguales de un enantiómero, ésta se denomina mezcla racémica. Son necesarias algunas técnicas para separar dichas mezclas tales como cristalización

preferencial, resolución cinética, cristalización de derivados diastereoméricos [17].

## 1.2. Resolución cinética

La separación de racematos por resolución cinética se basa en la diferencia de velocidad con la que reaccionan los enantiómeros del racemato con un reactivo quiral o en un entorno quiral. En estas condiciones los estados de transición tienen diferente energía de modo que una reacción es más rápida que la otra [17]. Los dos enantiómeros reaccionan a diferentes velocidades con una entidad quiral. La entidad quiral debe estar presente en cantidades catalíticas, y puede ser un biocatalizador (enzima libre o microorganismos) o un quimiocatalizador (ácido o base quiral o incluso un complejo quiral de un metal). Idealmente un enantiómero reacciona mucho más rápido que el otro [18].

### 1.2.1. Resolución cinética enzimática

El uso de enzimas con el propósito de transformar compuestos de interés presenta numerosas ventajas ya que las reacciones catalizadas por enzimas tienen lugar en condiciones suaves y proporcionan los productos con excelente estereoselectividad [17]. La resolución cinética puede llegar a proporcionar más del 50% de rendimiento si de combina con un proceso dinámico de equilibración de ambos enantiómeros basado en la hidrólisis enantioselectiva de una mezcla racémica en equilibrio en el medio básico de reacción [17].

Las enzimas aumentan la velocidad de las reacciones químicas combinándose transitoriamente con los reactivos, de manera que éstos alcanzan un estado de transición con una energía de activación menor que la de la reacción no catalizada. La actividad catalítica está restringida a una zona de la molécula llamada sitio activo. La interacción enzima-sustrato se realiza a través de enlaces de naturaleza débil (interacciones no covalentes) entre la molécula del sustrato y el sitio activo [19].

Muchas reacciones enzimáticas siguen un patrón de comportamiento cinético conocido como la cinética de Michaelis-Menten [19, 20]. Los catalizadores enzimáticos requieren que el sustrato se una de forma no-covalente a la enzima en el sitio activo de la enzima. El complejo enzima-sustrato formado, ES, es llamado el complejo de Michaelis-Menten y la constante de Michaelis-Menten, $K_M$, es igual a la

concentración del sustrato a la cual la velocidad de reacción es un medio de su máximo valor [20].

### 1.3. Atenolol

El atenolol, ((±)-2-[4-[2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi]fenil]etanamida), (Figura 1) es un bloqueante de los receptores β-adrenérgicos en el corazón. Se usa en el tratamiento de hipertensión, taquicardia sinusal, arritmias, enfermedades coronarias del corazón, ataques cardíacos. El enantiómero (*S*) posee mucha mayor afinidad para los receptores β-adrenérgicos que el enantiómero (*R*) [21, 22]. Los bloqueadores β-adrenérgicos se comercializan en forma de mezcla racémica, la actividad de éstos generalmente es asociada con el enantiómero (*S*) mientras que el enantiómero (*R*) carece de actividad y puede ser responsable de efectos indeseados [2]. Por este motivo hay una urgente necesidad en desarrollar un método rápido y selectivo para su resolución enantiomérica [21, 22].

### 1.4. Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas que hidrolizan a los triglicéridos en una interfaz lípido-agua. La actividad de las lipasas se incrementa dramáticamente tras la unión a la superficie de lípidos debido a un cambio conformacional de la enzima. Las lipasas han mostrado una amplia variación en la eficiencia y la especificidad por el sustrato. Las lipasas tienen especificidades diferentes dependiendo de la longitud de los ácidos grasos presentes en los triglicéridos [23].

Algunas lipasas presentan un lid o tapa que controla el acceso al sitio activo de la proteína. Cuando hay un sustrato presente, éste lid se abre y permite la activación de la lipasa mientras que sin sustrato, la enzima es inactiva. La lipasa B de *Candida antarctica* por ejemplo, no presenta activación interfacial y se dice que esto es debido a que esta enzima carece del lid que regula el acceso al sitio activo [5, 23, 24].

Las lipasas tienen un gran potencial en aplicaciones industriales como aditivos para detergentes en polvo, en la producción de aceites y grasas y para su uso en otro tipo de síntesis orgánica. También han demostrado ser catalizadores estereoselectivos eficientes en la resolución cinética de una variedad de

compuestos quirales. Reaccionan selectivamente con uno de los dos enantiómeros de los alcoholes secundarios [6].

## 1.5. *Candida antarctica*

La levadura *Candida antarctica* exhibe una actividad de lipasa no específica hacia los triglicéridos. Se han aislado de esta levadura dos lipasas denominadas A y B con diferentes puntos isoeléctricos (pI) y pesos moleculares. La lipasa B tiene un peso molecular de 33 kDa y un pI de 6,0. Esta enzima ha demostrado ser una enzima muy estereoespecífica tanto en la hidrólisis y en la síntesis orgánica y tiene una aplicación potencialmente importante en la síntesis de glucolípidos [23].

### 1.5.1. Lipasa B de *Candida antarctica*

La lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) se compone de 317 aminoácidos con un peso fórmula de 33273 Da. La secuencia de aminoácidos no muestra ninguna homología significativa con otras lipasas. Es una proteína α/β globular con dimensiones aproximadas de 30Å x 40Å x 50Å. En la estructura hay 10 α-hélices, la hoja β central está compuesta de siete hilos de los cuales los últimos seis son paralelos. La triada catalítica de CalB se compone de Ser105, His224 y Asp187 [23].

El sitio activo de CalB está constituido por los residuos Asp187, His224 y Ser105. La His224 se encuentra localizada de tal manera que su cadena lateral queda expuesta en el sitio activo justo en medio de Asp187 y Ser105 en la proteína silvestre. El entorno de Ser105 presenta una naturaleza polar: además de His224 se encuentra Thr40, Gln106, Asp134 y Gln157. Común a todas las lipasas es la tríada catalítica de aspartato, histidina y serina y su mecanismo de reacción es similar al de las proteasas de serina [6, 23]. La CalB tiene una gran superficie hidrofóbica que rodea la entrada del canal del sitio activo. El sitio activo consiste en un embudo elíptico y delgado con paredes constituidas predominantemente por residuos aminoacídicos hidrofóbicos alifáticos [6, 21].

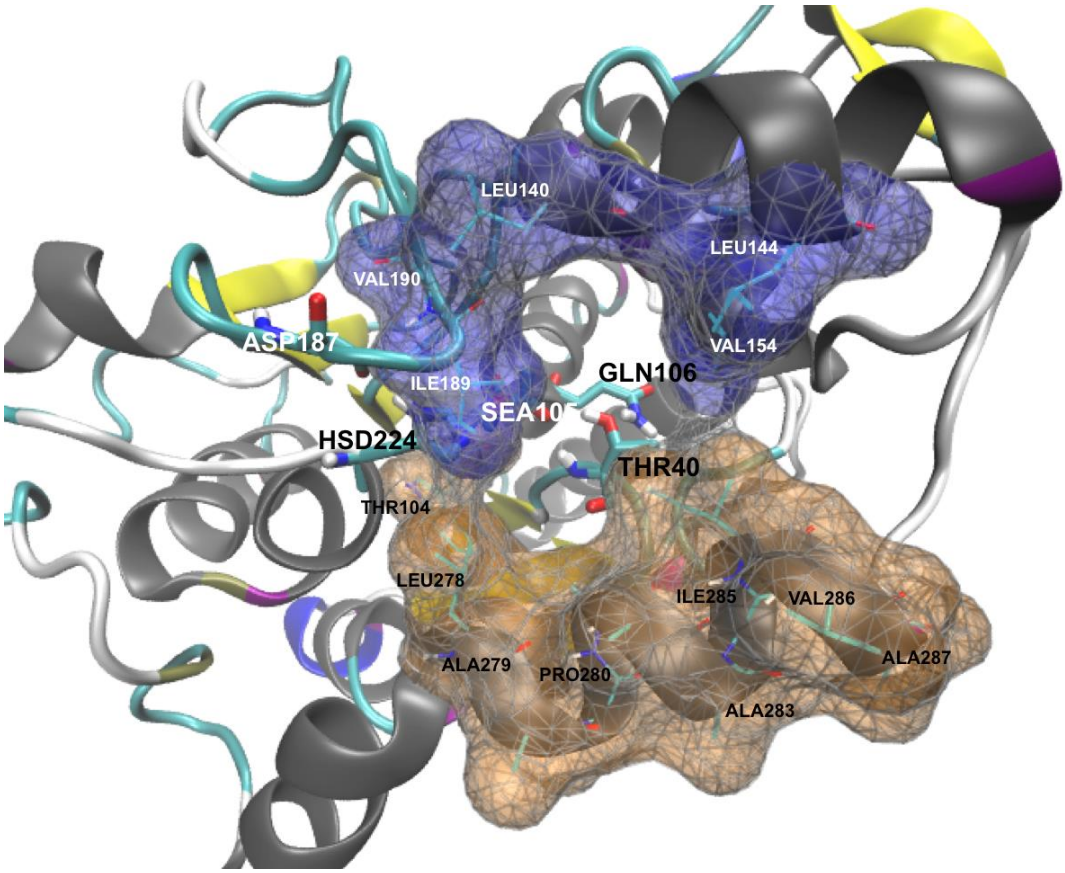
### 1.5.1.1. Características del sitio activo de CalB

La lipasa B de *Candida antarctica* ha sido usada exitosamente para resolver alcoholes secundarios y aminas secundarias [25]. La combinación de la cinética enzimática y modelado molecular se utilizó para construir un modelo de cómo los enantiómeros de alcoholes secundarios se unen en el sitio activo de esta enzima durante las reacciones de transesterificación. Los dos enantiómeros de los alcoholes secundarios se muestran en dos orientaciones diferentes en el sitio activo. Todos los enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis están presentes. La enantioselectividad depende de la diferencia de energía entre los MCCs y los estados de transición que se forman entre el enantiómero y la enzima [10].

En la Figura 3 se muestra que el sitio activo de CalB está formado por los residuos de Ser105, His224 y Asp187 que haen parte de la tríada catalítica, el hueco oxianiónico formado por los residuos Thr140 y Gln106, un bolsillo hidrofóbco grande ubicado por encima de la tríada catalítica formado por los residuos Ile189, Val190, Val154, Leu140, Leu144, Asp134 y Gln157, y un bolsillo hidrofóbico mediano ubicado por debajo de la tríada catalítica formado por los residuos Trp104, Leu278 – Ala287 [13].

De acuerdo a la ubicación del grupo feniletanamida del atenolol dentro del sitio activo de CalB se consideran dos modos de unión: Modo I y Modo II [8]. En el modo de unión I la cadena feniletanamida del (*R,S*)-atenolol se ubica en el bolsillo hidrofóbico grande mientras su cadena isopropilamino se ubica en el bolsillo hidrofóbico mediano. En el modo de unión II la cadena feniletanamida del (*R,S*)-atenolol se ubica en el bolsillo hidrofóbico mediano y la cadena isopropilamino en el bolsillo hidrofóbico grande.

Figura 3. Sitio activo de CalB. Los residuos seleccionados en representación *licorice* son los residuos de la triada catalítica de CalB. La representación *surf* muestra los residuos con los que interacciona el sustrato: En color azul el bolsillo hidrofóbico grande. En color amarillo el bolsillo hidrofóbico mediano.

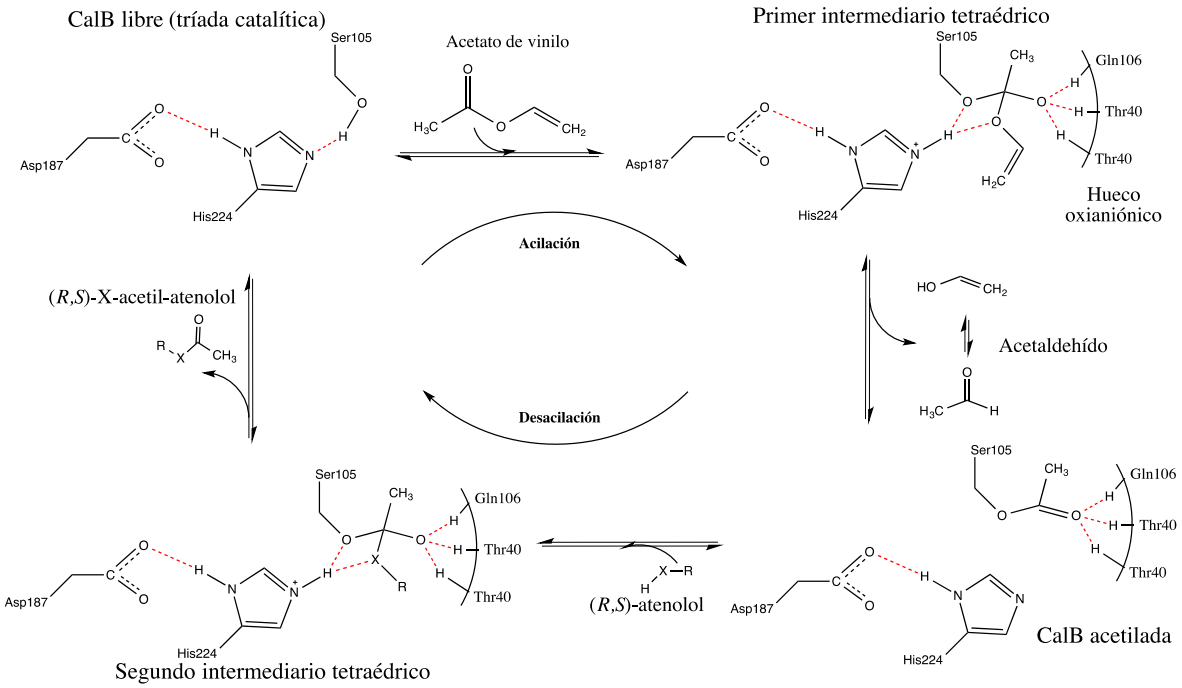



### 1.5.1.2. Mecanismo de reacción

El mecanismo de reacción es basado en dos etapas, la acilación y desacilación del residuo de Ser105 e involucra dos intermediarios tetraédricos (Figura 4). El primer intermediario tetraédrico es el resultado de un ataque nucleofílico del acetato de vinilo sobre la Ser105 originando el complejo acil-enzima. Este intermediario tetraédrico se estabiliza por medio de la formación de puentes de hidrógeno con los residuos del hueco oxianiónico. En esta primera parte de la reacción se obtiene la enzima acilada. El segundo intermediario tetraédrico se deriva del ataque nucleofílico del (*R,S*)-atenolol sobre el acil-enzima permitiendo la liberación del producto éster, (*R,S*)-*O*-acetil-atenolol, y de la enzima libre (CalB), este segundo

intermediario tetraédrico, también es estabilizado por la formación de puentes de hidrógeno con los residuos del hueco oxianiónico [5, 8, 9].

Figura 4. Mecanismo de reacción catalítico de la lipasa B de *Candida antarctica.*




## 1.6. Complejos de Michaelis (MCCs)

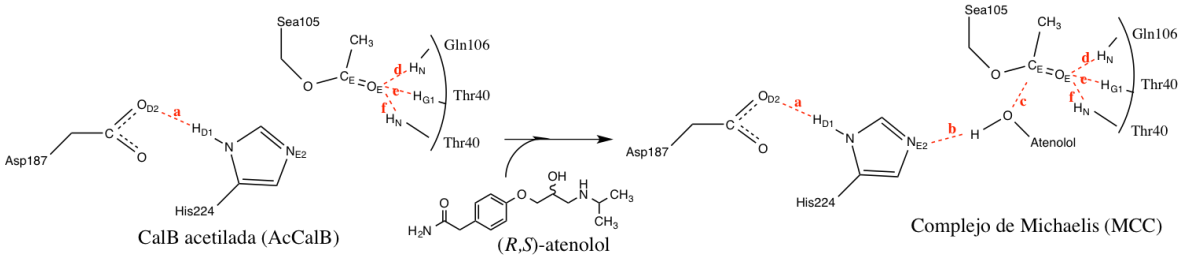
La primera etapa de las reacciones catalizadas por enzimas es la formación de un complejo entre el sustrato y el sitio activo de la enzima [26, 27]. Este complejo recibe el nombre de complejo enzima-sustrato o complejo de Michaelis. Los complejos de Michaelis se pueden considerar como una etapa de la reacción en la que el sustrato es estabilizado por puentes de hidrógeno [28]. La ecuación general para la formación de complejos enzima-sustrato es:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \overset{k_2}{\rightarrow} E + P$$

Dónde: (E) enzima, (S) sustrato y (ES) complejo enzima-sustrato y (P) producto, $k_1$: constante de velocidad de formación, $k_{-1}$: constante de disociación del complejo enzima-sustrato y $k_2$: constante de la velocidad de conversión de la E a P [26].

En el paso de desacilación de una reacción catalizada por lipasas, es que tienen lugar la formación de los MCCs. Éstos son formados entre la AcCalB y el (*R,S*)-atenolol como se muestra en la Figura 5. Las distancias mostradas en rojo (a-f) son las distancias interatómicas más importantes para el proceso catalítico. Se muestran en líneas punteadas porque son los nuevos enlaces que se forman al formarse el MCCs y continuar la reacción.

Figura 5. Formación de los complejos de Michaelis entre CalB y el (*R,S*)-atenolol durante el proceso catalítico de la reacción.




## 1.7. Acoplamiento molecular (Molecular Docking)

El acoplamiento molecular es un procedimiento computacional que intenta predecir de manera eficiente la unión no covalente de macromoléculas o, con mayor frecuencia, de una macromolécula (receptor) y una molécula pequeña (ligando), comenzando con sus estructuras no enlazadas, estructuras obtenidas a partir de simulaciones de dinámica molecular o modelado por homología. El objetivo es predecir las conformaciones de enlace y la afinidad de enlace [12, 29]. El acoplamiento molecular combina algoritmos de búsqueda y funciones de puntuación para la búsqueda de los complejos formados entre la proteína y el ligando. La idea del acoplamiento es generar un conjunto de conformaciones (MCCs) y clasificarlas de acuerdo a su estabilidad. El procedimiento en general es: generar una pose (cada pose es una posición, estructura y orientación del ligando en el sitio activo), puntuarla y compararla con las demás poses de modo que es aceptada o rechazada de acuerdo a la puntuación que obtenga [30, 31].

La mayoría de algoritmos de búsqueda, empleados en el acoplamiento molecular, son capaces de generar un gran número de estructuras posibles (MCCs) y requieren de un medio (una función de puntuación) para puntuar cada estructura y así identificar las de mayor interés. Un problema con el acoplamiento molecular implica muchos grados de libertad: hay seis grados de libertad traslacional y rotacional por cada molécula, y han sido desarrollados varios algoritmos para abordar este problema. Los algoritmos sencillos tratan la proteína y el ligando como cuerpos rígidos y exploran solo los seis grados de libertad traslacional y rotacional [31, 32].

El acoplamiento molecular ideal debería permitir al ligando y la proteína ser tratados como cuerpos flexibles. Una forma para incorporar la flexibilidad del sitio de unión es por medio de una simulación de dinámica molecular del complejo receptor-ligando, pero estos métodos solo son útiles para refinar las estructuras mediante otros métodos de acoplamiento. Otra forma de incorporar la flexibilidad de la proteína (al menos algunas cadenas laterales de los aminoácidos) pero esos métodos toman más tiempo que hacer el acomplamiento con la proteína en forma rígida [31].

Los programas de acoplamiento molecular generalmente utilizan una función de puntuación que puede ser vista como un intento de aproximar los potenciales químicos estándar del sistema [12]. Existen varios programas de acoplamiento molecular entre los cuales se pueden mencionar: DOCK, SYBYL, AutoDock, AutoDock Vina y GRAMM [11]. Dos paquetes computacionales con software libre son AutoDock y AutoDock Vina [12, 33].

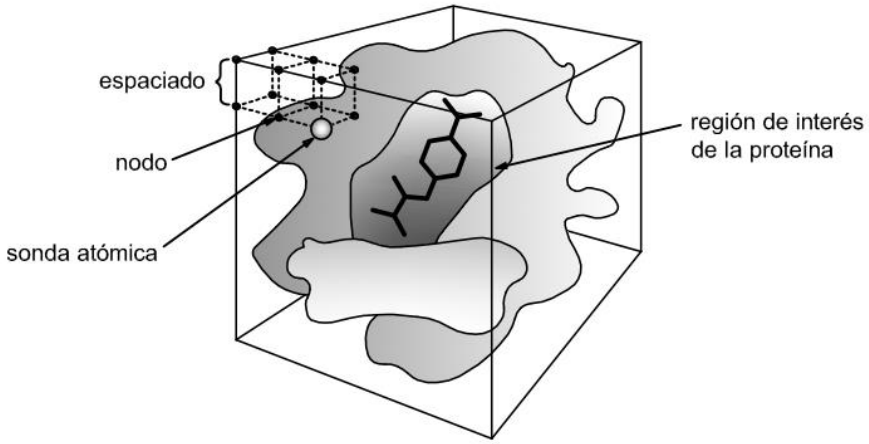
### 1.7.1. AutoDock4

AutoDock combina un campo de fuerza empírico de energía libre con un algortimo genético Lamarckiano para proveer una predicción de las conformaciones de enlace (MCCs) con sus energías libres de unión [34,35]. Se han ido desarrollando varias versiones que han incluido mejoras en el programa.

