

COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATO EN LA REACCIÓN DE ACILACIÓN DE
(*R,S*)-ATENOLOL CATALIZADA POR LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA*: UN
ESTUDIO COMPUTACIONAL.

JONATHAN AVILA TORRA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2015

COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATO EN LA REACCIÓN DE ACILACIÓN DE
(*R,S*)-ATENOLOL CATALIZADA POR LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA*: UN
ESTUDIO COMPUTACIONAL.

JONATHAN AVILA TORRA

Trabajo de grado presentado para optar al título de Químico

Director

MARTHA CECILIA DAZA ESPINOSA
Bióloga, Ph.D

Codirector

MARKUS H. OLIVER DOERR
Químico, Ph.D

Asesor

ANDRÉS MAURICIO ESCORCIA CABRERA
Químico, Ph.D

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2015

*A lo más valioso de mi vida,
Jesucristo mi Dios, sin ti nada de esto sería.
A mi hermosa familia*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis agradecimientos a Andrés M. Escorcía por su codirección, porque siempre fue diligente con su ayuda brindada y por los grandes aportes a este trabajo.

Expreso mis agradecimientos a la profesora Martha C. Daza E. por brindarme la oportunidad de hacer parte de lo que yo considero una segunda familia, el Grupo de Bioquímica Teórica. Por la paciencia y el tiempo dedicado a instruirme.

Al profesor Markus Doerr por la ayuda brindada durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros del Grupo de Bioquímica Teórica.

A la Escuela de Química y a la Universidad Industrial de Santander.

Por último, agradezco a mi familia por el apoyo brindado durante todo el tiempo y por estar presente en tiempos difíciles.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
1. MARCO TEÓRICO.....	18
1.1 QUIRALIDAD	18
1.2 RESOLUCION DE MEZCLAS RACÉMICAS	20
1.3 LIPASAS	21
1.4 SELECTIVIDAD ENZIMÁTICA	22
1.5 MECANISMO DE REACCIÓN	24
1.6 LIPASA B DE <i>CANDIDA ANTARTICA</i>	27
1.7 ATENOLOL	30
MODELOS TEÓRICOS Y MÉTODOS COMPUTACIONALES UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y REACTIVIDAD QUÍMICA	31
1.8 MECÁNICA CUÁNTICA.....	31
1.1 MÉTODOS HÍBRIDOS (QM/MM)	33
1.9 ACOPLAMIENTO MOLECULAR	37
1.10 AUTODOCK VINA	37
1.11 CAMPOS DE FUERZA CHARMM	40
2. METODOLOGÍA	43
2.1 PREPARACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE CALB ACETILADA (AcCALB)	43
2.2 FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE MICHAELIS ENTRE AcCALB Y (<i>R,S</i>)-ATENOLOL	45
2.3 OPTIMIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE MICHAELIS	47
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
3.1 COMPLEJOS ACCALB-ATENOLOL (COMPLEJOS DE MICHAELIS)	49
3.2 COMPLEJOS PRODUCTIVOS AcCALB <i>R</i> -ATENOLOL	53
3.3 COMPLEJOS PRODUCTIVOS AcCALB <i>S</i> -ATENOLOL	54
3.4 ENANTIOSELECTIVIDAD DE LA REACCIÓN	58
4. CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 (<i>R,S</i>)-atenolol.....	13
Figura 2 Mecanismo de reacción en las reacciones catalizadas por lipasas	14
Figura 3 Centro quiral.....	18
Figura 4 Ejemplos de sustancias quirales con distintas funciones biológicas.	19
Figura 5 Resolución cinética catalítica	21
Figura 6 Ejemplo de quimioselectividad enzimática	23
Figura 7 Ejemplo de regioselectividad enzimática	23
Figura 8 Ejemplo de enantioselectividad.....	24
Figura 9 Diagrama de la estructura secundaria de CalB	28
Figura 10 Estructura cristalina de CalB.....	29
Figura 11 Enantiómeros del Atenolol.....	30
Figura 12 Partición del sistema en el método híbrido QM/MM.....	34
Figura 13 Datos de un grupo de 190 complejos evaluados para los que se encontraron $RMSD \leq 2\text{Å}$ con AutoDock y con Vina.	38
Figura 1.4 Superficie de energía en una dimensión.....	42
Figura 15 Orientación del grupo acetil de la serina catalítica acetilada dentro del bolsillo de unión de CalB.....	44
Figura 16 Representación gráfica de la caja de búsqueda (GridBox).....	46

Figura 17 Estructura representativa de los complejos de Michaelis entre AcCalB y atenolol	50
Figura 18 Representación de los dos modos de unión del atenolol en el bolsillo de unión de CalB	51
Figura 19 Complejos productivos AcCalB <i>R</i> -atenolol obtenidos después de la optimización	55
Figura 20 Complejos productivos AcCalB <i>S</i> -atenolol obtenidos después de la optimización	57
Esquema 1 Mecanismo catalítico en la reacción de acetilación de (<i>R,S</i>)-atenolol	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Longitud (Å) de los puentes de hidrógeno esenciales para la actividad catalítica y estabilización de los complejos enzima-sustrato para AcCalB..... 44

Tabla 3.1 Distancias interatómicas y ángulos relevantes para el proceso catalítico en los complejos productivos AcCalB *R*-atenolol..... 54

Tabla 3.2 Distancias interatómicas y ángulos relevantes para el proceso catalítico en los complejos productivos AcCalB *S*-atenolol 56

RESUMEN

TÍTULO: COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATO EN LA REACCIÓN DE ACILACIÓN DE (*R,S*)-ATENOLOL CATALIZADA POR LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA*: UN ESTUDIO COMPUTACIONAL*

AUTOR: JONATHAN AVILA TORRA**

PALABRAS CLAVES: Lipasa B de *Candida antarctica*, Acilación, Quimioselectividad, Acoplamiento molecular, Atenolol

DESCRIPCIÓN: En este trabajo de investigación presentamos un estudio computacional de la acetilación de (*R,S*)-atenolol catalizada por lipasa B de *Candida antarctica* (CalB). El mecanismo de la reacción consiste de dos etapas. La primera (acilación) conduce a la formación de un acil-enzima reactiva. En la segunda etapa (deacilación) la acil-enzima transfiere el grupo acilo al atenolol, y es aquí donde se origina la quimio- y enantioselectividad. Ambas ocurren vía la formación de un complejo enzima-sustrato no covalente inicial (complejos de Michaelis) y un intermediario tetraédrico. El estudio se enfocó en la reacción de deacilación. Se modelaron los complejos de Michaelis utilizando un protocolo de acoplamiento el cual permitió evaluar la accesibilidad de los grupos nucleofílicos del atenolol para ser acetilados. Adicionalmente, las estructuras de los complejos fueron optimizadas usando un método híbrido Mecánica cuántica/Mecánica molecular (QM/MM) para considerar el efecto inducido en la estructura de la proteína por la presencia del atenolol dentro de la cavidad catalítica. Únicamente se identificaron complejos de Michaelis reactivos en los que el grupo hidroxilo del *R*- y *S*-atenolol se encuentra disponible para ser acilado por CalB. Por otro lado, en contraste con los resultados de la quimioselectividad, no se identificaron las bases moleculares que sustenten una enantioselectividad por alguno de los dos enantiómeros. Finalmente, para obtener información acerca del origen de la enantioselectividad a nivel molecular se sugiere realizar un estudio computacional más profundo. Por ejemplo, llevar a cabo simulaciones de dinámica molecular de los complejos de Michaelis AcCalB-atenolol, modelar el segundo intermediario tetraédrico y calcular los perfiles de reacción.

* Trabajo de grado

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

ABSTRACT

TITLE: ENZYME-SUSTRATE COMPLEXES IN THE ACETYLATION OF (R,S)-ATENOLOL CATALYZED BY *CANDIDA ANTARCTICA* LIPASE B: A COMPUTATIONAL STUDY *

AUTHOR: JONATHAN AVILA TORRA **

KEYWORDS: *Candida antarctica* lipase B, Acylation, Enantioselectivity, Chemoselectivity, Docking Molecular, Atenolol.

DESCRIPTION: Was carried out a computational study of the acetylation of (R,S)-atenolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (CalB). The reaction mechanism involves two steps. The first step leads to the formation of a reactive acyl-enzyme (acylation). The chemo- and enantioselectivity originates from the second step (deacylation), when the acyl-enzyme transfers the acyl group to the racemic substrate. Both steps proceed via an initial noncovalent enzyme-substrate complex (Michaelis complex) and a tetrahedral intermediate. The computational study was focused on the deacylation reaction. A docking molecular protocol was used to model the Michaelis complex. In addition, the structures of the complexes were optimized using a hybrid method QM/MM to consider the induced fit effect upon the binding of atenolol. Only reactive Michaelis complexes were identified for R- and S-atenolol, in which their hydroxyl group is available to be acetylated by CalB. Furthermore, the computational results obtained here provide an explanation for the chemoselectivity, but do not provide an explanation for the enantioselectivity of the reaction. Finally, for information about the origin of the enantioselectivity at the molecular level suggested a more thorough computational study. For example, performing molecular dynamics simulations of Michaelis complexes, modeling the second tetrahedral intermediate, and calculate reaction profiles.

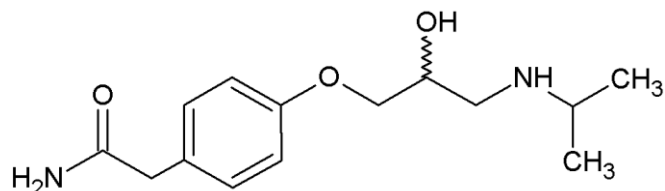
* Bachelor Thesis

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

INTRODUCCIÓN

El atenolol ((±)-2-[4-[2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi]fenil]etanamida -Figura 1-), un bloqueante beta-adrenérgico usado para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, es comercializado como una mezcla racémica. Sin embargo, el efecto terapéutico deseado está asociado con el enantiómero *S*, y la administración de la mezcla racémica del atenolol causa serios efectos secundarios como problemas bronquiales y diabetes [1], [2]. Entonces, el diseño de estrategias para obtener *S*-atenolol con una alta pureza enantiomérica es muy importante. En este contexto, se han diseñado diferentes rutas de síntesis química o quimioenzimática para obtener *S*-atenolol enantioméricamente puro [3], [4]. Se ha reportado la resolución biocatalítica de (*R,S*)-atenolol con el uso de reacciones de transesterificaciones e hidrólisis catalizadas por lipasas [5], [6].

Figura 1 (*R,S*)-atenolol

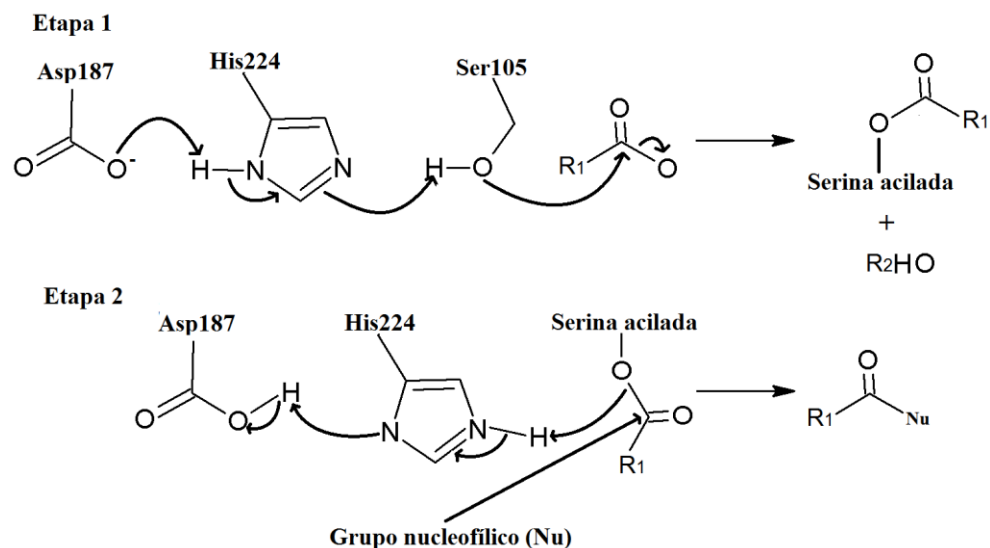


Las reacciones catalizadas por lipasas brindan el ambiente favorable para la síntesis de fármacos enantioméricamente puros en comparación con los métodos de síntesis convencionales. Las lipasas actualmente están muy bien establecidas en el campo de la síntesis orgánica. El uso de lipasas en solventes orgánicos es una excelente metodología para la resolución de mezclas racémicas por hidrólisis enzimática, reacciones de transesterificación o aminólisis [5], [7], [8], debido a que son muy estables y activas en solventes orgánicos [9].

El objetivo del presente estudio fue orientado a comprender las bases moleculares que definen la reacción de acilación de (*R,S*)-atenolol catalizada por lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) a un nivel muy detallado, al que experimentalmente no se puede acceder. Las metodologías aplicadas a los estudios computacionales se enfoca en una combinación de un protocolo de acoplamiento molecular con un método híbrido de mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM) [10]–[12].

De acuerdo al mecanismo aceptado para las reacciones catalizadas por lipasas [7], se deben considerar dos etapas (Figura 2). La primera etapa es la acilación de la enzima por el donador acilo (acetato de vinilo). En la segunda etapa, la enzima acilada (acilenzima) puede transferir el grupo acil a diferentes nucleófilos, como aminas, alcoholes (atenolol en este estudio) o peróxidos.

Figura 2 Mecanismo de reacción en las reacciones catalizadas por lipasas. El mecanismo involucra una triada catalítica conformada por Serina, Histidina y Aspartato [7]



Tanto la etapa de acilación, como la etapa de deacilación proceden a través de un complejo enzima-sustrato no covalente (complejo de Michaelis) y un intermediario tetraédrico. El estudio computacional de la acetilación de (*R,S*)-atenolol catalizada por CalB fue enfocado en la etapa de deacilación, en donde la quimio- y enantioselectividad de esta reacción se puede observar durante la reacción de la mezcla racémica de atenolol con la enzima acetilada (AcCalB).

Inicialmente el modelado molecular de CalB se llevó a cabo con la finalidad de generar las estructuras diana para el acoplamiento no covalente de *R*- y *S*-atenolol, es decir, para generar los complejos de Michaelis. Los complejos de Michaelis entre AcCalB y *R*- o *S*-atenolol fueron simulados usando un protocolo de acoplamiento similar al implementado en otros estudios de reacciones catalizadas por lipasas. Esto permitió evaluar la accesibilidad de los grupos nucleofílicos del atenolol (-OH y -NH) al sitio activo de la proteína, en la reacción de acetilación catalizada por CalB. Los complejos AcCalB-atenolol obtenidos mediante el procedimiento de acoplamiento implementado, fueron analizados con el fin de identificar posibles complejos productivos -PCPs- (complejos que conducen a la formación del producto). Los posibles complejos productivos (PCPs) fueron elegidos con base en tres criterios geométricos. El primer criterio es determinar la distorsión de la proteína, para lo cual se calculó la desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) entre la estructura cristalina de la proteína y la estructura de la proteína en los complejos (RMSD no debe superar los 3 Å). El segundo es que se deben conservar al menos dos de los tres puentes de hidrógeno con el hueco oxianiónico. El tercer criterio es la distancia entre el grupo nucleofílico (-OH o -NH) presentes en el atenolol y la serina catalítica acetilada (SEA). Debido a que el procedimiento de acoplamiento molecular aplicado considera a la proteína como un cuerpo rígido, los complejos AcCalB-(*R,S*)-atenolol seleccionados fueron sometidos a una cuidadosa optimización post-acoplamiento, con el objetivo de determinar el posible efecto inducido, expresado en pequeños desplazamientos en la estructura de la proteína por la presencia del sustrato. El método de optimización es una combinación QM(SCC-DFTB)/MM(CHARMM). Se usó una aproximación QM/MM porque no existen

parámetros de campo de fuerza CHARMM para el atenolol. La región QM correspondiente al sustrato fue tratada usando el método SCC-DFTB (Self-consistent charge-density functional tight binding) [13] y la región MM (AcCalB y aguas cristalinas) usando CHARMM [14]. El análisis de los complejos incluye una caracterización (longitud y ángulo) de los puentes de hidrógeno intermoleculares para los complejos reactivos (complejos que después de la optimización cumplen con los criterios descritos anteriormente) y la caracterización de la distancia y ángulo para el ataque nucleofílico.

