

Estudio computacional del efecto del grupo acilo sobre la quimio- y enantioselectividad en la acilación de (*RS*)-propranolol catalizada por lipasa B de *Candida antarctica*

Gilberto Alexander Zapata Romero

Tesis doctoral para optar al título de doctor en química

Directores

Martha Cecilia Daza Espinosa

Doctora en Ciencias Químicas

Markus Hans Oliver Doerr

Doctor rerum naturalium

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Doctorado en Química

Bucaramanga

2022

Agradecimientos

A Minciencias (Proyecto 110271250586) y a la Universidad Industrial de Santander
(Proyecto 8855)

Tabla de contenido

	Pág.
1. Introducción.....	16
2. Marco teórico.....	21
2.1 Mecanismo de acilación catalizada por una enzima lipasa.....	21
2.2 Dinámica Molecular y Acoplamiento Molecular.....	24
2.3 Modelo QM/MM (quantum mechanics/molecular mechanics).....	25
3. Objetivos.....	27
3.1 Objetivo general.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. Efecto de incrementar la longitud del grupo acilo en la proporción entre las poblaciones de conformaciones del complejo de Michaelis del modo de unión I y II (Objetivo 1).....	28
4.1 Introducción.....	28
4.2 Metodología.....	30
4.2.1 Muestreo conformacional.....	30
4.2.2 Modos de unión O y N.....	31
4.2.3 Modos de unión I y II.....	32
4.3 Resultados.....	33
4.4 Discusión.....	35
4.5 Conclusión.....	38
5. Efecto de incrementar la longitud del grupo acilo en el número de conformaciones reactivas del complejo de Michaelis y el intermediario tetraédrico (Objetivo 2).....	39

5.1 Conformaciones reactivas del complejo de Michaelis: Estabilización electrostática en el complejo de Michaelis.....	39
5.1.1 Introducción.....	39
5.1.2 Metodología.....	41
5.1.3 Resultados.....	42
5.1.4 Discusión.....	43
5.1.5 Conclusión.....	45
5.2 Conformaciones reactivas del complejo de Michaelis: Mecanismo transbordador de protón.....	47
5.2.1 Introducción.....	47
5.2.2 Metodología.....	48
5.2.3 Resultados.....	51
5.2.4 Discusión.....	58
5.2.5 Conclusión.....	60
5.3 Conformaciones reactivas del intermediario tetraédrico: Enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis.....	61
5.3.1 Introducción.....	61
5.3.2 Metodología.....	63
5.3.3 Resultados.....	65
5.3.4 Discusión.....	66
5.3.5 Conclusión.....	68

6. Efecto de incrementar la longitud del grupo acilo en la energía potencial del intermediario tetraédrico, y del primer y segundo estado de transición en relación a la energía del complejo de Michaelis (Objetivos 3 y 4).....	70
6.1 Introducción.....	70
6.2 Metodología.....	72
6.3 Resultados.....	75
6.4 Discusión.....	82
6.5 Conclusión.....	84
7. Conclusiones.....	85
8. Divulgación.....	87
Referencias bibliográficas.....	89
Apéndices.....	110

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1 <i>Condiciones estructurales que clasifican a una conformación del complejo de Michaelis como reactiva hacia la esterificación o amidación a través del mecanismo clásico o de transbordador de protón.....</i>	50
Tabla 2 <i>Población de enlaces de hidrógeno esenciales esenciales para la catálisis presente en el intermediario tetraédrico de la ruta de esterificación de (R)- y (S)-propranolol con etanoilo y butanoilo.....</i>	66

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 <i>Fórmula estructural del propranolol</i>	17
Figura 2 <i>Mecanismo Bi Bi ping-pong de la acilación de un sustrato catalizada por medio de una enzima lipasa. En el esquema, el guion representa un enlace covalente y los puntos una interacción no covalente, acilo-S1 y S2 son el primer y segundo sustrato, E es la lipasa, MC es el complejo de Michaelis e IT es el intermediario tetraédrico</i>	22
Figura 3 <i>Conversión, catalizada por lipasa B de Candida antarctica, del complejo de Michaelis a complejo enzima/producto. Nu hace referencia a algún átomo nucleofílico del segundo sustrato, MC1, IT1, acilo-E...S1, MC2, IT2 y E...acilo-S1 son los estados mostrados en la figura 2</i>	23
Figura 4 <i>Asignación del tipo de modo de unión de las conformaciones del complejo enzima/sustrato con base en las distancias entre el grupo isopropil y naftoxi del propranolol, y el bolsillo mediano y grande de lipasa B de Candida antarctica</i>	33
Figura 5 <i>Para cada enantiómero, R (cuadrado) y S (círculo), se muestra la cantidad de conformaciones en modo de unión I (amarillo) y II (azul) para conformaciones tipo O-MCC (izquierda) y tipo N-MCC (derecha)</i>	34
Figura 6 <i>Número de conformaciones tipo O- y N-MCC (izquierda) y promedio de la contribución de la energía potencial a la preorganización electrostática para cada conformación (la desviación estándar se muestra utilizando barras de error)</i>	43

Figura 7 <i>Ataque nucleofílico involucrado en la conversión del complejo de Michaelis al intermediario tetraédrico por medio del mecanismo clásico y del mecanismo de transbordador de protón.....</i>	48
Figura 8 <i>Distancias y ángulos relevantes para la formación del intermediario tetraédrico.....</i>	49
Figura 9 <i>Población de conformaciones reactivas utilizando las definiciones de la tabla 1. Las conformaciones corresponden a la suma de las conformaciones tipo mecanismo clásico y tipo mecanismo de transbordador de protón.....</i>	52
Figura 10 <i>Población de conformaciones reactivas imponiendo restricciones sobre la presencia de enlaces de hidrógeno en el hueco oxianiónico.....</i>	54
Figura 11 <i>Población de conformaciones reactivas imponiendo restricciones en el ángulo de ataque nucleofílico.....</i>	55
Figura 12 <i>Población de conformaciones reactivas imponiendo restricciones en el ángulo de protonación de la histidina.....</i>	56
Figura 13 <i>Población de conformaciones reactivas de acuerdo al mecanismo clásico y de acuerdo al mecanismo de transbordador de protón.....</i>	57
Figura 14 <i>Enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis en el intermediario tetraédrico formado en la ruta hacia la esterificación.....</i>	63
Figura 15 <i>Región QM indicada en rojo, el círculo representa un átomo de unión. La región QM incluye el residuo de serina de la triada catalítica y el propranolol. El esquema utiliza como ejemplo el grupo butanoilo.....</i>	65
Figura 16 <i>Esquema cualitativo de las barreras de activación en la descomposición del intermediario tetraédrico. E, E--S, IT, E--P y P se refieren a acil-CalB, el complejo</i>	

<i>enzima/sustrato, el intermediario tetraédrico, el complejo enzima/producto y el propranolol acilado, respectivamente</i>	68
Figura 17 <i>Región QM indicada en rojo, los círculos representan átomos de unión. La región QM incluye los tres residuos de la triada catalítica y el propranolol. El esquema utiliza como ejemplo el grupo butanoilo</i>	73
Figura 18 <i>Distancias interatómicas utilizadas en la definición de las coordenadas de reacción</i> .	74
Figura 19 <i>Barreras de activación para la descomposición del isómero R del intermediario tetraédrico formado con el grupo etanoilo. Comparación de resultados reportados en (Escorcía et al., 2017)</i>	76
Figura 20 <i>Barreras de activación para la descomposición del isómero S del intermediario tetraédrico formado con el grupo etanoilo. Comparación de resultados reportados en (Escorcía et al., 2017)</i>	77
Figura 21 <i>Barreras de activación para la descomposición del isómero R del intermediario tetraédrico formado con el grupo etanoilo</i>	78
Figura 22 <i>Barreras de activación para la descomposición del isómero S del intermediario tetraédrico formado con el grupo etanoilo</i>	79
Figura 23 <i>Barreras de activación para la descomposición del isómero R del intermediario tetraédrico formado con el grupo butanoilo</i>	80
Figura 24 <i>Barreras de activación para la descomposición del isómero S del intermediario tetraédrico formado con el grupo butanoilo</i>	81
Figura 25 <i>Topología para el propranolol y residuo de serina acilado. Los tipos de átomos corresponden a la nomenclatura utilizada en el campo de fuerza CHARMM36. Para el campo de</i>	

<i>fuerza CHARMM22 los tipos de átomo HA2 y HA3 del residuo de serina acilado se reemplazan por HA.....</i>	<i>111</i>
<i>Figura 26 Distancias monitoreadas en la construcción del intermediario tetraédrico y en el mapeo adiabático.....</i>	<i>126</i>

Lista de apéndices

	pág.
Apéndice A. Muestreo conformacional del complejo enzima/sustrato.....	110
Apéndice B. Muestreo conformacional del intermediario tetraédrico.....	120
Apéndice C. Mapeo adiabático.....	123

Glosario

Enantioselectividad: Preferencia por una ruta asociada con un enantiómero en comparación con el otro en una reacción química.

Quimioselectividad: Preferencia por una ruta asociada con un grupo funcional en comparación con el resto en una reacción química.

Resolución cinética: Metodología de separación de enantiómeros a partir de racematos por medio de la ejecución de una reacción química enantioselectiva.

Acilación: Reacción química en la que se adiciona un grupo acilo a un compuesto.

Grupo acilo: Grupo funcional formado al remover uno o más grupos hidroxilo de un oxácido.

Lipasa (triacilglicerol hidrolasa): Enzimas cuya función natural es catalizar la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los acilgliceroles.

Intermediario tetraédrico: Intermediario que existe en el transcurso del mecanismo de una reacción de acilación catalizada por una lipasa.

Modo de unión: Posición y orientación de una molécula dentro del sitio de unión (activo) de una proteína (enzima).

Mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM): Metodología que describe la energía potencial de un sistema molecular por medio de mecánica cuántica y de un campo de fuerza.

Campo de fuerza: Función matemática que expresa la energía potencial de un sistema molecular en términos de parámetros geométricos que describen su estructura.

Dinámica molecular: Simulación computacional de la evolución temporal de las posiciones de un conjunto de partículas.

Acoplamiento molecular: Simulación computacional que determina la conformación más estable entre dos moléculas unidas no covalentemente.

Resumen

Título: Estudio computacional del efecto del grupo acilo sobre la quimio- y enantioselectividad en la acilación de (*RS*)-propranolol catalizada por lipasa B de *Candida antarctica*ⁱ

Autor: Gilberto Alexander Zapata Romeroⁱⁱ

Palabras clave: enantioselectividad, quimioselectividad, catálisis enzimática, lipasa, esterificación, amidación

Descripción: La preparación de medicamentos requiere de metodologías para la producción de únicos enantiómeros. Entre estas metodologías, la resolución cinética separa racematos utilizando una reacción enantioselectiva. En este contexto, la lipasa B de *Candida antarctica* cataliza la esterificación selectiva del propranolol con el grupo etanoilo, compuesto que presenta actividad como bloqueador adrenérgico beta. Diversos factores influyen en la magnitud de la selectividad de las acilaciones catalizadas por lipasas. Aquí se investigó la relación entre el tamaño del grupo acilo y la selectividad. Para esto, se estudió de forma computacional el paso de deacilación del mecanismo, el cual involucra la transferencia del grupo acilo desde la enzima (previamente acilada) hacia el propranolol. Se construyeron modelos de la enzima acilada con los grupos etanoilo, butanoilo, octanoilo y hexadecanoilo. Utilizando simulaciones de dinámica molecular, se realizó una exploración conformacional del complejo enzima/sustrato y del intermediario tetraédrico. Además, se calculó el cambio en la energía potencial a lo largo de la reacción por medio de una simulación de mapeo adiabático. Se determinó que: (1) La quimioselectividad aportada por el complejo enzima/sustrato favorecerá la ruta de la amidación al utilizar grupos acilo largos. (2) La enantioselectividad aportada por el complejo enzima/sustrato favorecerá la esterificación del (*S*)-propranolol al utilizar grupos acilo largos. (3) La reactividad del intermediario tetraédrico cuantificada por medio de los enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis no explica la enantioselectividad de la esterificación del propranolol con etanoilo. (4) Analizando la energía potencial, el grupo butanoilo, en comparación con el grupo etanoilo, presenta una mayor enantioselectividad hacia esterificación de (*R*)-propranolol.

ⁱ Tesis doctoral

ⁱⁱ Facultad de Ciencias. Doctorado en Química. Directores: Martha Cecilia Daza Espinosa. Doctor en ciencias - química. Markus Hans Oliver Doerr. Doctor rerum naturalium

Abstract

Title: Computational study of the effect of the acyl group on the chemo- and enantioselectivity in the acylation of (*RS*)-propranolol catalyzed by lipase B of *Candida antarctica*ⁱ

Author: Gilberto Alexander Zapata Romeroⁱⁱ

Key words: enantioselectivity, chemoselectivity, enzyme catalysis, lipase, esterification, amidation

Description: Drug formulation requires methodologies for the production of single enantiomers. Among these methodologies, kinetic resolution separates racemates using an enantioselective reaction. In this context, lipase B of *Candida antarctica* catalyzes the selective esterification of propranolol with the ethanoyl group, compound that has activity as beta adrenergic blocker. Several factors influence the magnitude of the selectivity of lipase-catalyzed acylations. The relationship between the size of the acyl group and the selectivity was investigated here. For this, the deacylation step of the mechanism was studied computationally, which involves the transfer of the acyl group from the enzyme (previously acylated) to propranolol. Models of the acylated enzyme with the ethanoyl, butanoyl, octanoyl and hexadecanoyl groups were built. Using molecular dynamics simulations, a conformational exploration of the enzyme/substrate complex and the tetrahedral intermediate was performed. In addition, the change in potential energy throughout the reaction was calculated by means of an adiabatic mapping simulation. It was determined that: (1) The chemoselectivity provided by the enzyme/substrate complex will favor the amidation route when using long acyl groups. (2) The enantioselectivity provided by the enzyme/substrate complex will favor the esterification of (*S*)-propranolol by using long acyl groups. (3) The reactivity of the tetrahedral intermediate quantified by means of the hydrogen bonds essential for catalysis does not explain the enantioselectivity of the esterification of propranolol with ethanoyl. (4) Analyzing the potential energy, the butanoyl group, in comparison with the ethanoyl group, exhibits a higher enantioselectivity towards esterification of (*R*)-propranolol.

ⁱ Doctoral thesis

ⁱⁱ Facultad de Ciencias. Doctorado en Química. Advisors: Martha Cecilia Daza Espinosa. Doctor en ciencias - química. Markus Hans Oliver Doerr. Doctor rerum naturalium

1. Introducción

La producción de un único enantiómero puede abordarse desde tres metodologías (Poppe et al., 2016a): piscina quiral, que consiste en utilizar enantiómeros puros disponibles para sintetizar el enantiómero deseado; resolución, la cual consiste en la separación de un racemato; y síntesis enantioselectiva (también llamada síntesis asimétrica (Gawley & Aubé, 2012)), en la cual se genera un centro quiral a partir de un reactivo aquiral.

Entre las metodologías de resolución, la resolución cinética utiliza una reacción que diferencia los enantiómeros con base en una selectividad cinética por reactivos (Gawley & Aubé, 2012). La selectividad se refiere a la preferencia de una reacción a ocurrir cuando se comparan dos o más reacciones, en donde cada reacción presenta productos diferentes. Si las reacciones por comparar tienen los mismos reactivos puede presentarse selectividad por productos. Si las reacciones tienen algunos de los reactivos en común, puede ocurrir selectividad por reactivos (Poppe et al., 2016b). La causa de la selectividad hacia una reacción química particular, puede ser termodinámica o cinética (Gawley & Aubé, 2012). A temperatura y presión constantes, cuando la causa es termodinámica, la discriminación entre las reacciones se debe a la diferencia en energía de Gibbs entre los diferentes productos. Cuando la causa es cinética, la selectividad ocurre debido a un diferente energía de Gibbs de activación para cada reacción.