AutoDock4 utiliza algoritmos genéticos para buscar los MCCs y los resultados del acoplamiento se dan como estimaciones de la variación de energía libre tras la unión del ligando al receptor y como una predicción de conformación tridimensional de un complejo ligando-receptor. AutoDock4 requiere mayor tiempo de cálculo que otros programas de acoplamiento molecular [29].

Para realizar la búsqueda en el espacio conformacional disponible de un ligando en una enzima, AutoDock usa un método basado en rejillas(grids) para facilitar la evaluación de la energía libre de enlace de las conformaciones de prueba [35]. Estas rejillas contienen el espacio de búsqueda en el sitio activo calculando la energía de enlace entre la proteína y un átomo sonda, ver Figura 6. Este valor es guardado en unas tablas que contienen el resultado de la puntuación de cada nodo de la rejilla. Las rejillas son calculadas para cada tipo de átomo del ligando [30, 35].

Figura 6. Explicación del uso de mapa de rejillas.




Tomado de referencia 30.

El método de búsqueda de AutoDock4.2 es por medio de un algoritmo genético Lamarckiano [34], el cual crea una población de conformaciones de prueba y en las siguientes generaciones esas conformaciones individuales mutan, cambiando sus parámetros conformacionales y compitiendo entre ellos de modo que al final se seleccionan los individuos con las energías libre de enlace más bajas. Éste algoritmo permite que con una estructura ya encontrada se busquen otras conformaciones cercanas a esta estructura de una forma local pero de manera aleatoria y de ese modo la información pasa a las generaciones de conformaciones siguientes hasta encontrar su mínimo local [35].

AutoDock4 utiliza un campo de fuerza semiempírico de energía libre para predecir la energía libre de unión entre moléculas pequeñas y macromoléculas. El campo de fuerza se basa en un modelo termodinámico que permite la incorporación de energías intramoleculares en la predicción de la energía libre de enlace. Esto se

realiza mediante la evaluación de la energía para los estados enlazados y no enlazados. También incorpora un método de desolvatación que incluye términos para todos los tipos de átomos. El campo de fuerza fue calibrado con un conjunto de 188 complejos proteínas-ligando de estructura y energía de enlace conocida mostrando un error estándar de 2-3 kcal/mol en la predicción de la energía libre de unión [35, 36].

AutoDock4 permite el modelado flexible de secciones específicas de la proteína así como el ligando es tratado de una forma flexible en el acoplamiento. Los usuarios seleccionan cadenas laterales específicas y durante el acoplamiento, estas cadenas son tratadas explícitamente permitiendo la rotación alrededor de los enlaces utilizando el mismo método para explorar el espacio conformacional del ligando flexible [35], el resto de la proteína se sigue considerando de forma rígida [37].

Las conformaciones (MCCs) encontradas con el programa AutoDock4.2 se agrupan de acuerdo a un criterio de semejanza (RMSD), es decir, de acuerdo a la orientación del ligando en el sitio activo (pose) y a la energía libre de unión de cada uno. Cada cluster presenta su conformación más estable que no siempre es la que cumple todos los criterios requeridos para continuar con la reacción [33, 38, 39].

### 1.7.2. AutoDock Vina

Vina es un programa para acoplamiento molecular, diseñado para ser compatible con los formatos de archivo de AutoDock4. Vina utiliza un algoritmo de búsqueda iterado diferente con un método de optimización de su función de puntuación basada en el gradiente de la misma, en su procedimiento de optimización local [40].

Vina usa un método de optimización de la función de puntuación empírica basado en la derivada de las coordenadas espaciales de los átomos en su procedimiento de optimización para localizar un mínimo, el cálculo del gradiente da al algoritmo de optimización un sentido de dirección a partir de una evaluación individual. Vina puede acelerar el acoplamiento molecular mediante el aprovechamiento de múltiples CPUs o núcleos [12, 41].

Vina realiza una búsqueda aleatoria del espacio conformacional, optimiza la estructura encontrada con el gradiente de la función de puntuación y encuentra sus

mínimos locales. Vina utiliza un algoritmo de búsqueda de Monte Carlo para el acoplamiento proteína-ligando. En cada iteración, la conformación interna del ligando es cambiada (debido a la rotación de un enlace o a que el ligando es aleatoriamente trasladado o rotado en el sitio activo) generarando una nueva configuración. La nueva configuración es aceptada si su energía libre de enlace es menor que la de su predecesor y por medio de enfriamiento simulado (simmulated annealing) se busca la conformación de más baja energía [42, 43].

### 1.7.3. Similitudes y diferencias entre AutoDock4 y Vina

Vina fue diseñado para ser compatible con el formato de archivos de entrada para AutoDock4. Tanto Vina como AutoDock4 requieren una especificación del espacio de búsqueda en el que se va a realizar el acoplamiento. AutoDock4 requiere escoger manualmente el tipo de átomos para el mapa de red calculando los archivos con AutoGrid, elegir los parámetros de búsqueda y la agrupación de los resultados después del acoplamiento. Vina por el contrario calcula su propio mapa de red rápida y automáticamente, agrupa y clasifica los resultados sin exponer al usuario los detalles intermediarios [12].

Para comparar la exactitud de las predicciones de las estructuras experimentales se usó una medida de distancia entre las estructuras experimentales y predichas tomando en cuenta la simetría. Teniendo un conjunto de 199 complejos proteína-ligando de los que se conoce su estructura cristalográfica y tienen un número de enlaces rotables entre 0 y 32 se realizó un acoplamiento molecular con los programas AutoDock4.0.1 y Vina. Las predicciones de las estructuras son mejoradas con Vina. Esto se puede observar al calcular la desviación cuadrática media (RMSD) con respecto a los complejos reportados, el valor del RMSD es de 2Å.

Para dos estructuras a y b de una molécula idéntica, el RMSD se define como

$$RMSD_{ab} = \max(RMSD'_{ab}, RMSD'_{ba})$$

$$RMSD'_{ab} = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{ij} \min r^2{}_{ij}}$$

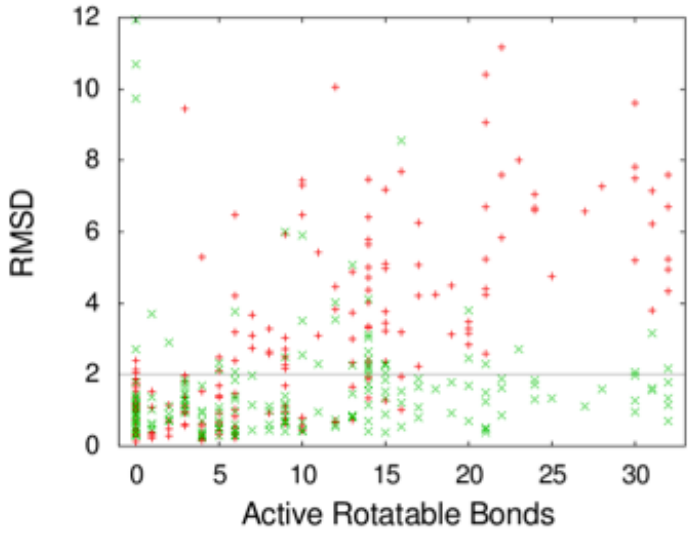
La sumatoria es sobre todos los átomos pesados N de la estructura a, el mínimo es sobre todos los átomos en la estructura b con el mismo tipo de átomo i en la estructura a.

En la Figura 7 se muestra la gráfica de los valores de RMSD para AutoDock4 como para Vina para los diferentes complejos con diferente número de enlaces rotables en la molécula, el corte de RMSD de 2Å es usado frecuentemente como un criterio de la predicción correcta de enlaces en la estructura. De ese modo y utilizando el mismo valor de RMSD como criterio de selección, se puede observar que a medida que se encuentran presentes más enlaces rotables en el ligando, AutoDock predice con más dificultad las estructuras con respecto a Vina [12].

En la Figura 8 se muestra el resumen de las fracciones de predicción de las estructuras para AutoDock4 y Vina, esta fracción es mayor con el programa Vina cuando el RMSD es menor a 2Å en comparación con AutoDock, lo cual quiere decir que las predicciones de las estructuras con Vina son mejores que con AutoDock [12].

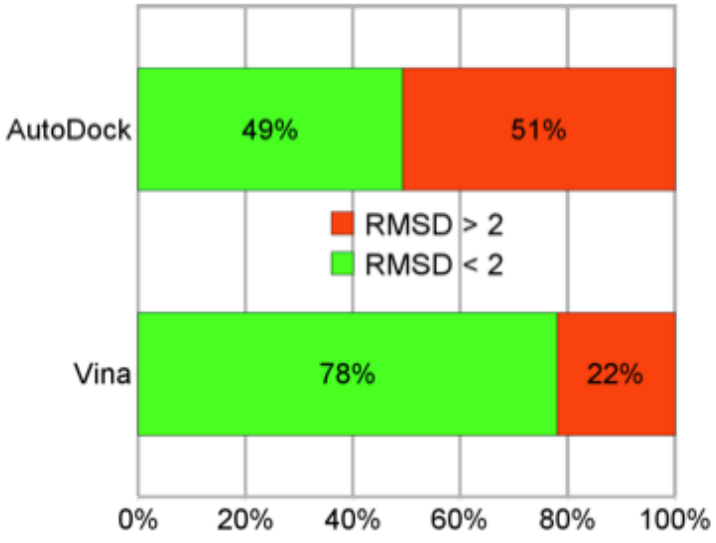
AutoDock Vina muestra una mejora de aproximadamente dos órdenes de magnitud en velocidad y simultáneamente una mejora significativa de la precisión de los modos de predicción de enlace sobre AutoDock4. Además el algoritmo de búsqueda de Vina es iterado y realiza una optimización de la función de puntuación basada en el gradiente de la misma que AutoDock no utiliza [12, 33].

Figura 7. Gráfica con el valor de RMSD para las conformaciones de enlace del ligando predichas dependiendo de la cantidad de enlaces rotables presentes en la molécula. AutoDock4 (+ rojas) y Vina (x verdes).




Tomado de la referencia 12.

Figura 8. Resumen de las fracciones de predicción de los complejos con RMSD < 2Å para AutoDock4 y Vina.




Tomado de la referencia 12.

Otro estudio realizado para AutoDock y Vina, fue comparar los dos programas en el contexto de virtual screening usando el acoplamiento para seleccionar compuestos activos en contra de la proteasa del VIH. El acoplamiento se utilizó para clasificar los compuestos de dos bibliotecas químicas que contienen ligandos experimentalmente verificados a la proteasa del VIH [33].

Durante el estudio, se encontró que los resultados del acoplamiento con AutoDock4 son procesados en un análisis de clusteres, y se escogen como representativas las conformaciones de menor energía mientras que Vina selecciona solamente las conformaciones con más baja energía sin proveer el análisis de clusteres. El método de búsqueda local de AutoDock4 emplea pequeños pasos aleatorios mientras busca las conformaciones más favorables, no calcula ningún gradiente mientras que Vina calcula derivadas para generar un gradiente realizando su optimización [33].

La conclusión a la que se llegó al terminar el estudio, es que ambos programas son capaces de proveer predicciones útiles cuando se modelan compuestos con un pequeño número de enlaces rotables. Cuando AutoDock tiene más de 8-10 enlaces rotables en una molécula se empiezan a ver problemas en la reproducción de los resultados del acoplamiento mientras que Vina puede reproducir resultados de acoplamiento de moléculas de hasta 20 enlaces rotables [33, 34, 44, 45].

## 1.8. Funciones de puntuación

Una función de puntuación es una función que estima la energía de enlace entre el ligando y la proteína para clasificar los resultados del acoplamiento molecular de acuerdo con las energías libre de unión de los diferentes ligandos [46]. La función de puntuación debería permitir la distinción entre las conformaciones aceptadas y todas las demás conformaciones alternativas que fueron exploradas [32].

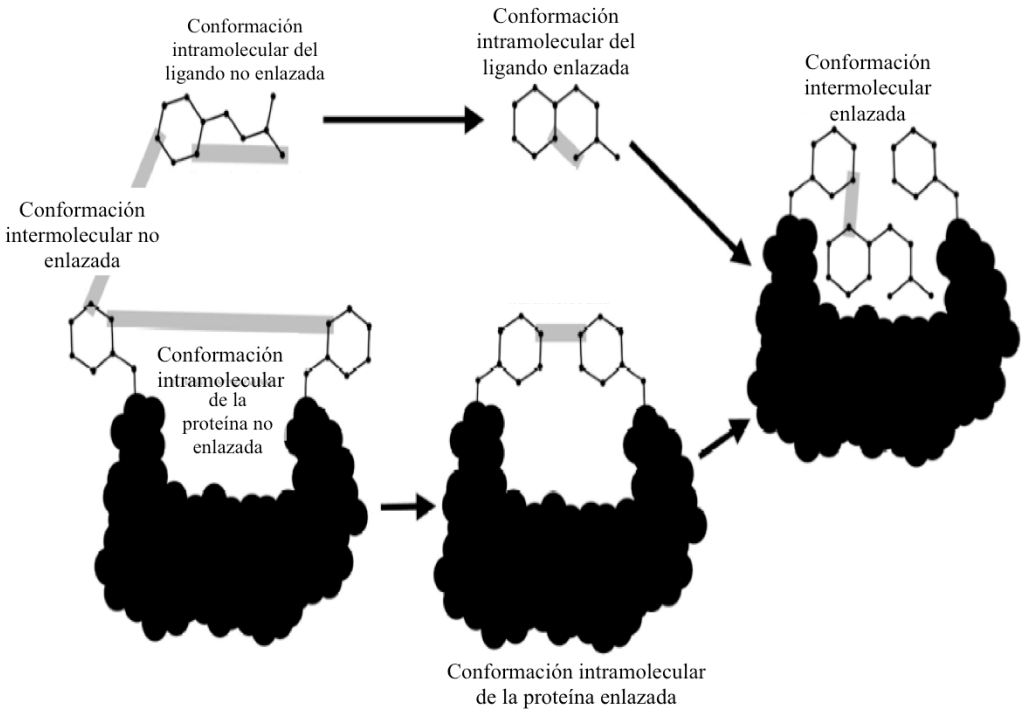
Se emplean en acoplamiento molecular como una forma eficiente de discriminar entre las orientaciones del ligando dentro del sitio activo de la proteína. Un problema importante en el acoplamiento molecular es el desarrollo de una función de puntuación que pueda describir la interacción entre la proteína y el ligando de manera rápida y precisa [11, 32].

Algunos términos que permiten a las funciones de puntuación calcular la energía libre de enlace son: interacciones de van der Waals, interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y algunas incluyen los efectos de solvatación [32,46].

### 1.8.1. Función de puntuación de AutoDock4.2

AutoDock4.2 utiliza un campo de fuerza semiempírico en su función de puntuación. El campo de fuerza evalúa la dinámica de la interacción en dos pasos (Figura 9): El ligando y la proteína comienzan en una conformación no enlazada. En el primer paso, se evalúa la energía intramolecular de la transición del estado no enlazado a la conformación que adoptarán el ligando y la proteína en el complejo enlazado. El segundo paso se evalúa la energía intermolecular de combinar el ligando y la proteína en su conformación enlazada [36,45].

Figura 9. Explicación de la evaluación de las interacciones del campo de fuerza en AutoDock4.2.




Tomada de referencia 36 con modificaciones hechas por la autora.

El campo de fuerza incluye la evaluación de seis parejas de términos (V) y una estimación de la entropía conformacional perdida en la unión (ΔSconf)

$$\Delta G = (V_{bound}^{L-L} - V_{unbound}^{L-L}) + (V_{bound}^{P-P} - V_{unbound}^{P-P}) + (V_{bound}^{P-L} - V_{unbound}^{P-L} + \Delta S_{conf})$$

Dónde: L ligando y P proteína en el complejo proteína-ligando. Los primeros dos términos de la ecuación son la energía intramolecular del ligando y la proteína en su estado enlazado y no enlazado, el último término es el cambio en la energía intermolecular entre los estados enlazado y no enlazado [36].

La evaluación de la función de puntuación incluye los siguientes términos [34, 36, 47]:

$$V = W_{vdw} \sum_{ij} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{6}} \right) + W_{hbound} \sum_{ij} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\varepsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{ij} (S_i V_j + S_j V_i) e^{\left(-r_{ij}^2/2\sigma^2\right)} + W_{tor} N_{tor}$$

- Dos potenciales de Lennard-Jones para la energía de las interacciones de Van der Waals y los enlaces de puentes de hidrógeno. El término de punte de hidrógeno tiene una direccionalidad debida al factor E(t) que es función del ángulo t.
- Un potencial de Coulomb para evaluar las interacciones electrostáticas.
- Un potencial de desolvatación basado en el volumen (V) de los átomos alrededor de un átomo dado, con parámetros de solvatación (S) y un término exponencial basado en la distancia.
- Por último, un término para los efectos entrópicos que es directamente proporcional al número de enlaces rotables en el molécula.

Todos los pesos de las constantes W son los que se optimizaron para la calibración de la energía libre de unión de un conjunto experimental de complejos caracterizados.

### 1.8.2. Función de puntuación de Vina

La forma general de la función de puntuación de con la que Vina está diseñada para trabajar es:

$$c = \sum_{i<j} f_{t_i t_j}(r_{ij})$$

donde la sumatoria es sobre todos los pares de átomos que pueden moverse entre sí, excluyéndose las interacciones 1-4. Cada átomo *i* está asignado a un tipo $t_i$ y se define un conjunto de funciones de interacciones $f_{titj}$ de una distancia interatómica $r_{ij}$. Este valor puede ser visto como la suma de las contribuciones intermoleculares e intramoleculares:

$$c = c_{inter} + c_{intra}$$

El algoritmo de optimización (búsqueda) de Vina intenta encontrar el mínimo global de *c* y otras conformaciones de baja puntuación que han sido clasificadas. La energía libre de unión es calculada de la parte intramolecular de las conformaciones con más baja puntuación:

$$s_1 = g(c_1 - c_{intra1}) = g(c_{inter1})$$

donde g es una función independiente de la conformación que tiene en cuenta los enlaces de la molécula que rotan. En el archivo de salida del programa, otras conformaciones de baja energía dan sus valores *s* pero se tiene en cuenta el $c_{intra}$ como el mejor modo de unión:

$$s_i = g(c_i - c_{intra1})$$

Las funciones de interacción $f_{titj}$ son definidas de acuerdo a la distancia interatómica:

$$f_{t_i t_j}(r_{ij}) \equiv h_{t_i t_j}(d_{ij})$$

$$d_{ij} = r_{ij} - R_{t_i} - R_{t_j}$$

dónde $R_t$ es el radio de van der Waals del tipo de átomo t. En la función de puntuación $ht_it_j$ es una suma de los pesos de las interacciones estéricas, las interacciones hidrofóbicas para los átomos hidrofóbicos y donde se aplique, los puentes de hidrógeno. Los terminos estéricos son:

$$gauss_1(d) = e^{-(d/0{,}5\text{Å})^2}$$

$$gauss_2(d) = e^{-((d-3\text{Å})/2\text{Å})^2}$$

$$repulsion(d) = \begin{cases} d^2, & si\ d < 0 \\ 0, & si\ d \geq 0 \end{cases}$$

Los términos hidrofóbicos son iguales a 1 cuando d < 0,5Å; 0 cuando d > 1,5Å y se interpola linealmente entre esos valores. Los términos de puente de hidrógeno son iguales a 1 cuando d < -0,7Å; 0 cuando d > 0, y se interpola linealmente entre estos valores. Todas las funciones de interacción $ft_it_j$ tienen un cut off en $r_{ij}$ = 8Å.

La función de conformación independiente g fue escogida como:

$$g(c_{inter}) = \frac{c_{inter}}{1 + wN_{rot}}$$

donde $N_{rot}$ es el número de enlaces rotables entre los átomos pesados en el ligando, y w es el peso asociado.

# 2. METODOLOGÍA

## 2.1. Preparación de la estructura de CalB acetilada (AcCalB).

Las coordenadas iniciales de CalB se tomaron de la estructura cristalina con código 1TCA en el Protein Data Bank. Esta estructura contiene dos unidades de N-acetil-glucosamina (NAG) las cuales fueron removidas debido a que están ubicadas lejos del sitio activo y no afectan la selectividad de la enzima [8, 48].

Se utilizó el programa PDB2PQR [49] para añadir los átomos de hidrógeno ausentes en la estructura cristalina, y el programa PROPKA [50, 51] para generar los estados de protonación de las cadenas laterales de los aminoácidos. Con base en este procedimiento, todos los aminoácidos polares y los potencialmente cargados fueron usados en su forma ionizada, excepto el Asp134 que fue protonado [8, 48].