A continuación le ofrecemos al lector tres secciones. En la primera sección se describen las características fisicoquímicas del atenolol y CalB incluyendo los conceptos más relevantes para comprender el proceso catalítico. Posteriormente comentamos los diferentes modelos teóricos y computacionales que se usaron para desarrollar este trabajo. En la segunda sección se describe la metodología que se ha propuesto para estudiar la formación de los complejos de Michaelis. Para finalizar, en la tercera sección, se muestran y discuten los resultados alcanzados en cada etapa de este proyecto.

Cabe resaltar que este trabajo cuenta con dos apéndices (apéndice A y apéndice B) en los que se detalla información complementaria para la metodología y el análisis de los resultados. Por último, esta investigación fue objeto de ponencia en un congreso Internacional, un congreso Nacional y un Simposio internacional:

- J. Avila, M. C. Daza, M. Doerr, A. M. Escorcía. "Complejos enzima-sustrato en la reacción de acilación de (*R/S*)-atenolol catalizada por lipasa B de *Candida antarctica*" V Encuentro Nacional de Químicos Teóricos y Computacionales - II Escuela de Teoría y Computación en las Ciencias Moleculares, Abril 27 - 30, Guatapé, Colombia, 2014.

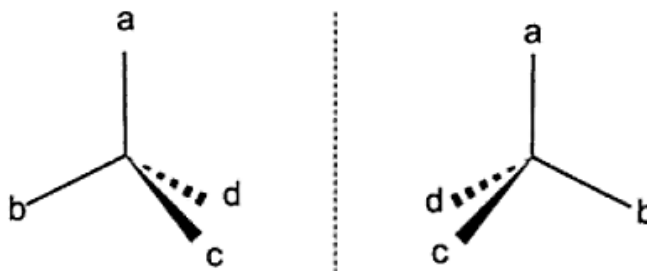
- J. Avila, A. M. Escorcia, M. C. Daza, M. Doerr. "Molecular modeling of the Michaelis complexes in the acetylation of (*R,S*)-atenolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B" 10th Congress of the World Association of Theoretical and Computational Chemists (WATOC), Octubre 5 – 10, Santiago, Chile, 2014.
- J. Avila, A. M. Escorcia, M. C. Daza, M. Doerr. "Molecular modeling of the Michaelis complexes in the acetylation of (*R,S*)-atenolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B" Primer Simposio Internacional en Biotecnología y Agroindustria, Diciembre 11-12, Bucaramanga, Colombia, 2014.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 QUIRALIDAD

Todas las estructuras moleculares tienen una imagen especular, pero no todos sus átomos o elementos son superponibles con ella. Un átomo de carbono con cuatro sustituyentes diferentes es asimétrico y es llamado centro quiral (Figura 1.1).

Figura 3 Centro quiral.

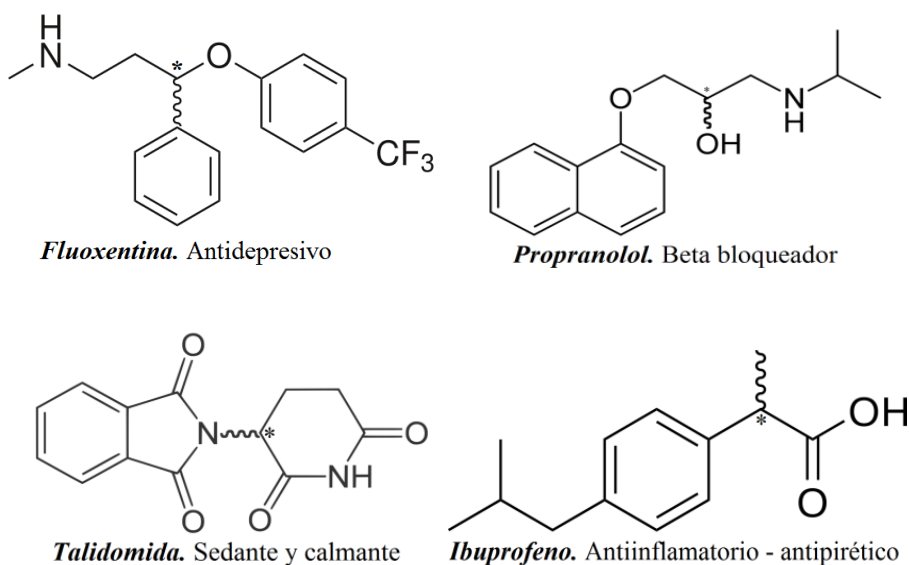


El número de estereoisómeros de una molécula depende del número de centros quirales. Una molécula con n centros quirales podrá tener 2^n enantiómeros. La quiralidad está involucrada en numerosos procesos biológicos, como los que involucran el metabolismo de fármacos quirales. Aunque las propiedades químicas y físicas de los enantiómeros son iguales, los efectos biológicos no. Algunos ejemplos de estas sustancias se indican en la

Figura 1.2. Por lo tanto, la prescripción de medicamentos racémicos puede generar efectos biológicos diferentes a los esperados [15][16].

El sistema de Cahn-Ingold-Prelog es el método estándar de notación de la estereoquímica [16]. Este sistema usa los descriptores (*R,S*) para indicar la configuración espacial de los sustituyentes de un centro quiral. Las propiedades físicas usuales como la densidad, el punto de fusión y el punto de ebullición son idénticas para ambos enantiómeros de un compuesto quiral, por consiguiente los enantiómeros no pueden ser diferenciados uno del otro por métodos químicos y físicos convencionales. La rotación del plano de la luz polarizada es el método físico para discriminar dos enantiómeros. El plano de polarización de una onda luminosa experimenta una rotación en presencia de una molécula quiral.

Figura 1.1 Ejemplos de sustancias quirales con distintas funciones biológicas. El estereocentro es marcado con un asterisco.



Las formas enantioméricas de una molécula quiral causan una rotación del plano de polarización de igual magnitud pero en direcciones opuestas. Las mezclas que contienen cantidades iguales de enantiómeros se llaman mezclas racémicas. Éstas son ópticamente inactivas. Cuando un enantiómero se encuentra en exceso, se observa una rotación neta del plano de polarización. En el caso en donde todas las moléculas sean de la misma lateralidad, se dice que la sustancia es *ópticamente pura*. La pureza óptica (la capacidad de una sustancia quiral para rotar el plano de la luz polarizada) se define como:

Pureza óptica = porcentaje de exceso enantiomérico

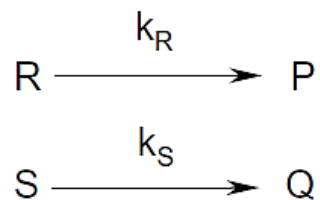
= porcentaje de un enantiómero - porcentaje del otro enantiómero

Por tanto, una muestra que tiene 50% de pureza óptica contiene 75% de un enantiómero y 25% del otro [16].

1.2 RESOLUCION DE MEZCLAS RACÉMICAS

De acuerdo a la IUPAC, la resolución cinética (RC) se define como: “El resultado de la resolución parcial o completa, de acuerdo con la rata de velocidad de la reacción, de los enantiómeros en un racemato con un agente quiral (reactivo, catalizador, solvente, etc.) [17]. La resolución de racematos puede ser dividida en cuatro categorías: cristalización preferencial directa, cristalización de sales diastereoméricas, cromatografía y RC. De todos estos métodos, la RC de racematos es de particular importancia por ser un método muy versátil para la separación de enantiómeros. El éxito de este método se basa en el hecho de que los dos enantiómeros reaccionan a velocidades diferentes con una sustancia quiral.

Figura 4 Resolución cinética catalítica. P es el producto para R y Q para S [18].



La RC ocurre cuando $k_R \neq k_S$ (Figura 1.3) y termina en algún punto entre el 0% y el 100% de conversión. Si el enantiómero R es el único reactivo, entonces $k_S = 0$. La sustancia quiral debe estar presente en proporciones o cantidades catalíticas; puede ser un biocatalizador (enzima o microorganismo) o un catalizador químico (ácido o base quiral o incluso un complejo metálico quiral). La RC de compuestos racémicos es por lejos, la transformación más común catalizadas por lipasas, en la que, la enzima discrimina entre los dos enantiómeros de una mezcla racémica, de modo que un enantiómero se convierte en producto más fácil que el otro [18].

1.3 LIPASAS

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas ubicuas y catalizan, principalmente, la descomposición química de grasas. Los triacilgliceroles, que son ésteres de ácidos carboxílicos de cadena larga, son uno de sus sustratos. Sin embargo muchas lipasas aceptan también otros ésteres de bajo peso molecular como sustratos. La masa molecular de la mayoría de las lipasas es en promedio de 35 kDa, a excepción de la lipasa A de *Bacillus subtilis* (BSLA) que posee una masa de 19 kDa. Las lipasas son conocidas por ser catalíticamente activas solo en interfases lípido-agua en micelas o en membranas. Este efecto es llamado activación interfacial. Las lipasas poseen un sitio activo caracterizado por una triada catalítica compuesta por serina, histidina y aspartato [8]. La

estructura tridimensional de todas las lipasas sigue un patrón común, con pliegues α/β característicos de la familia de las hidrolasas. Las lipasas tienen ventajas en la síntesis orgánica debido a su alta disponibilidad y por ser versátiles, siendo capaces de realizar hidrólisis y transesterificaciones enantioselectivas. Las lipasas constituyen la clase de enzimas hidrolíticas más importantes que catalizan la hidrólisis y la síntesis de ésteres. Algunas de las aplicaciones de las lipasas en síntesis asimétrica (síntesis quiral) son la resolución cinética de alcoholes racémicos, ácidos, ésteres, o aminas. Las lipasas han recibido una gran atención como biocatalizadores en numerosos procesos industriales, incluyendo áreas tales como aceites y grasas, detergentes, fabricación de queso, la limpieza de superficies duras como el cuero y el procesamiento de papel. En los últimos años, se ha desarrollado métodos de usos de lipasas en la industria farmacéutica [9]. Las lipasas exhiben especificidad de sustrato, regioselectividad, quimioselectividad y enantioselectividad [19]. Las lipasas tienen la habilidad de actuar sobre un amplio rango de sustratos, de ser altamente estables en temperaturas extremas, pH y solventes orgánicos. Las lipasas han sido utilizadas para la resolución de fármacos quirales, modificaciones en grasas, síntesis orgánica, transformaciones de biocombustibles[20], y en la producción de productos para el cuidado personal [19].

1.4 SELECTIVIDAD ENZIMÁTICA

La mayoría de moléculas orgánicas con relevancia biológica contienen más de un grupo funcional, y cada grupo funcional presenta una reactividad característica. Por lo tanto, hay que predecir qué grupo funcional va a reaccionar, dónde y cómo lo va hacer. Hay diferentes tipos de selectividad: *quimioselectividad*, *regioselectividad* y *enantioselectividad* [21]. Una enzima es *quimioselectiva* cuando discrimina un grupo funcional de otro con características análogas en un sustrato, como una reacción de acilación catalizada por lipasas (Figura 5). Una enzima es *regioselectiva* cuando es selectiva hacia uno de varios grupos funcionales similares en la misma molécula de sustrato, como en la reacción de fosforilación de glucosa

catalizada por la hexoquinasa (Figura 6) en la que la enzima fosforila de manera selectiva el hidroxilo 6 de la glucosa. Una enzima es *enantioselectiva* cuando es selectiva hacia uno de los dos isómeros de una molécula quiral (Figura 7).

Figura 5 Ejemplo de quimioselectividad enzimática. Reacción de acilación de un sustrato con dos grupos nucleofílicos distintos [5].

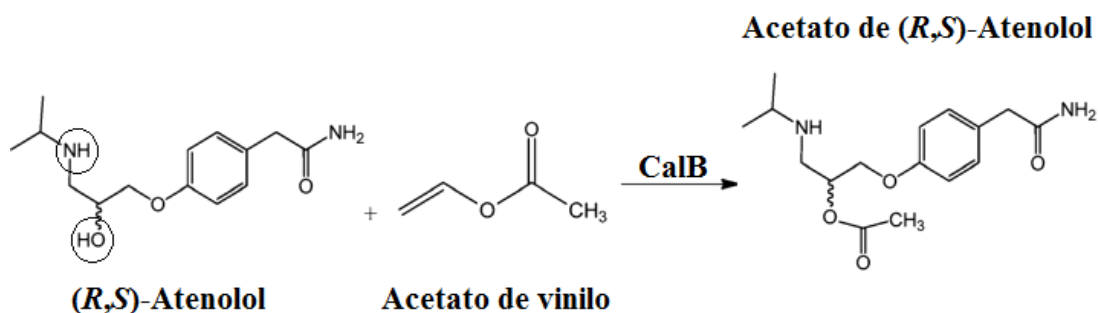


Figura 6 Ejemplo de regioselectividad enzimática. Reacción de fosforilación de glucosa catalizada por la hexoquinasa [15].

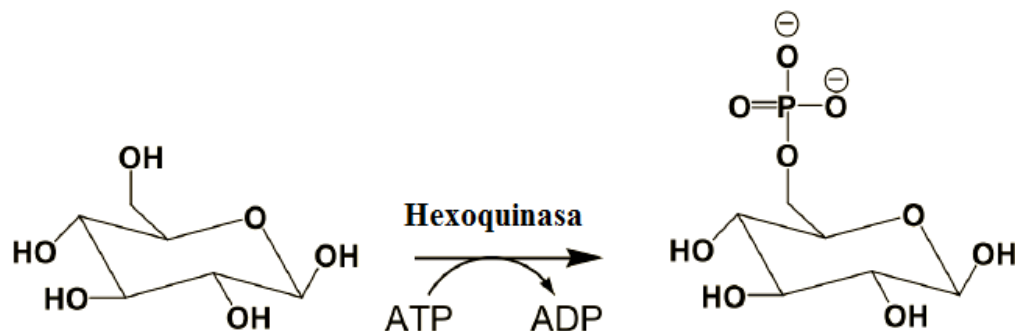
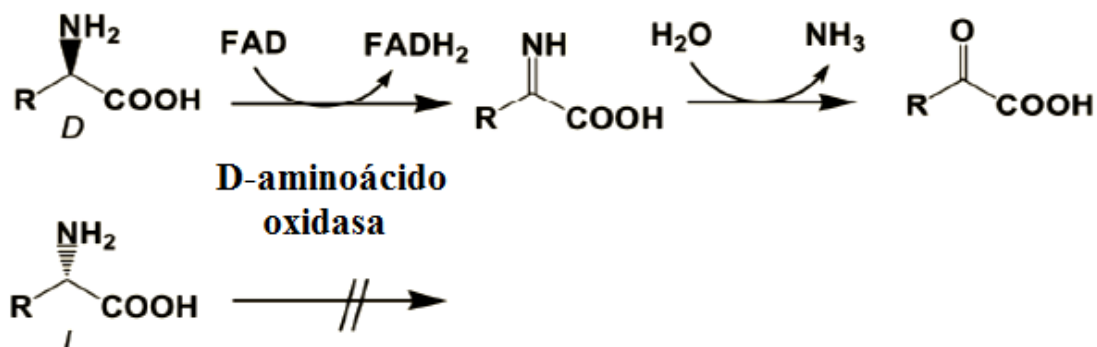


Figura 7 Ejemplo de enantioselectividad. Reacción catalizada por la D-aminoácido oxidasa [15].



1.5 MECANISMO DE REACCIÓN

El proceso catalítico que conduce a la escisión del sustrato éster puede ser dividido en dos etapas. La primera es llamada *acilación* y la segunda *deacilación*. Ambas ocurren vía la formación de un complejo enzima-sustrato no covalente inicial (Complejos de Michaelis) e intermediarios tetraédricos (Figura 3.1-sección 3-). El mecanismo de reacción también implica un intermediario acil-enzima y el tipo de catálisis que se da en la reacción es la catálisis nucleofílica. Los estudios experimentales de la cinética enzimática generalmente se realizan mediante el registro de la velocidad inicial de la formación de los productos en una solución en la cual se halla la enzima a una concentración muy baja. De hecho, las enzimas son catalizadores tan eficientes que se pueden observar aceleraciones significativas aun cuando su concentración es más de tres órdenes de magnitud menor que la del sustrato.