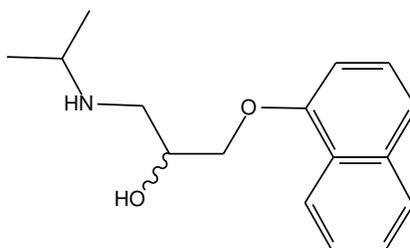
En resolución cinética se pretende que al avanzar la reacción, se produzca una mezcla del producto derivado de uno de los enantiómeros y el otro enantiómero sin reaccionar. Así, el producto de uno de los enantiómeros puede ser separado del enantiómero no reactivo con base en

su diferente composición química. En este método, la velocidad de reacción de un enantiómero se aumenta de forma preferencial, empleando un catalizador quiral, p. ej., una enzima.

El desarrollo de metodologías de producción de un único enantiómero es de gran importancia en la industria farmacéutica. Cuando un ingrediente activo farmacéutico es un compuesto químico quiral, en general, solo uno de los posibles enantiómeros presenta la actividad deseada para ser empleado como medicamento (Alkadi & Jbeily, 2018; Blaser, 2013; Jayakumar et al., 2018), los bloqueadores beta constituyen un ejemplo de esta situación (Agustian et al., 2010; Čižmáriková et al., 2019; Rajin et al., 2020). Por ejemplo, el isómero S del propranolol (ver figura 1) presenta una mayor actividad como bloqueador beta (Silber et al., 1982). Las lipasas, enzimas ampliamente utilizadas en diversas aplicaciones industriales (Sarmah et al., 2018), han sido empleadas en la separación de enantiómeros de tipo 1,2 amino alcohol (Gupta & Mahajan, 2018), característica química presente en el propranolol. De hecho, en investigaciones previas se planteó la separación de la mezcla racémica (*RS*)-propranolol a través de una resolución cinética, empleando la acetilación en tolueno catalizada por lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) libre (Escorcía et al., 2013) e inmovilizada (Barbosa et al., 2010).

Figura 1

Fórmula estructural del propranolol



Experimentalmente se determinó que la acilación de propranolol con el grupo etanoilo catalizada con CalB libre tiene una enantioselectividad hacia el (*R*)-propranolol ($E=63$) y una quimioselectividad hacia el grupo hidroxilo (100%) (Escorcía et al., 2013). Existen dos posibilidades para optimizar la enantioselectividad de la resolución cinética de este bloqueador beta. Una posibilidad es modificar directamente la enantioselectividad de la acilación del grupo hidroxilo y la otra posibilidad corresponde a la modificación de la quimioselectividad, lo cual indirectamente podría tener una repercusión en la enantioselectividad.

La modificación del grupo acilo es común en protocolos experimentales para optimizar reacciones catalizadas por lipasas (Chênevert et al., 2009; Devendran & Yadav, 2014; Foley et al., 2017; Goswami et al., 2005; Graber et al., 2016; Kirilin et al., 2010; Nechab et al., 2007; Ottosson & Hult, 2001; Rajin et al., 2020), pues su naturaleza afecta tanto la reactividad como la selectividad de las reacciones, y se ha propuesto como una variable en la optimización de la enantioselectividad desde ya hace tres décadas (C.-S. Chen & Sih, 1989). Sin embargo, en la actualidad no se ha estudiado esta relación con el fin de entender y predecir la enantioselectividad en función del grupo acilo. Además, resultados experimentales muestran que esta tarea no es trivial, pues la relación entre el grupo acilo y la enantioselectividad puede variar entre diferentes sustratos (Benamara et al., 2021; Ema et al., 1996; Graber et al., 2016; Ottosson & Hult, 2001; Santaniello et al., 2009).

El estudio computacional de la enantioselectividad de reacciones catalizadas por lipasas (Cen, Singh, et al., 2019; H. Chen et al., 2018; Christelle et al., 2011; Ferrario et al., 2015; Ji et al., 2010; Mathpati & Bhanage, 2018; Yang et al., 2017), y en particular por CalB (Dettori et al., 2018; Ferrario et al., 2015; R. Kazlauskas, 2000; Park et al., 2016; T. Xu et al., 2010), ha permitido una comprensión del origen de la selectividad a nivel atómico, lo cual se ha utilizado

para explicar y predecir la enantioselectividad en diversas reacciones (H. Chen et al., 2018; Ferrario et al., 2015; Mathpati & Bhanage, 2018). Sin embargo, hasta el momento no se han reportado estudios computacionales para racionalizar la relación entre selectividad y el grupo acilo. (Gu et al., 2011) utilizaron una metodología QSAR (quantitative structure-activity relationship) para generar un modelo predictivo de enantioselectividad en la acilación de alcoholes secundarios catalizada por CalB, entre las variables analizadas se incluyó la influencia del grupo acilo y se concluyó que presenta un rol determinante para el éxito del modelo. Pero, no se logró dilucidar las bases moleculares del efecto del grupo acilo en la enantioselectividad.

En la presente investigación se implementa una metodología computacional para determinar la relación entre la selectividad de la acilación catalizada, mediante CalB, de (*RS*)-propranolol y el tamaño del grupo acilo empleado. Se espera que la presente investigación tenga repercusiones en: (1) el desarrollo de metodologías para la producción de únicos enantiómeros, (2) profundizar el entendimiento de la acilación catalizada por lipasas y (3) el estudio de catálisis enzimática por medio de metodologías computacionales.

La metodología general, de forma resumida, consistirá en el muestreo del espacio configuracional del sistema en los estados complejo de Michaelis e intermediario tetraédrico empleando acoplamiento molecular en conjunto con dinámica molecular. A partir del colectivo de conformaciones generado, se calcularán caminos de reacción de mínima energía con el fin de determinar la contribución de la energía potencial a la energía de Gibbs de activación en las reacciones de formación del intermediario tetraédrico y complejo enzima-producto para cada enantiómero. Además, estos resultados se complementarán con el análisis estructural de las conformaciones de los estados complejo de Michaelis e intermediario tetraédrico, lo cual permite inferir cualitativamente la selectividad en términos de la energía de Gibbs de activación.

Lo que resta del documento se organiza así: En el capítulo 2 se introducen conceptos generales sobre el mecanismo de la reacción y los métodos computacionales utilizados para modelar los estados de la reacción. En el capítulo 3 se muestran los objetivos planteados cuando se propuso la presente investigación. En los capítulos 4 al 6 se desarrollan los objetivos planteados, para esto se utiliza una estructura tipo artículo constituida de introducción, metodología, resultados, discusión y conclusión. En el capítulo 4 se muestra el desarrollo del primer objetivo específico. En el capítulo 5 se muestra el desarrollo del segundo objetivo específico. En el capítulo 6 se muestra el desarrollo del tercer y cuarto objetivo. Por último, en el capítulo 7 se muestran las conclusiones.

2. Marco teórico

2.1 Mecanismo de acilación catalizada por una enzima lipasa

Las lipasas son enzimas tipo triacilglicerol hidrolasas (EC 3.1.1.3) y el mecanismo de la acilación de un sustrato catalizada por este tipo de enzimas es de tipo Bi Bi ping-pong, es decir, dos sustratos reaccionan secuencialmente con la enzima en dos etapas (Casas-Godoy et al., 2018). En la primera etapa de este mecanismo, un primer sustrato (donador de acilo) que aporta el grupo acilo le transfiere el grupo acilo a la enzima. En la segunda etapa, el grupo acilo es transferido desde la enzima hacia el segundo sustrato. Cada etapa está compuesta de 5 reacciones elementales (ver figura 2): unión del sustrato (pasos 1 y 6), formación del complejo de Michaelis (pasos 2 y 7), formación del intermediario tetraédrico (pasos 3 y 8), formación del complejo enzima/producto (pasos 4 y 9) y liberación del producto (pasos 5 y 10).

Figura 2

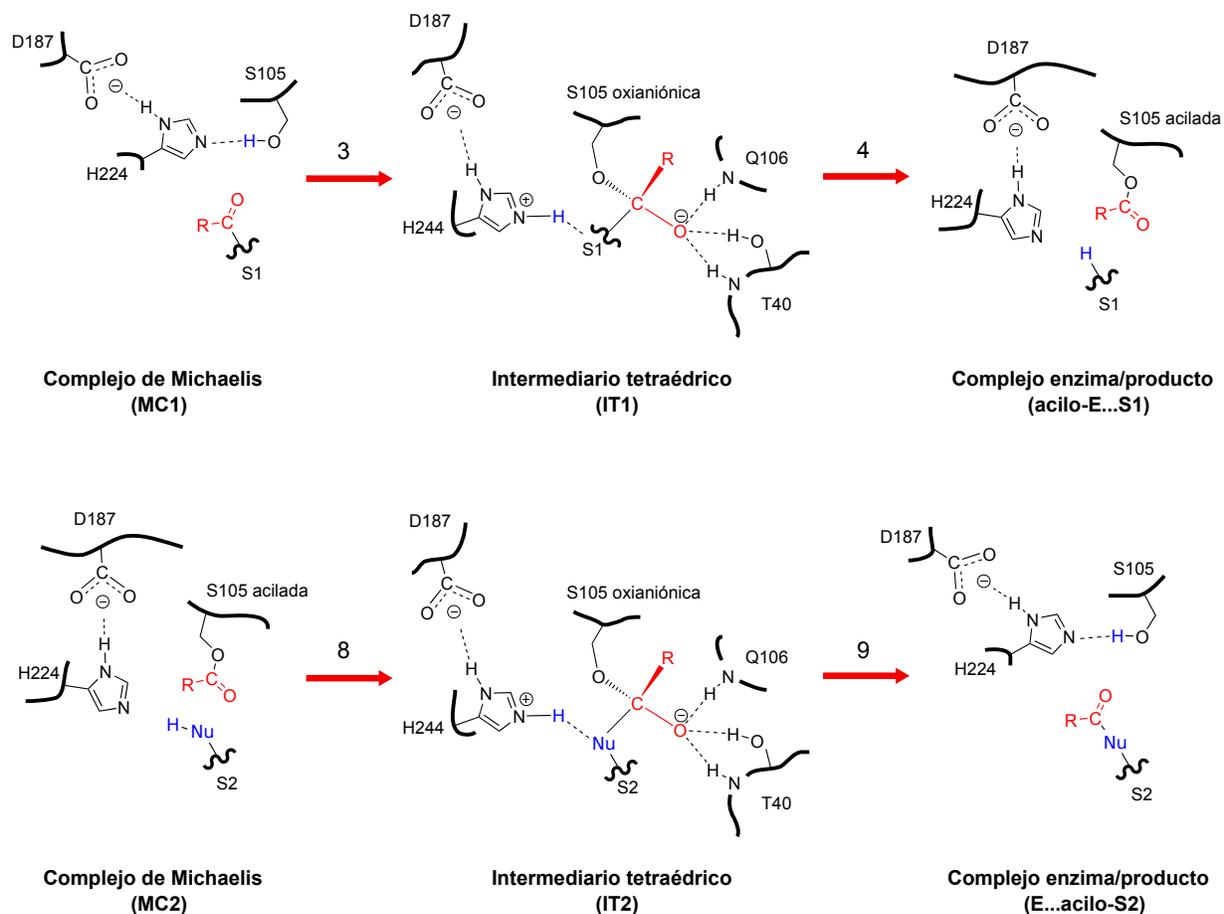
Mecanismo Bi Bi ping-pong de la acilación de un sustrato catalizada por medio de una enzima lipasa. En el esquema, el guion representa un enlace covalente y los puntos una interacción no covalente, acilo-S1 y S2 son el primer y segundo sustrato, E es la lipasa, MC es el complejo de Michaelis e IT es el intermediario tetraédrico.

(1) Etapa de acilación de la enzima**(2) Etapa de deacilación de la enzima**

Los cambios químicos involucrados en el mecanismo (pasos 3-4 y 8-9) son asistidos por varios residuos aminoacídicos presentes en el sitio activo de la enzima, ver figura 3. A un grupo de estos residuos se les denomina triada catalítica, dichos residuos asisten la transferencia del grupo acilo. Además de estos residuos, existen otros que forman una región denominada hueco oxianiónico, la cual estabiliza un oxianión que se forma como especie intermediaria, esta especie se denomina intermediario tetraédrico. Para lipasa B de *Candida antarctica* (CalB), la triada catalítica está constituida por tres residuos aminoacídicos, una serina, un ácido aspártico y una histidina (S105, D187 y H224), y el hueco oxianiónico está constituido por dos residuos, una glutamina y una treonina (Q106 y T40) (Ferrario et al., 2015).

Figura 3

Conversión, catalizada por lipasa B de Candida antarctica, del complejo de Michaelis a complejo enzima/producto. Nu hace referencia a algún átomo nucleofílico del segundo sustrato, MC1, IT1, acilo-E...S1, MC2, IT2 y E...acilo-S1 son los estados mostrados en la figura 2



Para el caso de propranolol, por ser el sustrato que recibe el grupo acilo, la etapa de deacilación de la enzima es donde ocurre la diferenciación en la reactividad de los grupos funcionales hidroxilo y amino, es decir, la quimioselectividad (selectividad por productos), así como la diferenciación en la reactividad del (R)- y (S)-propranolol, es decir, la enantioselectividad (selectividad por reactivos).

2.2 Dinámica Molecular y Acoplamiento Molecular

Al modelar de forma computacional una reacción catalizada por una enzima utilizando una descripción particulada del sistema, se hace necesario describir estructuralmente cada estado de la reacción. Para esto, se debe obtener un conjunto de conformaciones representativas del sistema que representen algún estado en particular. Una metodología ampliamente usada en enzimología computacional para generar dicho conjunto de conformaciones es una simulación de dinámica molecular (Hug, 2013; Lonsdale et al., 2012). Este método consiste en resolver la segunda ley de Newton de forma numérica; con lo cual, la serie de conformaciones (denominada trayectoria) generada a partir de la evolución en el tiempo de una conformación inicial se distribuirá de forma preferencial alrededor de un mínimo de potencial termodinámico. En contraste, una metodología de menor costo computacional es el acoplamiento molecular (Guedes et al., 2014; Lonsdale et al., 2012), la cual es ampliamente utilizada en diseño de medicamentos. Este método está principalmente diseñado para determinar la conformación más estable entre una proteína y una molécula orgánica pequeña, y consiste en una exploración de conformaciones mediante un método determinista o aleatorio, seguido de la asignación de un puntaje a estas conformaciones con base en una función de puntuación, en donde dicha función está diseñada (comúnmente mediante una parametrización realizada para reproducir un conjunto de datos experimentales) para identificar la conformación más estable.

2.3 Modelo QM/MM (quantum mechanics/molecular mechanics)

En simulaciones de dinámica molecular, el sistema biomolecular es modelado como un conjunto de partículas sometidas a diferentes interacciones. Dos modelos ampliamente utilizados dan origen a las metodologías QM y MM (Culka et al., 2017). QM (quantum mechanics) hace referencia a mecánica cuántica no relativista. En esta metodología, el sistema se conceptualiza como compuesto de núcleos cargados y electrones, los cuales interactúan por medio de interacciones electrostáticas. La energía es obtenida por medio de la ecuación de Schrödinger, comúnmente aplicando la aproximación de Born-Oppenheimer (Johansson et al., 2013). MM (molecular mechanics) se refiere al uso de campos de fuerza para calcular la energía del sistema (Monticelli & Tieleman, 2013), este modelo se basa en una descripción de las moléculas como compuestas de átomos con cargas parciales. La energía del sistema se supone compuesta, de forma aditiva, por diferentes interacciones entre grupos de átomos (principalmente entre pares). Las interacciones se clasifican como covalentes y no covalentes, a cada interacción se le asigna una forma funcional (por ejemplo polinomios cuadráticos) que se parametriza con base en datos experimentales o datos obtenidos utilizando QM. Las interacciones entre átomos se suponen transferibles entre diferentes moléculas con ambientes químicos similares.