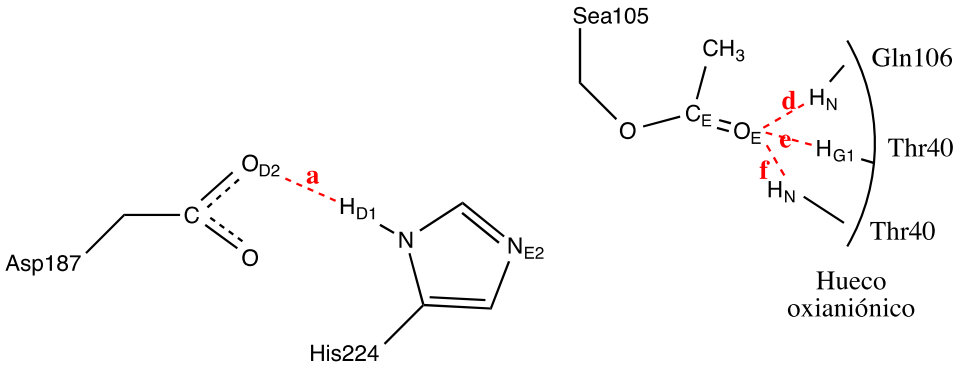
Después de la protonación de la estructura de CalB, el grupo OH del residuo Ser105 se reemplazó por el grupo acetato (complejo acilenzima: AcCalB). El oxígeno del grupo acetato se orientó de tres formas diferentes, de forma que se garantizó la formación de los puentes de hidrógeno con los residuos del hueco oxianiónico imitando la orientación del oxianión en el segundo intermediario tetraédrico. Las tres estructuras para AcCalB fueron llamadas Ace01, Ace02 y Ace03 de acuerdo a su orden de creación [8, 48].

Estas tres estructuras se utilizaron como las estructuras iniciales para una primera serie de simulaciones de MD (Molecular Dynamics) con tolueno explícito como solvente y con tiempo de simulación de 2ns [48]. Se utilizó el campo de fuerza CHARMM22 [52–54]. Los parámetros del campo de fuerza CHARMM para la nueva serina (serina acetilada SEA) se adaptaron de la serina y del grupo metil [8, 48] (Ver Apéndice A).

De acuerdo a la información obtenida después de la simulación de MD, las tres estructuras para AcCalB se mantuvieron estables durante la dinámica y conservaron estable la tríada catalítica después de la simulación MD [48]. Con base en lo anterior, se decidió utilizarlas como la enzima para el acoplamiento molecular [48]. Los puentes de hidrógeno necesarios para que la reacción se lleve a cabo se muestran en la

Figura 10 y están señalados en color rojo.

Figura 10. Puentes de hidógeno a, d, e y f (color rojo) necesarios para que la reacción de acilación catalizada por CalB se lleve a cabo.

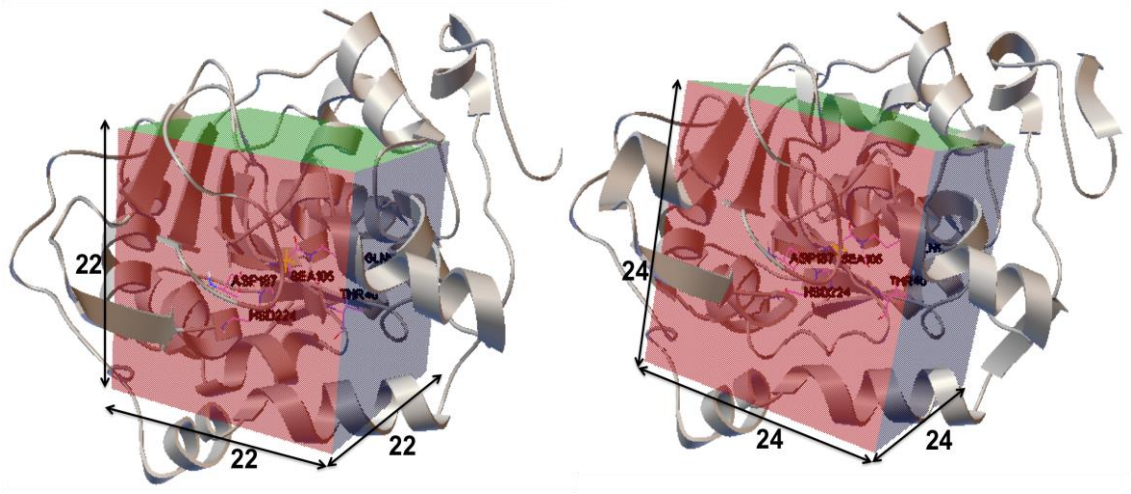



## 2.2. Formación de los complejos de Michaelis entre AcCalB y el (*R,S*)-atenolol

Se realizó el acoplamiento molecular no covalente para simular los complejos de Michaelis usando el programa AutoDock4.2 [45]. Se utilizó un enfoque rígido para la AcCalB y flexible para los enantiómeros del atenolol que se acoplan en el sitio activo por medio de interacciones no covalentes.

Se utilizaron los tamaños de caja, de 22x22x22Å y de 24x24x24Å, centrada en la triada catalítica de CalB (Cα de la Ser105), (Figura 11). Esto con el fin de variar el espacio de búsqueda conformacional [14]. Se utilizó el algoritmo genético Lamarckiano (LGA) y en las simulaciones se evaluaron 2000 conformaciones diferentes (parámetro ga_run). Los demás parámetros utilizados fueron los parámetros por defecto del programa AutoDock4.2.

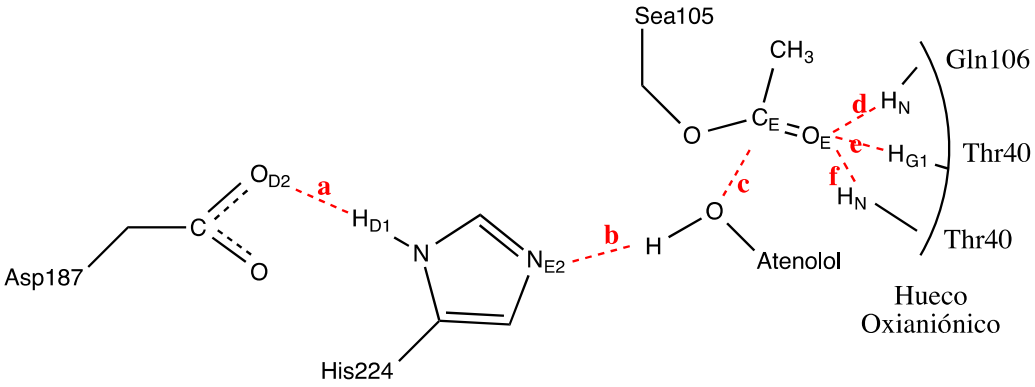
Figura 11. Dimensiones del tamaño de caja utilizados en el acoplamiento con las conformaciones de AcCalB, Ace01 y Ace03. La de la izquierda fue la utilizada con la conformación Ace01 y a la derecha con la conformación Ace03.




## 2.3. Selección de los MCCs

Los MCCs se seleccionaron con base en su energía libre de unión, en criterios geométricos y valores de RMSD > 0,5Å. Los criterios geométricos tenidos en cuenta se muestran en la Figura 12. Estos son la longitud del puente de hidrógeno entre el H del grupo hidroxilo del atenolol y el átomo His224:Nε (distancia -b-) y la distancia entre el O del grupo hidroxilo del atenolol con el átomo SEA:C de la serina catalítica (distancia -c-) y los puentes de hidrógeno entre el átomo de oxígeno, $O_E$, de la acil-serina y el hueco oxianiónico. Las distancias b y c deben tener un valor ≤ 4Å [8, 55, 56]. Y deben estar presentes al menos dos de los tres puentes de hidrógeno (d, e y f) que se forman con el hueco oxianiónico entre el O del grupo acetato de la Sea105 y los residuos aminoacídicos Thr40 y Glu106.

Figura 12. Puentes de hidrógeno (color rojo a, b, c, d, e y f) formados en los MCCs entre acCalB y el (*R,S*)-propranolol.

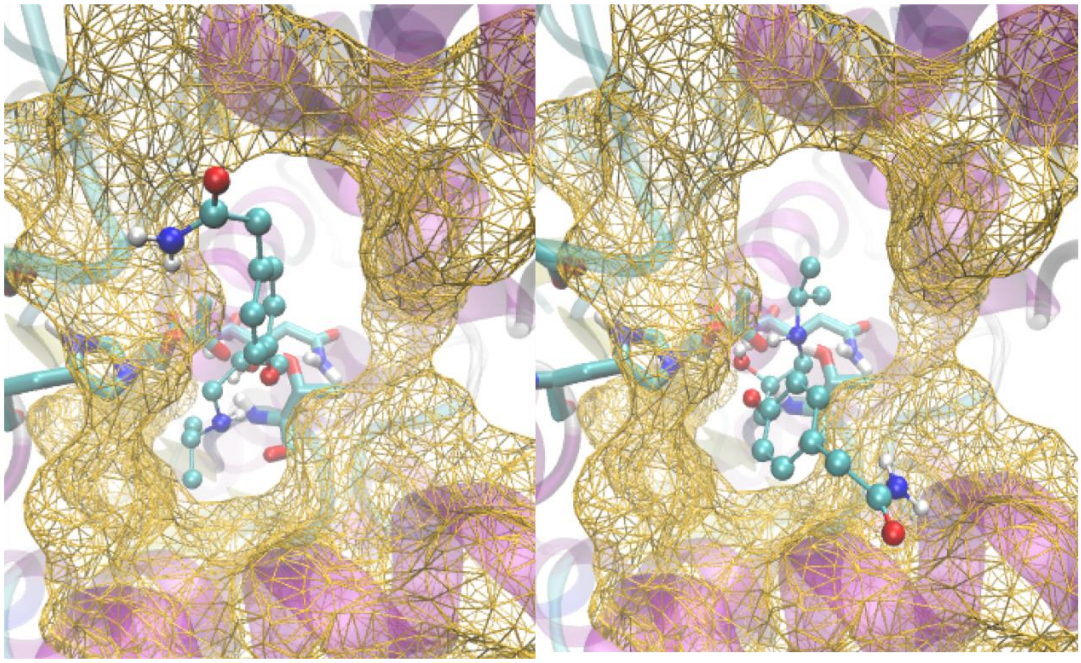



Otro criterio utilizado después de analizar las distancias b y c ≤ 4Å, fue comparar las estructuras de las poses (MCCs) del sustrato con un RMSD entre 0Å a 0,5Å siendo agrupadas de esta forma y se escogió una pose representativa de cada grupo. Los MCCs seleccionados se etiquetaron con AD (obtenidos con AutoDock4.2) y OR- u OS- para el enantiómero *R* o *S* del atenolol. Para diferenciar los MCCs seleccionados se les asignó un número. Los MCCs seleccionados son ADOR1-ADOR18 y ADOS1-ADOS20. En el Apéndice B se presentan las tablas con los valores de las distancias b y c para cada uno de los MCCs seleccionados.

### 2.4. Análisis de los MCCs entre AcCalB y el (*R,S*)-atenolol

Se analizó la población y la energía libre de enlace de los MCCs. Se analizaron las interacciones no covalentes en los MCCs. Los MMCs encontrados fueron agrupados de acuerdo a la orientación, en el sitio activo de CalB, del grupo feniletanamida del atenolol. Se encontraron dos modos de unión como se muestra en la Figura 13: modo de unión I y modo de unión II. En el modo de unión I la cadena feniletanamida del (*R,S*)-atenolol se ubica en el bolsillo hidrofóbico grande, mientras que su cadena isopropilamino se ubica en el bolsillo hidrofóbico mediano del sitio activo. En el modo de unión II la cadena feniletanamida del (*R,S*)-atenolol se ubica en el bolsillo hidrofóbico mediano y la cadena isopropilamino en el bolsillo hidrofóbico grande [8].

Figura 13. Modos de unión del (*R,S*)-atenolol en el sitio activo de CalB. La imagen de la izquierda muestra el modo de unión I y la imagen de la derecha el modo de unión II.



Los MCCs entre AcCalB y el (*R,S*)-atenolol obtenidos con el programa AutoDock4.2 fueron comparados con los MCCs obtenidos con el programa Vina[14]. Se tuvo en cuenta los valores de energía libre de afinidad y la ubicación del sustrato en el sitio activo de la enzima.

# 3. RESULTADOS

## 3.1. Conformaciones de AcCalB seleccionadas

Se obtuvieron MCCs entre AcCalB y el (*R,S*)-atenolol con las confomaciones Ace01 y Ace03 considerando tanto la enzima como el sustrato como cuerpos rígidos. Con la conformación Ace02 de la AcCalB no se obtuvieron MCCs debido a impedimentos estéricos por la posición del grupo acilo en el residuo de Ser105 y a que las conformaciones del sustrato en el sitio activo solo formaron dos puentes de hidrógeno con el hueco oxianiónico [48]. La superposición de las conformaciones Ace01, Ace02 y Ace03 y de los residuos aminoacídicos involucrados en la reacción se observa en la Figura 14. La Figura 15 da una idea más clara de los átomos involucrados en la formación de los puentes de hidrógeno en los MCCs. Los puentes de hidrógeno importantes en el proceso catalítico de CalB se muestran en la Tabla 1. Éstos corresponden a las distancias de los puentes de hidrógeno formados para cada una de las conformaciones Ace01, Ace02 y Ace03.

Figura 14. Superposición de las conformaciones AcCalB. AcCalB representada en su estructura secundaria. Los residuos de la triada catalítica y el hueco oxianiónico en representación licorice y para las conformaciones Ace01 en azul, Ace02 en rojo y Ace03 en verde.

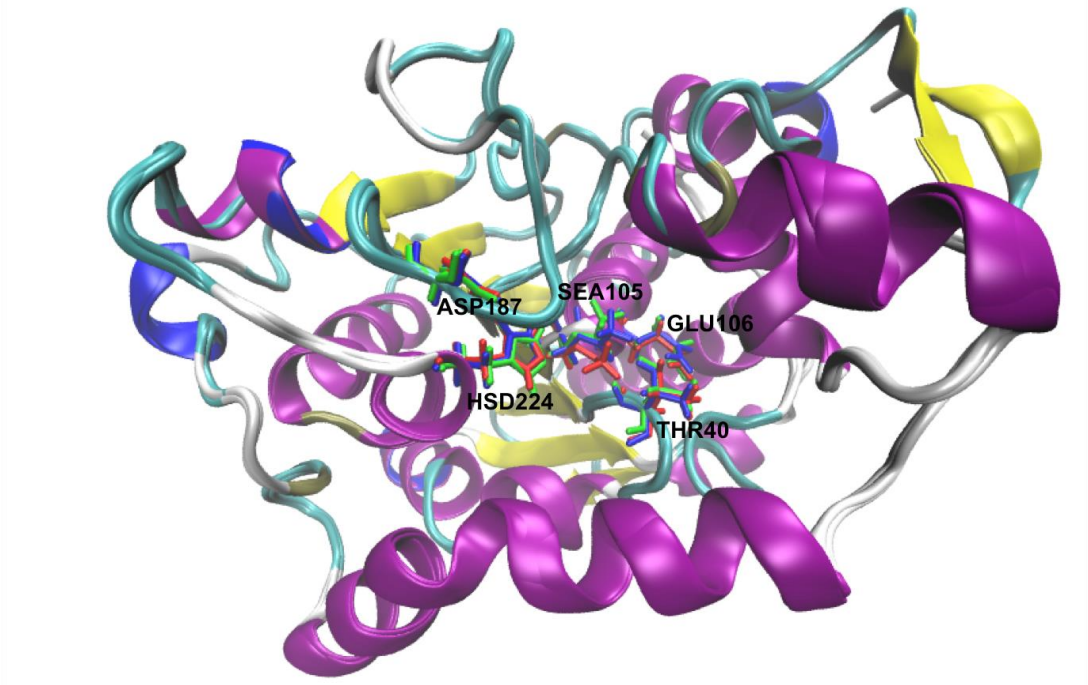


Figura 15. Átomos de los residuos aminoacídicos (de la tríada catalítica y el hueco oxianiónico) involucrados en la formación de los puentes de hidrógeno para llevarse a cabo la reacción catalítica para las conformaciones Ace01 en azul, Ace02 en rojo y Ace03 en verde.

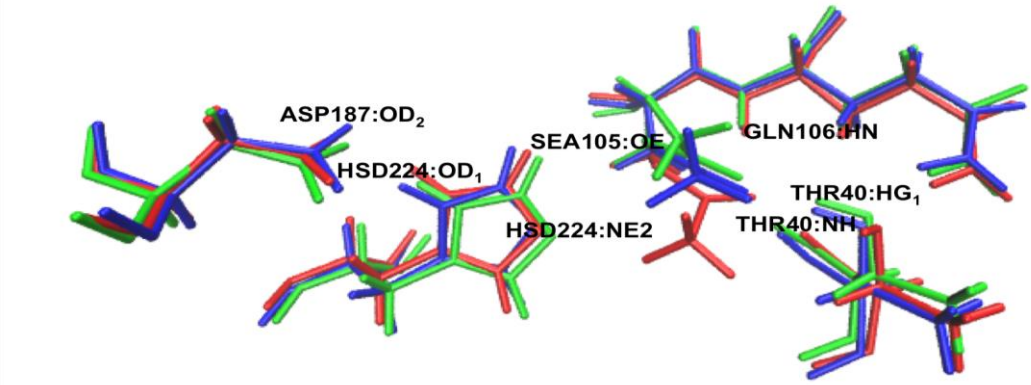



Tabla 1. Valores de las distancias (Å) de los puentes de hidrógeno en las conformaciones de Ace01, Ace02 y Ace03. La distancia a (Asp187:OD2···Hsd224:HD1), la distancia d (Sea105:OE···Gln106:HN), la distancia e (Sea105:OE···Thr40:HG1) y la distancia f (Sea105:OE···Thr40:HN).

| Distancia | Conformaciones de AcCalB | | |
|---|---|---|---|
| | Ace01 | Ace02 | Ace03 |
| a | 1,943 | 1,935 | 1,918 |
| d | 2,391 | 1,850 | 2,065 |
| e | 1,684 | 3,284 | 1,894 |
| f | 1,963 | 1,681 | 2,044 |

### 3.2. MCCs entre la AcCalB y el (*R,S*)-atenolol

En la Tabla 2 se muestra la población total de las conformaciones obtenidas (Población simulada) y los MCCs obtenidos en cada una de las simulaciones de acoplamiento aplicando los criterios de selección de los MCCs (distancias b y c ≤ 4Å y un RMSD entre 0 a 0,5Å).

Tabla 2. MCCs entre las conformaciones Ace01 y Ace03 de AcCalB y el (*R,S*)-atenolol obtenidos según los criterios de selección. Entre paréntesis se indica el modo de unión del sustrato.

| Conformación de la AcCalB | Sustrato | Población simulada | Población de los MCCS | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Por conformación | Por sustrato (modo) | Por RMSD (modo) |
| Ace01 | (*R*)-atenolol | 2000 | 16 | 16 (I) | 10 (I) |
| | (*S*)-atenolol | 2000 | 7 | 4 (I) 3 (II) | 4 (I) 3 (II) |
| Ace03 | (*R*)-atenolol | 2000 | 9 | 7 (I) 2 (II) | 6 (I) 2 (II) |
| | (*S*)-atenolol | 2000 | 30 | 6 (I) 24 (II) | 4 (I) 9 (II) |

Analizando el primer criterio de selección, se obtuvo el mayor número de MCCs (24) entre la conformación Ace03 y el isómero *S*-atenolol en el modo de unión II. Con el *R*-atenolol y la conformación Ace01 el mayor número de MCCs se obtuvieron para el modo de unión 1 (16). Al aplicar adicionalmente el criterio de selección RMSD (entre 0 a 0,5Å) se reduce la cantidad de MCCs seleccionados. Sin embargo, se observa la misma tendencia en los MCCs entre el *R*-Atenolol y la conformación de AcCalB, Ace01 que entre el *S*-atenolol y la conformación de AcCalB, Ace03. Al utilizar el criterio de RMSD se hace más fácil el análisis de los MCCs porque se descartan algunos MCCs que son estructuralmente muy similares entre ellos.

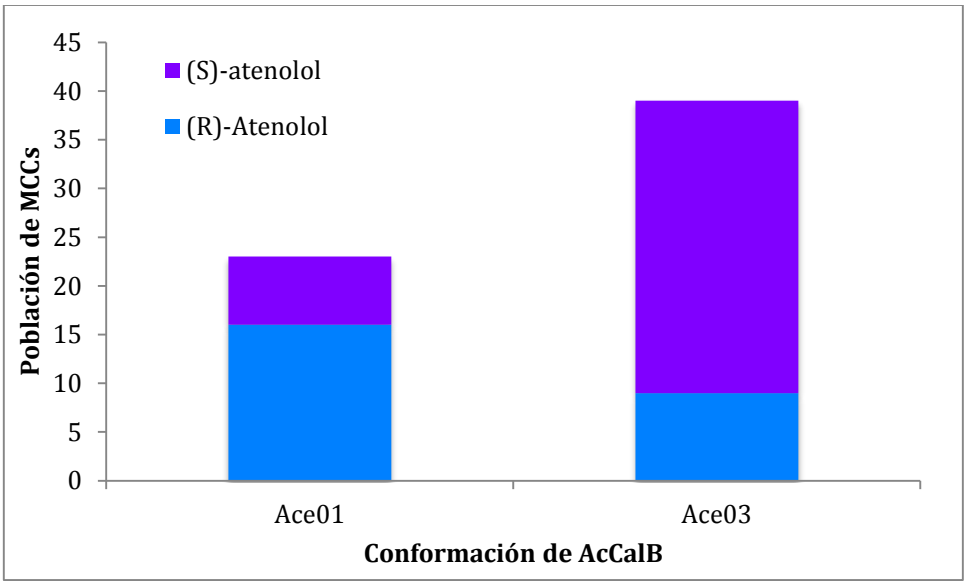
En la Tabla 3 se muestran solamente los MCCs seleccionados de acuerdo a los criterios de distancias interatómicas y RMSD. Se puede decir que con el criterio de las distancias b y c ≤ 4Å favorece la formación de MCCs con el *R*-atenolol y la conformación Ace01; y con *S*-atenolol y la conformación Ace03. Al aplicar el criterio de RMSD la tendencia en el número de MCCs se mantiene, más MCCs para el *R*-atenolol con la conformación AcCalB, Ace01 y para el *S*-atenolol con la conformación AcCalB, Ace03. Pero debido a que la diferencia en el número de MCCs es baja, 3 MCCs más para la conformación AcCalB, Ace03 con el *S*-atenolol, no es posible evaluar la enantioselectividad de la reacción solo con los MCCs ya que es necesario estudiar los intermediarios tetraédricos de la reacción para la acilación del atenolol y así saber si se lleva a cabo la reacción.