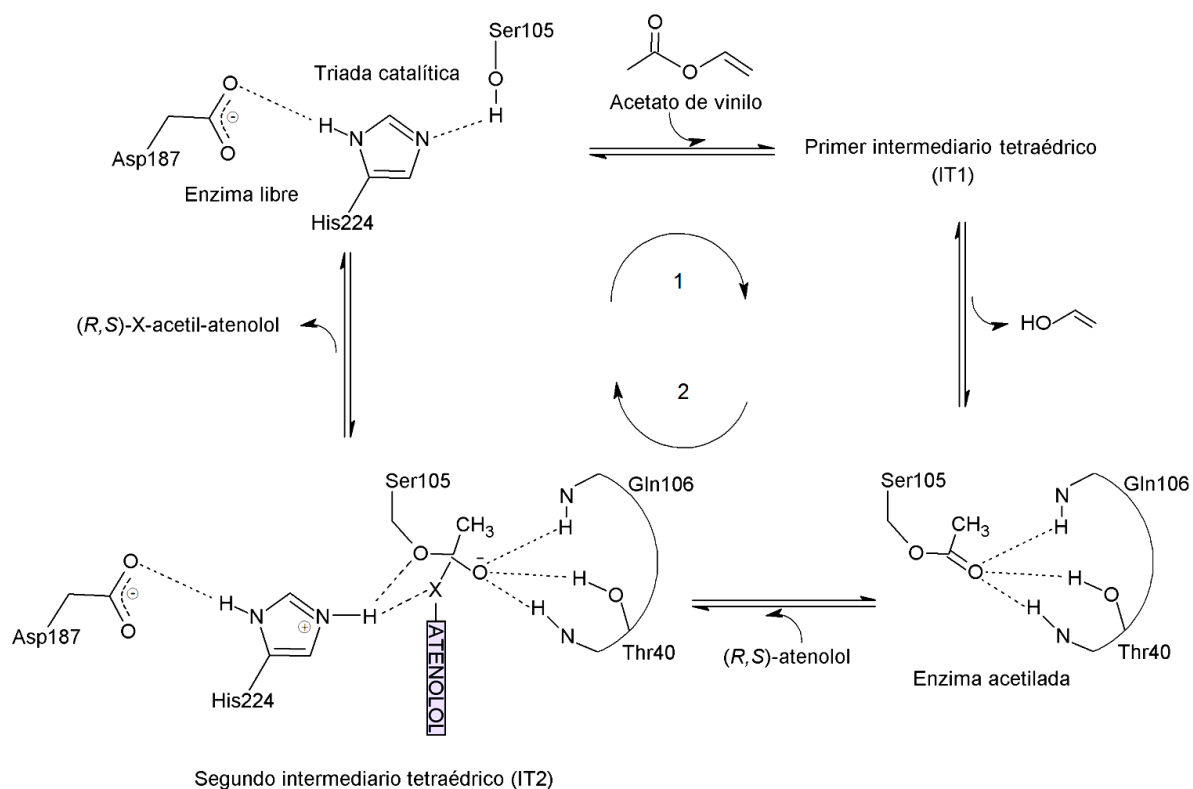
Un éster carboxílico se une al sitio activo y el carbono carbonílico del éster es entonces atacado por la serina catalítica 105 que actúa como nucleófilo, dando como resultado el primer estado de transición (TS1) (ver esquema 1). Este ataque es promovido por la

His224, la cual actúa como una base general que acepta protones desde la Ser105. Durante el ataque el enlace carbonílico empieza a transformarse en un enlace simple y el oxígeno carboxílico se convierte en un oxianión y forma tres enlaces con el hueco oxianiónico (dos con Thr40 y uno con Gln106).

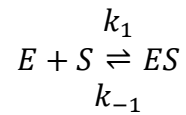
Características y componentes del sitio activo. El bolsillo de unión del sitio activo de CalB presenta dos regiones, un bolsillo hidrofóbico grande y uno mediano, identificados como zona de unión I y II, respectivamente (Figura 3.2 – sección 3). El bolsillo hidrofóbico grande está recubierto por Ile189 y Val190 a la izquierda, Val154 en el extremo derecho, así como Leu140 y Leu144 en la parte superior. En lo profundo de este bolsillo, Asp134 está a la izquierda y Gln157 a la derecha. El bolsillo hidrofóbico mediano está por debajo de la Ser105 y alberga a Thr40 y el segmento desde Leu278 hasta Ala287, que es una parte de la hélice $\alpha 10$.

Como en todas las serin proteasas, la triada catalítica está compuesta por un grupo de tres aminoácidos. La serina cumple con la función de hacer la transferencia del grupo acetato del donador acilo al sustrato, mediante su acetilación y posterior ataque nucleofílico sobre el sustrato. La histidina tiene la función ácido/base durante la catálisis, actúa como una base y aumenta la nucleofilicidad del grupo atacante, la serina. La histidina funciona como un ácido o una base dependiendo del requerimiento electrónico por parte de los intermediarios tetraédricos. El aspartato aumenta la capacidad nucleofílica de la serina. El hueco oxianiónico tiene la función de estabilizar la formación del intermediario tetraédrico. Existe una correlación entre la longitud de los enlaces C=O de la acilenzima y la velocidad de deacilación. Entre más largos sean estos enlaces mayor será la velocidad de deacilación [10].

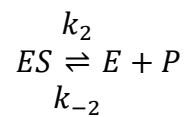
Esquema 1 Mecanismo catalítico en la reacción de acetilación de (*R,S*)-atenolol. La reacción procede en dos etapas: acilación (1) seguida de una deacilación (2) de CalB. X = N u O de acuerdo a los grupos nucleofílicos del atenolol. Durante el ataque, el enlace carbonílico empieza a transformarse en un enlace sencillo y el oxígeno carboxílico se convierte en un oxianión y forma tres enlaces con el hueco oxianiónico.



Complejos de Michaelis: Los complejos de Michaelis, referidos en este trabajo como complejos enzima-sustrato (ES), pueden proporcionar información sobre el mecanismo de reacción. Los complejos ES son la clave para comprender el comportamiento cinético. En la formación de los complejos ES, la enzima inicialmente se une, en una etapa reversible relativamente rápida, con un sustrato para formar un complejo ES:



El complejo ES entonces se descompone en un segundo paso más lento para producir la enzima libre y el producto de reacción P:



En cualquier instante dado en una reacción catalizada por la enzima, la enzima existe en dos formas, la forma libre o no combinado (E) y la forma combinada (ES). Con una baja concentración de sustrato ([S]), la mayor parte de la enzima está en la forma no combinada. Aquí, la velocidad de la reacción es proporcional a [S], porque el equilibrio está dirigido hacia la formación de ES a medida que aumenta [S]. Se observa que la velocidad inicial máxima de la reacción (V_{\max}) ocurre cuando virtualmente toda la enzima está en la forma ES y la [E] es muy pequeña. En estas condiciones la enzima está saturada de sustrato, de manera que aumentos de [S] no tienen ningún efecto sobre la velocidad de la reacción. Después de que el complejo ES se descompone para producir el producto P, la enzima es libre para catalizar la reacción de otra molécula de sustrato [15].

1.6 LIPASA B DE *CANDIDA ANTARTICA*

Es una lipasa producida por la levadura *Candida antarctica*. Es una proteína globular perteneciente a la familia de las hidrolasas. Su cadena polipeptídica consta de 317 aminoácidos con un peso molecular de 33 kDa. Su estructura secundaria y tridimensional

fue determinada por cristalografía de rayos X (Figura 8- Figura 9). La lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) contiene siete láminas β rodeadas por 10 hélices alfa. El sitio activo de la CalB está situado en el fondo de la proteína, es una cavidad de 12 Å de profundidad desde O_γ (oxígeno gama) de la serina hasta la superficie de la proteína, y con una anchura de 10×4 Å [22]. Esta cavidad está delimitada por tres regiones de la proteína: la espiral comprendida entre los aminoácidos 242 y 268; la hélice α_{10} (del residuo 268 al 287, cerca al extremo C-terminal) y la hélice α_5 .

Figura 8 Diagrama de la estructura secundaria de CalB. Las hélices alfa α_2 , α_9 y α_{10} son regiones pequeñas en donde el patrón de puentes de hidrógeno no es fijo y la dirección de las hélices cambian [22].

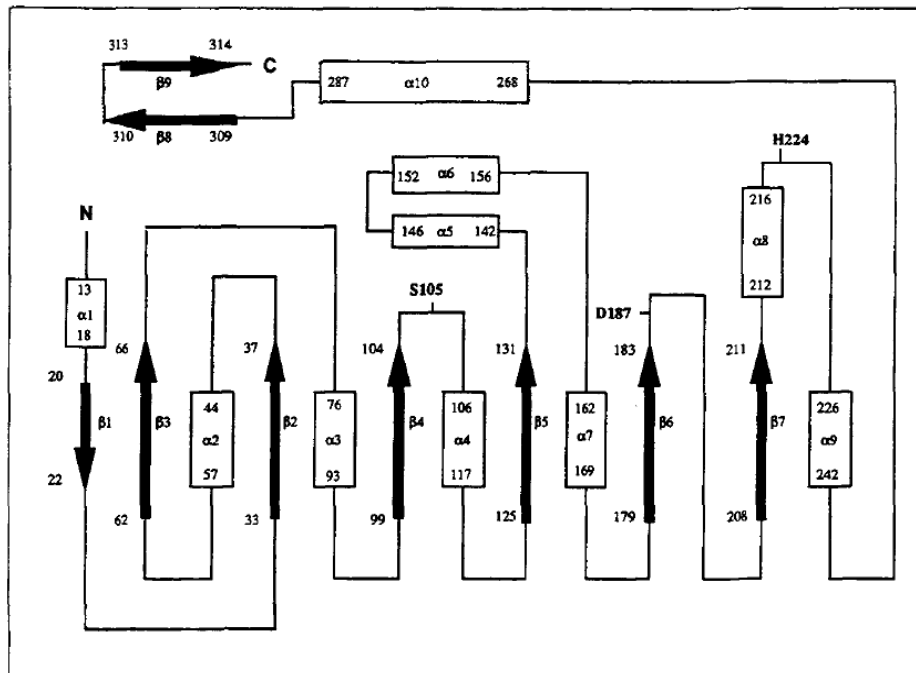
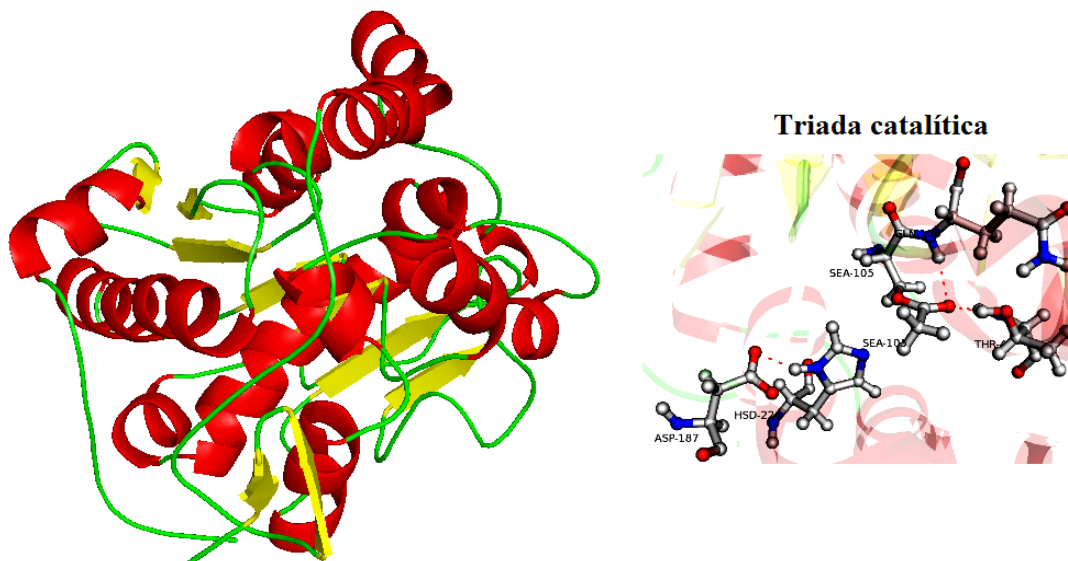


Figura 9 Estructura cristalina de CalB. Obtenida por difracción de rayos X. Resolución de 1.55Å. Se muestran las hojas β (amarillo), las hélices (rojo) y los bucles (verde).(PDB ID: 1TCA)[22]. A la derecha se muestran los residuos aminoacídicos que conforman la triada catalítica y el hueco oxianiónico.

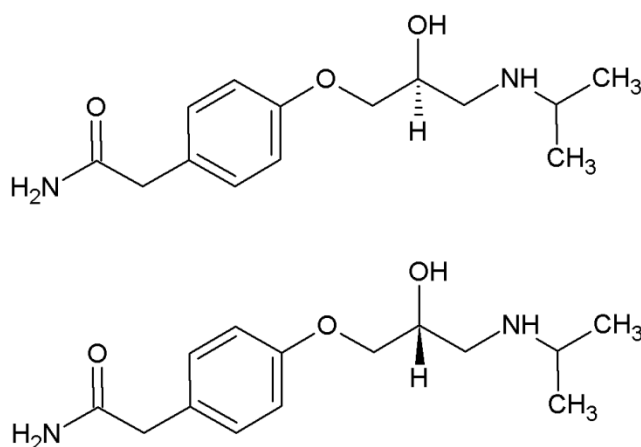


La triada catalítica está compuesta por serina 105, aspártico 187 e histidina 224. La serina se encuentra rodeada por la treonina 40, la glutamina 157 y el ácido aspártico 134, aminoácidos que están unidos por puentes de hidrógeno y cuyos átomos polares se sitúan a 5Å del O_7 . Estos residuos están expuestos al disolvente y pueden tener una función muy importante en la especificidad por el sustrato. El mecanismo catalítico de CalB incluye (Esquema 1) una triada catalítica y un hueco oxianiónico (Thr40 y Gln106) que estabiliza los intermediarios tetraédricos de la reacción[23].

1.7 ATENOLOL

El atenolol ((±)-2-[4-[2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi]fenil]etanamida -Figura 10-) es un amino alcohol secundario. En su estructura molecular hay dos grupos funcionales nucleofílicos con capacidad de interactuar en reacciones de esterificación. Dado que presenta una cadena lateral con muchos enlaces simples (carbonos sp^3), el atenolol posee gran flexibilidad. El atenolol es un bloqueante β -adrenérgico cardioselectivo sin acción simpaticomimética intrínseca ni estabilizante de membrana, aunque a altas dosis, también puede inhibir los receptores β_2 -adrenérgicos de la musculatura lisa bronquial y vascular (propiedad beta bloqueante reside en su forma S).

Figura 10 Enantiómeros del Atenolol. Estructuras creadas con ACD/ChemSketch [24].



El atenolol, posee efectos inotrópicos negativos (y por tanto, está contraindicado en la insuficiencia cardiaca no controlada). Al igual que otros β -bloqueantes, el mecanismo de acción de atenolol en el tratamiento de la hipertensión arterial, no está totalmente aclarado. El atenolol es efectivo y adecuadamente tolerado en la mayor parte de las poblaciones étnicas, aunque la respuesta puede ser inferior en individuos de raza negra. El atenolol se

vende como una mezcla racémica. Sin embargo, el *S*-atenolol es el que posee la acción terapéutica deseada, y el uso de la mezcla racémica de atenolol puede causar dificultades respiratorias y aumentar el riesgo de sufrir algún tipo de diabetes [1] . Por esta razón, el diseño de estrategias de síntesis para obtener el *S*-atenolol enantioméricamente puro es muy importante.

MODELOS TEÓRICOS Y MÉTODOS COMPUTACIONALES UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y REACTIVIDAD QUÍMICA

1.8 MECÁNICA CUÁNTICA

La química cuántica es un modelo matemático que describe satisfactoriamente el comportamiento de las partículas elementales, la estructura de los átomos y moléculas y las interacciones que puedan darse entre ellas. La mecánica cuántica postula que un sistema químico puede describirse de manera completa si se conoce su función de onda, que se obtiene a partir de la resolución de la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo.

$$H\Psi = E\Psi \quad (1)$$

donde H es el operador Hamiltoniano que incluye la energía cinética y potencial de núcleos y electrones, E es la energía del sistema y Ψ la función de onda. Resolviendo la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo se puede, en principio, determinar la estructura electrónica y las propiedades de cualquier sistema de interés químico. No obstante, para muchos sistemas químicos resulta imposible resolverla de manera exacta, a causa de los términos de repulsión interelectrónica del Hamiltoniano. Así pues, debemos usar métodos

aproximados. La aproximación de Born-Oppenheimer expresa la función de onda completa mediante el producto de una parte electrónica y una parte nuclear [25].