El alto costo computacional hace prohibitivo describir un sistema biomolecular mediante QM. Sin embargo, este modelo resulta necesario al describir ruptura o formación de enlaces, proceso que comúnmente no puede ser descrito mediante un modelo MM. La combinación de los modelos QM y MM, a la cual se le refiere como QM/MM, es una metodología ampliamente utilizada en enzimología computacional (Ainsley et al., 2018; Sousa et al., 2017). En esta metodología, se describe la macromolécula como compuesta de diferentes regiones, donde unas

regiones son modeladas mediante QM y otras mediante MM. La implementación usual, la cual se aplicará en la presente investigación, consiste en particionar el sistema en solo dos zonas, una QM y la otra MM.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar el rol de la longitud del grupo acilo en la quimio- y enantioselectividad de la acilación de (*RS*)-propranolol catalizada por lipasa B de *Candida antarctica*.

3.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto de incrementar la longitud del grupo acilo en:

(1) La proporción entre las poblaciones de conformaciones del complejo de Michaelis del modo de unión I y II.

(2) El número de conformaciones reactivas del complejo de Michaelis y el intermediario tetraédrico.

(3) La energía potencial del primer y segundo estado de transición en relación a la energía del complejo de Michaelis.

(4) La energía potencial del intermediario tetraédrico y del complejo enzima-producto en relación a la energía del complejo de Michaelis.

4. Efecto de incrementar la longitud del grupo acilo en la proporción entre las poblaciones de conformaciones del complejo de Michaelis del modo de unión I y II (Objetivo 1)

4.1 Introducción

A principios de los años 90, varios investigadores de forma independiente establecieron una regla empírica que determina la enantioselectividad de la esterificación de alcoholes secundarios catalizada por medio de lipasas (Ema, 2004). Actualmente, esta regla se conoce como regla de Kazlauskas (R. J. Kazlauskas et al., 1991), la cual indica que la disparidad en tamaño de los grupos sustituyentes unidos al carbono quiral que posee el grupo hidroxilo favorece la esterificación del isómero R. Adicionalmente, esta regla se ha aplicado a la enantioselectividad de acilación de aminas con el centro estereogénico en el carbono alfa (Gonzalez-Sabín et al., 2002).

La regla de Kazlauskas se puede interpretar en términos de impedimento estérico asociando las conformaciones reactivas del intermediario tetraédrico de cada isómero a diferentes modos de unión, es decir, a diferentes formas en las que el sustrato se posiciona y orienta respecto al sitio activo. Utilizando la estructura de un intermediario tetraédrico de lipasa B de *Candida antarctica* (CalB), previamente se definieron dos modos de unión caracterizando el sitio activo y el sustrato con base en su tamaño (Hæffner et al., 1998; Orrenius et al., 1998; Rotticci et al., 1998). Para el sitio activo se definieron dos regiones denominadas bolsillo mediano y bolsillo grande. De forma análoga, para el sustrato, se clasificaron dos de los sustituyentes del carbono quiral como mediano y grande (sustituyentes adicionales al hidroxilo e

hidrógeno). Al analizar las conformaciones reactivas, se encontró que las conformaciones del isómero R se encuentran en el denominado modo de unión I, el cual se encuentra menos impedido estéricamente. Las conformaciones reactivas del isómero S se encuentran en el denominado modo de unión II, modo que adopta una configuración espacial que lo hace más impedido estéricamente.

El análisis del intermediario tetraédrico es usual en el estudio de reacciones catalizadas por lipasas, puesto que este estado se utiliza como un estado de transición aproximado, con lo cual su energía se puede relacionar con la barrera de activación de la reacción (Ema, 2004). En este sentido, el estudio de la enantioselectividad con base en el análisis de los modos de unión del intermediario tetraédrico ha sido utilizado frecuentemente (Bartsch et al., 2008; Cen, Singh, et al., 2019; H. Chen et al., 2014; Eum et al., 2014; Meng et al., 2014; Park et al., 2016; Schulz et al., 2000; T. Xu et al., 2010). Sin embargo, la entrada del sustrato al sitio activo y salida del producto del sitio activo también pueden ser determinantes en catálisis enzimática (Kaushik et al., 2018; Kokkonen et al., 2019), pudiéndose controlar la selectividad mediante estos procesos (Feng et al., 2019; Marton et al., 2010). Aun cuando se ha señalado que la enantioselectividad solo depende del estado de transición y no del complejo enzima/sustrato (ES) (Ema, 2004), esto parece no ser una generalidad. Hay casos en los que el estudio del intermediario tetraédrico no explica la enantioselectividad, la cual se racionaliza únicamente en términos del ES (Guieysse et al., 2003; Lafaquière et al., 2009). De esta forma, la reactividad de una reacción catalizada por enzimas también se ha racionalizado por medio del estudio de los modos de unión en el ES (Gao et al., 2018; Hamnevik et al., 2017; Maurer et al., 2018; Miton et al., 2018; Voss et al., 2018; G. Xu et al., 2015).

Los modos de unión, de los isómeros de propranolol en el ES formado en la reacción de acetilación, se estudiaron previamente y se encontró un número similar de conformaciones reactivas para ambos isómeros en el modo de unión I y un mayor número para el isómero R en el modo de unión II (Escorcía et al., 2014). Así, se propuso que el modo de unión II es el modo que discrimina la reactividad de los dos enantiómeros por presentar una mayor población de conformaciones reactivas para el isómero R. Por lo tanto, es posible que la longitud del grupo acilo utilizado en la acilación de propranolol tenga un efecto sobre la selectividad de la reacción debido a que el grupo acilo modificará el sitio activo de CalB acilada, lo cual repercutirá directamente en la estabilidad de los diferentes modos de unión. Esta hipótesis se explora mediante el muestreo computacional de conformaciones del ES de la etapa de deacilación de CalB (figura 2) y el respectivo análisis estructural haciendo uso de la definición de los modos de unión I y II. Para evaluar el efecto de la longitud del grupo acilo, se estudia el ES resultante de la acilación de CalB con los grupos acilo etanoilo, butanoilo, octanoilo y hexadecanoilo.

4.2 Metodología

4.2.1 Muestreo conformacional

El procedimiento utilizado para construir el conjunto de conformaciones que representa el ES está expuesto de forma detallada en el Apéndice A. Muestreo conformacional del complejo enzima/sustrato. A continuación, se describe de forma resumida.

Se construyeron estructuras de la enzima acilada (acilo-CalB) a partir de una estructura de CalB obtenida experimentalmente por medio de rayos X (Uppenberg et al., 1994). Partiendo de estas estructuras, se realizó un muestreo conformacional de cada enzima acilo-CalB (con las

respectivas aguas de cristalización) inmersa en tolueno. El muestreo se realizó utilizando una simulación de dinámica molecular realizada con el programa y campo de fuerza CHARMM (Brooks et al., 2009). A partir del conjunto de conformaciones obtenido, se eligieron algunas conformaciones de acilo-CalB para muestrear las conformaciones del ES formado entre acilo-CalB y propranolol. Las estructuras del ES se construyeron utilizando una simulación acoplamiento molecular realizada con el programa Smina (Koes et al., 2013). Partiendo de estas estructuras, se realizó un muestreo conformacional de cada ES inmerso en tolueno (manteniendo las respectivas aguas de cristalización). El muestreo se realizó utilizando una simulación de dinámica molecular realizada con el programa CHARMM. En las simulaciones de dinámica molecular se implementó una metodología QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics). La región QM (propranolol) se describió con el método SCC-DFTB (self-consistent-charge density-functional-tight-binding method) (Cui et al., 2001) y la región MM (enzima, tolueno y agua) se describió con el campo de fuerza CHARMM.

4.2.2 Modos de unión O y N

Antes de clasificar las conformaciones de acuerdo a los modos de unión I y II, se definieron los modos de unión O y N referentes a conformaciones del ES reactivas hacia la esterificación y amidación, a estas conformaciones se les denota como O y N-MCC, respectivamente. Teniendo en cuenta que la reacción involucra un ataque nucleofílico (paso 8 en la figura 3), se utilizó la distancia entre el átomo nucleofílico (O o N) del propranolol y el carbono carbonílico del grupo acilo como métrica de la reactividad hacia uno de los dos caminos de reacción, estas distancias se denominan r_{OC} y r_{NC} . Se define entonces que una conformación del ES es tipo O-MCC cuando r_{OC} está dentro del rango (r_{min}, r_{max}] y r_{NC} es mayor a r_{OC} en

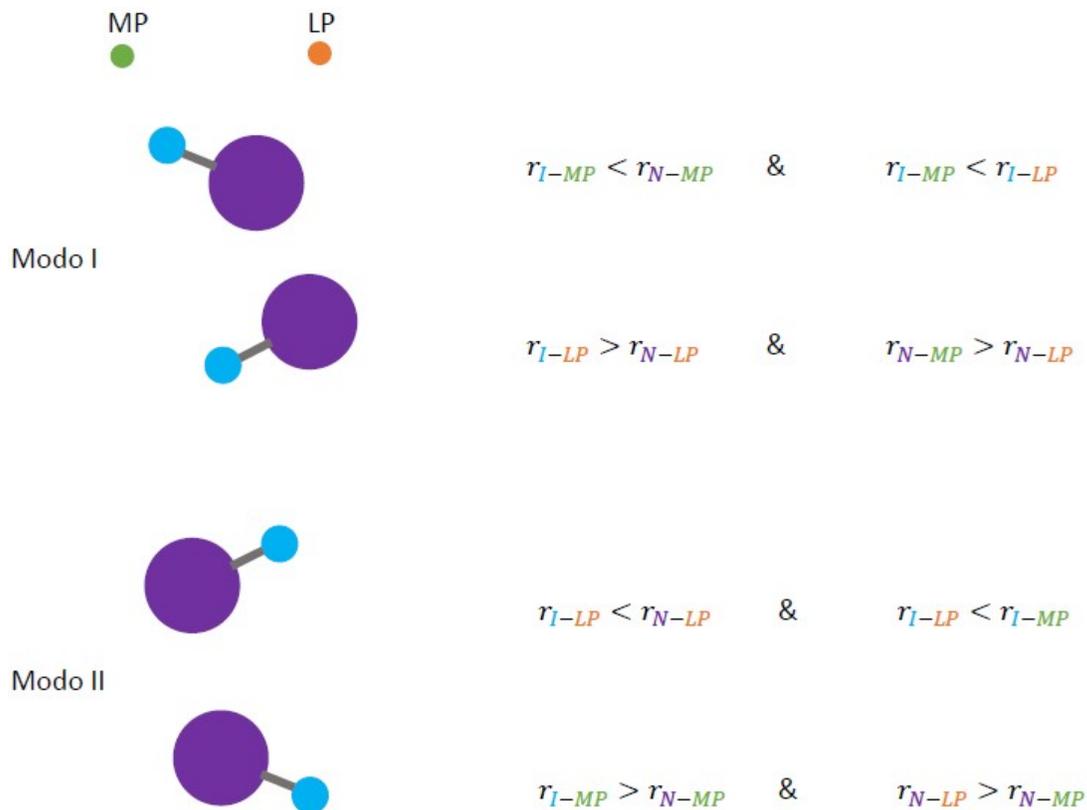
al menos 1.5 Å. De forma análoga, se define una conformación tipo N-MCC. Varios valores de r_{min} y r_{max} fueron explorados.

4.2.3 Modos de unión I y II

Las conformaciones tipo O- y N-MCC se clasificaron como modos de unión I o II. Para esto se definieron 4 distancias a monitorear: las distancias desde el grupo naftoxi del propranolol al bolsillo mediano (r_{N-MP}) o grande (r_{N-LP}) de la enzima, y las distancias desde el grupo isopropil a dichos bolsillos (r_{I-MP} y r_{I-LP} , respectivamente). Estas distancias se calcularon promediando la distancia entre todos los pares de átomos pesados del isopropil o naftoxi y los carbonos alfa del bolsillo mediano o grande. Los modos de unión se clasificaron de acuerdo a las condiciones mostradas en la figura 4. En la figura, MP y LP hacen referencia al bolsillo mediano y grande respectivamente, el grupo naftoxi del propranolol se representa con el círculo morado y el grupo isopropil con el círculo azul. El bolsillo grande se define con los residuos aminoacídicos 134, 138, 140, 141, 144, 154, 157, 188 y 189 y el bolsillo mediano con los residuos 39, 41, 42, 104, 225, 277, 278, 281, 282 y 285.

Figura 4

Asignación del tipo de modo de unión de las conformaciones del complejo enzima/sustrato con base en las distancias entre el grupo isopropil y naftoxi del propranolol, y el bolsillo mediano y grande de lipasa B de Candida antarctica

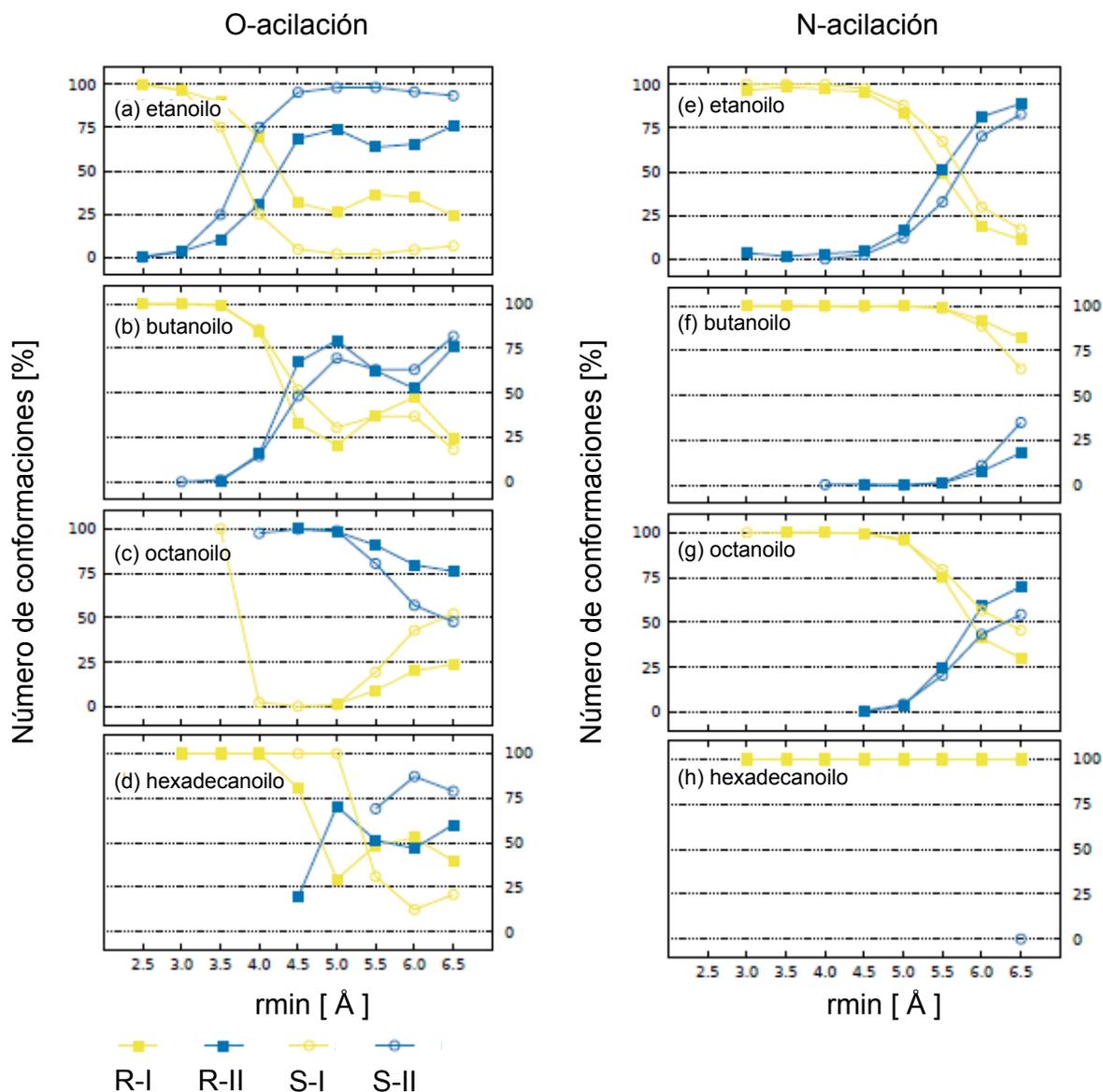


4.3 Resultados

En la figura 5 se muestra la población de conformaciones que se encuentran en modo de unión I y II para las conformaciones reactivas hacia la esterificación o amidación (O- o N-MCC), respectivamente.