Tabla 3. Población de MCCs para cada criterio de selección (distancias b y c ≤ 4Å y RMSD entre 0Å a 0,5Å) para las conformaciones Ace01 y Ace03. En paréntesis se muestra el modo de unión del sustrato.

| Conformación de la AcCalB | Sustrato | Población de los MCCs | |
|---|---|---|---|
| | | Distancia b y c < 4Å | RMSD |
| Ace01 | (*R*)-atenolol | 16 (I) | 10 (I) |
| | (*S*)-atenolol | 4 (I) 3 (II) | 4 (I) 3 (II) |
| Ace03 | (*R*)-atenolol | 7 (I) 2 (II) | 6 (I) 2 (II) |
| | (*S*)-atenolol | 6 (I) 24 (II) | 4 (I) 9 (II) |

En la Gráfica 1 se puede observar la población de MCCs obtenida con cada conformación de AcCalB para el (*R,S*)-atenolol teniendo en cuenta el criterio de selección de las distancias b y c ≤ 4Å. Para el *R*-atenolol hay mayor número de MCCs para AcCalB, Ace01 y para el *S*-atenolol hay mayor población de MCCs para AcCalB, Ace03.

Gráfica 1. Población de los MCCs para las conformaciones Ace01 y Ace03 de AcCalB con el criterio de distancias b y c ≤ 4Å. La población del enantiómero *R* se muestra en color azul y del enantiómero *S* en color morado.

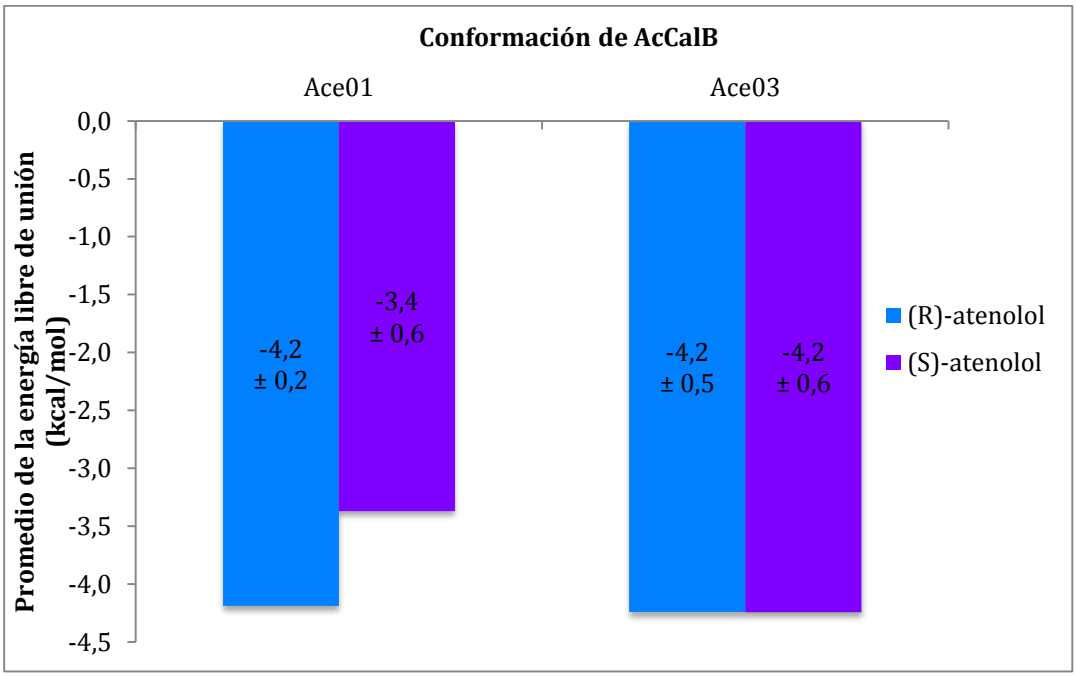


En la Tabla 4 se muestra los promedios de los valores de energía libre de unión de los MCCs con las diferentes conformaciones de AcCalB (Ace01 y Ace03) utilizadas con los enantiómeros del atenolol. En el Apéndice B se encuentran las tablas con los MCCs y sus valores de energía libre de unión. En la Gráfica 2 se ve la explicación gráfica de la Tabla 4 del promedio de los valores de energía libre de unión para los MCCs para cada conformación de AcCalB y para el (*R,S*)-atenolol.

Tabla 4. Promedio y desviación estándar de los valores de la energía libre de unión (kcal/mol) para los MCCs obtenidos con las diferentes conformaciones de AcCalB y el (*R,S*)-atenolol.

| Sustrato | Conformación de AcCalB | |
|---|---|---|
| | Ace01 | Ace03 |
| (*R*)-atenolol | -4,2 ± 0,2 | -4,2 ± 0,5 |
| (*S*)-atenolol | -3,4 ± 0,6 | -4,2 ± 0,6 |

Gráfica 2. Promedio de la energía libre de unión para la población de los MCCs simulados con las diferentes conformaciones de AcCalB (Ace01 y Ace03). La población del enantiómero *R* se muestra en color azul y del enantiómero *S* en color morado.

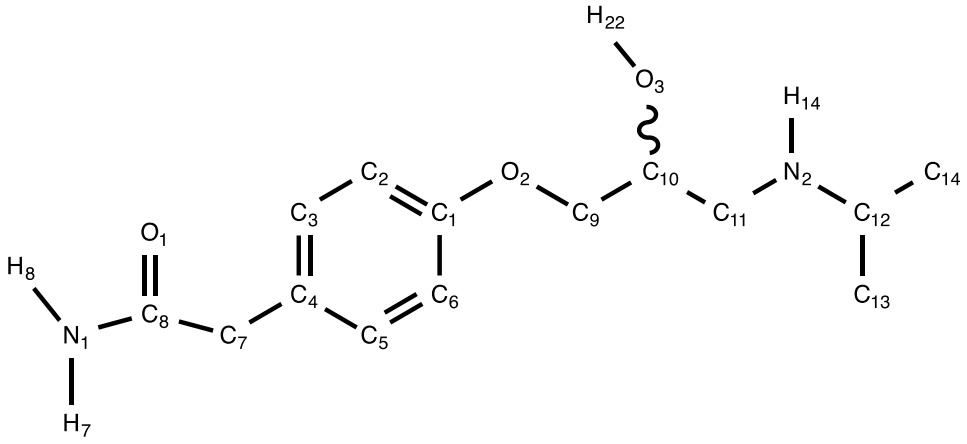


De acuerdo a la Gráfica 2, se observa que la conformación Ace03 tiene los mismos valores de la energía libre de unión para los MCCs del (*R,S*)-atenolol, y tanto para el *R*-, como para el *S*-atenolol se tiene el mismo valor promedio (-4,2 kcal/mol). Comparando los valores de energía libre de unión para las conformaciones de AcCalB, Ace01 y Ace03, se puede observar que el (*R*)-atenolol mantiene el mismo promedio de energía en comparación del (*S*)-atenolol que con la conformación Ace03 tiene valores de energía libre de unión ligeramente mayores que los obtenidos con la conformación Ace01.

### 3.3. Interacciones de contacto cercano y puentes de hidrógeno de los MCCs entre AcCalB y el (*R,S*)-atenolol.

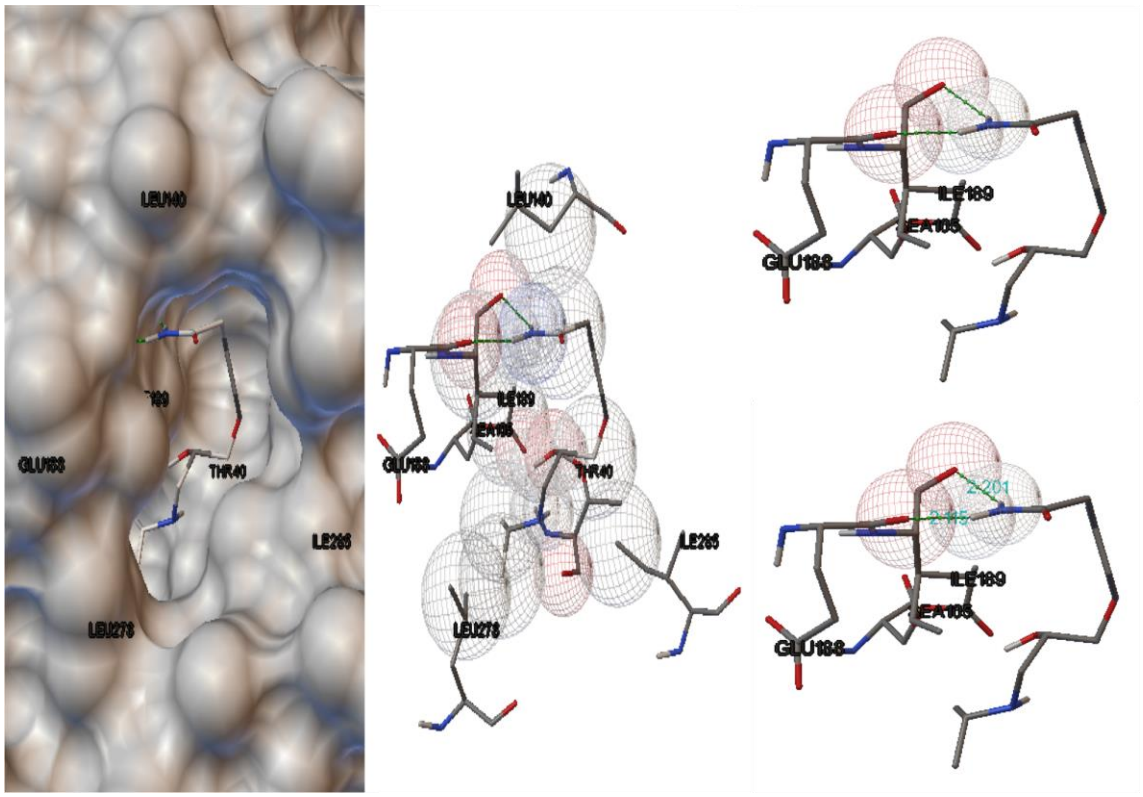
Las interacciones de contacto cercano y los puentes de hidrógeno formados en los MCCs se analizaron con el programa AutoDockTools [34]. Entre los residuos aminoácidicos con los que el sustrato presenta mayor contacto se encuentran Thr40, Sea105, His224, Glu188, Ile189, Leu278, Ala282, Ile 285 entre otros. Todos los MCCs presentan interacción de tipo de contacto cercano con el residuo Ile189, inclusive en algunos MCCs se forma un puente de hidrógeno con este residuo. Hay indicios que este residuo ayuda a la estabilización del sustrato en el sitio activo[13]. En la Figura 16, se muestra una imagen del (*R,S*)-atenolol con los átomos númerados para poder entender mejor cuáles átomos del (*R,S*)-atenolol se encuentran involucrados en los puentes de hidrógeno.

Figura 16. Átomos del (*R,S*)-atenolol numerados para ver los átomos involucrados en los puentes de hidrógeno formados.



Entre los puentes de hidrógeno formados para ayudar a la estabilización del (*R,S*)-atenolol en el sitio activo se encuentran en varios MCCs un puente de hidrógeno entre el $H_7$ del grupo amido de la parte feniletanamida del atenolol y el O del residuo Ile189 (Ile189:O···H7:Sub-N1:Sub). Este puente de hidrógeno se presenta en los MCCs del (*R,S*)-atenolol con cualquiera de las dos conformaciones de la enzima pero que se encuentran en modo de unión I. Otro puente de hidrógeno que se presenta es entre el otro hidrógeno del grupo amido ($H_8$) y el residuo Glu188 (Glu188···H8:Sub-N1:Sub). En la Figura 17 se muestran los enlaces de puente de hidrógeno descritos anteriormente. Las distancias de los puentes de hidrógeno encontrados es de 2,115 y 2,201 Å para el puente de hidrógeno de Glu188···H8:Sub-N1-Sub y Ile189:O···H7:Sub-N1:Sub respectivamente, estas distancias están dentro de las aceptadas para enlaces de puente de hidrógeno.

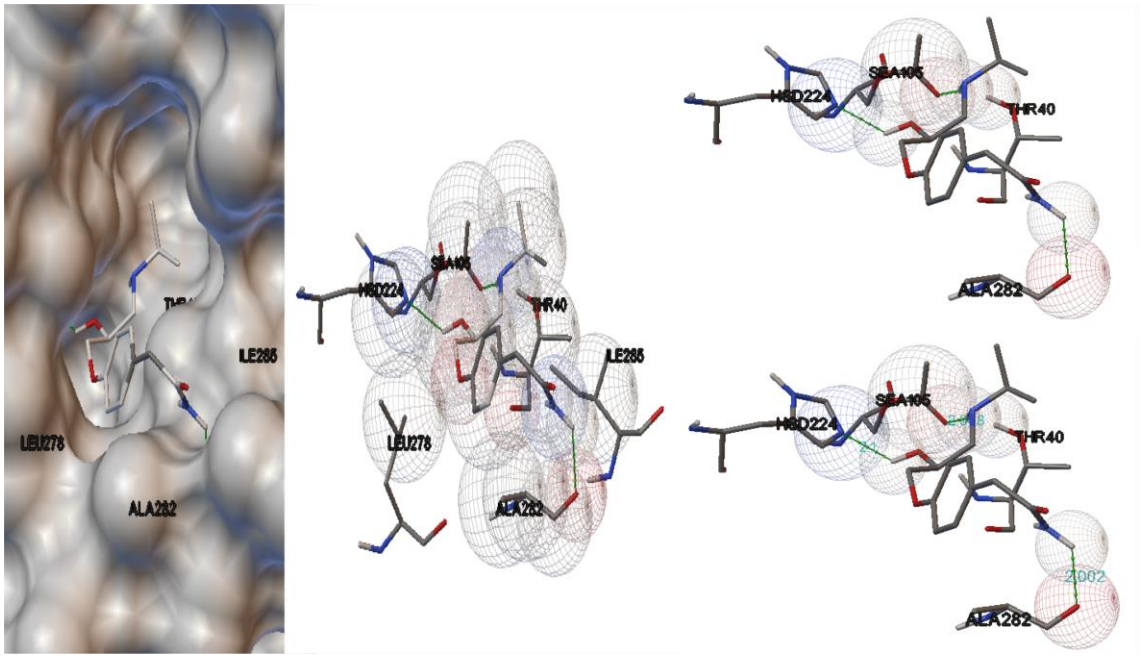
Figura 17. Ejemplo de las interacciones de contacto cercano (mostradas en esferas color gris) y los puentes de hidrógeno (izquierda y de color verde) formados en algunos de los MCCs entre el grupo amida del (*R,S*)-atenolol y los residuos Glu188 e Ile189.



Otro de los puentes de hidrógeno que pueden ser observados, es el formado entre el Nε de la His224 y el H del grupo hidroxilo del atenolol (Hsd224:Nε2···H22:Sub-O3:Sub). Este puente de hidrógeno se presenta en los MCCs del (*R,S*)-atenolol con cualquiera de las dos conformaciones de la enzima y en cualquiera de los dos modos de unión. Se ejemplifica en la Figura 18 y presenta una distancia de 2,1Å. Otro de los puentes de hidrógeno que se observa es entre el $H_{14}$ del grupo amino de la parte isopropilamino del atenolol y el residuo de Ser105 (Sea105:O···H14:Sub-N2:Sub) con una distancia de 2,048Å. Estos puentes de hidrógeno pueden ser observados en la Figura 18.

Otro puente de hidrógeno que se observa es el que se forma entre el $H_8$ del grupo amida de la parte feniletanamida del atenolol (Ala282:O···H8:Sub-N2:Sub) y el residuo Ala282, este puente de hidrógeno se presenta en la Figura 18 y tiene una distancia de 2,002Å. Las distancias para estos tres puentes de hidrógeno se encuentran dentro de las distancias aceptadas para puentes de hidrógeno. Los MCCs que presentan este tipo de puentes de hidrógeno encuentran orientados en modo de unión II en el sitio activo tanto para la conformación Ace01 como para Ace03.

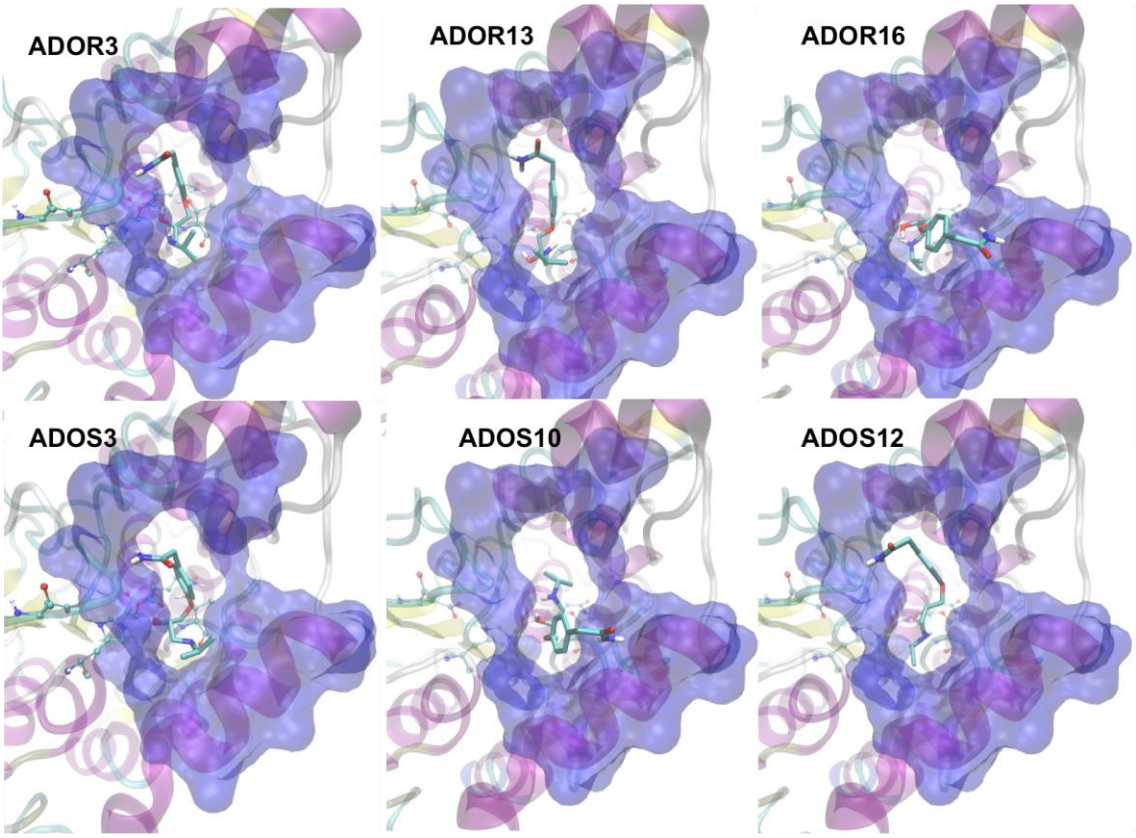
Figura 18. Ejemplo de las interacciones de contacto cercano (mostradas en esferas de color gris) y los puentes de hidrógeno (izquierda y de color verde) formados en algunos de los MCCs entre el grupo hidroxilo del (*R,S*)-atenolol y la Sea105, His224 y Ala282.



### 3.4. Modos de unión de los MCCs entre la AcCalB y el (*R,S*)-atenolol

En la Figura 19 se muestra ejemplos de los modos de unión del (*R,S*)-atenolol en el sitio activo de CalB. En la Figura 19 se muestran las conformaciones con el valor de energía libre de unión más negativo para las conformaciones de AcCalB, Ace01 y Ace03, en los dos modos de unión en el sitio activo. El anillo feniletanamida se encuentra ubicado hacia el bolsillo hidrofóbico grande y la parte isopropilamina hacia el bolsillo hidrofóbico mediano (Modo de unión I) y el anillo feniletanamida se encuentra ubicado hacia el bolsillo hidrofóbico mediano y la parte isopropilamina hacia el bolsillo hidrofóbico grande (Modo de unión II). Para la conformación Ace01 los MCCs solo se encuentran en el modo de unión I como se muestra en ADOR3 y ADOS3. Para la conformación Ace03 los MCCs se encuentran en los dos modos de unión: ADOR13 Y ADOS12 (modo de unión I) Y ADOR16 Y ADOS10 (modo de unión II).

Figura 19. Ejemplos de los modos de unión de los MCCs obtenidos para el (*R*)-atenolol (arriba) y para el (*S*)-atenolol (abajo) con las conformaciones de AcCalB, Ace01 y Ace03.