De acuerdo con la complejidad para resolver la ecuación de Schrödinger, se han desarrollado varias aproximaciones para su solución. Estas aproximaciones se reúnen en un conjunto de modelos teóricos:

- **Métodos *ab-initio*:** Los métodos *ab initio* tratan de derivar información mediante la resolución de la ecuación de Schrödinger sin parámetros de ajuste a los datos experimentales. En realidad, los métodos *ab initio* también hacen uso de los datos experimentales, pero de una manera un tanto más sutil. Existen muchos métodos aproximados para resolver la ecuación de Schrödinger, y cuál utilizar para un problema específico por lo general, se elige mediante la comparación del rendimiento de los datos experimentales conocidos. Así, los datos experimentales son la guía de selección del modelo de cálculo, en vez de entrar directamente en el procedimiento de cálculo [26].
- **Métodos semi-empíricos:** Los métodos semiempíricos fueron diseñados para reducir el coste computacional de los cálculos cuánticos. Todos parten de la teoría HF e introducen diversas simplificaciones en la expresión del Hamiltoniano, que son compensadas por la inclusión de parámetros ajustados para poder reproducir datos experimentales. El principal inconveniente es que son muy dependientes de los parámetros que los definen. Los métodos semiempíricos más usados incluyen el MNDO, AM1, PM3 y SCC-DFTB. Entre estos métodos de última generación se destaca el AM1 (que es una versión mejorada del MNDO; AM1: Modelos Austin 1, llamado así por la universidad de Tejas, en Austin) [25]. El método SCC-DFTB (*Self-consistent charge density functional tight-binding*) es una aproximación

basado en la teoría del funcional de la densidad (DFT). En la aproximación SCC-DFTB, la densidad electrónica en la teoría DFT es sustituida por una densidad de referencia más fluctuaciones. La energía DFT total es expandida a términos de segundo orden en las fluctuaciones de densidad de carga [27].

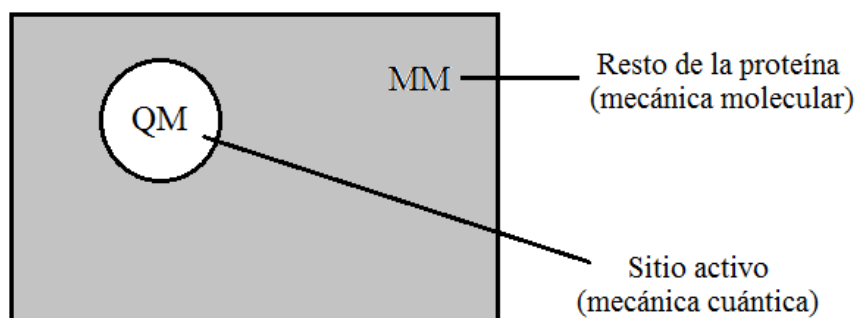
- **Métodos basados en la teoría del funcional de densidad (DFT):** se fundamentan en la idea de calcular la energía de intercambio y correlación electrónica (que corresponden a la interacción cuántica entre electrones) a partir de los funcionales generales de la densidad electrónica. Esta teoría intenta calcular la energía y otras propiedades moleculares del estado fundamental a partir de la densidad electrónica del estado fundamental. En el desarrollo de este proyecto empleamos el funcional híbrido de correlación e intercambio B3LYP. El funcional B3LYP (donde el 3 indica un funcional de tres parámetros) es una combinación lineal del término de intercambio HF, las contribuciones de intercambio (Becke) y el funcional de correlación de Lee, Yang y Parr (LYP). Este funcional es ampliamente utilizado en el estudio mecanocuántico de reacciones de transferencia, además de ser utilizado para determinar mínimos de energía potencial durante la optimización de estructuras moleculares [28].

1.1 MÉTODOS HÍBRIDOS (QM/MM)

La combinación de mecanismos cuánticos con mecanismos moleculares (QM/MM) se ha convertido en uno de los mejores métodos para modelar reacciones de sistemas biológicos. El método QM/MM se caracteriza por la partición del sistema en 1) una región QM que corresponde a la parte químicamente relevante (por ejemplo el centro activo de una enzima) y que se trata mediante un método basado en la mecánica cuántica y 2) una región MM que incluye el resto del sistema y que se describe mediante un método de mecánica molecular (Figura 11). El cálculo QM/MM se define por los métodos QM y MM empleados, por

cómo se combinan los Hamiltonianos (según si es por acoplamiento mecánico o electrónico) y por la forma de tratar la interfase entre las regiones QM y MM [29].

Figura 11 Partición del sistema en el método híbrido QM/MM El sitio activo de la proteína se describe mediante mecánica cuántica, mientras que el entorno proteico y el solvente se describe con un campo de fuerzas. El anillo negro representa la región límite entre los dominios QM y MM, allí se encuentran átomos que tienen características y hacen parte de los dos subsistemas.



MÉTODO QM

La elección del método QM depende de la precisión que se desea y el coste computacional del método. Los métodos QM más usados para el cálculo de reacciones enzimáticas son los basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT), los semiempíricos o los post-Hartree Fock (post-HF).

Los métodos semi-empíricos son los menos costosos computacionalmente. Los métodos semi-empíricos más usados son MNDO, AM1, PM3 y SCC-DFTB. Normalmente estos métodos se combinan con métodos más precisos como una forma de explorar la reacción y luego calcular la energía potencial con un método DFT o post-Hartree Fock.

Los métodos basados en DFT requieren más recursos computacionales pero son más precisos y versátiles que los semiempíricos (ya que se requieren mucho menos parámetros y éstos son independientes del sistema). El método semi-empírico SCC-DFTB usado en el presente trabajo, se basa en la teoría del funcional de la densidad con buenos resultados en el cálculo de energías relativas y geometrías [27].

MÉTODO MM

El método MM se define por el campo de fuerzas usado. Actualmente hay una gran variedad de campos de fuerzas para proteínas (CHARMM22 [30], AMBERFF99SB-ildn [31]), carbohidratos (GLYCAM06H [32]) o ácidos nucleicos (CHARM27 [33]). La evolución de los campos de fuerza para simulaciones QM/MM se centra en considerar el efecto de la región QM sobre las cargas parciales de la región MM mediante campos de fuerza polarizables. La función clásica de energía potencial (campo de fuerza) de la región MM contiene términos de enlace (alargamiento, flexión, torsión de enlace; deformaciones fuera del plano o torsiones impropias); términos de van der Waals del tipo Lennard-Jones; términos de interacción electrostáticas entre cargas puntuales rígidas.

ENERGÍA TOTAL DEL SISTEMA

La energía total del sistema (E_{total}) se puede calcular mediante un esquema aditivo y uno sustractivo. El esquema aditivo, inicialmente propuesto por Warshel y Levitt en 1976, es aplicado en la mayoría de programas QM/MM, y contiene tres términos:

$$E_{total} = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM/MM} \quad (2)$$

donde E_{total} es la energía total de sistema entero calculada al nivel de la teoría QM/MM, E_{QM} es la energía del ligando calculada al nivel de la teoría QM, E_{MM} es la energía de la

región MM calculada mediante mecánica clásica y $E_{QM/MM}$ es el término de acoplamiento explícito entre el ligando y el receptor, o sea, la energía de interacción QM/MM

$$E_{QM/MM} = E_{QM/MM}^{vdW} + E_{QM/MM}^{elec} + E_{QM/MM}^{enlace} \quad (3)$$

donde los términos de van der Waals y de enlace se calculan con mecánica molecular y el electrostático se calcula con mecánica cuántica.

El esquema sustractivo (o de integración mecánica) requiere de tres cálculos separados para determinar la energía total del sistema. El primer cálculo está relacionado con el sistema entero al nivel de la teoría MM. El ligando es tratado al nivel de la teoría QM y final e independientemente, al nivel de la teoría MM. El esquema sustractivo remueve todas las contribuciones MM internas del ligando y por lo tanto, los resultados de la energía MM contiene solo la energía del receptor y el solvente y la energía de la interacción entre el ligando y su entorno [28], [29].

$$E_{total} = E_{QM} + E_{MM}(total) - E_{MM}(QM) \quad (4)$$

En este caso las interacciones electrostáticas QM/MM se calculan a partir de cargas puntuales y sin considerar la polarización de la región QM.

En la región límite entre los dominios QM y MM no hay ninguna regla para deducir cuáles son los átomos que deben incluirse en la región MM y cuáles no. El procedimiento más formal es considerar un sistema MM o QM basado en un criterio químico (por ejemplo, la

entalpía o la geometría del centro activo), y determinar la variación cuando se añaden más residuos. Si el corte entre las regiones QM/MM se da en un enlace covalente, se debe asegurar que la estructura electrónica no se ve afectada. La forma más común es la de saturar la región QM con un átomo ficticio (generalmente un hidrógeno), con un pseudoenlace que sustituye el enlace QM-MM o con un orbital híbrido sobre el átomo MM [34].

1.9 ACOPLAMIENTO MOLECULAR

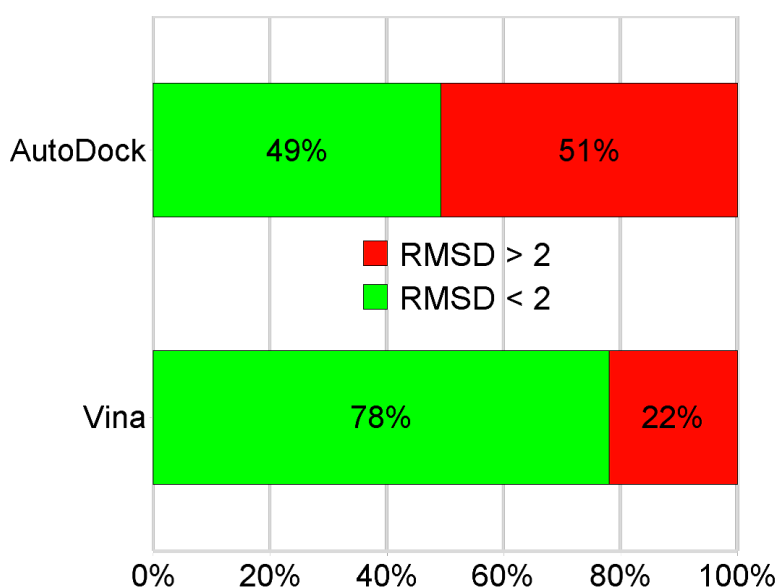
Acoplamiento molecular (*molecular docking*) es un procedimiento computacional eficiente, utilizado para predecir las uniones no covalentes de macromoléculas o, frecuentemente, de una macromolécula (receptor) y una molécula pequeña (ligando). El objetivo es predecir las conformaciones de los complejos macromolécula-ligando, y la afinidad en la unión. Los resultados de acoplamiento (*docking*) son ampliamente usados para sugerir los modos de unión del sustrato a una enzima. La mayoría de los algoritmos utilizados en docking molecular son capaces de generar un número amplio de estructuras y brindan una guía para escoger las estructuras más convenientes para estudiar en detalle el proceso de catálisis [35].

1.10 AUTODOCK VINA

AutoDock Vina (al que de ahora en adelante llamaremos Vina) es un programa computacional que permite predecir enlaces no covalentes de macromoléculas y moléculas pequeñas eficientemente, a partir de estructuras obtenidas de simulaciones MD o de algún modelador análogo. El objetivo principal es predecir conformaciones e interacciones. Vina deriva de una modificación de su predecesor AutoDock 4 que le brindan características de mayor precisión; Vina mejora significativamente la precisión de las predicciones del modo

de unión. Vina, comparado con AutoDock 4, tiene una capacidad superior de predecir estructuras con $\text{RMSD} \leq 2\text{\AA}$ entre las poses de acoplamiento y las obtenidas por cristalografía (Figura 12).

Figura 12 Datos de un grupo de 190 complejos evaluados para los que se encontraron $\text{RMSD} \leq 2\text{\AA}$ con AutoDock y con Vina [35].



Al igual que AutoDock 4, se necesitan especificar los hidrógenos polares en las estructuras de partida para el acoplamiento molecular para identificar correctamente los posibles enlaces de hidrógeno. No obstante, en Vina, los grados de libertad referentes a los átomos de hidrógeno, tales como las torsiones de los grupos hidroxilo, son degenerados. Por lo tanto en las estructuras de salida, algunos átomos de hidrógeno son colocados al azar (pero consistente con la estructura covalente). La mayoría de algoritmos Doking son capaces de generar una amplia lista de soluciones potenciales. Algunas de ellas pueden ser rechazadas inmediatamente a causa de sus altas energías.

Vina usa *funciones de puntuación* para clasificar los resultados. La forma funcional general de las conformaciones dependientes, parten de las funciones de puntuación que se diseñaron para trabajar con la siguiente expresión matemática:

$$C = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij}) \quad (5)$$

donde la sumatoria es sobre todos los pares de átomos que puedan tener movimiento relativo, normalmente se excluyen interacciones 1-4, por ejemplo, átomos separados por tres o más enlaces covalentes consecutivos. Aquí, cada átomo i es asignado un tipo t_i , y un conjunto asimétrico de funciones de interacción $f_{t_i t_j}$ definidas por la distancia interatómica r_{ij} [36]. EL valor de c puede ser definido como una suma de las contribuciones intermoleculares e intramoleculares:

$$c = c_{\text{inter}} + c_{\text{intra}} \quad (6)$$

El algoritmo de optimización, tiene como objetivo encontrar el mínimo global de c y otras conformaciones de baja energía [36]. Tanto en el caso de AutoDock como de Vina se utiliza una caja rectangular para definir el espacio de búsqueda. Esta caja puede estar centrada según la ubicación del receptor o ligando (por ejemplo en el carbono alfa de la serina catalítica acetilada), mientras que el tamaño y la posición exacta de la caja pueden ser definidos manualmente por el usuario. Ambos programas requieren representar el receptor y ligando en un formato llamado *pdbqt*, el cual consiste en una versión modificada del formato *pdb* Protein Data Bank. El archivo *pdb* puede convertirse en formato *pdbqt* con el uso del programa AutoDock tools. Una vez definido el lugar de unión y preparadas las moléculas, se inicia el proceso de acoplamiento. Los resultados contienen archivos de

información de configuración espacial y energía de afinidad, que pueden ser analizadas con el uso de algún tipo de visualizador como VMD [37].

1.11 CAMPOS DE FUERZA CHARMM

MÉTODOS DE MINIMIZACIÓN DE ENERGÍA: EL MÉTODO NEWTON-RAPHSON

Un mínimo de energía se logra por movimientos de cada átomo hasta que cada uno está en un punto donde la energía ya no se puede reducir por los movimientos o cuando el gradiente del potencial con respecto a los cambios en las coordenadas espaciales de los átomos, la fuerza, es cero. Durante el desarrollo de CHARMM, seis diferentes métodos matemáticos para minimizar una función de muchas variables se han aplicado a sistemas moleculares. Estos métodos difieren en su estabilidad, capacidad para llegar a un mínimo, idoneidad cuando un sistema está lejos de un mínimo, y la velocidad de convergencia. En CHARMM se trabaja el método ABNR que deriva del método Newton-Raphson [30].

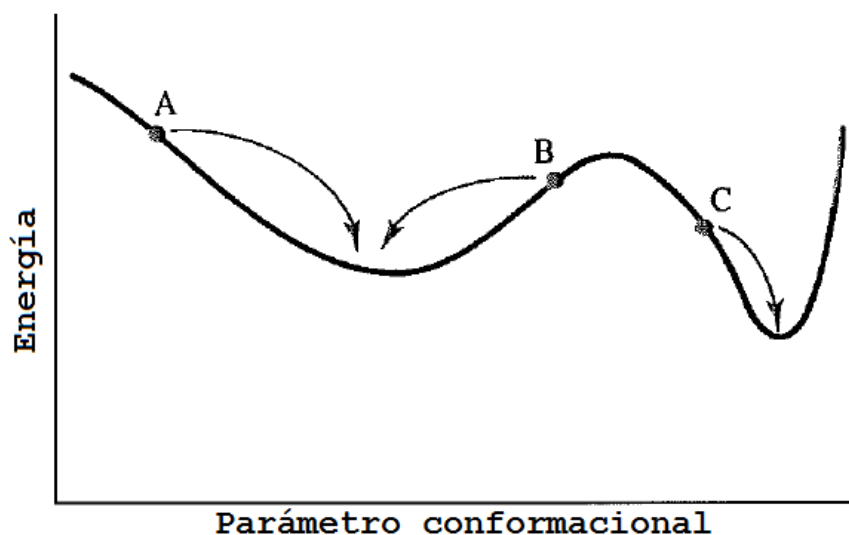
Para todos los sistemas, excepto para sistemas muy simples, la energía potencial es muy compleja, es una función multidimensional de las coordenadas. Por ejemplo, la energía de una conformación para el etano está en función de 18 coordenadas internas o 24 coordenadas cartesianas que son requeridas para especificar completamente la estructura. El camino en el cual la energía varía con las coordenadas es normalmente llamado *superficie de energía potencial*. Para sistemas con N átomos la energía es entonces una función de $3N-6$ coordenadas internas o $3N$ coordenadas cartesianas. Por lo que es imposible visualizar la superficie de energía, excepto para casos simples en donde la energía es una función de una o dos coordenadas. En modelamiento molecular estamos interesados en determinar los mínimos sobre la energía potencial. La disposición de los

átomos sobre un mínimo de la superficie corresponde a estados estables del sistema. El mínimo con la energía más baja se conoce como el *mínimo de energía global*. Para identificar las geometrías del sistema que corresponde a puntos de mínimos sobre la superficie de energía potencial nosotros usamos un *algoritmo de minimización*. Podemos clasificar los algoritmos de minimización en dos grupos: aquellos que usan derivadas de la energía respecto a las coordenadas y aquellos que no. Las derivadas pueden ser muy útiles porque ellas pueden proporcionar información del cambio de la energía, y usadas apropiadamente pueden aumentar la eficiencia con la que se localiza un mínimo. La mayoría de los algoritmos de minimización solo pueden localizar un mínimo que esté cerca al punto de partida. La Figura 13, es un esquema de una superficie de energía y los mínimos que podrían ser obtenidos a partir de los puntos de partida A, B y C. Para localizar más de un mínimo o localizar el mínimo de energía global usualmente se requiere generar diferentes puntos de partida, cada uno de los cuales son minimizados [38].