Figura 5

Para cada enantiómero, *R* (cuadrado) y *S* (círculo), se muestra la cantidad de conformaciones en modo de unión I (amarillo) y II (azul) para conformaciones tipo *O*-MCC (izquierda) y tipo *N*-MCC (derecha).



(Escorcia et al., 2014) exploraron los modos de unión en el sistema etanoilo-CalB/propranolol determinaron que no existía una diferencia significativa en el número de conformaciones reactivas en modo de unión I para los isómeros de propranolol en la ruta de esterificación. Pero se encontró un mayor número de conformaciones reactivas en el modo de unión II para el isómero R, adjudicándole así a este modo de unión la selectividad de la reacción. En este estudio, se expandió el muestreo de este sistema. Además, se expandió el análisis incluyendo varios valores de la distancia rOC. En estas condiciones, se encontró un comportamiento diferente para el número de conformaciones reactivas en cada modo de unión (ver figura 5a). A distancias pequeñas, para ambos isómeros de propranolol el modo de unión I es el modo más frecuente y a distancias grandes el modo de unión más frecuente es el II. Sin embargo, no se encontró un mayor número de conformaciones reactivas en modo de unión II para el (*R*)-propranolol en comparación con el (*S*)-propranolol. En la figura los porcentajes no son, en general, comparables entre isómeros. Sin embargo, para el sistema etanoilo-CalB si lo son debido a que el número total de conformaciones para (*R*)- y (*S*)-propranolol son similares.

4.4 Discusión

La acetilación del propranolol utilizando CalB es selectiva hacia el (*R*)-propranolol (Escorcia et al., 2013), lo cual es común para las lipasas de acuerdo con la regla de Kazlauskas (R. J. Kazlauskas et al., 1991). La figura 5a muestra que las conformaciones más reactivas (menores valores de rmin) de ambos isómeros se encuentran en un modo de unión tipo I. Además, se observa que las conformaciones menos reactivas (mayores valores de rmin) adoptan principalmente un modo de unión tipo II. Sin embargo, este modo domina completamente solo

para (*S*)-propranolol. Para (*R*)-propranolol, existe una proporción ~75:25 entre el modo de unión II y I. Estos resultados se pueden interpretar bajo dos escenarios posibles.

En el primer escenario se puede suponer que la enantioselectividad experimental no involucra ningún aporte del ES (pasos 7 y 8 de la figura 2). En este escenario como se observa en la figura 5a, las estructuras más reactivas (menores valores de r_{min}) se correlacionan adecuadamente con este comportamiento, es decir, la formación del ES en modo de unión I (modo que favorece la reacción) se da por igual para cada isómero. En otras palabras, no hay enantioselectividad en la formación de conformaciones del complejo de Michaelis reactivas hacia la esterificación.

En el segundo escenario, la formación del complejo de Michaelis influye en la enantioselectividad experimental, bien sea de forma determinante o parcial. En este caso, las estructuras menos reactivas (mayores valores de r_{min}) explicaría la enantioselectividad. Previamente se ha reportado que la conversión de una conformación del ES desde un modo no productivo a un modo productivo puede determinar la rapidez de una reacción biocatalizada (Karbstein & Herschlag, 2003). Por lo tanto, el resultado de la figura 5a se puede interpretar así: el (*S*)-propranolol forma el ES inicialmente (sustrato más lejos del sitio activo, mayor r_{min}) en modo de unión II y para reaccionar (sustrato más cerca al sitio activo, menor r_{min}) debe cambiar al modo de unión I. Sin embargo, por encima de r_{min} igual a 4.5 Å solo existe modo de unión II. Por esto, todas las conformaciones deben pasar por la barrera energética asociada con el cambio de modo de unión (si no hubiese una barrera, las poblaciones serían iguales en cada modo). En contraste, (*R*)-propranolol puede asumir conformaciones del ES iniciales (mayores valores de r_{min}) que se encuentran en modo de unión I, así que alrededor de un 25% de las conformaciones

no debe asumir el gasto energético de cambiar de modo de unión II a I y de esta forma se genera la enantioselectividad observada.

Con estos datos no es posible determinar cuál de estos escenarios es el que representa lo observado experimentalmente. Por esto, se procede a analizar el efecto del tamaño del grupo acilo en la enantioselectividad para cada escenario. En el primer escenario en donde las estructuras más reactivas (menores valores de r_{min}) determinan la enantioselectividad, el aumento del tamaño del grupo acilo de etanoilo a butanoilo (figura 5b) o hexadecanoilo (figura 5d) no afectaría la enantioselectividad de la esterificación del propranolol observada para etanoilo. En el caso del grupo octanoilo (figura 5c), podría haber un cambio en la selectividad hacia (*S*)-propranolol, pues solo para este isómero se encuentran conformaciones más reactivas y, además, en modo de unión I.

En el segundo escenario en donde las estructuras menos reactivas (mayores valores de r_{min}) determinan la enantioselectividad, al utilizar el grupo butanoilo (figura 5b), la enantioselectividad se anularía o se disminuiría debido a que la formación del modo de unión I para (*S*)-propranolol se favorecería de tal forma que sería equiparable con (*R*)-propranolol. Al seguir aumentando el tamaño del grupo acilo, en el caso del grupo octanoilo (figura 5c), la enantioselectividad se vería invertida debido a que en comparación en el grupo etanoilo, ahora (*S*)-propranolol tendría una mayor población de conformaciones en modo de unión I. Sin embargo, al seguir aumentando la longitud del grupo acilo (hexadecanoilo, figura 5d) parece que la tendencia a favorecer la esterificación de (*S*)-propranolol desaparece. Pues aún al compararlo con el etanoilo, efectivamente hay un mayor número de conformaciones en modo de unión I para el isómero S. Pero para (*R*)-propranolol, también se aumenta el número de conformaciones tipo

modo de unión I, lo cual podría mantener la selectividad hacia la esterificación de (*R*)-propranolol.

Para complementar, se aplica el mismo análisis a la amidación del propranolol (figuras 5e-h). En este caso, se observa que el único efecto de aumentar el tamaño del grupo acilo es que la favorabilidad de formar el modo de unión I aumenta. Sin embargo, no hay diferencia entre ambos isómeros por lo cual no se esperaría enantioselectividad para ningún grupo acilo, en caso de darse la amidación.

4.5 Conclusión

El análisis del complejo enzima/sustrato formado entre lipasa B de *Candida antarctica* acilada y los isómeros de propranolol indican que el cambio de la longitud del grupo acilo tiene un efecto sobre la proporción entre las conformaciones reactivas del complejo que adquieren una configuración tipo modo de unión I y las que adoptan una configuración tipo modo de unión II. Si la formación de una conformación reactiva en el complejo enzima/sustrato es un paso que contribuye a la enantioselectividad de la esterificación del propranolol, entonces, se espera que el aumento de la longitud del grupo acilo de etanoilo hasta octanoilo favorezca la esterificación del (*S*)-propranolol.

5. Efecto de incrementar la longitud del grupo acilo en el número de conformaciones reactivas del complejo de Michaelis y el intermediario tetraédrico (Objetivo 2)

5.1 Conformaciones reactivas del complejo de Michaelis: Estabilización electrostática en el complejo de Michaelis

5.1.1 Introducción

Las altas rapidezces de reacción que se observan en reacciones catalizadas por enzimas se pueden entender por medio de la estabilización del estado de transición. Actualmente, se ha propuesto que la disposición espacial de los residuos aminoacídicos que forman el sitio activo generan un ambiente electrostático que favorece la estructura del estado de transición, a lo que se le denomina preorganización electrostática del sitio activo (Jindal & Warshel, 2017; Warshel et al., 2006). A pesar de esto, antes de formarse el estado de transición, el sustrato tiene que ingresar al sitio activo. Por lo cual, el túnel de acceso al sitio activo también tiene un importante rol en catálisis enzimática (Kaushik et al., 2018; Kokkonen et al., 2019) y en algunos casos puede determinar la selectividad de una reacción (Feng et al., 2019; Lafaquière et al., 2009; Marton et al., 2010).

Cuando una enzima y un sustrato se encuentran en solución solo una pequeña fracción de encuentros da lugar a complejos no covalentes, y no todos estos complejos son reactivos (complejos de Michaelis) (Bar-Even et al., 2015). Para que ocurra la reacción, el modo de unión, es decir, la posición y orientación del sustrato en el sitio activo, tiene que ser apropiada (Tawfik & Khersonsky, 2010). Por lo tanto, el modo de unión del complejo enzima/sustrato (ES) puede

determinar el éxito de una reacción, así como su selectividad (Gao et al., 2018; Hamnevik et al., 2017; Maurer et al., 2018; Miton et al., 2018; Voss et al., 2018; G. Xu et al., 2015).

(Escorcia et al., 2013) determinaron experimentalmente que la acilación de propranolol con el grupo etanoilo catalizada con lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) tiene una enantioselectividad hacia el isómero R y una quimioselectividad hacia el grupo hidroxilo. En dicho estudio, también se realizó una investigación computacional que mostró que el ES presenta predominantemente conformaciones en un modo de unión que favorece la esterificación (denominado aquí modo de unión O) en comparación con un modo de unión que favorece la amidación (denominado aquí modo de unión N).

Usualmente, factores como impedimento estérico, hidrofobicidad de residuos, y reorganización de la red de enlaces de hidrógeno, se utilizan para explicar cómo ciertos modos de unión favorecen la reacción (Marton et al., 2010). Todos estos conceptos tienen su raíces en la distribución de carga del sitio activo, lo cual apoya el concepto de preorganización electrostática. Por esta razón, a continuación se explora si la preorganización electrostática del sitio activo se correlaciona con la favorabilidad del modo de unión O en el ES formado entre etanoilo-CalB y propranolol. Para esto, se propone y calcula un parámetro definido para cuantificar parte de la preorganización electrostática. A este parámetro se le denotará aquí con el símbolo ΔE y se le referirá como la contribución de la energía potencial a la preorganización electrostática. Además, teniendo en cuenta que la presencia del grupo acilo en el sitio activo puede modificar el ambiente electrostático de este sitio, se evalúa el efecto sobre la selectividad al incrementar el tamaño del grupo etanoilo en la acilación de propranolol. Para esto se analizan los grupos butanoilo, octanoilo y hexadecanoilo.

5.1.2 Metodología

Se utilizó el conjunto de conformaciones del ES formado entre acilo-CalB y propranolol que se obtuvo como se describe de forma resumida en 4.2.1 Muestreo conformacional y de forma detallada en Apéndice A. Muestreo conformacional del complejo enzima/sustrato. La clasificación de las conformaciones del ES en conformaciones en modo de unión N y O, denominadas N- y O-MCC, se realizó de acuerdo a lo descrito en 4.2.2 Modos de unión O y N.

En la metodología QM/MM que se utiliza, la interacción entre la región QM y MM de tipo aditiva y el embebido es de tipo mecánico (Cui et al., 2001). Así, la energía potencial total ($U_{QM/MM}$) es igual a:

$$U_{QM/MM} = U_{QM} + U_{MM} + U_{QM-MM}^{vdW} + U_{QM-MM}^{el}, \quad (1)$$

es decir, la suma de la energía potencial de la región QM y MM más la interacción entre las dos regiones. Debido a que la región QM (propranolol) y la región MM (acilo-CalB, agua y tolueno) no presentan interacciones covalentes por tratarse del ES, la interacción está limitada a las interacciones de van der Waals y la interacción electrostática.

Teniendo en cuenta lo anterior, para calcular ΔE , se extraen las coordenadas del propranolol y acilo-CalB para cada conformación y se calculan dos energías: la energía potencial del propranolol incluyendo la interacción con acilo-CalB ($U_{P,E}$),

$$U_{P,E} = U_{QM} + U_{QM-MM}^{vdW} + U_{QM-MM}^{el}, \quad (2)$$

y la energía potencial del propranolol en el vacío (U_P), es decir,

$$U_P = U_{QM}. \quad (3)$$

Con estas dos energías se define ΔE como

$$\Delta E = U_{P,E} - U_P. \quad (4)$$

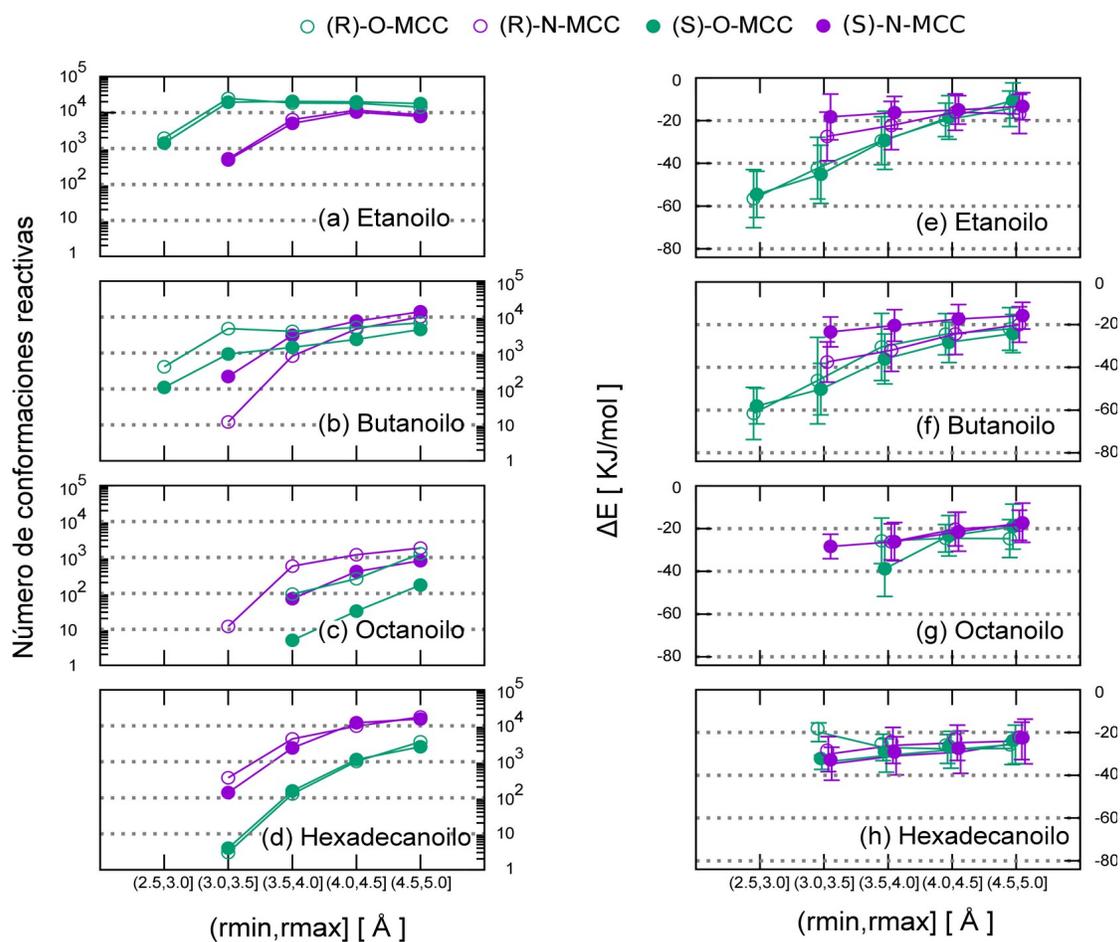
De esta forma, la diferencia en energía potencial en la ecuación 4 se origina a partir de la polarización de la densidad electrónica del propranolol debido a la distribución de cargas puntuales de la enzima y a partir de las interacciones tipo van der Waals entre el propranolol y la enzima. Por lo cual, una energía negativa se interpreta como la estabilización que le brinda acilo-CalB al propranolol en términos de energía potencial.