## 3.5. Comparación entre los MCCs obtenidos con las confomaciones de AcCalB en el acoplamiento con los programas AutoDock4.2 y Vina [14]

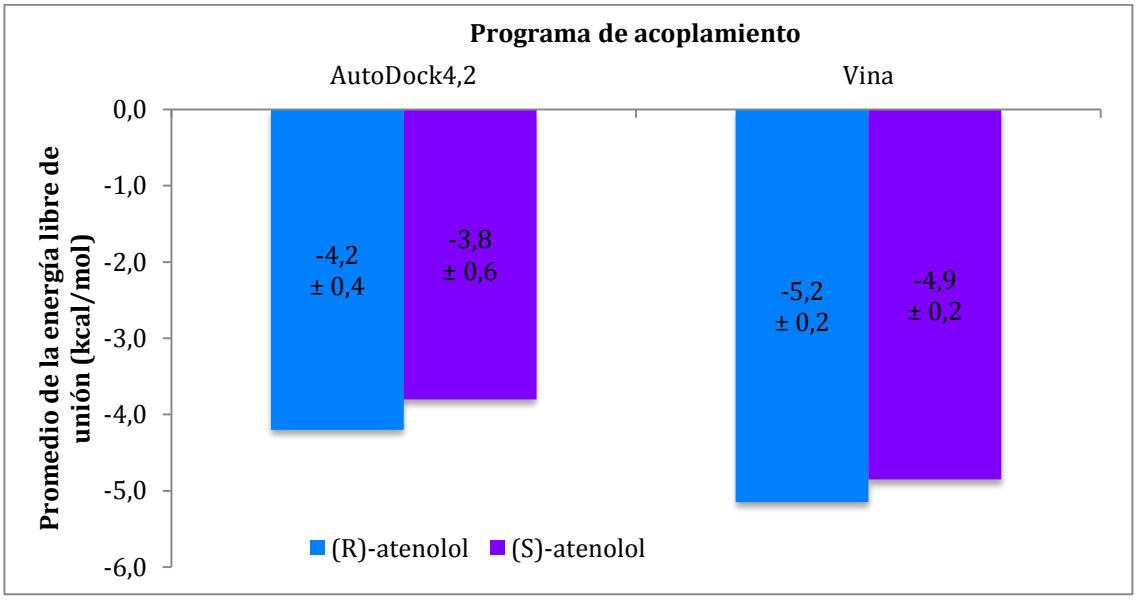
### 3.5.1. Energía libre de unión y población obtenida

Con los dos programas de acoplamiento, AutoDock4.2 y Vina, solo se obtuvieron MCCs para las conformaciones Ace01 y Ace03 de la AcCalB. En la Tabla 5 se presentan los promedios de los valores de energía libre de unión para el acoplamiento con AutoDock4.2 y Vina [14]. En la Gráfica 3 se puede observar que el valor del promedio de la energía libre de unión de los MCCs obtenidos para los dos enantiómeros del atenolol con el programa Vina son más negativos que los valores obtenidos con el programa AutoDock4.2. Esto puede deberse a que ambos programas trabajan con funciones de puntuación diferente (descritas en la sección 1.8) y tienen un procedimiento diferente para encontrar sus mínimos locales. Otra de las cosas a tener en cuenta, es que aunque se trabaja con el mismo sustrato cada programa provee predicciones de conformaciones diferentes dependiendo de la cantidad de enlaces que rotables presentes en la molécula, de acuerdo con esto Vina acepta más enlaces rotables en una molécula en comparación con los que AutoDock4.2 puede trabajar.

Tabla 5. Promedio y desviación estándar de la energía libre de unión para los MCCs obtenidos con el programa AutoDock4.2 y Vina. Se muestra la población de MCCs obtenida que cumple con los criterios de selección en los dos programas. Los modos de unión se indican entre paréntesis.

| Programa | Sustrato | Promedio de la energía libre de unión (kcal/mol) | MCCs | Modos de unión | |
|---|---|---|---|---|---|
| AutoDock4,2 | (*R*)-atenolol | -4,2 ± 0,4 | 18 | 16 (I) | 2(II) |
| | (*S*)-atenolol | -3,8 ± 0,6 | 20 | 8 (I) | 12 (II) |
| Vina | (*R*)-atenolol | -5,2 ± 0,2 | 20 | 1 (I) | 19 (II) |
| | (S)-atenolol | -4,9 ± 0,2 | 19 | 1 (I) | 18 (II) |

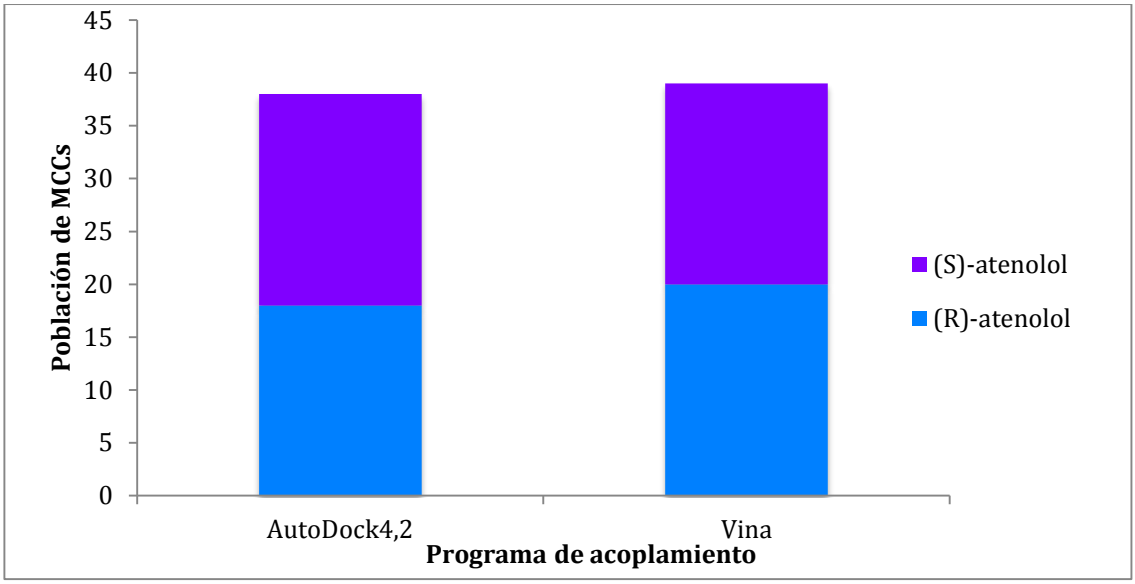
Gráfica 3. Promedio de la energía libre de unión para la población de los MCCs obtenidos con el programa AutoDock4.2 y Vina. La población del enantiómero *R* se muestra en color azul y del enantiómero *S* en color morado.




Como se puede observar en la Gráfica 3, la diferencia en la energía libre de unión es solo de 1 a 1,1 kcal/mol entre los dos programas y con el *R*- y *S*-atenolol respectivamente. También se puede observar una tendencia de que la energía libre de unión es más negativa para el (*R*)-atenolol que para el (*S*)-atenolol en ambos programas.

En la Gráfica 4 se observa la población de los MCCs obtenidos con cada uno de los programas para cada enantiómero del (*R,S*)-atenolol. Se puede observar por medio de la gráfica que la cantidad de MCCs obtenidos después de analizar los criterios de selección (distancia b y c <4Å y el valor de RMSD entre 0 a 0,5Å) es aproximadamente la misma, sin poder decir cual enantiómero se ve más o menos favorecido en la reacción de acilación.

Gráfica 4. Población de los MCCs, que cumplen con los criterios de selección con los programas de acoplamiento AutoDock4.2 y Vina. La población del enantiómero *R* se muestra en color azul y del enantiómero *S* en color morado.

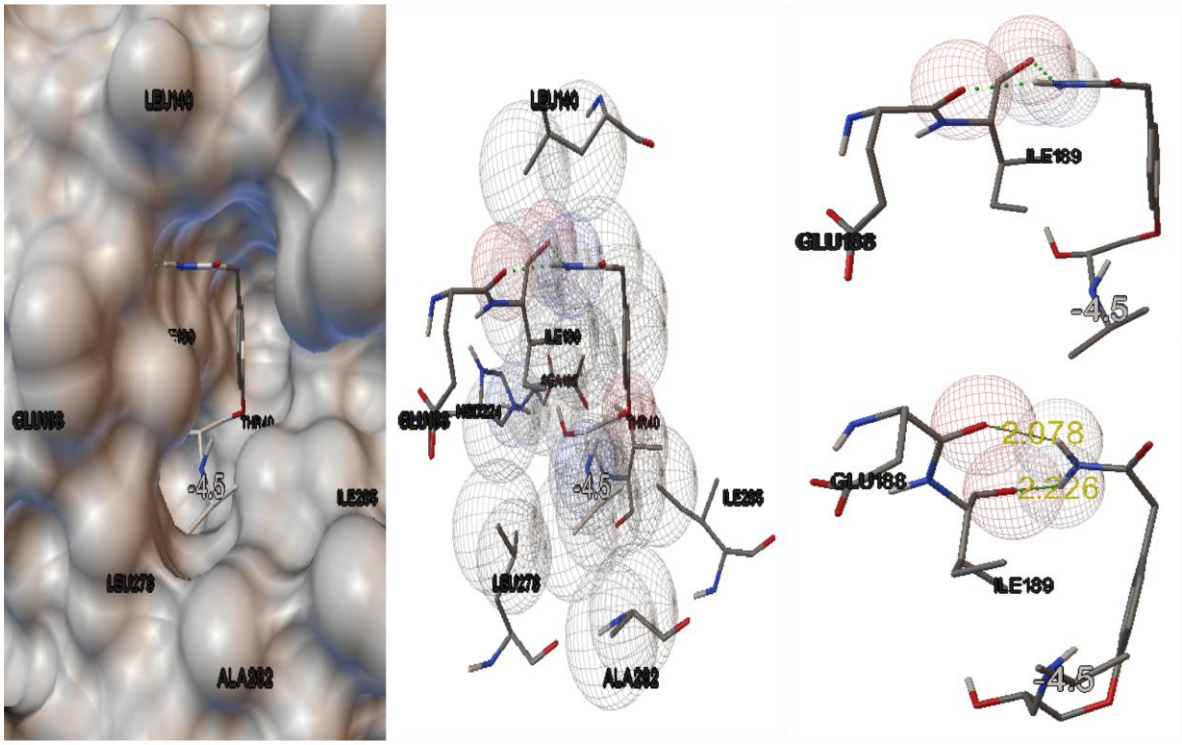



### 3.5.2. Interacciones de contacto cercano

Como se mencionó anteriormente en la sección 3.3, para todos los MCCs obtenidos con el programa AutoDock4,2 se encontró interacción de contacto cercano con el residuo aminoacídico Ile189 y los mismo sucedió con los MCCs obtenidos con el programa Vina, así como también con residuos aminoacídicos como Ser 105, Glu 188, Leu278, Ala282 e Ile 285. En los MCCs obtenidos con el programa Vina también se encuentran algunos enlaces de hidrógeno como se puede ver en la Figura 20. Los puentes de hidrógeno encontrados en los MCCs del programa Vina son menos que los encontrados en los MCCs del programa AutoDock4.2. En la Figura 16 se puede ver la numeración de los átomos del (*R,S*)-atenolol.

Figura 20. Ejemplo de las interacciones de contacto cercano (mostradas en esferas de color gris) y los puentes de hidrógeno (izquierda y de color verde) formados en

algunos de los MCCs entre el grupo amida del (*R,S*)-atenolol y los residuos Glu188 e Ile189.




Como se puede observar en la Figura 20, se encuentran puentes de hidrógeno formados entre el $H_7$ del grupo amido de la parte feniletanamida del atenolol y el O del residuo Ile189 (Ile189:O···H7:Sub-N1:Sub) y entre el otro hidrógeno del grupo amido ($H_8$) y el residuo Glu188 (Glu188:O···H8:Sub-N1:Sub), las distancias de dichos puentes de hidrógeno son de 2,226 y 2,078 Å respectivamente.

Estos dos puentes de hidrógeno se encuentran en los MCCs obtenidos con el programa AutoDock4.2 y con el programa Vina (ver Figura 17 y Figura 20). Y también se puede observar que cuando se forman estos puentes de hidrógeno entre el grupo amido del atenolol con los residuos Glu188 e Ile189 los MCCs de ambos programas se encuentran orientados en el sitio activo en el modo de unión I. Estos puentes de hidrógeno ayudan a estabilizar los MCCs en el sitio activo.

### 3.5.3. Modos de unión de los MCCs obtenidos con AutoDock4.2 y los obtenidos con Vina

Para los MCCs reportados con el programa Vina se obtienen dos modos de unión al igual que para los obtenidos con el programa AutoDock4.2. Estos dos modos de unión se diferencian de la misma forma en los dos programas. El anillo feniletanamida orientado hacia el bolsillo hidrofóbico grande y la parte isopropilamina del atenolol ubicado hacia el bolsillo hidrofóbico mediano (modo de unión I) o el anillo feniletanamida ubicado hacia el bolsillo hidrofóbico mediano y la parte isopropilamina del atenolol ubicado hacia el bolsillo grande (modo de unión II).

En la Tabla 5 se puede observar que con el programa AutoDock4.2 se encuentran más MCCs en el modo de unión I contrario a lo que se observa por el programa Vina que se encuentran más MCCs en el modo de unión II. Con Vina solo se encuentran dos MCCs en modo de unión I, la mayoría de los MCCs acoplados con Vina se encuentran en modo de unión II contrario a lo que sucede con AutoDock4.2 aunque se encuentra una gran cantidad de MCCs en modo de unión II la cantidad de MCCs en modo de unión I es un poco mayor (15 a 23 respectivamente).

En la Figura 21 se observan los dos diferentes modos de unión para los MCCs del (*R*)-atenolol con los programas AutoDock4.2 y Vina. Estos MCCs tiene el valor de energía libre de unión más negativo de todos los MCCs encontrados para el (*R*)-atenolol. ADOR3 y ADOR16 fueron encontrados con el programa AutoDock4.2 mientras que OR6 y OR1 fueron encontrados con el programa Vina. ADOR3 y OR6 se encuentran orientados en modo de unión I y ADOR16 y OR1 se encuentran orientados en modo de unión II.

En la Figura 22 se observan los dos diferentes modos de unión para los MCCs del (*S*)-atenolol con los programas AutoDock4.2 y Vina. Estos MCCs tiene el valor de energía libre de unión más negativo de todos los MCCs encontrados para el (*S*)-atenolol. ADOS3 y ADOS10 fueron encontrados con AutoDock4.2 mientras que OS3 y OS6 se encontraron con el programa Vina. ADOS3 y OS3 se encuentran orientados en modo de unión I mientras que ADOS10 y OS6 se orientan en modo de unión II.

En las Figura 21 y Figura 22 se puede observar que con los dos programas, en el modo de unión II el anillo feniletanamida del atenolol se encuentra ubicado hacia la parte de afuera del sitio activo y la parte isopropilamina hacia la parte interior del

sitio activo. Las demás imágenes de los modos de unión de los MCCs se encuentran en el Apéndice C.

Figura 21. Modos de unión para los programas AutoDock4.2 (arriba) y Vina (abajo) para el (*R*)-atenolol. ADOR3 Y OR6 están orientados en modo de unión I y ADOR16 y OR1 se orientan en modo de unión II.

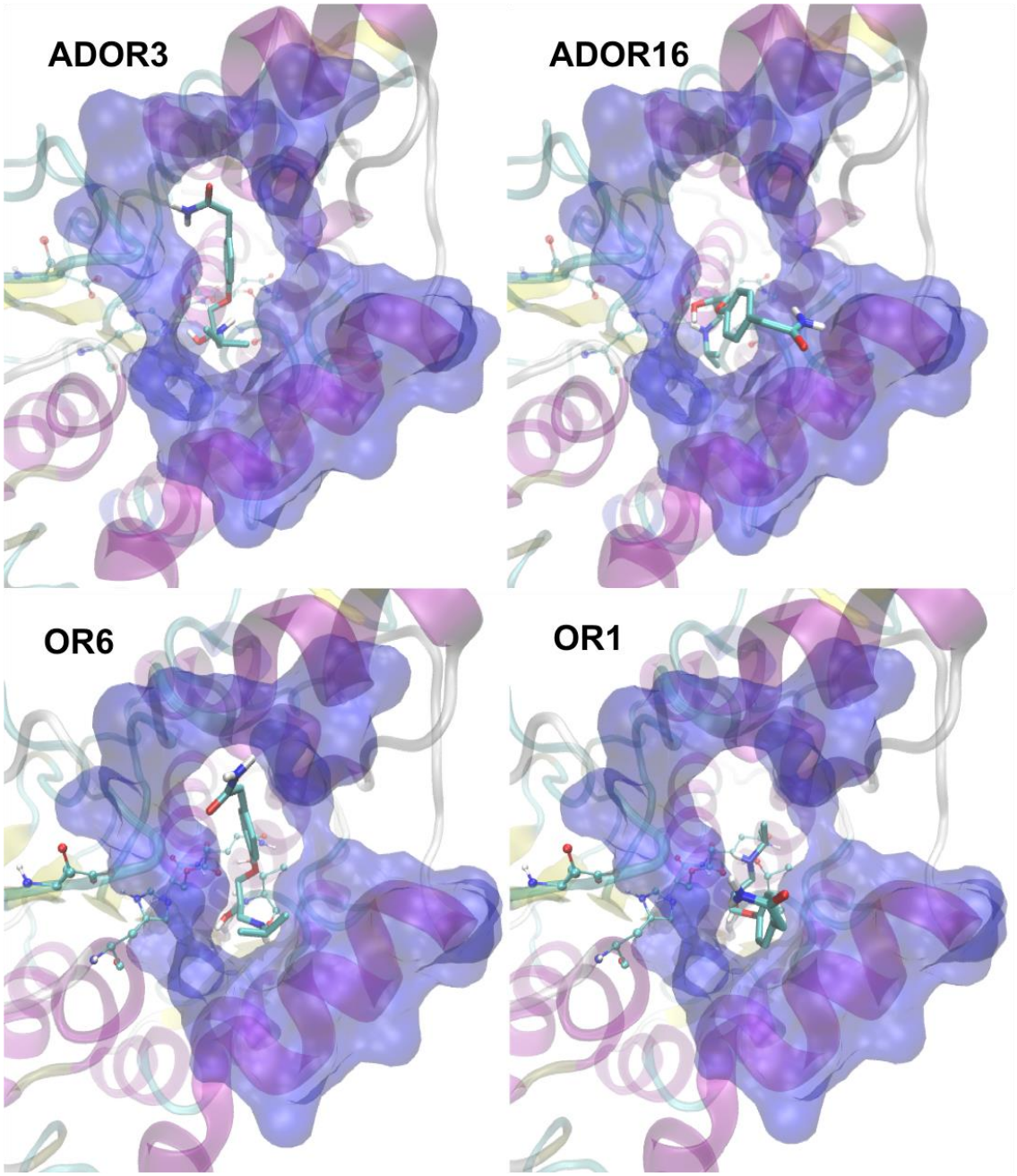
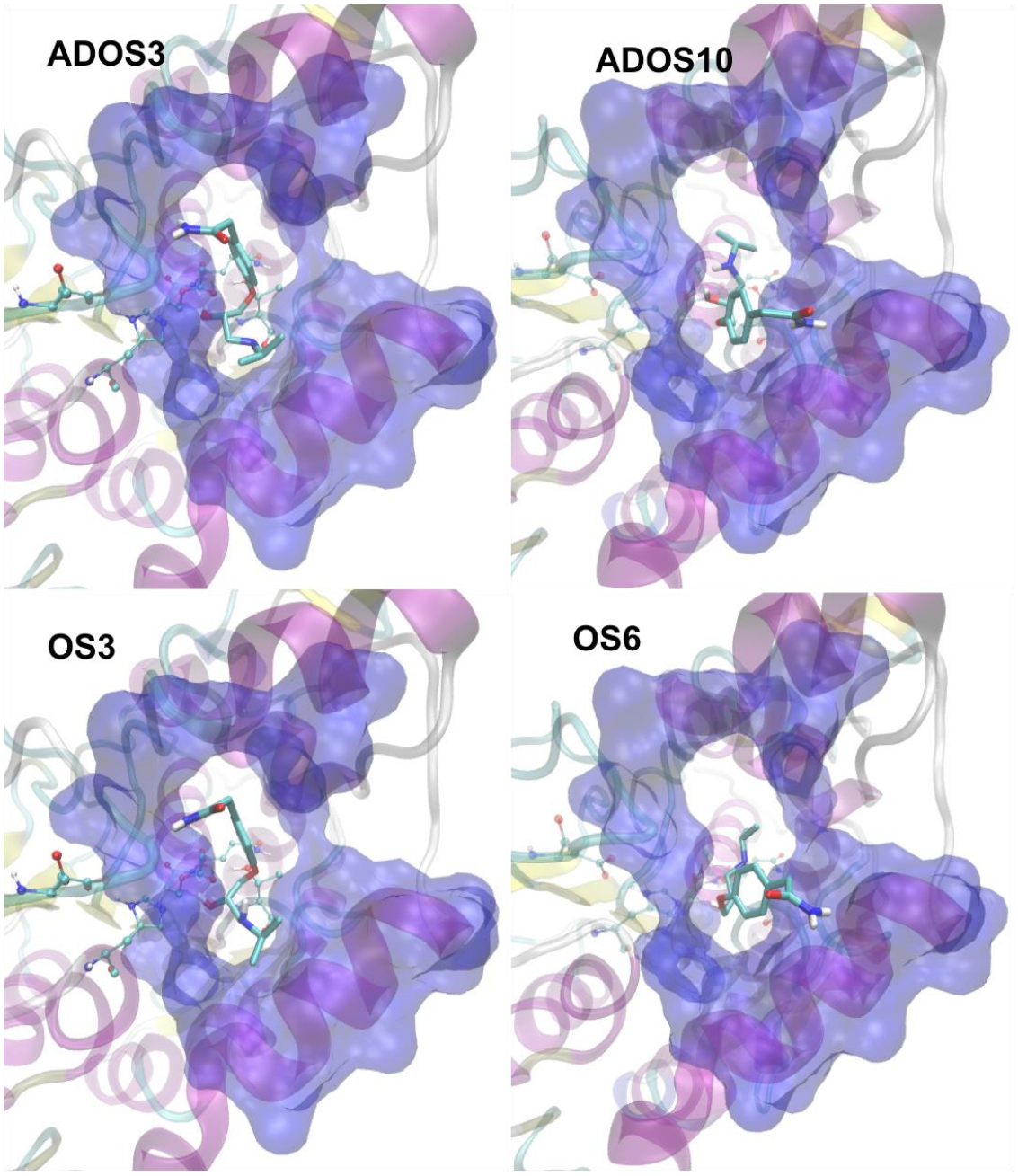


Figura 22. Modos de unión para los programas AutoDock4.2 (arriba) y Vina (abajo) para el (*S*)-atenolol. ADOS3 Y OS3 están en modo de unión I y ADOS10 y OS6 se ubican en modo de unión II.