El problema de minimización puede ser descrito formalmente como sigue: dada una función f que depende de una o más variables independientes x_1, x_2, \dots, x_i , donde los valores de esas variables corresponden a un valor mínimo. Sobre un punto mínimo la primera derivada de la función respecto a cada una de las variables es cero y la segunda derivada son todas positivas:

$$\frac{\partial f}{\partial x_i} = 0; \quad \frac{\partial^2 f}{\partial x_i^2} > 0 \quad (7)$$

Figura 13 Superficie de energía en una dimensión. El método de minimización conduce la búsqueda desde el punto de partida al mínimo más cerca. Los mínimos locales tienen mayor energía que el global [38].



Dos algoritmos de minimización de primer orden que son frecuente usados en modelamiento molecular son los métodos de *etapas descendentes* (steepest descents) y *gradiente conjugado* (conjugate gradient). Estos métodos gradualmente cambian las coordenadas espaciales de los átomos de manera que el sistema se aproxima al punto mínimo. El método Newton-Raphson es un método de segundo orden que utiliza, no solo las primeras derivadas, sino que también usa las segundas derivadas para localizar un mínimo. La segunda derivada provee información acerca de la curvatura de la función, es decir, la trayectoria hacia el mínimo [38].

2. METODOLOGÍA

2.1 PREPARACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE CALB ACETILADA (AcCALB)

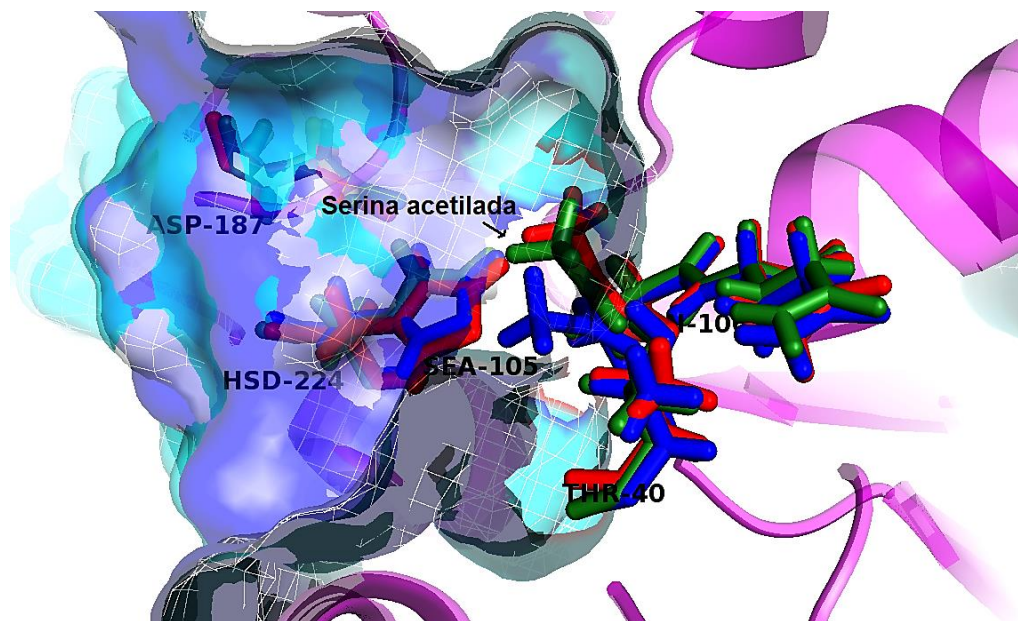
Las coordenadas iniciales de CalB corresponden a la estructura cristalina resuelta por difracción de rayos X (resolución: 1.55 Å)[22], con código 1TCA en el Protein Data Bank. Esta estructura contiene dos unidades de *N*-acetil-glucosamina (NAG), las cuales están distantes del sitio activo y con una influencia casi nula sobre la selectividad. Por lo tanto estas dos unidades de NAG fueron removidas[12].

El software PB2PQR[39], [40] fue usado para generar los átomos de hidrógeno ausentes, revisar la estructura de CalB junto con sus aguas cristalinas por PROPKA con el objetivo de generar los estados de protonación de las cadenas laterales de los aminoácidos, y la correcta orientación de las cadenas laterales de los residuos asparagina, histidina o glutamina. PDB2PQR es un software que facilita la preparación de las estructuras para cálculos electrostáticos como cálculos MM, y usa PROPKA para determinar los valores del pKa de los residuos[41], [42]. Los aminoácidos ácidos y básicos fueron usados en su forma ionizada, con excepción del Asp-134. Posterior a la protonación de la estructura de CalB, el grupo hidroxilo de la cadena lateral del residuo Ser105 fue reemplazado por el grupo acetato para reproducir el complejo acilenzima, y el nuevo residuo corresponde a la serina catalítica acetilada, fue nombrado SEA. El átomo de oxígeno del grupo acetato fue ubicado en tres diferentes orientaciones hacia el hueco oxianiónico (Figura 2.1), garantizando la formación de los puentes de hidrógeno con los residuos del hueco oxianiónico.

Tabla 2.1 Longitud (Å) de los puentes de hidrógeno esenciales para la actividad catalítica y estabilización de los complejos enzima-sustrato para AcCalB[12].

	COMPLEJOS AcCalB		
	ACE01	ACE02	ACE03
Asp187:OD-His224:HNH	1.94	1.94	1.92
SEA:O-Gln106:NH	2.39	1.85	2.07
SEA:O-Thr40:NH	1.96	1.68	2.04
SEA:O-Thr40:OH	1.68	3.28	1.89

Figura 2.1 Orientación del grupo acetyl de la serina catalítica acetilada dentro del bolsillo de unión de CalB: ACE01 (verde), ACE02 (azul) y ACE03 (rojo). La triada catalítica y el hueco oxianiónico se muestran en la representación licorice. La entrada al bolsillo de unión se representa por la superficie de color cian.



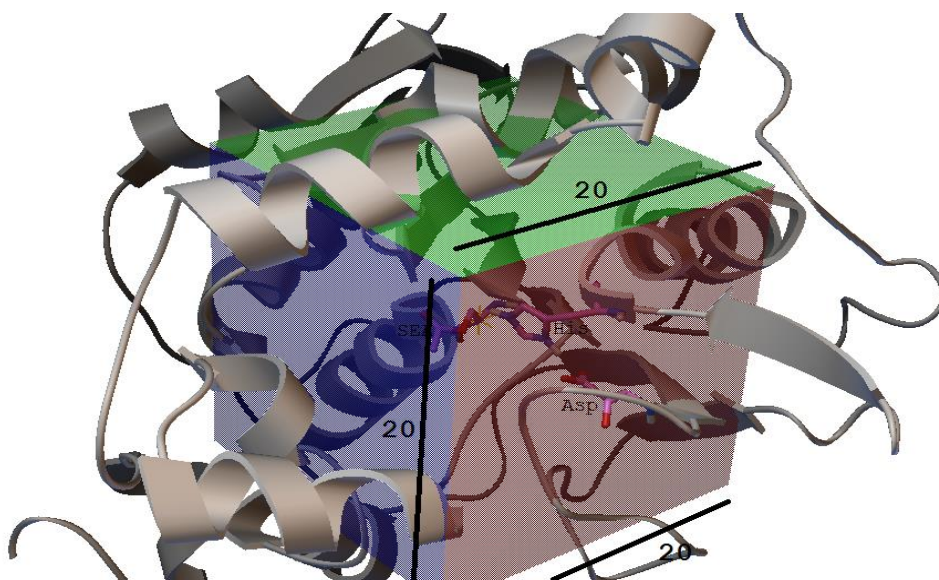
Las estructuras obtenidas para la acilenzima fueron llamadas ACE01, ACE02 y ACE03 de acuerdo al orden en que fueron creadas. Los parámetros de campo de fuerza para la serina acetilada (SEA) fueron adaptados de la serina y el grupo metil (ver apéndice A para consultar la topología). En las tres formas acetiladas de CalB la distancia de los puentes de hidrógeno estabilizantes con el hueco oxianiónico se mantienen en rangos aceptables (Tabla 2.1).

2.2 FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE MICHAELIS ENTRE AcCALB Y (R,S)-ATENOLOL

Para evaluar las interacciones del sustrato en el sitio activo de la enzima se realizó acoplamiento (*docking*) molecular, utilizando el programa AutoDock Vina[36]. Para construir los complejos de Michaelis (Acil-CalB – sustrato), tanto el *R*- como el *S*-atenolol fueron acoplados en la región catalítica de la enzima por interacciones de tipo no covalentes. Esta metodología permitió explorar diferentes orientaciones del sustrato dentro del sitio activo de la enzima. Para los cálculos de acoplamiento de los dos enantiómeros, se incluyeron los mismos parámetros, de tal forma que los resultados fueran comparables y reproducibles. La búsqueda de los complejos se hizo en una región de la enzima determinada por una caja cúbica de diferentes tamaños (20, 22, 24) centrada en SEA:CA (carbono alfa de la serina catalítica acetilada) para cada uno de los enantiómeros y con un parámetro de exhaustividad para las búsquedas de 20 (Figura 14). Los posibles complejos productivos (PCPs) fueron elegidos de acuerdo a la afinidad de unión al igual que por un criterio geométricos, determinado por la distancia de los grupos hidroxilo y amino del atenolol y la serina acetilada. El primer criterio es la RMSD entre la estructura de la proteína en los complejos y su estructura cristalina inicial. La estructura de la proteína puede presentar cambios conformacionales como resultado de la unión del sustrato al sitio activo de la proteína (efecto inducido). Se establece que para considerar que un complejo es productivo, el valor de la RMSD debe estar por debajo de 3Å. El segundo es que se deben conservar al menos dos de los tres puentes de hidrógeno formados entre el oxígeno

del grupo acetato de la SEA y los residuos del hueco oxianiónico Thr40 y Gln106. El tercer criterio es la distancia entre el grupo nucleofílico (-OH o -NH) presentes en el atenolol y el carbono (del grupo acetato) de la SEA y el átomo N_{ϵ} del residuo His224. Para ser considerados como complejo reactivos (complejos en los que se pueden llegar a un intermediario tetraédrico) las distancias de estos enlaces, en simultáneo, deben ser menores a 4\AA para el enlace nucleofílico e iguales o menores a 4\AA para el puente de hidrógeno formado entre el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo y el N_{ϵ} de la His224. [23].

Figura 14 Representación gráfica de la caja de búsqueda (GridBox). La caja está centrada en el carbono alfa de la SEA ($x = -0.077$; $y = -0.222$; $z = -0.029$). Las dimensiones de la caja contienen, además de la triada catalítica, los residuos del hueco oxianiónico y los residuos hidrofóbicos de las paredes que posiblemente pueden interactuar con el sustrato.



2.3 OPTIMIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE MICHAELIS

Debido a que el procedimiento de acoplamiento molecular aplicado considera a la proteína como un cuerpo rígido, los complejos AcCalB-(*R,S*)-atenolol seleccionados fueron sometidos a una cuidadosa optimización post-acoplamiento, con el objetivo de determinar el posible efecto inducido, expresado en pequeños desplazamientos en la estructura de la proteína por la presencia del sustrato. Se ha demostrado la crucial influencia de la estructura del sustrato en la quimioselectividad de CalB, determinada por el tamaño de las cadenas laterales del sustrato y por los grupos funcionales presentes en ellas [43]. Se usó una aproximación QM/MM porque no existen parámetros de campo de fuerza CHARMM para el atenolol. La región QM correspondiente al sustrato fue tratada por el método SCC-DFTB [13] y la región MM (AcCalB y aguas cristalinas) por CHARMM [14]. Las minimizaciones de energía consecutivas fueron aplicadas siguiendo un procedimiento similar al usado por De Oliveira et al [23] con algunas modificaciones. Se implementaron tres minimizaciones de energía consecutivas, en etapas descendentes y algoritmos ABNR (adapted-basis Newton-Raphson): (1) una restricción fija fue aplicada al backbone de la proteína y las partes restantes de la proteína fueron tratadas con una restricción armónica ($k = 30 \text{ mol } \text{Å}^{-2}$) en 100 pasos de minimización de rápido descenso; (2) el backbone de la proteína se mantuvo fijo, las cadenas laterales y las aguas cristalinas fueron mantenidas fijas y en el acoplamiento el sustrato tuvo libertad de movimiento en 800 pasos de una minimización; (3) solo el backbone fue fijado, el resto del sistema con libertad de movimiento durante la tercera minimización [12]. Orientados a determinar si los complejos optimizados corresponden a modos de unión productivos, analizamos tres criterios usados comúnmente para estudios de modelamiento molecular con lipasas, análogo a lo planteado por De Oliveira et al. [23].

Para las minimizaciones de energía no se utilizó solvente, es decir, los complejos fueron tratados como un sistema aislado en el vacío, donde solamente se consideraron las interacciones entre los grupos presentes en la cadena lateral del sustrato y los residuos

aminoácidos del sitios catalítico de la enzima (triada catalítica, los presentes en las paredes de la cavidad y el hueco oxianionico). La proteína fue considerada como un receptor rígido y seis moléculas (HOH130, HOH136, HOH149, HOH238, HOH265, HOH285) de agua fueron removidas del bolsillo de unión para acomodar el sustrato.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

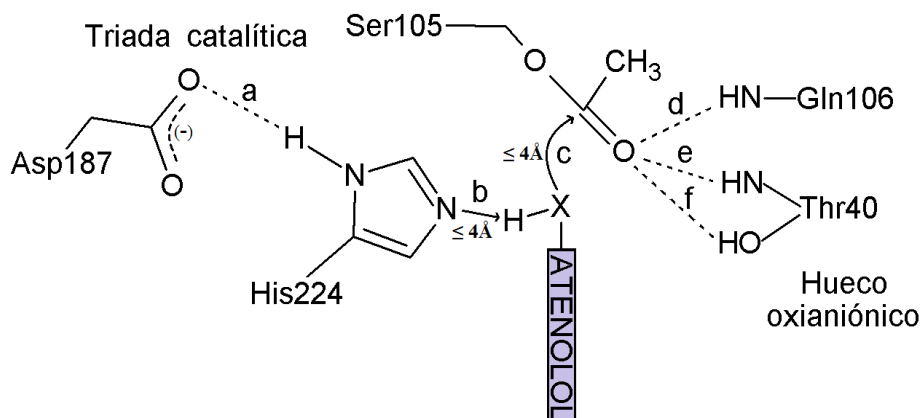
3.1 COMPLEJOS ACCALB-ATENOLOL (COMPLEJOS DE MICHAELIS)

El *R*- y *S*-atenolol fueron acoplados contra la CalB acilada (AcCalB) utilizando como blanco las estructuras ACE01, ACE02 y ACE03 (Figura 2.1). Los complejos AcCalB-atenuolol obtenidos mediante el procedimiento de acoplamiento implementado (sección 2.2), fueron analizados con el fin de identificar posibles complejos productivos –PCPs– (complejos que conducen a la formación del producto) para la *O*- o *N*-acilación del atenolol. De acuerdo con el mecanismo generalmente aceptado para reacciones catalizadas por lipasas [7], para que pueda ocurrir la *O*- o *N*-acilación del atenolol, el grupo OH o NH del atenolol debe posicionarse de forma simultánea cerca a los átomos His224:Ne y SEA:C de la enzima acilada, respectivamente (Figura 3.1). Únicamente se encontraron complejos en los que el grupo hidroxilo cumple con este criterio, lo que sugiere que la reacción presenta una quimioselectividad exclusiva en favor de la formación del producto *O*-acilado (*O*-acetil-atenuolol).