5.1.3 Resultados

En la parte izquierda de la figura 6 se muestra el número de conformaciones clasificadas como N- y O-MCC, el rango descrito por r_{min} y r_{max} tiene la connotación dada en 4.2.3 Modos de unión I y II, menores valores implican mayor reactividad. Se encontró que la población relativa entre ambas conformaciones depende de la longitud del grupo acilo. Para el grupo etanoilo y butanoilo (figura 6a-b), existe un mayor número de conformaciones O-MCC. Sin embargo, para los grupos octanoilo y hexadecanoilo (figura 6c-d), las conformaciones dominantes resultan ser de tipo N-MCC. A diferencia de lo que sucede para los grupos butanoilo y octanoilo, para los grupos etanoilo y hexadecanoilo, no se observa una diferencia significativa entre el comportamiento de los dos diferentes isómeros. En la parte derecha de la figura 6 se aprecia que ΔE no muestra variación respecto al tipo de conformación reactiva para los grupos grandes (figura 6g-h), sin embargo, para los grupos pequeños (figura 6e-f) hay una mayor estabilización para las conformaciones tipo O-MCC.

Figura 6

Número de conformaciones tipo O- y N-MCC (izquierda) y promedio de la contribución de la energía potencial a la preorganización electrostática para cada conformación (la desviación estándar se muestra utilizando barras de error)



5.1.4 Discusión

El comportamiento de las conformaciones reactivas para el ES formado entre etanoilo-CalB y propranolol es consistente con la quimioselectividad hacia la esterificación hallada

experimentalmente, es decir, hay más O-MCC que N-MCC (figura 6a). Sin embargo, no se evidencia la enantioselectividad hacia el (*R*)-propranolol. Esto puede interpretarse de dos formas: (1) la etapa de conversión del complejo de Michaelis al intermediario tetraédrico no contribuye de forma significativa a la enantioselectividad total; (2) La distancia monitoreada para clasificar las conformaciones en O- o N-MCC no es adecuada para la diferenciación entre los dos enantiómeros.

En cuanto a la quimioselectividad, la inversión en las poblaciones de conformaciones reactivas hacia la esterificación y amidación al incrementar la longitud del grupo acilo, se interpreta como un cambio en la altura relativa de las barreras de activación para cada reacción. De esta forma, para los grupos octanoilo y hexadecanoilo, se predice un cambio en la quimioselectividad, respecto a los grupos etanoilo y butanoilo, que puede deberse a la disminución en la barrera de activación para la N-acilación o al aumento de la barrera para la O-acilación.

Respecto a etanoilo-CalB/propranolol, el número de conformaciones tipo O-MCC para butanoilo-CalB/propranolol disminuye ligeramente. Para octanoilo- y hexadecanoilo-CalB/propranolol la disminución es significativa. El número de conformaciones tipo N-MCC, es aproximadamente igual para cada acilo-CalB/propranolol, con excepción de octanoilo-CalB/propranolol, complejo para el cual ocurre una disminución. Estos resultados sugieren que la barrera de activación del ataque nucleofílico en la O-acilación se hace mayor. Pues una menor barrera de activación para la N-acilación indicaría una mayor reactividad y por lo tanto se esperaría que hubiese un mayor número de conformaciones reactivas que el determinado para etanoilo-CalB/propranolol.

La inversión de la quimioselectividad al utilizar un grupo acilo más grande como el hexadecanoilo en comparación a un grupo pequeño como el etanoilo dependerá del valor absoluto de la barrera de activación para la N-acilación, pues se espera que la magnitud sea similar según lo expuesto anteriormente. Si la selectividad hacia la esterificación ocurre debido a una barrera de activación demasiado alta para la amidación, entonces, se espera que no ocurra ninguna acilación al utilizar los grupos octanoilo y hexadecanoilo pues la barrera seguirá siendo demasiado alta. Sin embargo, si la selectividad hacia la esterificación ocurre porque la barrera de la esterificación es mucho menor que la de la amidación, pero la última sigue siendo accesible a condiciones experimentales. Entonces, se espera que la acilación de propranolol utilizando octanoilo o hexadecanoilo sea selectiva hacia la N-acilación.

Para el grupo etanoilo y butanoilo, ΔE es más negativa para conformaciones tipo O-MCC, lo cual indica que las conformaciones en el modo de unión O son favorecidas por el ambiente electrostático del sitio activo de acilo-CalB. Esto es consistente con la alta población de este tipo de conformaciones en comparación con las que se encuentran en modo de unión N. Sin embargo, para los grupos acilo grandes la diferencia en población entre las estructuras reactivas no se correlaciona con el valor de ΔE . Esto sugiere que para estos dos sistemas el factor entrópico de la preorganización electrostática puede resultar importante en la diferenciación de las dos rutas de reacción.

5.1.5 Conclusión

La estabilización del estado de transición tiene un rol principal en catálisis enzimática. Por lo tanto, el ambiente electrostático, que el sitio activo provee, puede determinar la selectividad entre múltiples caminos de reacción. Aquí se encontró que la contribución de la energía potencial a esta estabilización en el complejo enzima/sustrato puede explicar la

quimioselectividad observada experimentalmente en la esterificación selectiva de propranolol con etanoilo catalizada con lipasa B de *Candida antarctica*. Sin embargo, esta cantidad no se correlaciona con la enantioselectividad experimental. Debe de tenerse en cuenta que los resultados expuestos solo dan información sobre una de las cinco etapas elementales de la reacción y es posible que no ocurra enantioselectividad en este paso en particular. Para grupos acilo grandes, la favorabilidad de formar conformaciones reactivas hacia una de las dos rutas de acilación no es explicada por medio de la contribución de la energía potencial a la estabilización electrostática, esto sugiere la necesidad de investigar el factor entrópico de la estabilización electrostática.

5.2 Conformaciones reactivas del complejo de Michaelis: Mecanismo transbordador de protón

5.2.1 Introducción

Cuando hay presencia de los grupos hidroxilo y amino en un reactivo, las lipasas pueden utilizarse para catalizar quimioselectivamente la O-acilación (Gardossi et al., 1991; Kanerva et al., 1992; Lundell et al., 2003; Nagao & Kito, 1989; Tawaki & Klivanov, 1993) o la N-acilación (Ferrari et al., 2014; Gotor et al., 1988; Maugard et al., 1997; Quan et al., 2007; Torre et al., 2006). La lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) presenta selectividad hacia la acilación de alcoholes en presencia de aminas (Le Joubioux et al., 2011; Öhrner et al., 1996; Syrén et al., 2013). Sin embargo, para 1,2-amino alcoholes la selectividad es hacia la N-acilación. Una forma de entender este cambio en la quimioselectividad es través del mecanismo de transbordador de protón, mecanismo de reacción en el cual los grupos hidroxilo y amino, cuando se encuentran espacialmente cerca, interactúan para favorecer la N-acilación a través de la transferencia de un protón desde el grupo alcohol hacia el grupo amino (Syrén et al., 2013). A continuación, se evalúa si el mecanismo de transbordador de protón es favorable en la acilación de propranolol catalizada por CalB. Para esto, para el complejo enzima/sustrato (ES) se definen y cuantifican las conformaciones reactivas, en adelante MCC, para el mecanismo clásico y el de transbordador de protón. El mecanismo clásico hace referencia al mecanismo aceptado para la acilación de sustratos mediada por lipasas explicado en la sección 2.1 Mecanismo de acilación catalizada por una enzima lipasa. Además, se exploran varios parámetros geométricos para definir reactividad. El concepto de conformaciones con modos de unión reactivos en acilaciones catalizadas por

lipasas se ha aplicado al estudio de la regioselectividad en la acilación de aminoácidos (Dettori et al., 2018) y polialcoholes (De Oliveira et al., 2009; Oger et al., 2010; Palocci et al., 2007), y la quimioselectividad de péptidos (Ferrari et al., 2014)

5.2.2 Metodología

Se utilizó el conjunto de conformaciones del ES formado entre acilo-CalB y propranolol que se obtuvo como se describe de forma resumida en 4.2.1 Muestreo conformacional y de forma detallada en Apéndice A. Muestreo conformacional del complejo enzima/sustrato. Las conformaciones son clasificadas como reactivas explorando diferentes formas de definir reactividad con base en diferentes parámetros geométricos.

Teniendo en cuenta los enlaces que se rompen y se forman en la conversión del complejo de Michaelis al intermediario tetraédrico, ver figura 7, se definen conformaciones reactivas utilizando las distancias r_H , $r_{H,intra}$ y r_C mostradas en la figura 8.

Figura 7

Ataque nucleofílico involucrado en la conversión del complejo de Michaelis al intermediario tetraédrico por medio del mecanismo clásico y del mecanismo de transbordador de protón

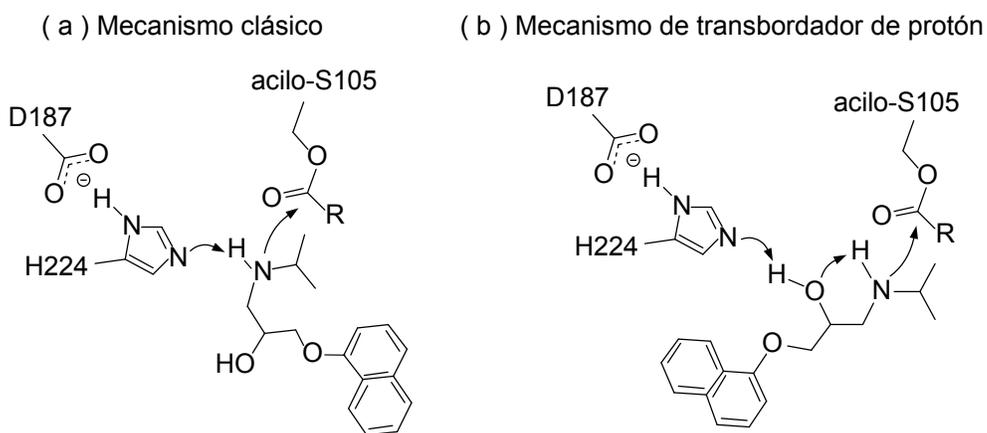
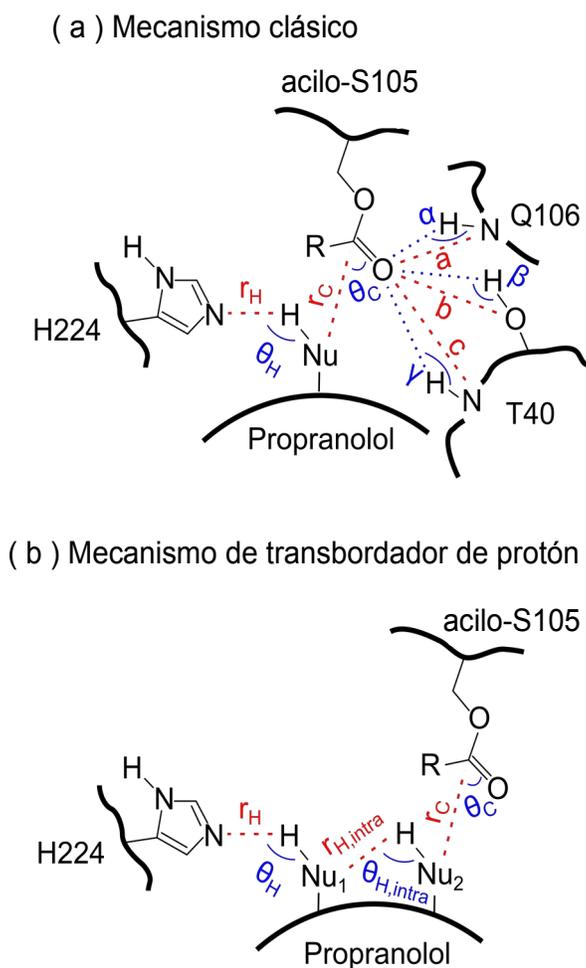


Figura 8

Distancias y ángulos relevantes para la formación del intermediario tetraédrico



En la tabla 1, se muestran las condiciones utilizadas para clasificar las conformaciones. Se definen las conformaciones tipo O- y N-MCC para indicar reactividad hacia la esterificación y amidación, respectivamente. Además, se introduce la conformación tipo ON-MCC para referirse a las conformaciones que no se pueden clasificar como O- o N-MCC. Esta conformación no presenta una preferencia hacia la O- o N-acilación. Cuando se hace referencia

al mecanismo clásico se utiliza el subíndice C, para el mecanismo de transbordador de protón se utiliza el subíndice T. El parámetro rMCC es una distancia utilizada para indicar la cercanía entre el grupo nucleofílico y el grupo acilo. En la tabla se utiliza una letra entre paréntesis para indicar si se hace referencia al grupo hidroxilo o amino del propranolol.

Tabla 1

Condiciones estructurales que clasifican a una conformación del complejo de Michaelis como reactiva hacia la esterificación o amidación a través del mecanismo clásico o de transbordador de protón

MCC	Definición	
O_T-MCC	$\{rC(O), rH, \text{intra}(N), rH(N)\} \leq rMCC$	$\{rH(O), rC(N)\} > rMCC$
N_T-MCC	$\{rC(N), rH, \text{intra}(O), rH(O)\} \leq rMCC$	$\{rH(N), rC(O)\} > rMCC$
OH o NH a una distancia de la triada catalítica menor a rMCC		
O_c-MCC	$\max\{rC(O), rH(O)\} \leq rMCC$	$\max\{rC(N), rH(N)\} > rMCC$
N_c-MCC	$\max\{rC(N), rH(N)\} \leq rMCC$	$\max\{rC(O), rH(O)\} > rMCC$
OH y NH a una distancia de la triada catalítica menor a rMCC		
O_c-MCC	$\max\{rC(O), rH(O), rC(N), rH(N)\} \leq rMCC$	$rC(O) \leq rC(N)$ $rH(O) < rH(N)$
		$rC(O) < rC(N)$ $rH(O) \leq rH(N)$
N_c-MCC	$\max\{rC(O), rH(O), rC(N), rH(N)\} \leq rMCC$	$rC(N) \leq rC(O)$ $rH(N) < rH(O)$
		$rC(N) < rC(O)$ $rH(N) \leq rH(O)$

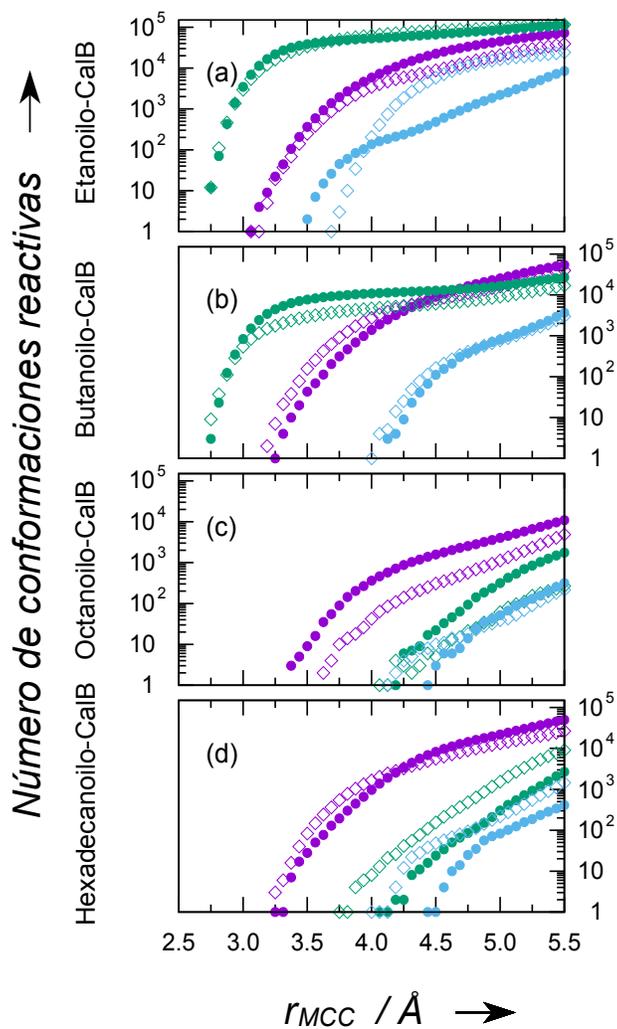
Además, se analizan definiciones de conformaciones reactivas que involucran: 1) La desviación del ángulo óptimo de ataque nucleofílico, el cual se define como 107° (El ángulo óptimo cuando el átomo nucleofílico es oxígeno está entre $\{100^\circ, 110^\circ\}$ y cuando es nitrógeno es 107° (Bürgi et al., 1973, 1974)); 2) La desviación del ángulo óptimo de enlace de hidrógeno entre el residuo de histidina y el grupo nucleofílico, 180° ; 3) La presencia de enlaces de hidrógeno en el hueco oxianiónico, definiendo un enlace de hidrógeno con una distancia a, b o c $\leq 3 \text{ \AA}$ y un ángulo α, β o $\gamma \geq 160^\circ$. Previamente la orientación relativa de los átomos a formar enlaces ha sido utilizada para definir reactividad en el estudio de la enantioselectividad mediada por lipasas (Bruice, 2002; Sadiq & Coveney, 2015). Además, los enlaces de hidrógeno en el hueco oxianiónico son de gran relevancia para el mecanismo de las acilaciones catalizadas por lipasas (H. Chen et al., 2018).