# 4. CONCLUSIONES

El uso de diferentes programas de acoplamiento, sea AutoDock4.2 o Vina, da como resultado un número similar de MCCs en los resultados del acoplamiento molecular de la reacción de acilación del (*R,S*)-atenolol con CalB de modo que es posible utilizar cualquiera de los dos programas en esta reacción.

Los valores de la energía libre de afinidad calculados con el programa Vina son más negativos que los calculados con el programa AutoDock4.2 esto puede ser debido a las diferencias que presentan los programas de acuerdo a la cantidad de enlaces rotables en el sustrato, en su función de puntuación diferente o en la forma de búsqueda global que utiliza el programa.

Se encontró que los dos modos de unión predichos para el (*R,S*)-atenolol en el sitio activo de CalB se encuentran con AutoDock4,2 y con Vina. Estos modos de unión dependen de la orientación del anillo feniletanamida del atenolol en el sitio activo de CalB.

Se encontró que los MCCs obtenidos con los programas AutoDock4.2 y Vina, presentan puentes de hidrógeno entre los residuos aminoacídicos Glu188 e Ile189 con el grupo amido de la parte feniletanadamida del atenolol ayudando a estabilizar el atenolol en el sitio activo de CalB.

El estudio muestra que para poder comprender la enantioselectividad de CalB con el (*R,S*)-atenolol es necesario realizar un estudio completo de la reacción donde se puedan ver las demás especies químicas participantes en la reacción debido a que los MCCs no muestran cual enantiómero es favorecido en la acilación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. Lindholm, L. H., Carlberg, B. & Samuelsson, O. Should beta blockers remain first choice in the treatment of primary hypertension? A meta-analysis. *Lancet Lond. Engl.* **366,** 1545–1553 (2005).

2. Zelaszczyk, D. & Kiec-Kononowicz, K. Biocatalytic Approaches to Optically Active β-Blockers. *Curr. Med. Chem.* **14,** 53–65 (2007).

3. Margolin, A. L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enzyme Microb. Technol.* **15,** 266–280 (1993).

4. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. (Springer Berlin Heidelberg, 2004). at <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-18537-3>

5. Ghanem, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* **63,** 1721–1754 (2007).

6. Uppenberg, J. *et al.* Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from Candida antarctica reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry (Mosc.)* **34,** 16838–16851 (1995).

7. Li, W. *et al.* Molecular modeling study of chiral separation and recognition mechanism of β-adrenergic antagonists by capillary electrophoresis. *Int. J. Mol. Sci.* **13,** 710–725 (2012).

8. Escorcia, A. M., Molina, D., Daza, M. C. & Doerr, M. Acetylation of (*R,S*)-propranolol catalyzed by Candida antarctica lipase B: An experimental and computational study. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **98,** 21–29 (2013).

9. De Oliveira, E. B. *et al.* A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by Candida antarctica lipase B. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **59,** 96–105 (2009).

10. Haeffner, F., Norin, T. & Hult, K. Molecular modeling of the enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterification reactions. *Biophys. J.* **74,** 1251–1262 (1998).

11. Huang, S.-Y., Grinter, S. Z. & Zou, X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* **12,** 12899–12908 (2010).

12. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31,** 455–461 (2010).

13. Escorcia, A. M., Daza, M. C. & Doerr, M. Computational study of the enantioselectivity of the O-acetylation of (*R,S*)-propranolol catalyzed by Candida

antarctica lipase B. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **108,** 21–31 (2014).

14. Jonathan Avila Torra, Martha Cecilia Daza Espinosa, Markus H. Oliver Doerr & Andrés Mauricio Escorcia Cabrera. *COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATO EN LA REACCIÓN DE ACILACIÓN DE (R,S)-ATENOLOL CATALIZADA POR LIPASA B DE CANDIDA ANTARCTICA: UN ESTUDIO COMPUTACIONAL.* (2015).

15. Janice Smith. *Organic Chemistry*. (McGraw-Hill Education, 2013).

16. Brown T, LeMay H, Bursten B & Burdge J. *Química la ciencia central.* (Pearson Educación, 2004).

17. Camps García, P., Vázquez cruz, S. & Escolano Mirón, C. *Química farmacéutica I. Tomo 1.* (Edicions Universitat Barcelona, 2010).

18. Ghanem, A. & Aboul-Enein, H. Y. Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality* **17,** 1–15 (2005).

19. Mª, C. V. R., Angeles, F. M., Concepción, L. G., Marta, P. T. & Dolores, S. M. G. M. *QUÍMICA BIOORGÁNICA Y PRODUCTOS NATURALES*. (Editorial UNED, 2013).

20. Fersht, A. *Estructura y mecanismo de los enzimas*. (Reverte, 1980).

21. Alizadeh, T. Enantioseparation of atenolol using chiral ligand-exchange chromatography on C8 column. *Sep. Purif. Technol.* **118,** 879–887 (2013).

22. Pearson, A. A., Gaffney, T. E., Walle, T. & Privitera, P. J. A stereoselective central hypotensive action of atenolol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250,** 759–763 (1989).

23. Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S. & Jones, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica. *Structure* **2,** 293–308 (1994).

24. Ganjalikhany, M. R., Ranjbar, B., Taghavi, A. H. & Tohidi Moghadam, T. Functional Motions of Candida antarctica Lipase B: A Survey through Open-Close Conformations. *PLoS ONE* **7,** e40327 (2012).

25. Öhrner, N., Orrenius, C., Mattson, A., Norin, T. & Hult, K. Kinetic resolutions of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the Candida antarctica lipase B. *Enzyme Microb. Technol.* **19,** 328–331 (1996).

26. A. L. Lehninger, D. L. Nelson & M. M. Cox. *Lehninger Principles os Biochemistry*. (Omega, 2005).

27. Johnson, K. A. & Goody, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper. *Biochemistry (Mosc.)* **50,** 8264–8269 (2011).

28. *Computer Simulation of Biomolecular Systems*. (Springer Netherlands, 1997). at <http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-1120-3>

29. Abreu, R. M., Froufe, H. J., Queiroz, M. J. R. & Ferreira, I. C. MOLA: a bootable, self-configuring system for virtual screening using AutoDock4/Vina on computer clusters. *J. Cheminformatics* **2,** 10 (2010).

30. Aguirre Valderrama, A. Estudio mecanocuántico, docking y dinámica molecular de tioazúcares como inhibidores de la proteína fucosidasa: algoritmos para el análisis conformacional y programa para el cálculo de constantes de acoplamientos vecinales (CAL3JHH). (2011). at <http://www.tesisenred.net/handle/10803/16939>

31. Andrew R. Leach. *MOLECULAR MODELLING PRINCIPLES AND APPLICATIONS.* (Pearson Education, 2001).

32. Sousa, S. F., Fernandes, P. A. & Ramos, M. J. Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins* **65,** 15–26 (2006).

33. Chang, M. W., Ayeni, C., Breuer, S. & Torbett, B. E. Virtual Screening for HIV Protease Inhibitors: A Comparison of AutoDock 4 and Vina. *PLoS ONE* **5,** e11955 (2010).

34. Morris, G. M. *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **19,** 1639–1662 (1998).

35. Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30,** 2785–2791 (2009).

36. Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J. & Goodsell, D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.* **28,** 1145–1152 (2007).

37. Morris, G. M. *et al.* Automated docking with protein flexibility in the design of femtomolar 'click chemistry' inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Chem. Inf. Model.* **53,** 898–906 (2013).

38. Ruth Huey, Garrett M. Morris & Stefano Forli. Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A Tutorial. (2012). at <http://autodock.scripps.edu/faqs-help/tutorial/using-autodock-4-with-autodocktools/2012_ADTtut.pdf>

39. Shirin Shahsavand & Boris Steipe. Protein-Ligand Docking Using AutoDock 4. (2011).

40. Takwa, M. *Lipase Specificity and Selectivity [Elektronisk resurs] : Engineering, Kinetics and Applied Catalysis*. (KTH, 2010). at <http://kth.diva-

portal.org/smash/get/diva2:355255/FULLTEXT01.pdf>

41. Krüger, D. M., Jessen, G. & Gohlke, H. How Good Are State-of-the-Art Docking Tools in Predicting Ligand Binding Modes in Protein–Protein Interfaces? *J. Chem. Inf. Model.* **52,** 2807–2811 (2012).

42. Leach, A. R. & Gillet, V. J. *An Introduction to Chemoinformatics*. (Springer Science & Business Media, 2007).

43. Yuriev, E., Agostino, M. & Ramsland, P. A. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. *J. Mol. Recognit. JMR* **24,** 149–164 (2011).

44. Emrah Atilgan & Jianjun Hu. Improving Protein Docking Using Sustainable Genetic Algorithms. **3,** 248–255 (2011).

45. Garrett M. Morris, David S. Goodsell, Michael E. Pique, William 'Lindy' Lindstrom, Ruth Huey, Stefano Forli, William E. Hart, Scott Halliday, Rik Belew and Arthur J. Olson. User Guide AutoDock Version 4.2 Updated for version 4.2.5 Automated Docking of Flexible Ligands to Flexible Receptors. (2012). at <http://autodock.scripps.edu/faqs-help/manual/autodock-4-2-user-guide/AutoDock4.2_UserGuide.pdf>

46. Schulz-Gasch, T. & Stahl, M. Scoring functions for protein–ligand interactions: a critical perspective. *Drug Discov. Today Technol.* **1,** 231–239 (2004).

47. Fuhrmann, J. Gradient based optimization in ligand-receptor docking. (2009). at <http://scidok.sulb.uni-saarland.de/volltexte/2009/2564/>

48. Andrés Mauricio Escorcia Cabrera. Enantioselective and Chemoselective Acylation of (*R,S*)-Propranolol Catalyzed by Candida antarctica Lipase B: A Theoretical and Experimental Approach. (Universidad Industrial de Santander, 2014).

49. Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A. & Baker, N. A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **32,** W665–667 (2004).

50. Bas, D. C., Rogers, D. M. & Jensen, J. H. Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes. *Proteins* **73,** 765–783 (2008).

51. Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **7,** 525–537 (2011).

52. Mackerell, A. D., Feig, M. & Brooks, C. L. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics

simulations. *J. Comput. Chem.* **25,** 1400–1415 (2004).

53. MacKerell, A. D. *et al.* All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B* **102,** 3586–3616 (1998).

54. Brooks, B. R. *et al.* CHARMM: The biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* **30,** 1545–1614 (2009).

55. De Oliveira, E. B. *et al.* An approach based on Density Functional Theory (DFT) calculations to assess the Candida antarctica lipase B selectivity in rutin, isoquercitrin and quercetin acetylation. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **66,** 325–331 (2010).

56. Ferrari, F. *et al.* Molecular rules for chemo- and regio-selectivity of Candida antarctica lipase B in peptide acylation reactions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **101,** 122–132 (2014).

## BIBLIOGRAFÍA


ABREU, R. M. *et al*. MOLA: a bootable, self-configuring system for virtual screening using AutoDock4/Vina on computer clusters. En: *J. Cheminformatics.* 2012, vol 2**,** 10 (2010).

AGUIRRE VALDERRAMA, A. Estudio mecanocuántico, docking y dinámica molecular de tioazúcares como inhibidores de la proteína fucosidasa: algoritmos para el análisis conformacional y programa para el cálculo de constantes de acoplamientos vecinales (CAL3JHH). Tesis Univ. Granada. Departamento de Química Orgánica. Editorial de la Universidad de Granada, 2009.

ALIZADEH, T. Enantioseparation of atenolol using chiral ligand-exchange chromatography on C8 column. En: *Sep. Purif. Technol.* 2013, vol 118, 879–887.

AVILA TORRA, Johathan *et al.* COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATO EN LA REACCIÓN DE ACILACIÓN DE (*R,S*)-ATENOLOL CATALIZADA POR LIPASA B DE CANDIDA ANTARCTICA: UN ESTUDIO COMPUTACIONAL. Trabajo de grado Químico. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. 2015. 74 p.

BROOKS, B.R. et al. CHARMM: The biomolecular simulation program. En: J. Comput. Chem. 2009. Vol 30, no. 10, pp 1545-1614.

BROWN, T. *et al.* Química la ciencia central. Pearson Educación, 2004.

CAMPS GARCÍA, P. et al. Universitat de Barcelona Departament de Farmacologia i Química Terapèutica. Química farmaceútica I. Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona, 2009.

CHANG, M. et al. Virtual Screening for HIV Protease Inhibitors: A Comparison of AutoDock 4 and Vina. En: PLoS ONE 5, 2012, e11955.

CLARAMUNT VALLESPÍ, Rosa Mª. *et al.* QUÍMICA BIOORGÁNICA Y PRODUCTOS NATURALES. UNED. UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACION A DISTANCIA. 2013 pp 346. ISBN 9788436267945.

DE OLIVEIRA, E. B. et al. A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by Candida antarctica lipase B. En: J. Mol. Catal. B Enzym. Jul. 2009. vol. 59, no. 1–3, pp. 96–105.

DOLINSKY, T. et al. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. En: Nucleic Acids Res. 2004, vol 32, W665–W667.

ESCORCIA, A. Enantioselective and Chemoselective Acylation of (*R,S*)-Propranolol Catalyzed by Candida antarctica Lipase B: A Theoretical and Experimental Approach. Tesis de Doctorado en Química. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. 2015.

ESCORCIA, A.M. et al. Acetylation of (*R,S*)-propranolol catalyzed by Candida antarctica lipase B: An experimental and computational study. En: Journal of Molecular Catalysis Enzymatic. Dec, 2013. vol. 98, pp. 21–29.

ESCORCIA, A. et al. Computational study of the enantioselectivity of the O-acetylation of (*R,S*)-propranolol catalyzed by Candida antarctica lipase B. En: J. Mol. Catal. B Enzym. 2014, vol 108, 21–31.

FABER, Frank. *Biotransformations in Organic Chemistry*. A Textbook. 5 Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2004. 454. ISBN 978-3-642-18537-3.

FERRARI, F. et al. Molecular rules for chemo- and regio-selectivity of Candida antarctica lipase B in peptide acylation reactions. En: J. Mol. Catal. B Enzym. 2014, vol 101, 122–132.

FERSHT, A. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. W.H. Freeman, 1999.

GANJALIKHANY, M. R., *et al.* Functional Motions of Candida antarctica Lipase B: A Survey through Open-Close Conformations. En: *PLoS ONE*. 2012, vol 7**,** e40327.

GARRETT M, M. et al. User Guide AutoDock Version 4.2. Updated for version 4.2.5. Automated Docking of Flexible Ligands to Flexible Receptors. (2012).

GHANEM, A & ABOUL-ENEIN, H. Y. Application of lipases in kinetic resolution of racemates. En: *Chirality*. 2005, vol 17**,** 1–15.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. En: *Tetrahedron.* 2007, vol 63, 1721–1754.

HÆFFNER, F. et al. Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Transesterification Reactions. En: Biophys. J. 1998, vol 74, 1251–1262.

HUANG, S-Y; GRINTER, S. Z. y ZOU, X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions. En: *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* . 2010. vol 12**,** 12899–12908.

HUEY, R. *et al.* A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. En: *J. Comput. Chem.* 2007, vol 28, 1145–1152.

JOHNSON, K. A. & GOODY, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. En: Biochemistry (Mosc.). 2011, vol 50, 8264–

8269.

KRÜGER, D. M., JESSEN, G. & GOHLKE, H. How Good Are State-of-the-Art Docking Tools in Predicting Ligand Binding Modes in Protein–Protein Interfaces?. En: *J. Chem. Inf. Model.* 2012, vol 52, 2807–2811.

LEACH, Andrew R. Molecular Modelling Principles and Aplications. Pearson Education. Prentice Hall, 2001. pp 744.

LI, W. *et al.* Molecular modeling study of chiral separation and recognition mechanism of β-adrenergic antagonists by capillary electrophoresis. En: *Int. J. Mol. Sci.* 2012. vol 13**,** 710–725.

LINDHOLM, L. H; CALBERG, B. y SAMUELANNSON, O. Should beta blockers remain first choice in the treatment of primary hypertension? A meta-analysis. En: *Lancet Lond. Engl.* October 29 2005. vol 366**,** 1545–1553.

MACKERELL, A. D., FEIG, M. & BROOKS, C. L. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* 2004, Vol 25, 1400–1415.

MARGOLIN, A. L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. En: *Enzyme Microb. Technol.* 1993. vol 15**,** 266–280.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. En: J. Comput. Chem. 2009, vol 30, 2785–2791.

MORRIS, G. M. *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. En: *J. Comput. Chem.* 1998, vol 19, 1639–1662.

MORRIS, G. M. *et al.* Automated docking with protein flexibility in the design of femtomolar ‘click chemistry’ inhibitors of acetylcholinesterase. En: *J. Chem. Inf. Model.* 2013, vol 53, 898–906.

NELSON, D. L. et al.. Lehninger principios de bioquímica. Omega, 2005.

ÖHRNER, N. *et al*. Kinetic resolutions of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the Candida antarctica lipase B. En: *Enzyme Microb. Technol.* 1996, vol 19**,** 328–331.

OLSSON, M. H. M. et al. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. En: J. Chem. Theory Comput. 2011, vol 7, 525–537.

PEARSON, A. A. et al. A stereoselective central hypotensive action of atenolol. En: J. Pharmacol. Exp. Ther. Sep. 1989. vol. 250, no. 3, pp. 759–763.

SCHULZ-GASCH, T. & STAHL, M. Scoring functions for protein–ligand interactions: a critical perspective. En: *Drug Discov. Today Technol.* 2004, vol 1, 231–239.

SMITH, Janice. Organic Chemistry. McGraw-Hill; 3rd edition. January 8, 2010. pp. 1178.

SOUSA, S. F., FERNANDES, P. A. & RAMOS, M. J. Protein-ligand docking: current status and future challenges. En: *Proteins.* 2006, vol 65**,** 15–26.

TROTT, O. & OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. En: J. Comput. Chem. 2010, vol 31, 455-461.

UPPENBERG, J. et al. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from Candida antarctica reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. En: Biochemistry (Mosc.), 1995, vol 34, 16838–16851.

UPPENBERG, J. et al. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica. En: Struct. Lond. Engl. Apr. 1994. vol. 2, no. 4, pp. 293–308.

YURIEV, E. et al. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. En: J. Mol. Recognit. 2011, vol 24, 149–164.

ZELASZCZYK, D. and Kieć-Kononowicz, K. Biocatalytic approaches to optically active beta-blockers. En: Curr. Med. Chem. 2007. vol. 14, no. 1, pp. 53–65.