Para el *R*- y *S*-atenolol se identificaron prácticamente el mismo número total de PCPs (20 y 19 complejos, respectivamente). La energía libre de unión de los complejos AcCalB *R*-atenolol se encuentra en el rango de -4.3 a -5.8 kcal/mol, mientras que la de los complejos AcCalB *S*-atenolol varía entre -4.3 kcal/mol y -5.6 kcal/mol (ver apéndice B para más detalles). Los PCPs identificados pudieron ser agrupados de acuerdo a dos modos de unión (denominados modos de unión I y II). En el modo I la cadena lateral feniletanamida de la molécula de atenolol se encuentra posicionada en el bolsillo hidrofóbico grande de CalB, mientras que su cadena lateral isopropilamino se orienta hacia el bolsillo mediano. En el modo II las cadenas laterales del atenolol se orientan de manera contraria al modo I (Figura 16).

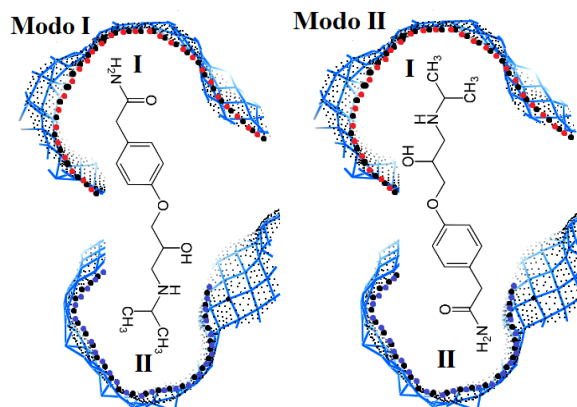
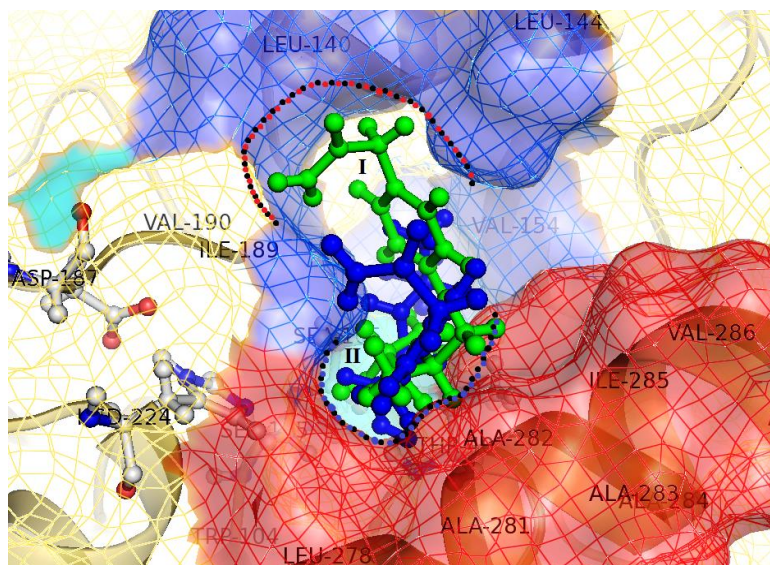
Los PCPs identificados involucran únicamente a las acilenzimas ACE01 y ACE03. Para ACE02 no se encontraron PCPs. Esto puede atribuirse a que la orientación del grupo acilo en ACE02 no permite que el sustrato posicione adecuadamente ninguno de sus grupos reactivos para ejecutar el ataque nucleofílico. Como puede verse en la Figura 15, en el caso de ACE02, una posición adecuada del grupo NH u OH del atenolol conllevaría a repulsiones estéricas entre las cadenas laterales del atenolol y los residuos hidrofóbicos circundantes que hacen parte del bolsillo de unión de CalB, dando como resultado estructuras menos estables.

Figura 15 Estructura representativa de los complejos de Michaelis entre AcCalB y atenolol (X = N- u O- de acuerdo a los grupos nucleofílicos del atenolol). **a – f** son las distancias interatómicas más importantes para el proceso catalítico. Para que ocurra la *N*- u *O*-acilación del atenolol, el grupo NH u OH de este último debe posicionarse simultáneamente a una distancia $\leq 4 \text{ \AA}$ de los residuos catalíticos His224 y SEA (ser105 acilada) [12].



El siguiente paso en este estudio fue someter los PCPs identificados a un protocolo de optimización (ver metodología), esto con el fin de considerar posibles efectos de ajuste inducido en la proteína por presencia del sustrato [43], ya que durante el procedimiento de-

Figura 16 Representación de los dos modos de unión del atenolol en el bolsillo de unión de CalB (se presenta una vista frontal del bolsillo de unión con la triada catalítica Asp-His-Ser orientada de izquierda a derecha). En el modo I la función feniletanamida de la molécula de atenolol se encuentra posicionada en el bolsillo hidrofóbico grande de CalB (etiquetado aquí como zona **I**), el cual está delimitado por los residuos Ile189 y Val190 a la izquierda, Val154 en el extremo derecho, Leu140 y Leu144 en la parte superior, y en el fondo, Asp134 a la izquierda y Gln157 a la derecha. En el modo II la función feniletanamida del atenolol está dirigida hacia el bolsillo hidrofóbico mediano de CalB (etiquetado aquí como zona **II**), donde se ubican los residuos Trp104 y Leu278-Ala287 (hélice α 10).



-acoplamiento la proteína fue tratada como un cuerpo rígido. Los complejos optimizados fueron analizados para determinar finalmente si corresponden a un modo de enlace productivo o no, de acuerdo con tres criterios: (1) distorsión de la estructura de la proteína, (2) conservación de los puentes de hidrógeno entre la serina acilada (SEA) y los residuos del hueco oxianiónico (distancias **d-f** en la Figura 3.1), (3) la distancia entre los grupos nucleofílicos del atenolol y los átomos His224:N_ε y SEA:C (distancias **b** y **c** en la Figura 3.1) [23].

Para determinar la distorsión de la proteína, se calculó el valor de la desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) entre la estructura cristalina de CalB y la estructura de CalB en los complejos optimizados. El valor de la RMSD indica que tan diferentes son la estructura cristalina de CalB y la obtenida después de la optimización de los PCPs. Entre mayor sea el valor de RMSD mayor será la diferencia entre las estructuras. Cambios drásticos en la estructura de CalB pueden conllevar a una disminución (o anulación) de su actividad catalítica, especialmente si la posición de residuos importantes para el proceso catalítico (e.g. residuos del hueco oxianiónico) se ve afectada. De acuerdo con estudios realizados para CalB, el valor de RMSD entre su estructura cristalina y su estructura en los complejos optimizados no debe superar los 3 Å [44].

Los valores de RMSD obtenidos en este estudio indican una alta conservación de la estructura de la proteína. En promedio, el valor de RMSD observado para los diferentes complejos optimizados fue de 0.053 Å. De hecho, los puentes de hidrógeno con los residuos del hueco oxianiónico se conservaron en todos los complejos después de la optimización. Por tanto, todos los complejos optimizados cumplen con los dos primeros criterios para ser considerados complejos productivos. Sin embargo, no todos satisfacen el tercer criterio. Los complejos optimizados que cumplen con todos los criterios y que por tanto se consideran complejos productivos, se describen en las secciones siguientes.

3.2 COMPLEJOS PRODUCTIVOS AcCALB *R*-ATENOLOL

Después de la optimización, solo el 25% de los PCPs de *R*-atenolol obtenidos del procedimiento de acoplamiento cumplió con todos los criterios para ser considerado un complejo productivo. Todos estos complejos corresponden a modos productivos para la *O*-acilación. En la Tabla 3.1 se muestra el valor de la longitud del puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo del atenolol y el átomo His224:Ne (distancia **b** en la Figura 3.1) así como también la distancia para el ataque nucleofílico (distancia **c** en la Figura 3.1) en estos complejos (etiquetados como OR6, OR7, OR13, OR16 y OR20; -Figura 3.3-).

En todos los complejos productivos de *R*-atenolol obtenidos después de la optimización el sustrato está orientado en modo de unión I (Figura 17). La distancia **c** es muy similar en los complejos OR6, OR7 y OR20 (alrededor de 3.30-3.50 Å). Sin embargo, en OR6 el puente de hidrógeno entre el oxígeno alcohol e His224 es más fuerte (con una distancia **-b-** de 2.10 Å). Esto sugiere que la acilación del *R*-atenolol vía OR6 es más favorable respecto a OR7 y OR20, ya que entre más fuerte sea el puente de hidrógeno con His224 mayor será la nucleofilicidad del oxígeno alcohol, facilitando el ataque nucleofílico sobre SEA. Además, el ángulo para el ataque nucleofílico observado en OR6 (85.47°) está más cercano al ángulo ideal (107°) que se encuentra reportado para una adición nucleofílica sobre un grupo carbonilo [45]. Por otro lado, los puentes de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico de SEA y Thr40 (distancias **e** y **f** en la Tabla 3.1) son más fuertes en OR6, los cuales pueden contribuir a una mayor estabilización del estado de transición e intermediario tetraédrico que se deriven de este complejo, comparado con OR7 y OR20.

Tabla 3.1 Distancias interatómicas y ángulos relevantes para el proceso catalítico en los complejos productivos AcCalB *R*-atenolol después de la optimización^a

Nombre del complejo	Distancia (Å)					
	b	c	d	e	f	a
OR6	2.10 (167.56)	3.48 (85.47)	2.20(136.75)	1.65(163.79)	1.84(165.05)	1.94(165.43)
OR7	3.02 (128.33)	3.28 (64.66)	1.99(148.45)	2.05(159.15)	1.84(165.66)	1.85(168.86)
OR13	2.03(169.05)	3.92(76.19)	2.09(141.45)	1.96(161.68)	1.85(168.53)	1.86(167.97)
OR16	2.02(170.09)	3.84(75.96)	2.09(151.41)	1.96(161.57)	1.85(168.55)	1.86(168.06)
OR20	2.99 (155.81)	3.32 (72.15)	2.02(152.06)	2.93(160.95)	1.87(161.62)	1.84(169.07)

^a Las distancias **a-f** corresponden a las que se muestran en la Figura 3.1. Entre paréntesis se muestran los ángulos (en grados) para los respectivos puentes de hidrógeno y el ataque nucleofílico sobre la serina acetilada (O•••C=O).

En contraste con OR6, OR7 y OR20, en OR13 y OR16 las distancias **c** y **b** son muy similares (alrededor de 3.90 Å y 2.00 Å, respectivamente), lo que sugiere que la reactividad de estos complejos es muy similar. Por otro parte, la distancia **c** en OR13 y OR16 es más larga comparada con la que se observa en OR6, OR7 y OR20, lo que muestra que la acilación del *R*-atenolol vía OR6 es también más favorable respecto a estos complejos (véase el párrafo anterior).

3.3 COMPLEJOS PRODUCTIVOS AcCALB *S*-ATENOLOL

Después de la optimización, el 74% de los PCPs de *S*-atenolol obtenidos del procedimiento de acoplamiento cumplió con todos los criterios para ser considerado un complejo productivo. Al igual que para el *R*-atenolol, todos estos complejos corresponden a modos productivos para la *O*-acilación. En la Tabla 3.2 se muestran las distancias interatómicas relevantes para el proceso catalítico observadas en estos complejos (etiquetados como OS1-OS8, OS12, OS13, OS15-OS17 y OS19 -Figura 18-). En uno de los complejos

productivos el *S*-atenolol se encuentra orientado en modo de enlace II (OS3), mientras que en los otros complejos se encuentra en modo I.

Figura 17 Complejos productivos AcCalB *R*-atenolol obtenidos después de la optimización. El sustrato se muestra en verde. Los puentes de hidrógeno entre los residuos catalíticos se muestran en rojo. El puente de hidrógeno entre His224 y el grupo hidroxilo del atenolol se muestra en azul.