5.2.3 Resultados

En la figura 9 se muestra el número de conformaciones reactivas en el ES formado entre acilo-CalB y propranolol de acuerdo con las definiciones de la tabla 1. Con respecto a la definición utilizada en 4.2.2 Modos de unión O y N, la presente definición incluye la distancia asociada a la protonación del residuo aminoacídico histidina, la cual previamente se ha encontrado relevante en la enantioselectividad de reacciones catalizadas por lipasas (H. Chen et al., 2014; Schulz et al., 2000).

Figura 9

Población de conformaciones reactivas utilizando las definiciones de la tabla 1. Las conformaciones corresponden a la suma de las conformaciones tipo mecanismo clásico y tipo mecanismo de transbordador de protón



Símbolos:

● (S)-propranolol ◇ (R)-propranolol

Colores:

■ N-MCC ■ O-MCC ■ ON-MCC

En las figuras 10, 11 y 12 se muestra como cambia la proporción entre las conformaciones reactivas tipo N- y O-MCC al imponer en su definición la presencia de enlaces de hidrógeno en el hueco oxianiónico, y una orientación óptima para el ataque nucleofílico o para la protonación del residuo de histidina.

Figura 10

Población de conformaciones reactivas imponiendo restricciones sobre la presencia de enlaces de hidrógeno en el hueco oxianiónico

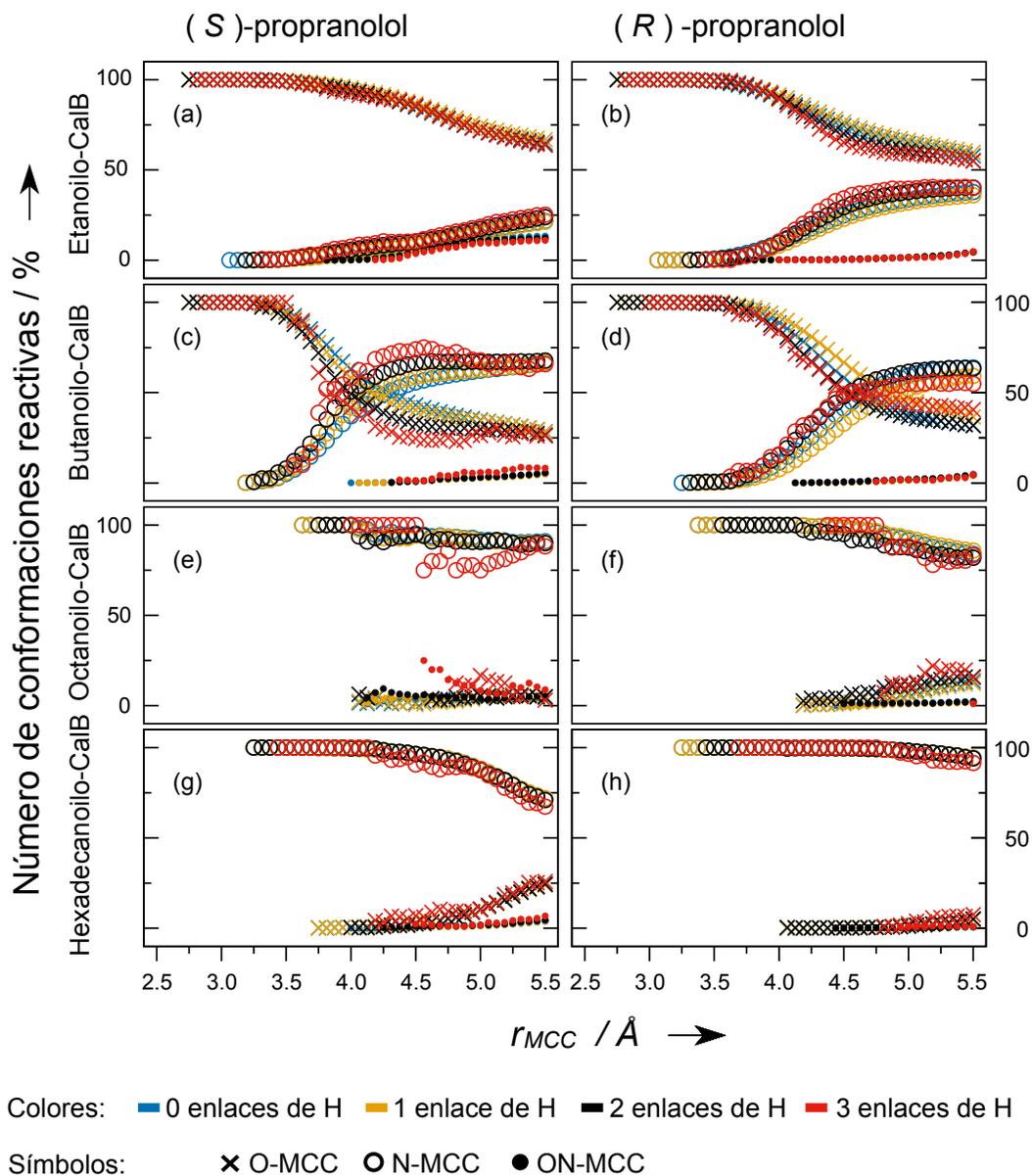


Figura 11

Población de conformaciones reactivas imponiendo restricciones en el ángulo de ataque nucleofílico

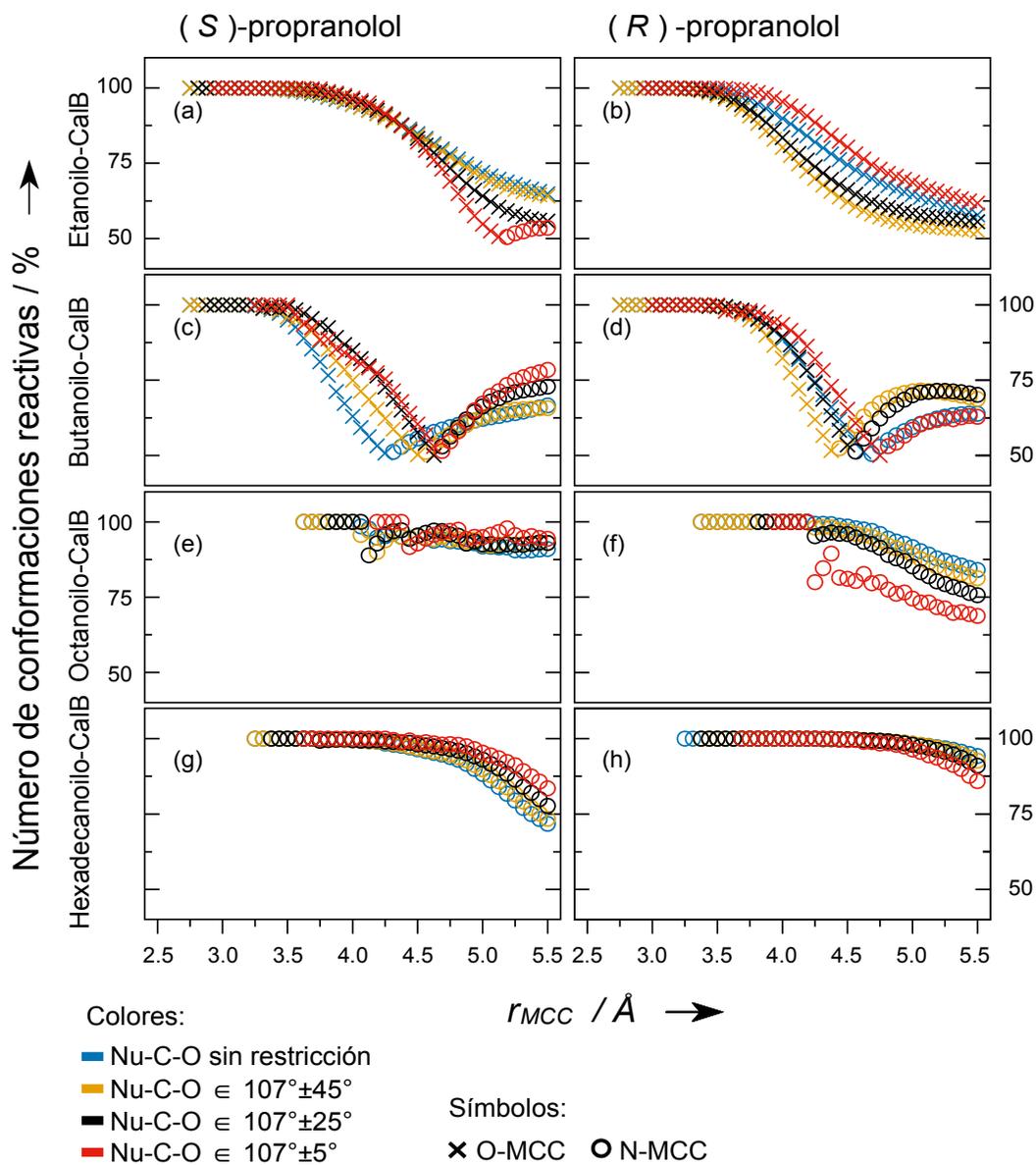
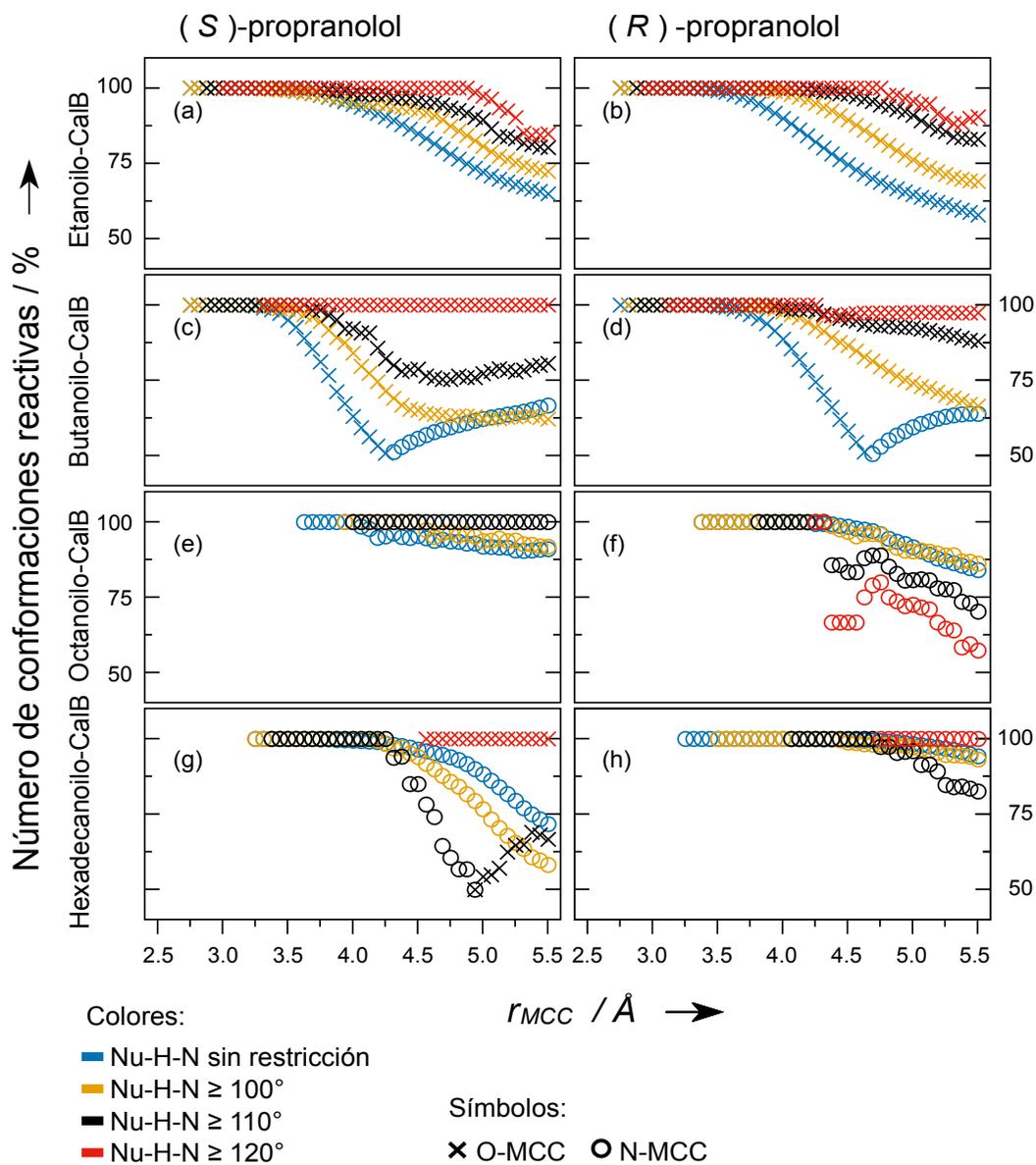