# ANEXOS

## Apéndice A

### Detalles computacionales - Parámetros CHARMM para la serina acetilada (SEA)

La topología para el residuo SEA (ver abajo) se creó removiendo un átomo de hidrógeno del grupo metilo del acetato de metilo (topppar_all22_prot_model.str, MAS) y reemplazando la cadena lateral de la serina (top_all27_prot_lipid.rtf, SER) por el resto de MAS. Para una descripción correcta del residuo SEA el nombre de algunos átomos que pertenecen a MAS y que poseen el mismo nombre que átomos de la serina fueron modificados (**C** por **CE**, **O** por **OE**). La carga del átomo de carbono C2 en MAS fue ajustada de -0.14 a -0.05 (este valor fue obtenido mediante la adición de la carga (0.09) del átomo de hidrógeno que fue removido en MAS). El átomo C2 fue asignado como un tipo de átomo CT2 (CH2) en lugar de CT3 (CH3):

**!!!!!!!!!!!!!!!!!!!! MAS TOPOLOGY !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!**

```
RESI MAS              0.00 !
GROUP
ATOM   C1     CT3   -0.17 !          H22
ATOM   C       CD     0.63 !           |
ATOM   OM    OS     -0.34 !  H21-C2-H23
ATOM   C2     CT3  -0.14 !            \
ATOM   O       OB    -0.52 !           OM
ATOM   H11   HA     0.09 !            /
ATOM   H12   HA     0.09 !     O=C
ATOM   H13   HA     0.09 !          |
ATOM   H21   HA     0.09 !  H11-C1-H13
ATOM   H22   HA     0.09 !          |
ATOM   H23   HA     0.09 !         H12
BOND   C1    C       C   OM   OM    C2
DOUBLE     C   O
BOND   C1  H11  C1  H12  C1  H13
```

```
BOND   C2  H21  C2  H22  C2  H23
IMPR    C  C1  OM  O
```

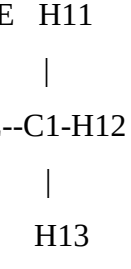
**!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!SERINE TOPOLOGY!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!**

```
RESI SER                0.00
GROUP
ATOM   N      NH1    -0.47 !
ATOM   HN      H       0.31 !     |
ATOM   CA      CT1    0.07 ! HN-N       HB1
ATOM   HA      HB     0.09 !    |            |
GROUP                          ! HA-CA--CB--OG
ATOM   CB      CT2    0.05 !         |       |       \
ATOM   HB1     HA     0.09 !    O=C      HB2  HG1
ATOM   HB2     HA     0.09 ! |
ATOM   OG      OH1 -0.66
ATOM   HG1     H       0.43
GROUP
ATOM   C        C       0.51
ATOM   O        O      -0.51
BOND  CB CA  OG CB  N HN  N CA
BOND C CA  C +N  CA HA  CB HB1
BOND CB HB2  OG HG1
DOUBLE O C
IMPR N -C  CA HN  C CA  +N O
CMAP -C N  CA C  N CA  C +N
DONOR  HN N
DONOR  HG1 OG
ACCEPTOR  OG
```

ACCEPTOR  O C

**!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!SEA TOPOLOGY!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!**

RESI SEA  0.00
GROUP
ATOM  N  NH1  -0.47
ATOM  HN  H  0.31 !
ATOM  CA  CT1  0.07 !
ATOM  HA  HB  0.09 !
GROUP
ATOM  C1  CT3  -0.17 !
ATOM  CE  CD  0.63 !
ATOM  OM  OS  -0.34 !
ATOM  C2  CT2  -0.05
ATOM  OE  OB  -0.52
ATOM  H11  HA  0.09
ATOM  H12  HA  0.09
ATOM  H13  HA  0.09
ATOM  H21  HA  0.09
ATOM  H23  HA  0.09
GROUP
ATOM  C  C  0.51
ATOM  O  O  -0.51
BOND  C2 CA  OM C2  N HN  N CA
BOND  C CA  C +N  CA HA  C2 H21
BOND  C2 H23  OM CE  C1 CE
BOND  C1 H11  C1 H12  C1 H13



DOUBLE  O C  CE OE

IMPR  N -C CA HN  C CA +N O  CE C1 OM OE

CMAP  -C N CA C  N CA C +N

DONOR  HN N

ACCEPTOR  OM

ACCEPTOR  O C

ACCEPTOR  OE CE

Los parámetros ausentes para describir el enlace OS-CT2 y el ángulo OS-CT2-CT1 en SEA fueron asignados en analogía a los parámetros para OSL-CTL2-CTL1 y OSL-CTL2 en lípidos (par_all_27_prot_lipid.prm).

La información dada anteriormente ha sido tomada de Escorcia et al. (2013) [8]

## Apéndice B

### Tablas complementarias a la sección de resultados.

En las tablas B.1. a B.8. se muestran los MCCs que cumplen con los criterios para llevar a cabo la reacción con sus respectivos valores distancias interatómicas importantes para la catalisis. Las tablas B.4. a B.8. fueron tomadas de [14] con modificaciones realizadas por la autora. La energía libre de unión en las tablas es nombrada como Afinidad.

Tabla B. 1. Distancias interatómicas en los MCCs del (*R*,*S*)-atenolol acoplados con Ace01 obtenidos con el programa AutoDock4.2.

| Conformación de la enzima | Sustrato | Nombre | Sub1:O3-Sea105:CE | Sub1:H22-HSD224:NE2 | Afinidad (kcal/mol) |
|---|---|---|---|---|---|
| Ace01 | (*R*)-atenolol | ADOR1 | 3,343 | 3,963 | -4,14 |
| | | ADOR2 | 3,401 | 3,922 | -4,45 |
| | | ADOR3 | 3,334 | 3,858 | -4,52 |
| | | ADOR4 | 3,735 | 3,463 | -4,10 |
| | | ADOR5 | 3,783 | 3,744 | -4,48 |
| | | ADOR6 | 3,614 | 2,800 | -3,98 |
| | | ADOR7 | 3,824 | 3,334 | -3,93 |
| | | ADOR8 | 3,767 | 3,163 | -3,99 |
| | | ADOR9 | 3,448 | 2,846 | -4,05 |
| | | ADOR10 | 3,354 | 3,731 | -4,23 |
| | (*S*)-atenolol | ADOS1 | 3,636 | 3,071 | -4,08 |
| | | ADOS2 | 3,427 | 3,730 | -2,60 |
| | | ADOS3 | 3,757 | 2,941 | -4,17 |
| | | ADOS4 | 3,720 | 2,124 | -3,58 |
| | | ADOS5 | 3,786 | 3,746 | -2,94 |
| | | ADOS6 | 3,714 | 2,225 | -3,03 |
| | | ADOS7 | 3,535 | 2,282 | -3,19 |

Tabla B. 2. Distancias interatómicas en los MCCs del (*R,S*)-atenolol acoplados con Ace03 obtenidos con el programa AutoDock4.2.

| Conformación de la enzima | Sustrato | Nombre | Sub1:O3-Sea105:CE | Sub1:H22-HSD224:NE2 | Afinidad (kcal/mol) |
|---|---|---|---|---|---|
| Ace03 | (*R*)-atenolol | ADOR11 | 3,432 | 3,377 | -3,27 |
| | | ADOR12 | 3,009 | 2,079 | -4,7 |
| | | ADOR13 | 3,835 | 1,839 | -5,00 |
| | | ADOR14 | 3,836 | 2,703 | -4,14 |
| | | ADOR15 | 3,698 | 3,005 | -4,32 |
| | | ADOR16 | 3,891 | 2,783 | -4,21 |
| | | ADOR17 | 3,599 | 3,137 | -4,16 |
| | | ADOR18 | 3,490 | 2,343 | -4,11 |
| | (*S*)-atenolol | ADOS8 | 3,272 | 3,543 | -3,76 |
| | | ADOS9 | 3,213 | 3,240 | -3,49 |
| | | ADOS10 | 2,762 | 2,100 | -4,78 |
| | | ADOS11 | 3,562 | 3,797 | -4,82 |
| | | ADOS12 | 2,890 | 3,871 | -5,18 |
| | | ADOS13 | 3,221 | 3,243 | -3,82 |
| | | ADOS14 | 3,888 | 3,626 | -3,64 |
| | | ADOS15 | 2,946 | 3,996 | -4,77 |
| | | ADOS16 | 3,197 | 3,299 | -3,82 |
| | | ADOS17 | 3,045 | 3,150 | -3,57 |
| | | ADOS18 | 2,934 | 3,739 | -5,02 |
| | | ADOS19 | 3,189 | 3,258 | -3,81 |
| | | ADOS20 | 2,863 | 2,113 | -4,68 |

Tabla B. 3. Modos de unión para los MCCs obtenidos con Ace01 que cumplen los criterios de las distancias interatómicas y RMSD con el programa AutoDock4.2.

| Conformación de la enzima | Sustrato | Nombre | Afinidad (kcal/mol) | Modo de unión |
|---|---|---|---|---|
| **Ace01** | **(*R*)-atenolol** | ADOR1 | -4,14 | I |
| | | ADOR2 | -4,45 | I |
| | | ADOR3 | -4,52 | I |
| | | ADOR4 | -4,10 | I |
| | | ADOR5 | -4,48 | I |
| | | ADOR6 | -3,98 | I |
| | | ADOR7 | -3,93 | I |
| | | ADOR8 | -3,99 | I |
| | | ADOR9 | -4,05 | I |
| | | ADOR10 | -4,23 | I |
| | **(*S*)-atenolol** | ADOS1 | -4,08 | I |
| | | ADOS2 | -2,60 | II |
| | | ADOS3 | -4,17 | I |
| | | ADOS4 | -3,58 | I |
| | | ADOS5 | -2,94 | I |
| | | ADOS6 | -3,03 | II |
| | | ADOS7 | -3,19 | II |

Tabla B. 4. Modos de unión para los MCCs obtenidos con Ace03 que cumplen los criterios de las distancias interatómicas y RMSD con el programa AutoDock4.2.

| Conformación de la enzima | Sustrato | Nombre | Afinidad (kcal/mol) | Modo de unión |
|---|---|---|---|---|
| **Ace03** | **(*R*)-atenolol** | ADOR11 | -3,27 | I |
| | | ADOR12 | -4,7 | I |
| | | ADOR13 | -5,00 | I |
| | | ADOR14 | -4,14 | I |
| | | ADOR15 | -4,32 | I |
| | | ADOR16 | -4,21 | II |
| | | ADOR17 | -4,16 | I |
| | | ADOR18 | -4,11 | II |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | ADOS8 | -3,76 | II |
| | ADOS9 | -3,49 | II |
| | ADOS10 | -4,78 | II |
| | ADOS11 | -4,82 | I |
| | ADOS12 | -5,18 | I |
| | ADOS13 | -3,82 | II |
| **(*S*)-atenolol** | ADOS14 | -3,64 | II |
| | ADOS15 | -4,77 | I |
| | ADOS16 | -3,82 | II |
| | ADOS17 | -3,57 | II |
| | ADOS18 | -5,02 | I |
| | ADOS19 | -3,81 | II |
| | ADOS20 | -4,68 | II |

Tabla B. 5. Distancias interatómicas en los MCCs del (*R,S*)-atenolol acoplados con Ace01 obtenidos con el programa Vina.

| **Conformación de la enzima** | **Sustrato** | **Nombre** | **Sub1:O3-Sea105:CE** | **Sub1:H22-HSD224:NE2** | **Afinidad (kcal/mol)** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Ace01** | **(*R*)-atenolol** | OR1 | 3,90 | 3,53 | -4,9 |
| | | OR2 | 3,45 | 3,58 | -4,9 |
| | | OR3 | 4,04 | 3,59 | -4,8 |
| | | OR4 | 3,95 | 3,52 | -4,7 |
| | | OR5 | 3,66 | 4,22 | -4,6 |
| | | OR6 | 2,55 | 3,89 | -4,3 |
| | **(*S*)-atenolol** | OS1 | 3,55 | 3,57 | -4,5 |
| | | OS2 | 3,02 | 3,34 | -4,5 |
| | | OS3 | 2,68 | 3,63 | -4,5 |
| | | OS4 | 2,63 | 3,33 | -4,5 |
| | | OS5 | 3,33 | 3,67 | -4,3 |

Tabla B. 6. Distancias interatómicas en los MCCs del (*R,S*)-atenolol acoplados con Ace03 obtenidos con el programa AutoDock4.2.

| Conformación de la enzima | Sustrato | Nombre | Sub1:O3-Sea105:CE | Sub1:H22-HSD224:NE2 | Afinidad (kcal/mol) |
|---|---|---|---|---|---|
| Ace03 | (R)-atenolol | OR7 | 3,33 | 3,01 | -5,8 |
| | | OR8 | 4,00 | 3,34 | -5,8 |
| | | OR9 | 2,50 | 3,28 | -5,7 |
| | | OR10 | 3,19 | 3,43 | -5,7 |
| | | OR11 | 2,55 | 3,41 | -5,7 |
| | | OR12 | 4,01 | 3,39 | -5,7 |
| | | OR13 | 2,70 | 3,43 | -5,6 |
| | | OR14 | 2,57 | 3,24 | -5,6 |
| | | OR15 | 2,86 | 3,39 | -5,5 |
| | | OR16 | 2,46 | 3,38 | -5,5 |
| | | OR17 | 3,75 | 3,38 | -5,5 |
| | | OR18 | 2,54 | 3,36 | -5,4 |
| | | OR19 | 3,98 | 3,42 | -5,4 |
| | | OR20 | 3,15 | 3,30 | -5,1 |
| | (S)-atenolol | OS6 | 2,41 | 3,43 | -5,6 |
| | | OS7 | 2,72 | 3,31 | -5,5 |
| | | OS8 | 3,43 | 3,39 | -5,5 |
| | | OS9 | 2,67 | 3,35 | -5,4 |
| | | OS10 | 2,53 | 3,37 | -5,3 |
| | | OS11 | 3,42 | 3,42 | -5,3 |
| | | OS12 | 3,12 | 3,41 | -5,3 |
| | | OS13 | 3,11 | 3,42 | -5,2 |
| | | OS14 | 2,83 | 3,30 | -5,1 |
| | | OS15 | 3,25 | 3,34 | -5,1 |
| | | OS16 | 2,93 | 3,37 | -5,0 |
| | | OS17 | 3,31 | 3,40 | -5,0 |
| | | OS18 | 3,19 | 3,34 | -4,9 |
| | | OS19 | 3,47 | 3,38 | -4,9 |

Tabla B. 7. Modos de unión para los MCCs obtenidos con Ace01 que cumplen los criterios de las distancias interatómicas y RMSD con el programa Vina.

| Conformación de la enzima | Sustrato | Nombre | Afinidad (kcal/mol) | Modo de unión |
|---|---|---|---|---|
| Ace01 | (*R*)-atenolol | OR1 | -4,9 | II |
| | | OR2 | -4,9 | II |
| | | OR3 | -4,8 | II |
| | | OR4 | -4,7 | II |
| | | OR5 | -4,6 | I |
| | | OR6 | -4,3 | II |
| | (*S*)-atenolol | OS1 | -4,5 | II |
| | | OS2 | -4,5 | II |
| | | OS3 | -4,5 | I |
| | | OS4 | -4,5 | II |
| | | OS5 | -4,3 | II |

Tabla B. 8. Modos de unión para los MCCs obtenidos con Ace03 que cumplen los criterios de las distancias interatómicas y RMSD con el programa Vina.

| Conformación de la enzima | Sustrato | Nombre | Afinidad (kcal/mol) | Modo de unión |
|---|---|---|---|---|
| Ace03 | (*R*)-atenolol | OR7 | -5,8 | II |
| | | OR8 | -5,8 | II |
| | | OR9 | -5,7 | II |
| | | OR10 | -5,7 | II |
| | | OR11 | -5,7 | II |
| | | OR12 | -5,7 | II |
| | | OR13 | -5,6 | II |
| | | OR14 | -5,6 | II |
| | | OR15 | -5,5 | II |
| | | OR16 | -5,5 | II |
| | | OR17 | -5,5 | II |
| | | OR18 | -5,4 | II |
| | | OR19 | -5,4 | II |
| | | OR20 | -5,1 | II |
| | (*S*)-atenolol | OS6 | -5,6 | II |

| | | |
|---|---|---|
| OS7 | -5,5 | II |
| OS8 | -5,5 | II |
| OS9 | -5,4 | II |
| OS10 | -5,3 | II |
| OS11 | -5,3 | II |
| OS12 | -5,3 | II |
| OS13 | -5,2 | II |
| OS14 | -5,1 | II |
| OS15 | -5,1 | II |
| OS16 | -5,0 | II |
| OS17 | -5,0 | II |
| OS18 | -4,9 | II |
| OS19 | -4,9 | II |

## Apéndice C

**Imágenes complementarias de los MCCs obtenidos con el programa AutoDock4.2 y Vina en los diferentes modos de unión.**

Figura C. 1. Imágenes de los MCCs (ADOR1 hasta ADOR12) obtenidos para el (*R*)-atenolol con el programa AutoDock4.2.

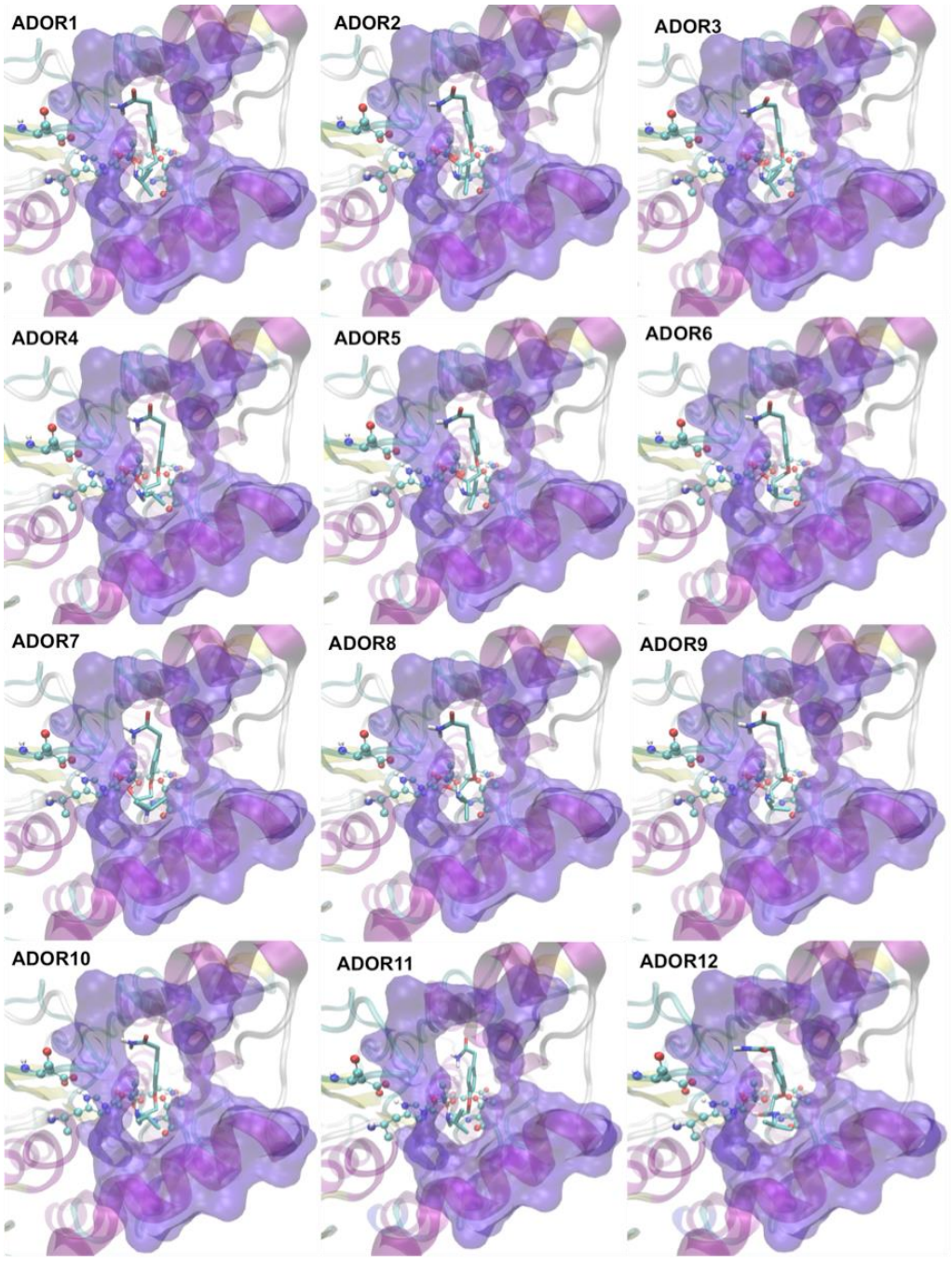


Figura C. 2. Imágenes de los MCCs (ADOR13 hasta ADOR18) obtenidos para el (*R*)-atenolol con el programa AutoDock4.2.