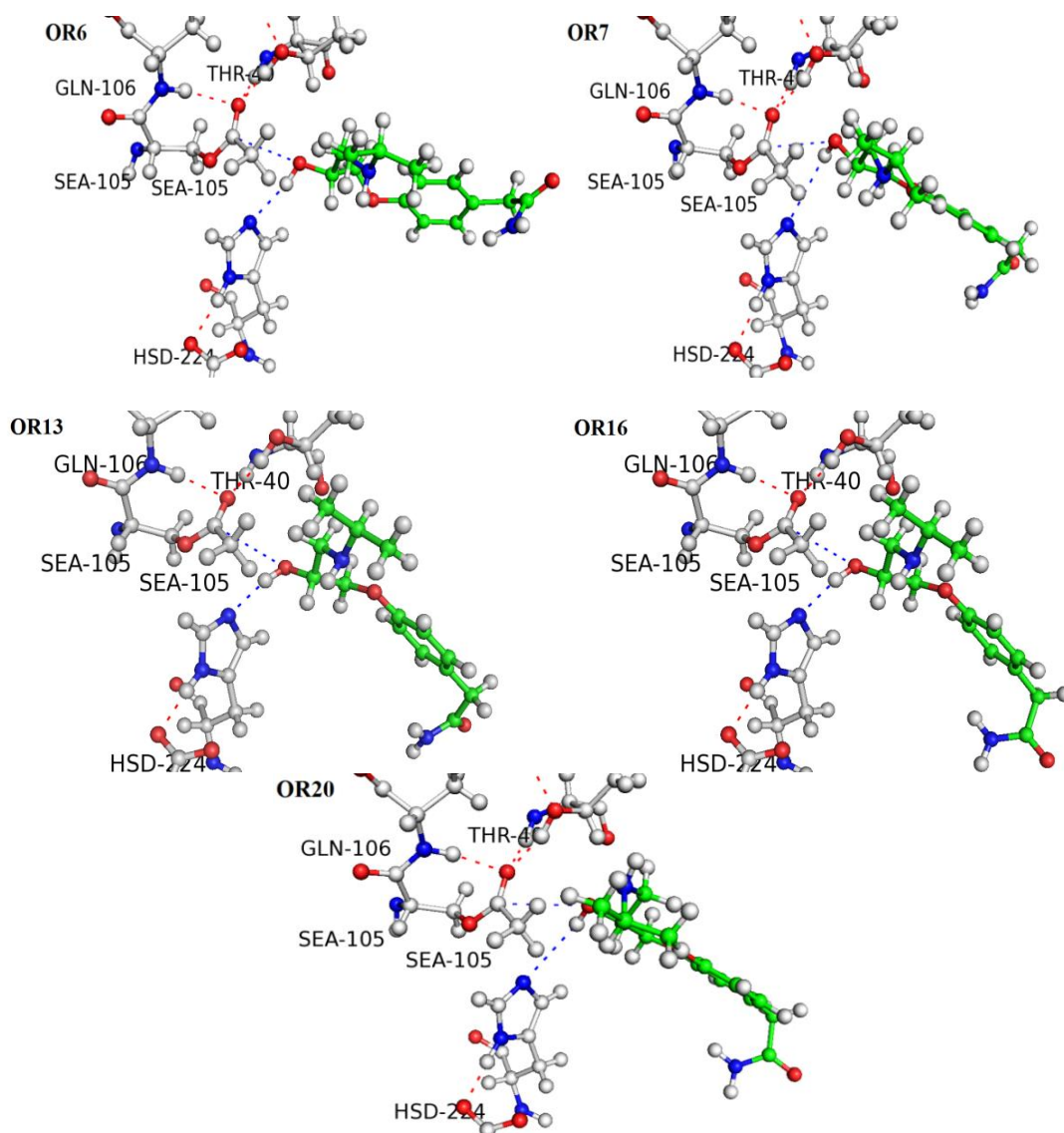


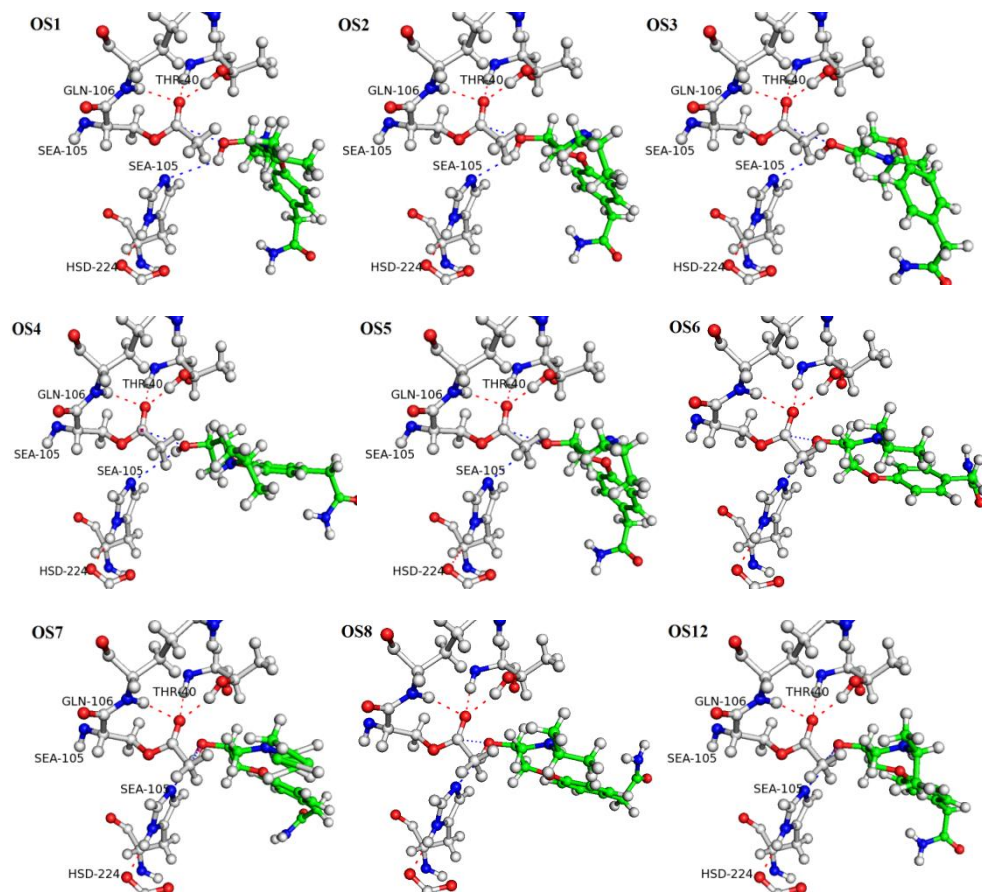
Tabla 3.2 Distancias interatómicas y ángulos relevantes para el proceso catalítico en los complejos productivos AcCalB *S*-atenolol después de la optimización^a

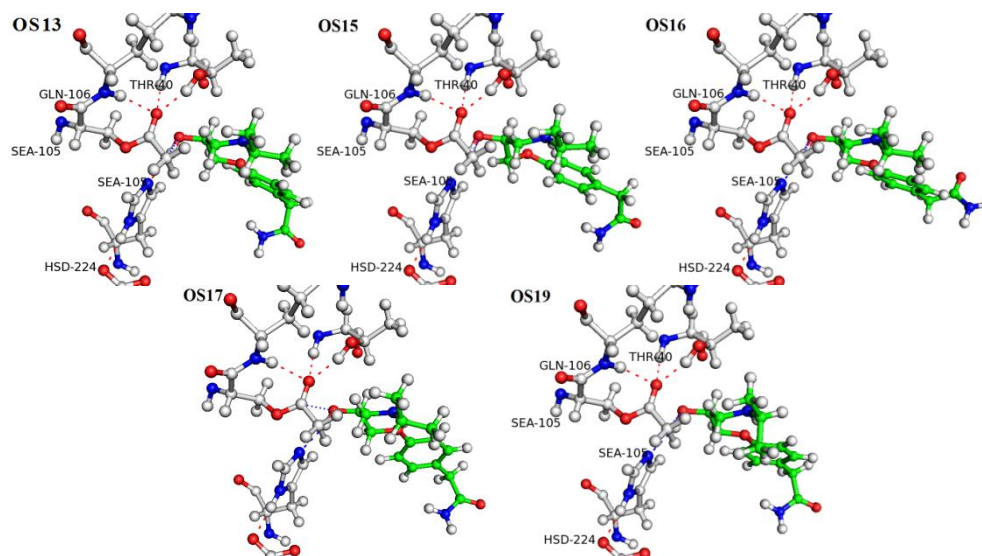
Nombre del complejo	Distancia (Å)					
	b	c	d	e	f	a
OS1	3.04(126.68)	3.48(89.15)	2.19(137.56)	1.86(164.12)	1.66(172.64)	1.88(166.18)
OS2	2.64(138.93)	3.44(84.91)	2.17(137.49)	1.85(163.80)	1.66(173.86)	1.91(166.39)
OS3	2.84(142.89)	3.41(89.50)	2.20(137.49)	1.86(164.07)	1.65(174.44)	1.91(167.02)
OS4	3.10(123.39)	3.28(87.31)	2.22(136.50)	1.90(163.69)	1.66(173.55)	1.91(165.49)
OS5	3.67(87.69)	3.44(85.82)	2.21(137.97)	1.84(164.22)	1.67(172.15)	1.88(164.76)
OS6	2.07(166.59)	3.90(73.61)	2.09(149.20)	2.04(161.09)	1.87(166.52)	1.88(167.81)
OS7	2.04(169.05)	3.43(71.05)	2.05(146.45)	2.13(159.65)	1.88(165.61)	1.87(168.24)
OS8	2.05(168.60)	3.74(72.42)	2.07(147.62)	2.09(160.40)	1.88(165.86)	1.88(167.98)
OS12	2.09(163.23)	3.30(71.89)	2.04(146.79)	2.11(159.35)	1.87(165.77)	1.88(168.28)
OS13	2.05(168.37)	3.43(70.45)	2.05(146.44)	2.13(159.65)	1.88(165.65)	1.88(168.16)
OS15	1.96(174.71)	3.24(72.23)	2.02(146.35)	2.12(158.61)	1.86(167.05)	1.85(167.56)
OS16	2.04(167.83)	3.47(71.32)	2.06(146.76)	2.12(159.85)	1.88(165.59)	1.87(168.28)
OS17	2.06(165.20)	3.91(73.60)	2.10(148.99)	2.05(161.08)	1.87(166.96)	1.87(168.37)
OS19	2.12(160.93)	3.37(72.38)	2.05(147.61)	2.09(159.81)	1.87(166.08)	1.87(168.54)

^a Las distancias **a-f** corresponden a las que se muestran en la Figura 3.1. Entre paréntesis se muestran los ángulos (en grados) para los respectivos puentes de hidrógeno y el ataque nucleofílico sobre la serina acetilada (O•••C=O).

Las diferencias más significativas que se observan en los complejos productivos de *S*-atenolol son en relación con la distancia **b** y el ángulo para el ataque nucleofílico. En los complejos OS2, OS3, OS6, OS7, OS12, OS13, OS15-OS17 y OS19 la distancia **b** es más corta (< 2.90 Å) que en los complejos OS1, OS4 y OS5 (> 3.0 Å), lo que sugiere una mayor nucleofilicidad del oxígeno alcohol en los primeros. Por otro lado, los complejos OS1 y OS3 presentan un mejor ángulo para el ataque nucleofílico (aproximadamente 90 °). Con base en este análisis, se puede decir en general que la transformación del *S*-atenolol es más favorable vía los complejos OS1, OS3 y OS15.

Figura 18 Complejos productivos AcCalB *S*-atenolol obtenidos después de la optimización. El sustrato se muestra en verde. Los puentes de hidrógeno entre los residuos catalíticos se muestran en rojo. El puente de hidrógeno entre His224 y el grupo hidroxilo del atenolol se muestra en azul.





3.4 ENANTIOSELECTIVIDAD DE LA REACCIÓN

Los resultados obtenidos en este proyecto no permiten explicar claramente la enantioselectividad que se observa experimentalmente en la reacción a favor de la transformación del *R*-atenolol. Por el contrario, los resultados obtenidos sugieren que la primera etapa de la reacción de desacilación (que corresponde a la formación del segundo intermediario tetraédrico a partir de los complejos de Michaelis AcCalB-atenolol -Esquema 1-) ocurre en favor de la transformación del *S*-atenolol. Esto con base en dos aspectos: i) existe un mayor número de complejos AcCalB-atenolol productivos para el *S*-atenolol que para el *R*-atenolol y ii) existen complejos del *S*-atenolol en los que el puente de hidrógeno entre el hidrógeno alcohol e His224 (distancia **b** en la Figura 3.1) es más fuerte respecto a los complejos de *R*-atenolol (véase por ejemplo el caso de OR6 y OS15). Por tanto, para obtener información acerca del origen de la enantioselectividad a nivel molecular se sugiere realizar un estudio computacional más riguroso. Por ejemplo, llevar a cabo simulaciones de dinámica molecular de los complejos de Michaelis AcCalB-atenolol [12], modelar el segundo intermediario tetraédrico y calcular los perfiles de reacción.

4. CONCLUSIONES

El modelamiento de los complejos de Michaelis entre atenolol y CalB acetilada (AcCalB), demostró que solo existen complejos productivos que conducen a la formación de *R*- y *S*-*O*-acetil-atenolol. Esto sugiere que la reacción de acetilación del atenolol catalizada por CalB presenta una quimioselectividad exclusiva en favor de la *O*-acilación del atenolol, y que esta última es por ende la responsable de la enantioselectividad que se observa experimentalmente. Se encontró que el *R* y *S*-atenolol se pueden orientar en el bolsillo de unión de CalB en dos modos (denominados modos I y II), ya sea con la cadena feniletanamida o isopropilamino posicionada en el bolsillo hidrofóbico grande de CalB, respectivamente.

Por otro lado, este estudio muestra que para comprender el origen de la enantioselectividad de la reacción es necesario un estudio computacional más riguroso (que involucre además las otras especies químicas que participan en la reacción), ya que en los complejos de Michaelis no se pudo identificar ningún parámetro geométrico que explique el favorecimiento de CalB hacia la transformación más rápida del atenolol que se observa experimentalmente.

REFERENCIAS

- [1] A. A. Pearson, T. E. Gaffney, T. Walle, and P. J. Privitera, "A stereoselective central hypotensive action of atenolol.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 250, no. 3, pp. 759–763, Sep. 1989.
- [2] D. Zelaszczyk and K. Kieć-Kononowicz, "Biocatalytic approaches to optically active beta-blockers," *Curr. Med. Chem.*, vol. 14, no. 1, pp. 53–65, 2007.
- [3] S. V. Damle, P. N. Patil, and M. M. Salunkhe, "Biotransformations with *Rhizopus arrhizus* and *Geotrichum candidum* for the preparation of (S)-Atenolol and (S)-Propranolol," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 8, no. 8, pp. 2067–2070, Aug. 2000.
- [4] S. V. Darnle, P. N. Patil, and M. M. Salunkhe, "Chemoenzymatic Synthesis of (R) - and (S) - Atenolol and Propranolol employing Lipase Catalyzed Enantioselective Esterification and Hydrolysis," *Synth. Commun.*, vol. 29, no. 22, pp. 3855–3862, Nov. 1999.
- [5] O. Barbosa, C. Ortiz, R. Torres, and R. Fernandez-Lafuente, "Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: Enantiospecific production of atenolol acetate," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 71, no. 3–4, pp. 124–132, Sep. 2011.
- [6] H. S. Bevinakatti and A. A. Banerji, "Lipase catalysis in organic solvents. Application to the synthesis of (R)- and (S)-atenolol," *J. Org. Chem.*, vol. 57, no. 22, pp. 6003–6005, 1992.
- [7] A. Ghanem, "Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds," *Tetrahedron*, vol. 63, no. 8, pp. 1721–1754, Feb. 2007.
- [8] M. T. Reetz, "Lipases as practical biocatalysts," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 6, no. 2, pp. 145–150, Apr. 2002.
- [9] V. Gotor-Fernández, R. Brieva, and V. Gotor, "Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 40, no. 3–4, pp. 111–120, Jun. 2006.

- [10] Alexander-Nikolaj Otte, “Combined Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Investigation of Enantioselective Reactions in Lipases,” Tesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, 2006.
- [11] S. Raza, L. Fransson, and K. Hult, “Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: A molecular dynamics study,” *Protein Sci.*, vol. 10, no. 2, pp. 329–338, 2001.
- [12] A. M. Escorcia, M. C. Daza, and M. Doerr, “Computational study of the enantioselectivity of the O-acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 108, pp. 21–31, Oct. 2014.
- [13] M. Elstner, D. Porezag, G. Jungnickel, J. Elsner, M. Haugk, T. Frauenheim, S. Suhai, and G. Seifert, “Self-consistent-charge density-functional tight-binding method for simulations of complex materials properties,” *Phys. Rev. B*, vol. 58, no. 11, pp. 7260–7268, Sep. 1998.
- [14] B. R. Brooks, C. L. Brooks, A. D. Mackerell, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caflisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoseck, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, H. L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D. M. York, and M. Karplus, “CHARMM: The biomolecular simulation program,” *J. Comput. Chem.*, vol. 30, no. 10, pp. 1545–1614, 2009.
- [15] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman, 2005.
- [16] Francis A. Carey, *Química orgánica*, 6th ed. McGraw-Hill, 2006.
- [17] G. P. Moss, “Basic terminology of stereochemistry (IUPAC Recommendations 1996),” *Pure Appl. Chem.*, vol. 68, no. 12, Jan. 1996.
- [18] A. Ghanem and H. Y. Aboul-Enein, “Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents,” *Tetrahedron Asymmetry*, vol. 15, no. 21, pp. 3331–3351, Nov. 2004.
- [19] A. B. Salleh and M. Basri, *New Lipases and Proteases*. Nova Publishers, 2006.

- [20] Y. Chen, B. Xiao, J. Chang, Y. Fu, P. Lv, and X. Wang, "Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor," *Energy Convers. Manag.*, vol. 50, no. 3, pp. 668–673, Mar. 2009.
- [21] C. E. Mirón, P. C. García, and S. V. Cruz, *Fundamentos de síntesis de fármacos*. Edicions Universitat Barcelona, 2005.
- [22] J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, and T. A. Jones, "The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*," *Struct. Lond. Engl.* 1993, vol. 2, no. 4, pp. 293–308, Apr. 1994.
- [23] E. B. De Oliveira, C. Humeau, L. Chebil, E. R. Maia, F. Dehez, B. Maigret, M. Ghoul, and J.-M. Engasser, "A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 59, no. 1–3, pp. 96–105, Jul. 2009.
- [24] Advanced Chemistry Development, Inc., *ACD/ChemSketch*. Toronto, ON, Canada: Copyright © 1997–2009 Advanced Chemistry Development, Inc., 2009.
- [25] Ira N. Levine, *Química Cuántica*, 5th ed. Brooklyn, New York: Prentice Hall S.A., 2001.
- [26] F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry*. John Wiley & Sons, 2013.
- [27] G. de M. Seabra, R. C. Walker, M. Elstner, D. A. Case, and A. E. Roitberg, "Implementation of the SCC-DFTB Method for Hybrid QM/MM Simulations within the Amber Molecular Dynamics Package†," *J. Phys. Chem. A*, vol. 111, no. 26, pp. 5655–5664, 2007.
- [28] T. Tuttle, "Chapter 1 Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Approaches in Drug Design," in *Drug Design Strategies: Computational Techniques and Applications*, 2012.
- [29] H. M. Senn and W. Thiel, "QM/MM Methods for Biomolecular Systems," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 48, no. 7, pp. 1198–1229, Feb. 2009.
- [30] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus, "CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations," *J. Comput. Chem.*, vol. 4, no. 2, pp. 187–217, 1983.