Figura 12

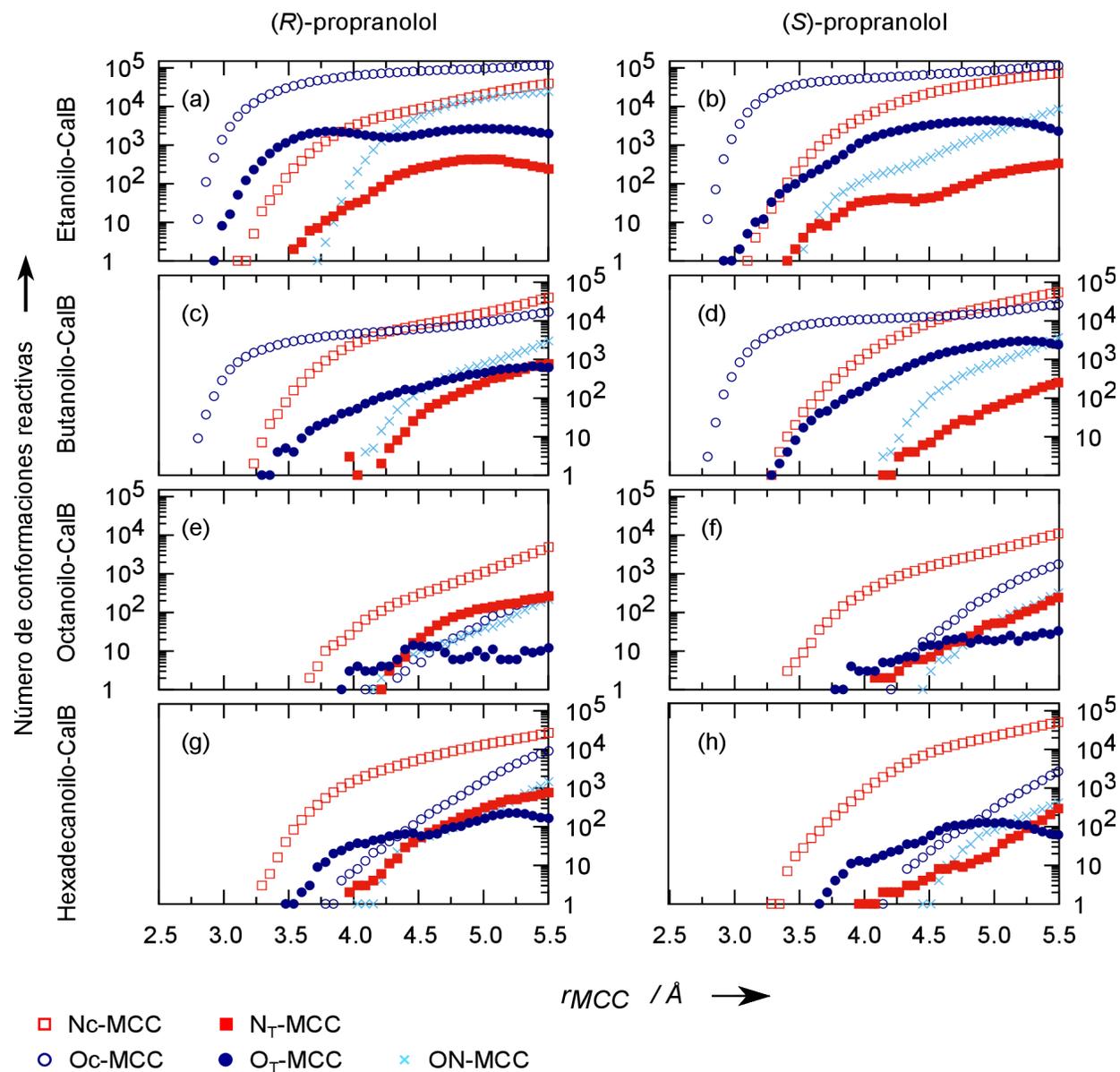
Población de conformaciones reactivas imponiendo restricciones en el ángulo de protonación de la histidina



En la figura 13 se muestra el número de conformaciones tipo O- y N-MCC para el mecanismo clásico y de transbordador de protón.

Figura 13

Población de conformaciones reactivas de acuerdo al mecanismo clásico y de acuerdo al mecanismo de transbordador de protón



5.2.4 *Discusión*

La definición de conformaciones reactivas en términos de parámetros estructurales comparte la misma dificultad con la definición de coordenadas de reacción al estudiar dinámica de reacciones. La razón radica en intentar condensar información inherentemente multidimensional en unos cuantos parámetros, lo cual podría llevar a conclusiones incorrectas. Para evaluar la validez de los resultados obtenidos en el capítulo anterior, se utilizan definiciones adicionales de conformaciones reactivas basadas en otros parámetros geométricos de importancia para la formación del intermediario tetraédrico.

En la figura 9, además de incluir la distancia interatómica relacionada con el ataque nucleofílico también se incluye la distancia asociada con la transferencia del protón desde el nucleófilo hasta la histidina. Adicional a la cuantificación de las conformaciones tipo O- y N-MCC, se cuantifican las conformaciones con una geometría que no favorece de forma preferencial a alguna de las dos rutas, las cuales se denominan conformaciones tipo ON-MCC. Como se aprecia en esta figura, las conformaciones muestran una preferencia hacia alguna de las dos rutas de acilación. Esta preferencia se acentúa a medida que la distancia del propranolol a los residuos catalíticos se hace menor.

Al especificar características como la orientación y la presencia de enlaces de hidrógeno, lo cual se muestra en las figuras 10, 11 y 12, se nota que el resultado predicho en el capítulo anterior se mantiene. Es decir, para los grupos acilo cortos, etanoilo y butanoilo, la población dominante de conformaciones, es la de tipo O-MCC, y para grupos largos, octanoilo y hexadecanoilo, la población dominante de conformaciones, es la de tipo N-MCC.

Para acilaciones catalizadas por CalB, experimentalmente se ha mostrado que la longitud del grupo acilo no afecta la quimioselectividad (Fernández-Pérez & Otero, 2001, 2003; Kidwai

et al., 2009; Liang et al., 2018; Plastina et al., 2009; Quintana et al., 2016; Whitten et al., 2012). Sin embargo, en estos estudios se han utilizado ácidos grasos saturados e insaturados o sus ésteres, de más de 10 carbonos. Al comparar los grupos octanoilo y hexadecanoilo, las poblaciones relativas de O- y N-MCC son similares. Las conformaciones de acilo-CalB, y de los complejos acilo-CalB/propranolol revelan que los grupos etanoilo y butanoilo ocupan parte del sitio activo de CalB tal que el grupo metilo terminal está dentro del sitio activo. El grupo octanoilo se extiende hasta que el grupo metilo terminal llega hasta la entrada del sitio activo. Para el grupo hexadecanoilo, los últimos 8 carbonos se encuentran fuera del sitio activo. Por lo tanto, es de esperar que una cadena hidrocarbonada lineal modificará el sitio activo (al ocupar espacio) hasta aproximadamente 8 carbonos para CalB. Para grupos acilo de más de 8 carbonos se espera un comportamiento similar pues los carbonos adicionales se encuentran por fuera del sitio activo.

En cuanto a la posibilidad de que la reacción transcurra a través del mecanismo de transbordador de protón, tanto para las conformaciones O-MCC, que dominan en los grupos etanoilo y butanoilo, como para las conformaciones N-MCC, que dominan para los grupos octanoilo y hexadecanoilo, el mecanismo más probable es el clásico pues hay un mayor número de conformaciones reactivas hacia este mecanismo. Si se analizan las conformaciones reactivas para cada mecanismo por separado se encuentra que la acilación por medio del mecanismo de transbordador de protón favorece la esterificación para todos los grupos acilo y para el mecanismo clásico al aumentar el tamaño del grupo acilo la ruta de la amidación se hace más favorable.

La propuesta del mecanismo transbordador de protón para la amidación de aminoalcoholes, se apoyó en que las conformaciones tipo N_T-MCC eran más propensas y su

energía menor. Sin embargo, para el ES formado entre propranolol y acilo-CalB, aun para los grupos octanoilo y hexadecanoilo, grupos acilo para los cuales hay mayor número de N-MCC, el número de N_T -MCC es pequeño en comparación con el número de N_C -MCC. Además, no solo se encontraron conformaciones tipo O_T -MCC sino que su población es mayor para las conformaciones tipo N_T -MCC en la zona de las conformaciones más reactivas, es decir, de menor valor en rMCC (figura 13e-h). Esto hace que el mecanismo transbordador de protón sea poco probable en la amidación de propranolol con octanoilo y hexadecanoilo.

Las reacciones de amidación selectivas catalizadas por CalB que se utilizaron para proponer el mecanismo de transbordador de protón utilizan un grupo acilo largo, el butadecanoilo. Sin embargo, además de la acilación con etanoilo de propranolol, existen otros reportes de esterificación selectiva utilizando grupos acilo pequeños. Por ejemplo, la acilación de 2-hidroxi metilpiperidina con butanoilo (Lundell et al., 2003) y atenolol con etanoilo (Barbosa et al., 2011). Por lo tanto, aun existen vacíos en los límites de aplicabilidad del mecanismo de transbordador de protón.

5.2.5 Conclusión

La metodología empleada para interpretar reactividad en términos de conformaciones reactivas es robusta respecto a la definición de conformaciones reactivas. El resultado para la acilación de propranolol con etanoilo está de acuerdo con la quimioselectividad experimental. Y para los grupos butanoilo, octanoilo y hexadecanoilo, se predice que la favorabilidad de formarse conformaciones del complejo de Michaelis reactivas hacia la esterificación disminuye con el tamaño del grupo acilo. Además, la acilación de propranolol catalizada por lipasa B de *Candida antarctica* resulta ser más favorable por el mecanismo clásico en comparación con el mecanismo transbordador de protón.

5.3 Conformaciones reactivas del intermediario tetraédrico: Enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis

5.3.1 Introducción

El mecanismo de reacción para una acilación catalizada por una lipasa involucra la interacción secuencial de dos sustratos con la enzima, en donde cada etapa (denominadas etapas acilación y deacilación) inicia a través de un ataque nucleofílico (Ferrario et al., 2015). Debido a que las lipasas poseen los mismos residuos catalíticos que las proteasas de serina, se acepta que el mecanismo de reacción es análogo (Błaszczuk & Kielbasiński, 2020; Ema, 2004). Por lo tanto, el ataque nucleofílico conlleva a la generación de un intermediario previo a la generación del producto en cada etapa. De esta forma, cada etapa está constituida de dos reacciones elementales, una que conlleva a la formación del intermediario y otra que conlleva a su descomposición (Hedstrom, 2002).

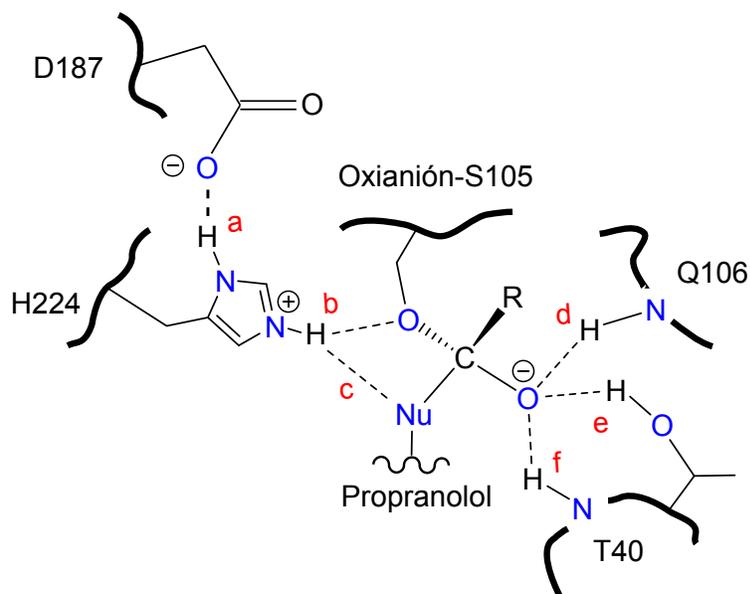
El intermediario, conocido como intermediario tetraédrico, es similar energética- y estructuralmente a los estados de transición de cada reacción elemental (Ema, 2004), por lo que es común que cada etapa se aproxime como compuesta de una única reacción elemental; en donde, el intermediario tetraédrico asume el rol de estado de transición. Esta aproximación facilita el estudio del estado de transición de estas etapas de dos formas: 1) Se puede estudiar de forma experimental la estructura del estado de transición por medio de análogos al estado de transición (análogos al intermediario) (Colton et al., 2011; Ema et al., 2003) y 2) se pueden aplicar técnicas computacionales utilizadas para el estudio de especies estables (mínimos de energía), e.g. mecánica molecular (Cen, Li, et al., 2019; Meng et al., 2014; Park et al., 2016).

La enantioselectividad de las reacciones catalizadas por lipasas se relaciona con la diferencia del costo energético entre las rutas de reacción recorridas por cada enantiómero. Por esto, la comparación entre los intermediarios tetraédricos de cada enantiómero se ha utilizado para racionalizar la enantioselectividad (Hæffner et al., 1998; Meng et al., 2014; Min et al., 2015; Schulz et al., 2001). La reactividad del intermediario de cada enantiómero se puede evaluar de forma estructural haciendo uso de los enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis (H. Chen et al., 2018), lo cual ha permitido explicar la enantioselectividad de acilaciones catalizadas por lipasas (Cen, Singh, et al., 2019; H. Chen et al., 2014; Eum et al., 2014; Rincón et al., 2021; T. Xu et al., 2010).

A continuación, se muestrean conformaciones del intermediario tetraédrico para cada enantiómero del propranolol correspondientes a la ruta de esterificación con los grupos acilo etanoilo y butanoilo. Luego, se relaciona la población de los enlaces de hidrógeno esenciales con la enantioselectividad de la reacción. Los enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis de reacciones de acilación cuando se utiliza lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) corresponden a los enlaces de hidrógeno del hueco oxianiónico (d, e, f en la figura 14) y los enlaces de hidrógeno de los residuos catalíticos (a, b, c en la figura 14).

Figura 14

Enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis en el intermediario tetraédrico formado en la ruta hacia la esterificación



5.3.2 Metodología

El procedimiento utilizado para construir el conjunto de conformaciones para representar el intermediario tetraédrico está expuesto de forma detallada en el Apéndice B. Muestreo conformacional del intermediario tetraédrico. A continuación, se describe de forma resumida.

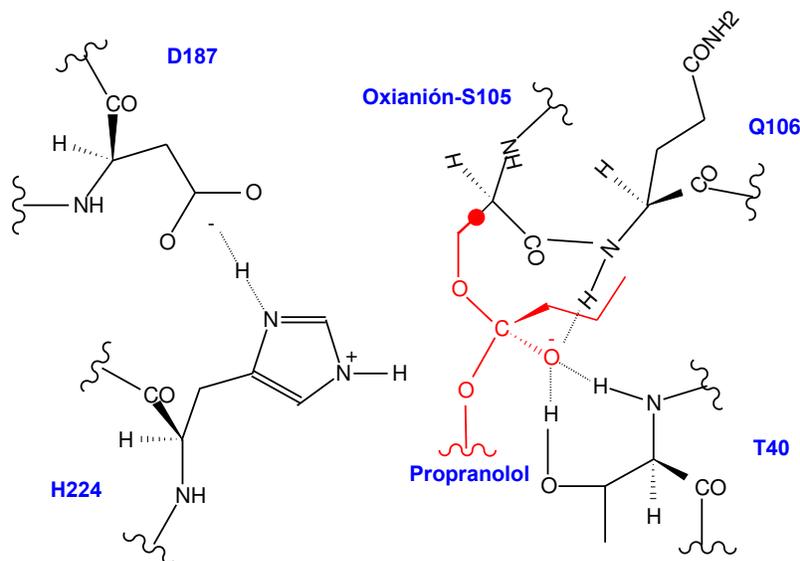
Se seleccionaron algunas conformaciones del complejo enzima/sustrato (ES) muestreadas previamente (4.2.1 Muestreo conformacional). Utilizando el programa CHARMM (Brooks et al., 2009), se impuso un potencial semiarmónico a la distancia entre el oxígeno del hidroxilo del propranolol y el carbono carbonílico del grupo acilo. La constante de fuerza se aumentó gradualmente, realizando minimizaciones de energía para cada constante de fuerza, hasta que el

oxígeno del hidroxilo estuviese a una distancia de enlace del carbono carbonílico del grupo acilo. Luego, se realizó una minimización de energía sin el potencial impuesto. Estas conformaciones del intermediario tetraédrico se utilizaron para iniciar simulaciones de dinámica molecular utilizando una metodología QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics). A partir de las trayectorias generadas se calculó la población de enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis. La presencia de un enlace de hidrógeno se caracterizó mediante una distancia de enlace entre los átomos pesados $\leq 3.0 \text{ \AA}$ y un ángulo $\geq 160^\circ$ entre los átomos involucrados.