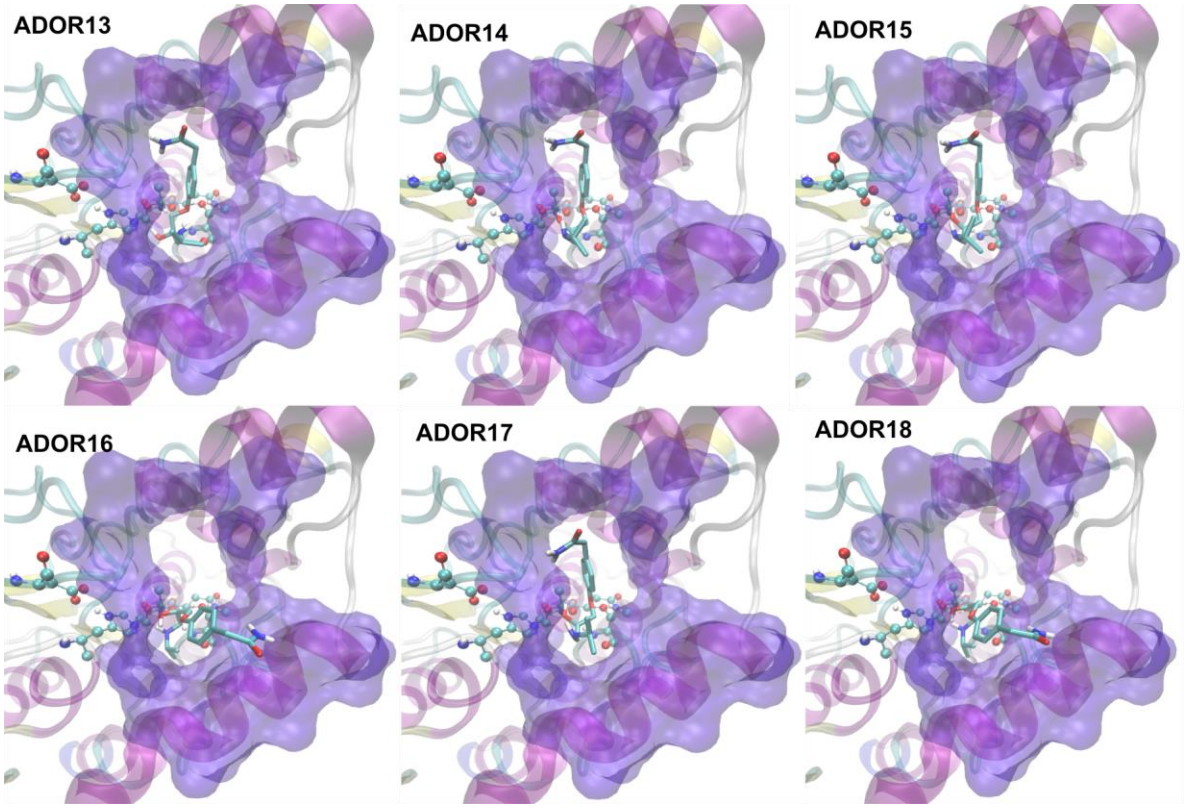


Figura C. 3. Imágenes de los MCCs (ADOS1 hasta ADOS12) obtenidos para el (*S*)-atenolol con el programa AutoDock4.2.

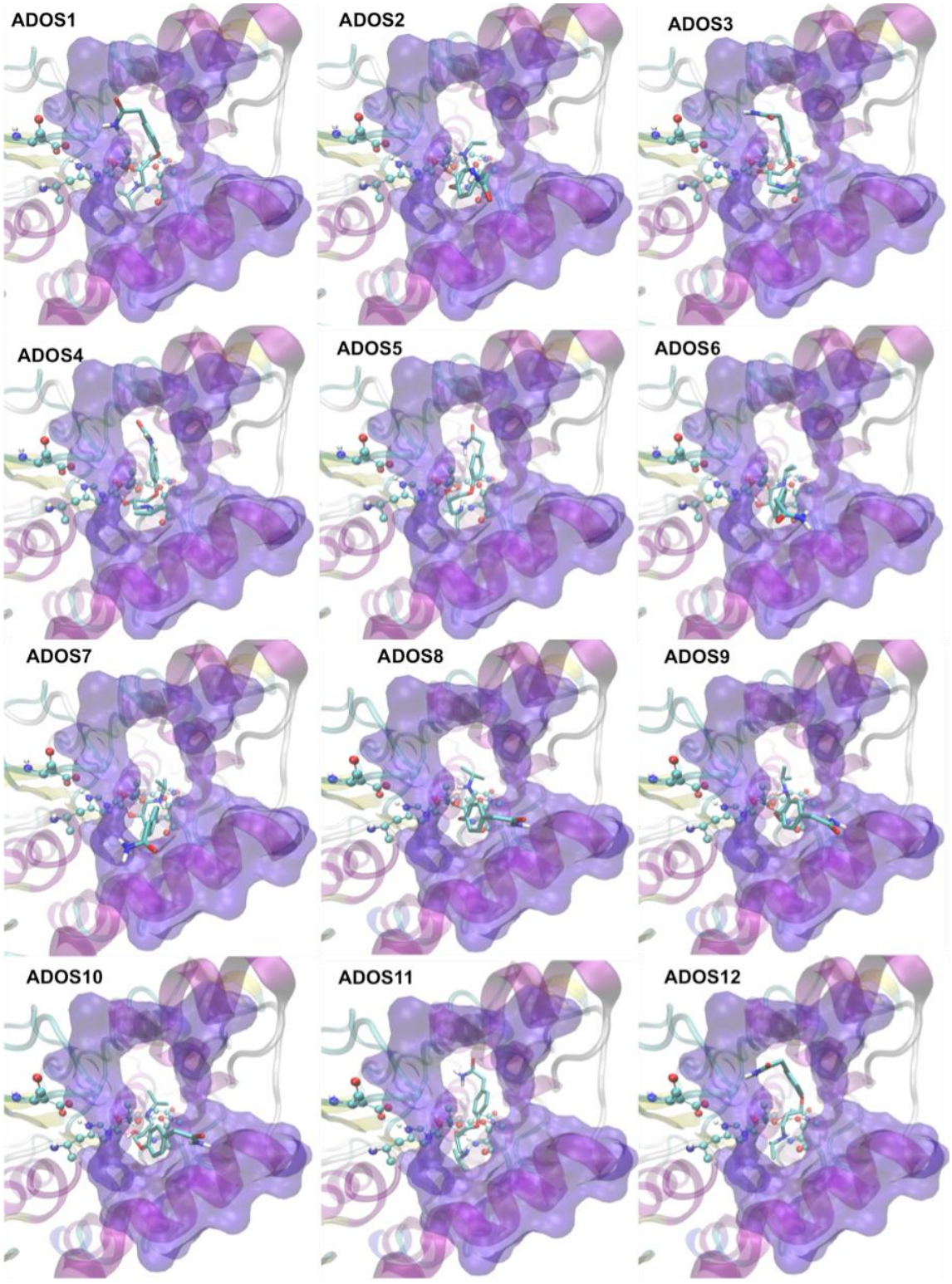


Figura C. 4. Imágenes para los MCCs (ADOS13 hasta ADOS20) obtenidos para el (*S*)-atenolol con el programa AutoDock4.2.

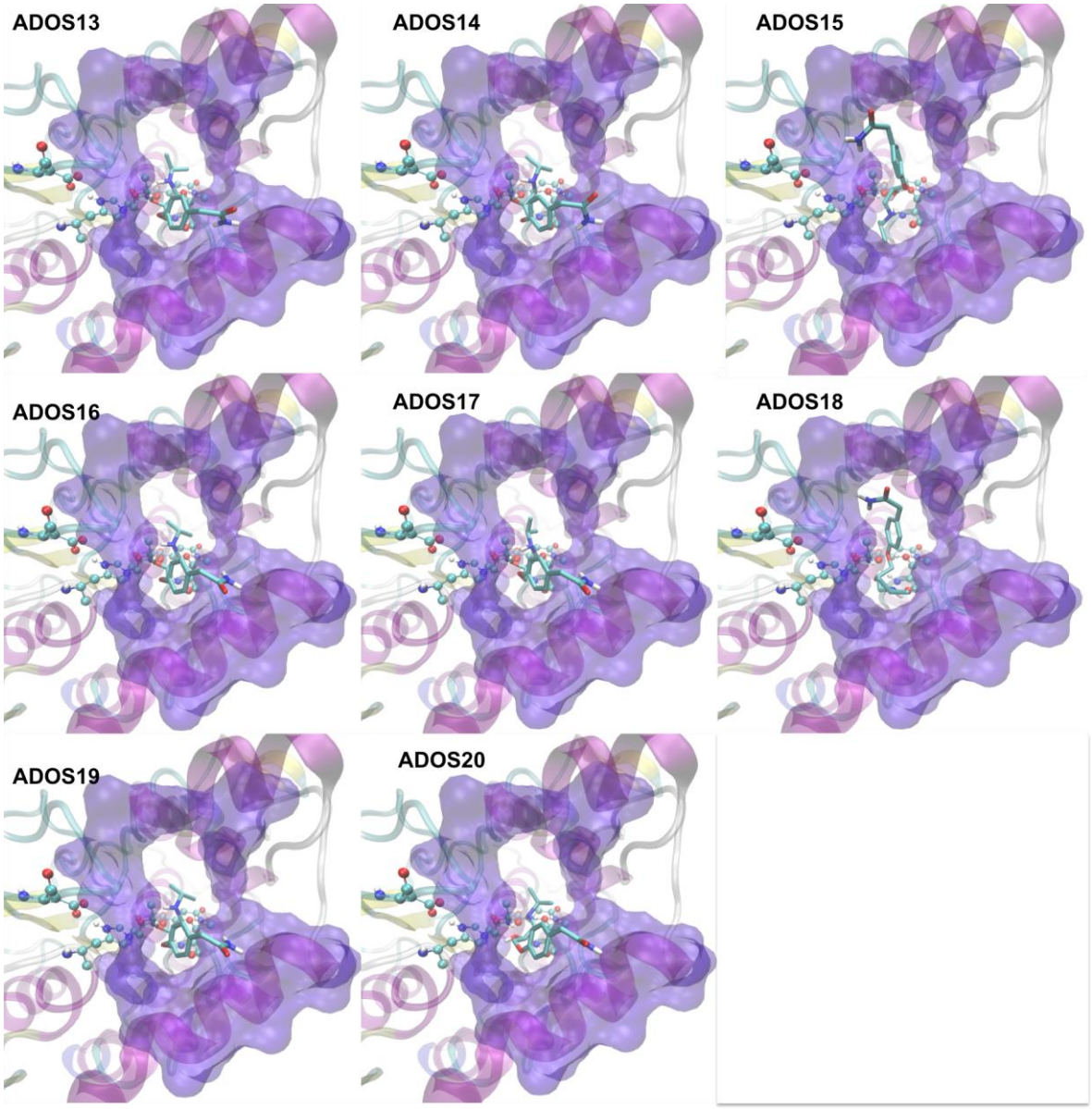


Figura C. 5. Imágenes de los MCCs (OR1 hasta OR12) obtenidos para el (*R*)-atenolol con el programa Vina.

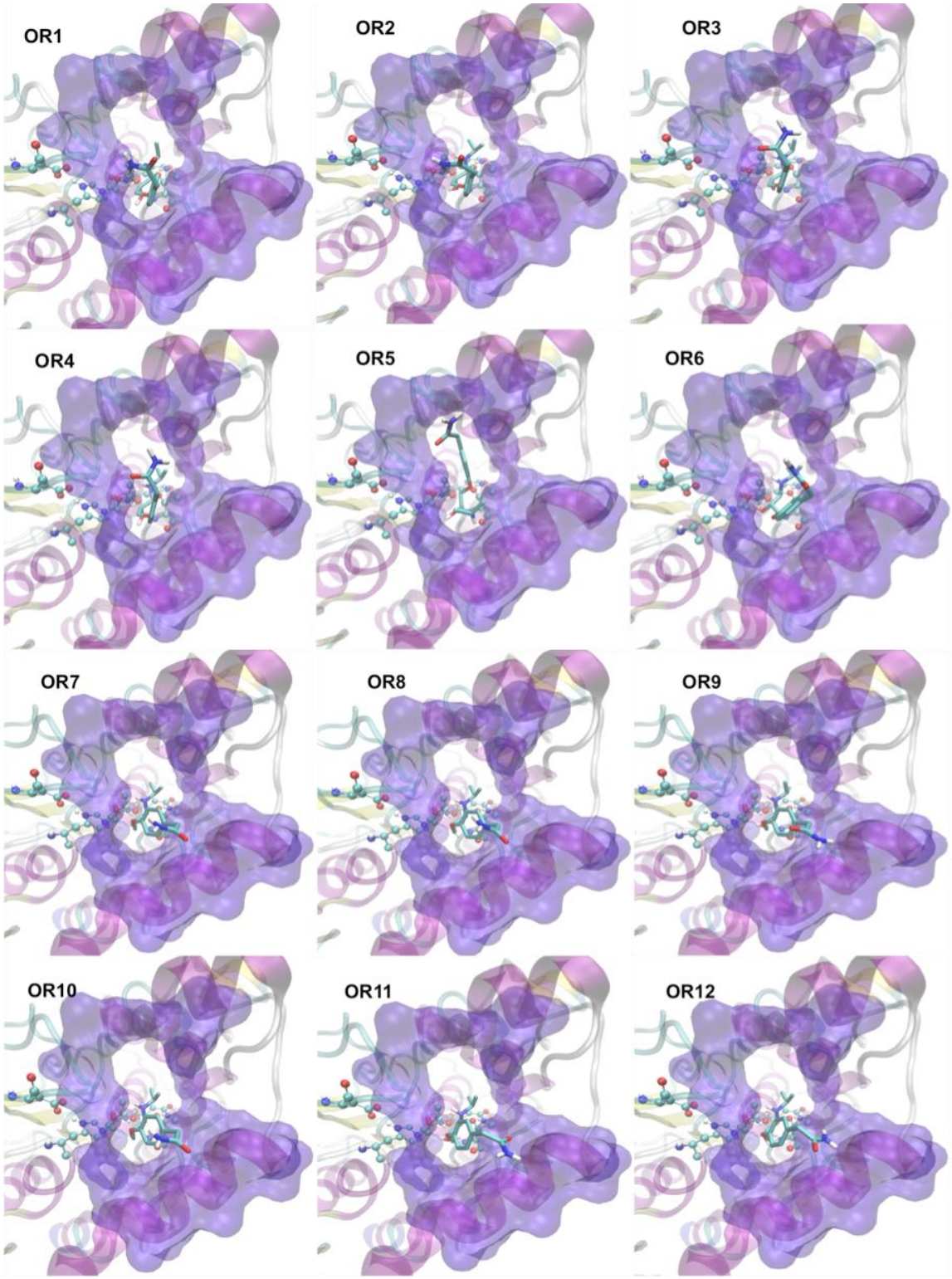


Figura C. 6. Imágenes de los MCCs (OR13- hasta OR20) obtenidos para el (*R*)-atenolol con el programa Vina.

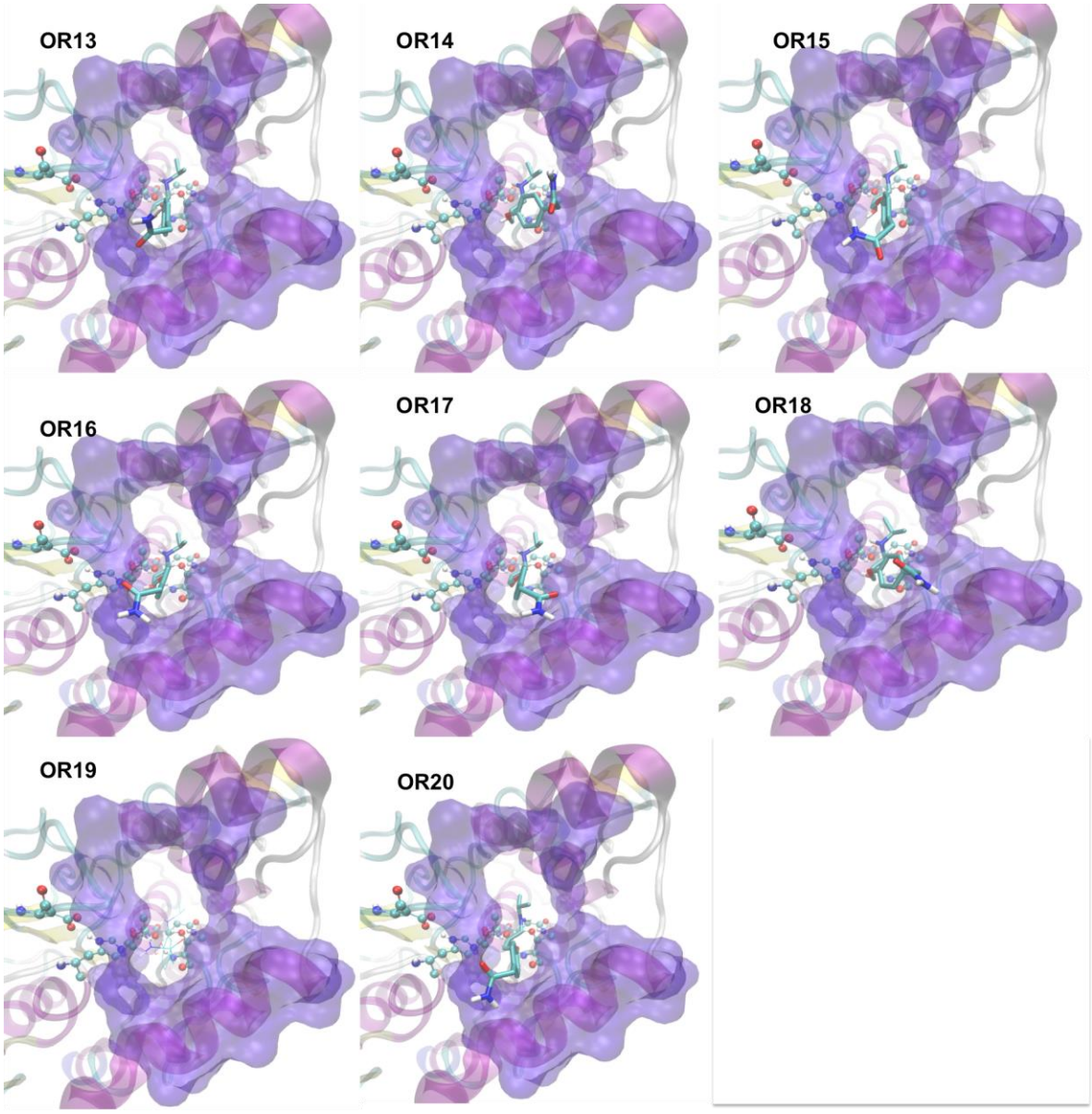


Figura C. 7. Imágenes de los MCCs (OS1 hasta OS12) obtenidos para el (*S*)-atenolol con el programa Vina.

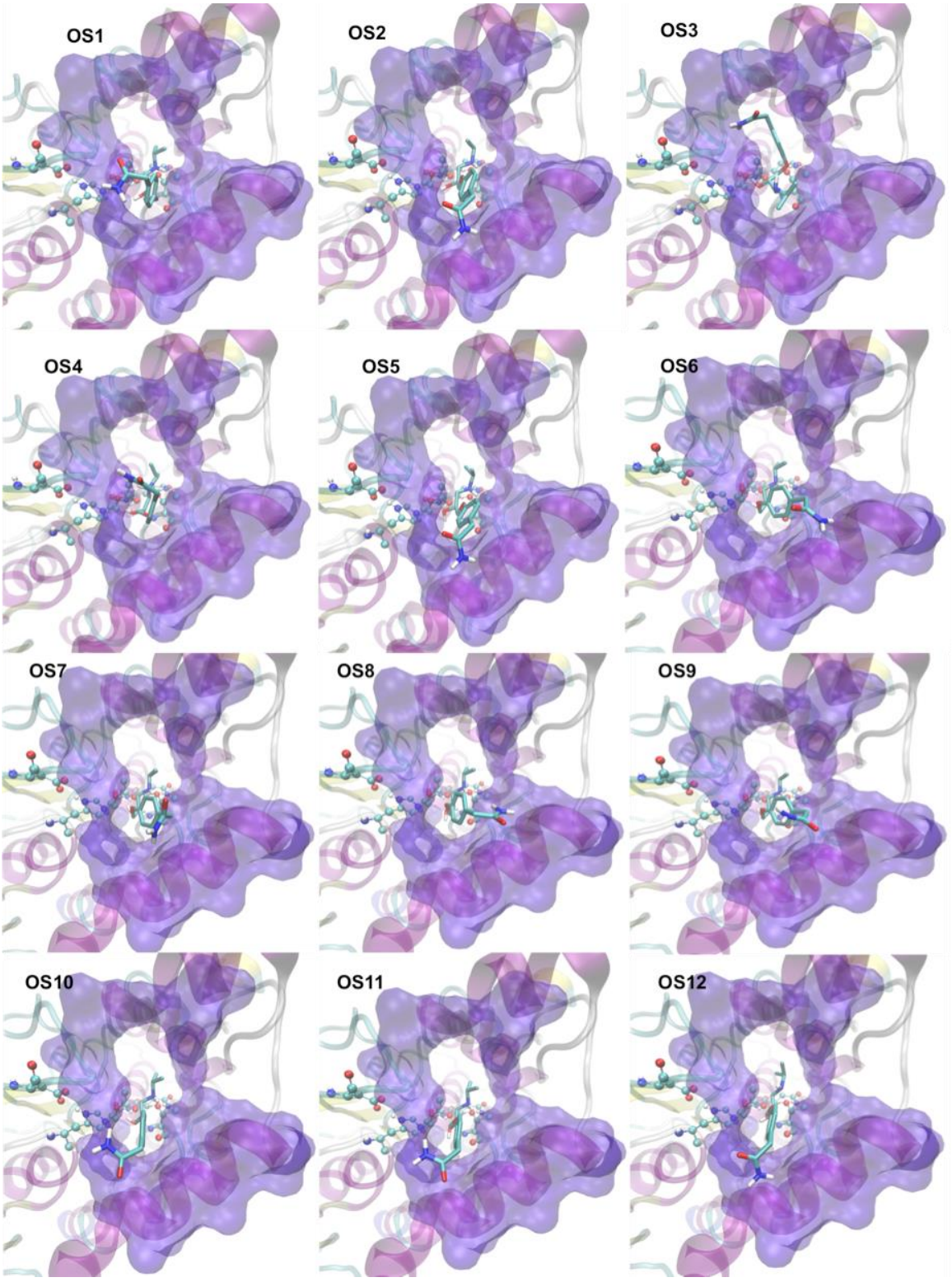


Figura C. 8. Imágenes de los MCCs (OS13 hasta OS19) obtenidos para el (*S*)-atenolol con el programa Vina.