- [31] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J. L. Klepeis, R. O. Dror, and D. E. Shaw, “Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field,” *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 78, no. 8, pp. 1950–1958, 2010.
- [32] K. N. Kirschner, A. B. Yongye, S. M. Tschampel, J. González-Outeiriño, C. R. Daniels, B. L. Foley, and R. J. Woods, “GLYCAM06: A generalizable biomolecular force field. Carbohydrates,” *J. Comput. Chem.*, vol. 29, no. 4, pp. 622–655, 2008.
- [33] A. Pérez, F. Lankas, F. J. Luque, and M. Orozco, “Towards a molecular dynamics consensus view of B-DNA flexibility,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 7, pp. 2379–2394, Apr. 2008.
- [34] Y. Zhang, “Pseudobond ab initio QM/MM approach and its applications to enzyme reactions,” *Theor. Chem. Acc.*, vol. 116, no. 1–3, pp. 43–50, Oct. 2005.
- [35] O. Trott and A. J. Olson, “AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading,” *J. Comput. Chem.*, vol. 31, no. 2, pp. 455–461, Jan. 2010.
- [36] O. Trott and A. J. Olson, “AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading.” The Scripps Research Institute, Molecular Biology, La Jolla, CA., 2009.
- [37] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, “VMD: visual molecular dynamics,” *J. Mol. Graph.*, vol. 14, no. 1, pp. 33–38, 27–28, Feb. 1996.
- [38] R. Leach Andrew, . *Molecular Modelling: Principles and applications.*, 2nd ed. Pearson, prentice hall, 2001.
- [39] Poisson Boltzmann, <http://www.poissonboltzmann.org/pdb2pqr/>. .
- [40] T. J. Dolinsky, J. E. Nielsen, J. A. McCammon, and N. A. Baker, “PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. suppl 2, pp. W665–W667, Jul. 2004.
- [41] D. C. Bas, D. M. Rogers, and J. H. Jensen, “Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein–ligand complexes,” *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 73, no. 3, pp. 765–783, 2008.

- [42] H. Li, A. D. Robertson, and J. H. Jensen, “Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values,” *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 61, no. 4, pp. 704–721, 2005.
- [43] F. Le Joubioux, Y. B. Henda, N. Bridiau, O. Achour, M. Graber, and T. Maugard, “The effect of substrate structure on the chemoselectivity of *Candida antarctica* lipase B-catalyzed acylation of amino-alcohols,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 85–86, pp. 193–199, Jan. 2013.
- [44] I. Vallikivi, L. Fransson, K. Hult, I. Järving, T. Pehk, N. Samel, V. Tõugu, L. Villo, and O. Parve, “The modelling and kinetic investigation of the lipase-catalysed acetylation of stereoisomeric prostaglandins,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 35, no. 1–3, pp. 62–69, Aug. 2005.
- [45] H. B. Burgi, J. D. Dunitz, and E. Shefter, “Geometrical reaction coordinates. II. Nucleophilic addition to a carbonyl group,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 95, no. 15, pp. 5065–5067, 1973.
- [46] A. M. Escorcia, D. Molina, M. C. Daza, and M. Doerr, “Acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B: An experimental and computational study,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 98, pp. 21–29, Dec. 2013.

BIBLIOGRAFÍA

BARBOSA, O. *et al.* Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: Enantiospecific production of atenolol acetate. In: *J. Mol. Catal. B Enzym.* Sep. 2011. vol. 71, no. 3–4, pp. 124–132.

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

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.* Jul. 2009. vol. 59, no. 1–3, pp. 96–105.

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

GHANEM, A. and Aboul-Enein, H.Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. In: *Tetrahedron Asymmetry.* Nov. 2004. vol. 15, no. 21, pp. 3331–3351.

JOUBIOUX, F. The effect of substrate structure on the chemoselectivity of *Candida antarctica* lipase B-catalyzed acylation of amino-alcohols. In: *Journal of Molecular Catalysis Enzymatic.* Jan, 2013. vol. 85–86, pp. 193–199.

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

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

ZELASZCZYK, D. and Kieć-Kononowicz, K. Biocatalytic approaches to optically active beta-blockers. In: *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 in 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 !	HN-N	H21	OE	H11
ATOM HA	HB		0.09 !				
GROUP				! HA-CA--C2--OM-CE--C1-H12			
ATOM C1	CT3		-0.17 !				
ATOM CE	CD		0.63 !	O=C	H23		H13
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 Escorcía et al. (2013)[46]

Apéndice B

Acoplamiento molecular del atenolol

Los posibles complejos productivos (PCPs) AcCalB-atenolol identificados mediante el procedimiento de acoplamiento se muestran en las Figuras B.1-B.4. En las Tablas B.1-B.2 se muestran las distancias entre el grupo amino e hidroxilo del atenolol y los residuos catalíticos de CalB His224 y la Ser105 acilada (SEA). Los complejos fueron nombrados como OR u OS de acuerdo a si se trata del *R*- o *S*-atenolol, respectivamente, seguido de 1,2,3.... de acuerdo con el orden en que fueron identificados.

Tabla B.1 Distancias interatómicas entre los grupos nucleofílicos del *R*-atenolol y el carbono carbonílico de la serina catalítica acetilada (SEA:C) y el átomo N ϵ de la histidina catalítica (His224:N ϵ) en los PCPs obtenidos del acoplamiento molecular.

Nombre del complejo	Acilenzima blanco	His224:N ϵ -Sub:H _O (Å)	SEA:C-Sub:O (Å)	His224:N ϵ -Sub:H _N (Å)	SEA:C-Sub:N (Å)	Afinidad (kcal/mol)
OR1	ACE01	3.90	3.53	5.15	4.59	- 4.9
OR2	ACE01	3.45	3.58	5.14	4.44	- 4.9
OR3	ACE01	4.04	3.59	5.15	4.41	- 4.8
OR4	ACE01	3.95	3.52	5.20	4.23	- 4.7
OR5	ACE01	3.66	4.22	6.95	7.15	- 4.6
OR6	ACE01	2.55	3.89	5.53	4.82	- 4.3
OR7	ACE03	3.33	3.01	4.54	4.15	- 5.8
OR8	ACE03	4.00	3.34	4.59	4.27	- 5.8
OR9	ACE03	2.50	3.28	4.75	4.31	- 5.7
OR10	ACE03	3.19	3.43	4.63	4.16	- 5.7
OR11	ACE03	2.55	3.41	4.93	4.66	- 5.7
OR12	ACE03	4.01	3.39	4.75	4.48	- 5.7
OR13	ACE03	2.70	3.43	4.95	4.03	- 5.6
OR14	ACE03	2.57	3.24	4.51	3.96	- 5.6
OR15	ACE03	2.86	3.39	5.14	3.81	- 5.5
OR16	ACE03	2.46	3.38	4.98	4.11	- 5.5
OR17	ACE03	3.75	3.38	5.32	3.20	- 5.5
OR18	ACE03	2.54	3.36	4.46	4.21	- 5.4
OR19	ACE03	3.98	3.42	4.97	4.10	- 5.4
OR20	ACE03	3.15	3.30	6.34	3.76	- 5.1

Tabla B.2 Distancias interatómicas entre los grupos nucleofílicos del *S*-atenolol y el carbono carbonílico de la serina catalítica acetilada (SEA:C) y el átomo N ϵ de la histidina catalítica (His224:N ϵ) en los PCPs obtenidos del acoplamiento molecular.

Nombre del complejo	Acilenzima blanco	His224:N ϵ -Sub:H _O (Å)	SEA:C-Sub:O (Å)	His224:N ϵ -Sub:H _N (Å)	SEA:C-Sub:N (Å)	Afinidad (kcal/mol)
OS1	ACE01	3.55	3.57	6.94	4.49	- 4.5
OS2	ACE01	3.02	3.34	6.98	4.92	- 4.5
OS3	ACE01	2.68	3.63	6.39	6.86	- 4.5
OS4	ACE01	2.63	3.33	5.12	4.82	- 4.5
OS5	ACE01	3.33	3.67	6.94	4.70	- 4.3
OS6	ACE03	2.41	3.43	5.88	4.43	- 5.6
OS7	ACE03	2.72	3.31	5.85	4.52	- 5.5
OS8	ACE03	3.43	3.39	6.01	4.81	- 5.5
OS9	ACE03	2.67	3.35	5.93	4.54	- 5.4
OS10	ACE03	2.53	3.37	6.33	4.80	- 5.3
OS11	ACE03	3.42	3.42	6.35	4.85	- 5.3
OS12	ACE03	3.12	3.41	6.31	5.23	- 5.3
OS13	ACE03	3.11	3.42	6.30	4.84	- 5.2
OS14	ACE03	2.83	3.30	6.68	5.13	- 5.1
OS15	ACE03	3.25	3.34	5.95	4.43	- 5.1
OS16	ACE03	2.93	3.37	6.33	4.74	- 5.0
OS17	ACE03	3.31	3.40	6.09	4.73	- 5.0
OS18	ACE03	3.19	3.34	6.70	5.03	- 4.9
OS19	ACE03	3.47	3.38	6.81	5.17	- 4.9

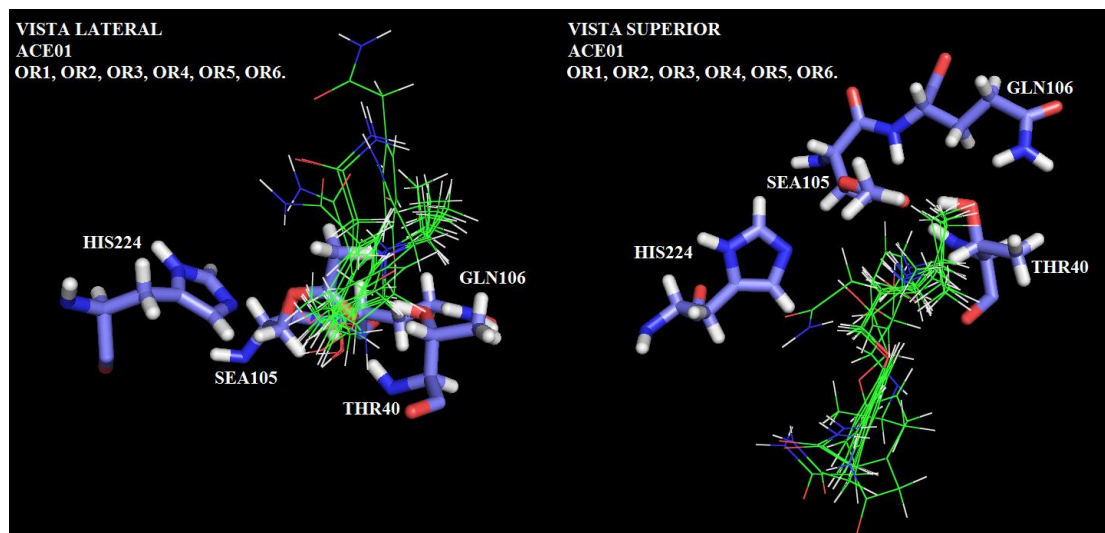


Figura B.1 Complejos entre el *R*-atenolol y ACE01 seleccionados para optimización. Vista lateral y superior del bolsillo de unión.

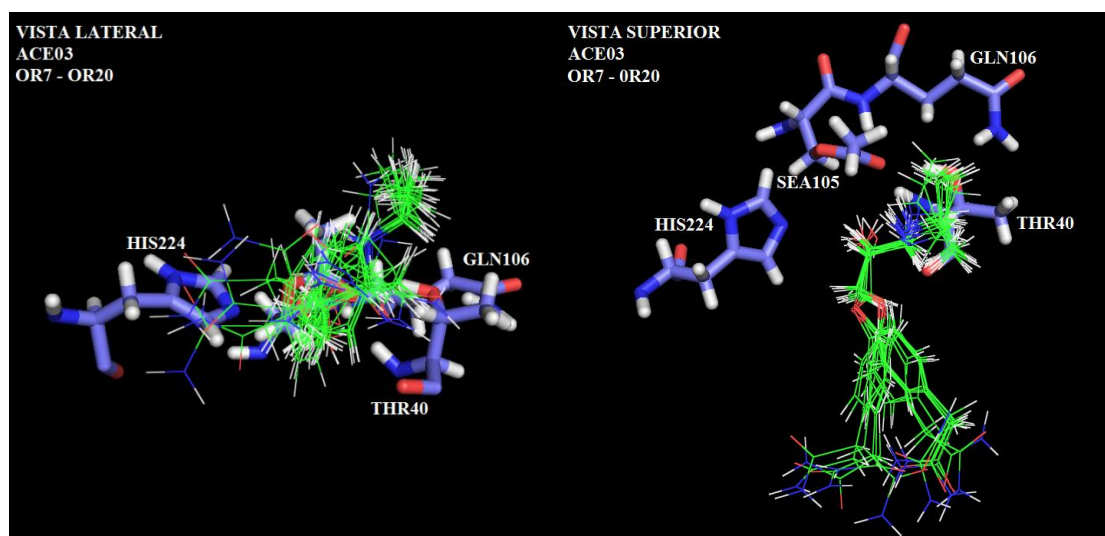


Figura B.2 Complejos entre el *R*-atenolol y ACE03 seleccionados para optimización. Vista lateral y superior del bolsillo de unión.

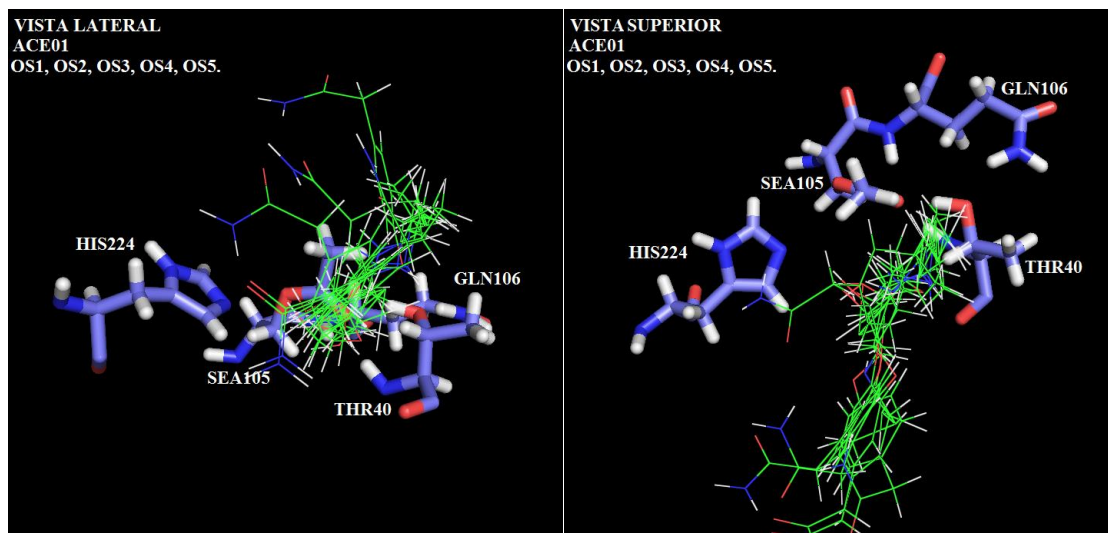


Figura B.3 Complejos entre el *S*-atenolol y ACE01 seleccionados para optimización. Vista lateral y superior del bolsillo de unión.

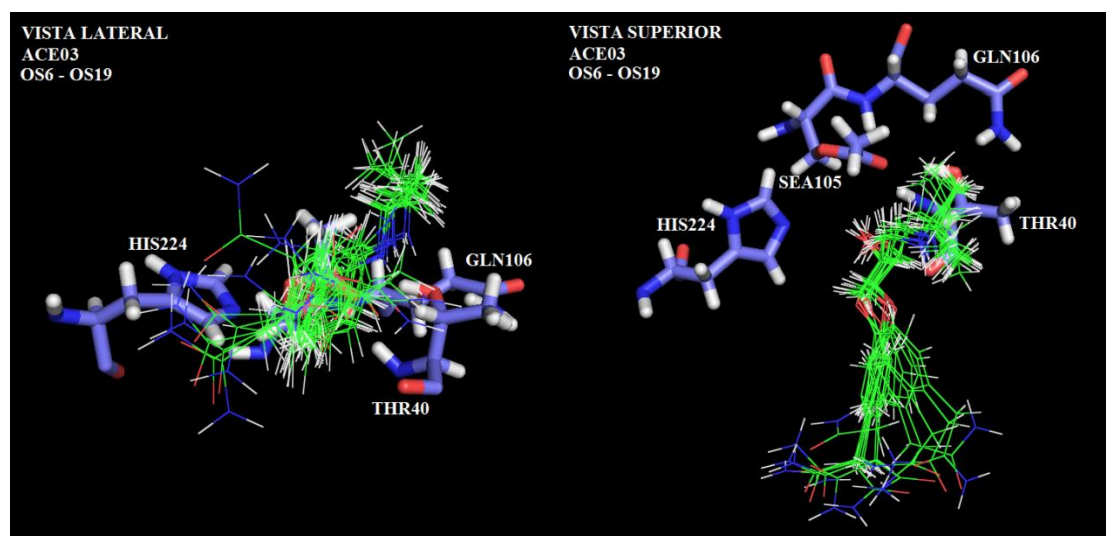


Figura B.4 Complejos entre el *S*-atenolol y ACE03 seleccionados para optimización. Vista lateral y superior del bolsillo de unión.