Para describir el intermediario se utilizó la región QM indicada en el figura 15, la cual abarca el propranolol y el grupo acilo. La partición del enlace covalente en el residuo de serina, en la frontera QM/MM, se realizó mediante el método átomo de unión (link atom). La región QM se describió con el método SCC-DFTB (self-consistent-charge density-functional-tight-binding method) (Cui et al., 2001) y la región MM con el campo de fuerza CHARMM36 (Brooks et al., 2009).

Figura 15

Región QM indicada en rojo, el círculo representa un átomo de unión. La región QM incluye el residuo de serina de la triada catalítica y el propranolol. El esquema utiliza como ejemplo el grupo butanoilo



5.3.3 Resultados

El protocolo descrito anteriormente se aplicó utilizando los grupos acilo octanoilo y butanoilo. Sin embargo, el intermediario no resultó ser estable. Lo cual terminó en simulaciones no convergidas en la iteración autoconsistente del método QM o en la descomposición del intermediario hacia el ES o complejo enzima/producto (EP). En la tabla 2, se muestran la población de enlaces de hidrógeno esenciales para los sistemas con grupos acilo etanoilo y butanoilo.

Tabla 2

Población de enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis presente en el intermediario tetraédrico de la ruta de esterificación de (R)- y (S)-propranolol con etanoilo y butanoilo

Grupo acilo		etanoilo		butanoilo	
Enantiómero		R	S	R	S
Población de enlaces de hidrógeno [%]	a	86	84	85	78
	b	4	32	5	43
	c	19	3	26	2
	d	46	41	44	71
	e	81	67	80	71
	f	90	92	92	91

5.3.4 Discusión

El enlace de hidrógeno f del hueco oxianiónico es independiente del grupo acilo y del isómero de propranolol, se mantiene alrededor de 90 %. Aparte de este enlace de hidrógeno, el enlace de hidrógeno entre D187 y H224 (enlace a) también mantiene una población similar para ambos grupos acilos y ambos enantiómeros, alrededor de 80%.

En cuanto a los otros dos enlaces de hidrógeno del hueco oxianiónico, el enlace d no diferencia entre los isómeros del intermediario tetraédrico formado con el grupo etanoilo, en ambos casos la población es de aproximadamente 40%. Sin embargo, al duplicar la longitud del grupo acilo, ocurre un aumento en la población de este enlace para el intermediario tetraédrico

del isómero *S*. El comportamiento del enlace e es similar para ambos grupos acilo, en cada caso existe una mayor población de éste enlace para el intermediario del (*R*)-propranolol.

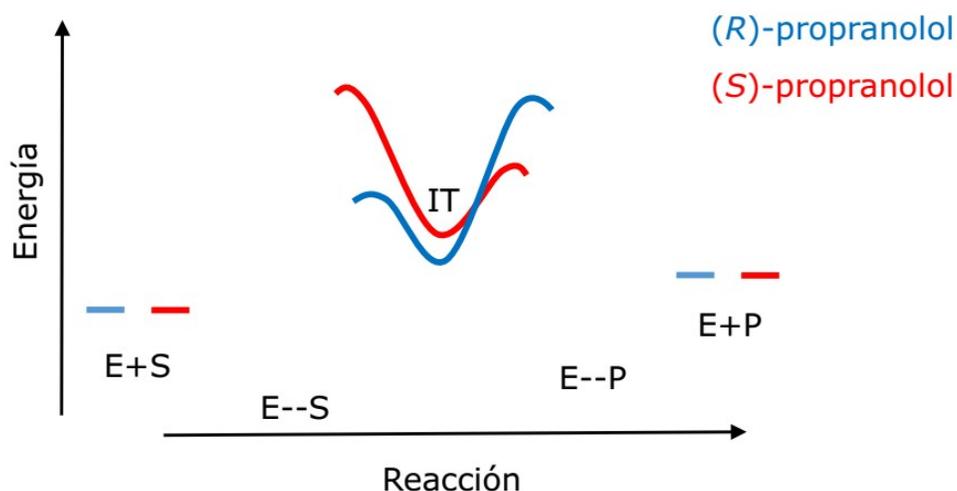
La diferencia más notable entre los isómeros ocurre en las poblaciones de los enlaces de hidrógeno b y c. El intermediario de (*S*)-propranolol presenta una mayor tendencia a formar el enlace b. Al contrario, (*R*)-propranolol presenta una mayor tendencia a formar el enlace c. Este comportamiento se acentúa un poco al aumentar el tamaño del grupo acilo.

Los enlaces de hidrógeno b y c están relacionados con la transferencia del átomo de hidrógeno desde la histidina hacia la serina, en el camino a la formación del EP (enlace b), o hacia el propranolol, en el camino a la formación del ES (enlace c). Por lo tanto, la población de estos enlaces de hidrógeno permite inferir cualitativamente la relación entre las barreras de activación entre estas dos rutas de reacción. De esta forma, si la diferencia energética entre los complejos de Michaelis de ambos isómeros es despreciable, (*R*)-propranolol presenta una menor barrera de activación para alcanzar el intermediario tetraédrico. Sin embargo, el siguiente paso hacia los productos, es decir, la descomposición del intermediario para formar el EP es más favorable energicamente para (*S*)-propranolol.

Lo anterior se esquematiza en la figura 16 mostrando la relación entre las barreras de activación para la ruta recorrida por cada isómero. El comportamiento es el mismo para ambos grupos acilo. Se supone más estable el intermediario tetraédrico de (*R*)-propranolol debido a la mayor población de enlaces de hidrógeno en el hueco oxianiónico, específicamente del enlace e. En el caso del butanoilo, esto podría cambiar y la energía de los intermediarios para cada isómero podría ser igual debido a una compensación con el aumento de población del enlace d para (*S*)-propranolol.

Figura 16

Esquema cualitativo de las barreras de activación en la descomposición del intermediario tetraédrico. E, E--S, IT, E--P y P se refieren a acil-CalB, el complejo enzima/sustrato, el intermediario tetraédrico, el complejo enzima/producto y el propranolol acilado, respectivamente.



5.3.5 Conclusión

Los enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis fueron analizados en los intermediarios tetraédricos formados en la esterificación de propranolol con los grupos acilo etanoilo y butanoilo. Se encontró que los enantiómeros del intermediario tienen una diferente población entre los enlaces de hidrógeno relacionados con la transferencia de protón desde la histidina (enlaces b y c). Sin embargo, este resultado no clarifica la enantioselectividad observada experimental al esterificar el propranolol con el grupo etanoilo. A pesar de esto, provee información sobre las alturas relativas de las barreras de activación involucradas en la descomposición del intermediario. A saber, la transformación del complejo enzima/sustrato al

intermediario tetraédrico requiere menos energía para el isómero R y la formación del complejo enzima/producto a partir del intermediario requiere menor energía para el isómero S. Este comportamiento no depende del tamaño del grupo acilo.

6. Efecto de incrementar la longitud del grupo acilo en la energía potencial del intermediario tetraédrico, y del primer y segundo estado de transición en relación a la energía del complejo de Michaelis (Objetivos 3 y 4)

6.1 Introducción

La resolución cinética es una metodología de producción de enantiómeros a partir de racematos que utiliza la selectividad cinética por reactivos de una reacción. En el contexto de la teoría del estado de transición, la selectividad se relaciona con la diferencia entre las energías de Gibbs de activación de la ruta de reacción que sigue cada enantiómero (Gawley & Aubé, 2012).

La energía de Gibbs de activación se puede calcular por medio de simulaciones computacionales utilizando el formalismo de la mecánica estadística. Para esto, se necesita un muestreo suficiente para incluir el estado de transición, lo que se considera un evento raro. Por esta razón, existe una amplia gama de métodos para calcular la energía de Gibbs basados en un denominado muestreo mejorado, el cual se logra a través de la adición de potenciales que perturban la energía interna del sistema y lo guían hacia los eventos raros (Camilloni & Pietrucci, 2018; Pietrucci, 2017; Saladino et al., 2017). Sin embargo, estos métodos involucran un alto costo computacional y de recurso humano, pues cada simulación necesita ser optimizada para cada sistema para poder lograr producir datos confiables (Pietrucci, 2017).

Un acercamiento en forma parcial, a la descripción cuantitativa de la selectividad, consiste en analizar solo la contribución de la energía potencial (Dubey et al., 2016; Escorcía et al., 2013; Polyak et al., 2013; Shaik et al., 2010; Szaleniec et al., 2014; Tang et al., 2017; Tyzack

et al., 2016; Wei et al., 2018). El análisis de la energía potencial, la cual hace parte del componente entálpico de la energía de Gibbs, ha mostrado ser exitoso en la descripción de reacciones catalizadas por enzimas (Culka et al., 2017; Ranaghan & Mulholland, 2017; Senn & Thiel, 2009). Esta metodología se puede emplear utilizando dos enfoques: analizar el camino de mínima energía de una reacción construido a partir de (1) una única conformación o (2) un conjunto de conformaciones (Sousa et al., 2017). Aunque computacionalmente la primera metodología resulta ser ventajosa, este método depende significativamente de la conformación utilizada. Esta conformación deberá contener la información necesaria para describir la reacción (von der Esch et al., 2019). Aun cuando ha sido útil en varias ocasiones, en algunos casos resulta necesario utilizar diferentes conformaciones para representar la reacción en cuestión. Esto se debe a que en las condiciones experimentales habituales (presión atmosférica y temperatura ambiente), la energía del sistema es tal que los compuestos involucrados pueden explorar un gran número de conformaciones.

A continuación, se estudia la contribución de la energía potencial a la energía de Gibbs de activación de la reacción de acilación de propranolol catalizada por lipasa B de *Candida antarctica* (CalB). De esta forma, se evalúa la efectividad de la metodología implementada en describir la enantioselectividad de esta reacción. Experimentalmente, la acilación resulta ser selectiva hacia la esterificación de (*R*)-propranolol cuando se utiliza el grupo etanoilo. Además, se evalúa el efecto del tamaño del grupo acilo en la enantioselectividad comparando las rutas de reacción para la acilación del propranolol con el grupo etanoilo y butanoilo.

6.2 Metodología

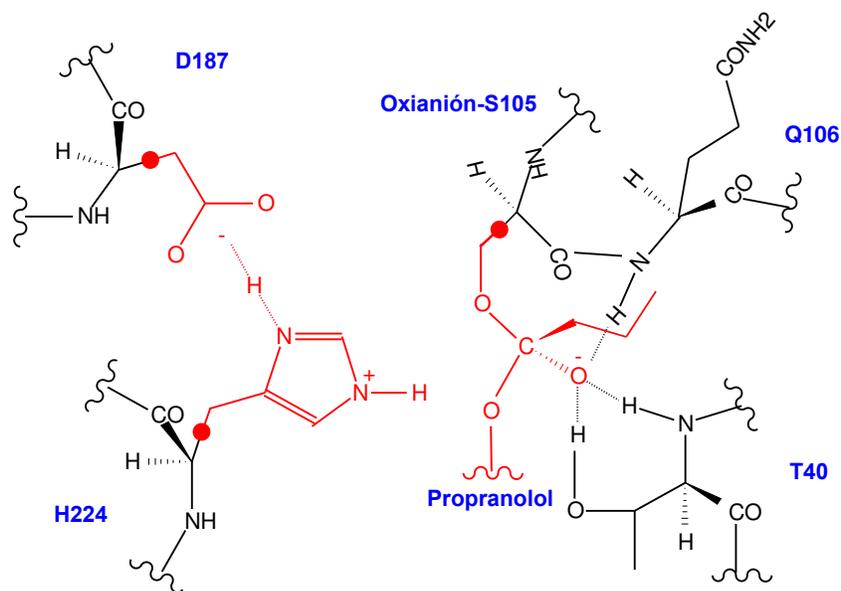
El procedimiento utilizado para construir el perfil de energía potencial en función del avance de la reacción está expuesto de forma detallada en el Apéndice C. Mapeo adiabático. A continuación, se describe de forma resumida.

Se seleccionaron algunas conformaciones del complejo enzima/sustrato (ES) y se construyeron conformaciones del intermediario tetraédrico utilizando el programa CHARMM (Brooks et al., 2009). Para esto, mediante la aplicación de potenciales semiarmónicos los átomos del grupo nucleofílico se trasladaron gradualmente hasta lograr distancias interatómicas correspondientes a la formación de los enlaces a formar en el intermediario tetraédrico. En cada paso se realiza una minimización de energía manteniendo los potenciales en los nuevos valores de equilibrio y al final, se realiza una minimización de energía sin el potencial impuesto.

Se utiliza una metodología QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular mechanics) utilizando el método SCC-DFTB (self-consistent-charge density-functional-tight-binding method) (Cui et al., 2001) y el campo de fuerza CHARMM (Brooks et al., 2009). La región QM utilizada en esta sección se expande en relación con la utilizada en 5.3 Conformaciones reactivas del intermediario tetraédrico: Enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis, se adicionan, a la serina y propranolol, el residuo aminoacídico histidina y ácido aspártico, como se muestra en la figura 17. Los enlaces en la frontera QM/MM se describen por medio del método átomo de unión (link atom).

Figura 17

Región QM indicada en rojo, los círculos representan átomos de unión. La región QM incluye los tres residuos de la triada catalítica y el propranolol. El esquema utiliza como ejemplo el grupo butanoilo



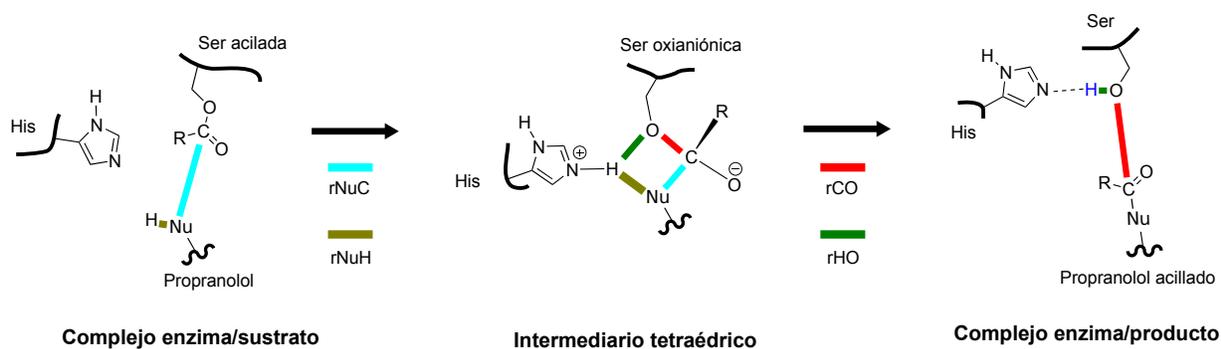
Las conformaciones del intermediario tetraédrico se utilizaron para comenzar la exploración del camino de mínima energía, la cuál se realizó utilizando el programa ChemShell (Metz et al., 2014) y el programa MNDO99 (Thiel, 2007). Para esto, se definieron dos coordenadas de reacción, una para describir el cambio estructural hacia el ES y otra hacia el complejo enzima/producto (EP). Comenzando en el intermediario, se avanzó en cada una de las coordenadas de reacción hasta llegar a cada complejo. En cada paso se realizó una minimización imponiendo un potencial armónico en el valor de la coordenada, metodología denominada mapeo adiabático (también llamada escaneo relajado o dirección de coordenada) (von der Esch et al., 2019). Luego, a partir de los perfiles de energía en función de la coordenada de reacción se

aproxima la energía del estado de transición como la energía en la barrera de activación presente en el perfil (el valor se redondea para reportarse como número entero).

La coordenada de reacción para describir el cambio entre el intermediario tetraédrico y el ES corresponde a la diferencia entre las distancias interatómicas entre el átomo nucleofílico y su protón (en el ES), y el átomo nucleofílico y el carbono carbonílico del grupo acilo. Es decir, $r_{\text{NuH}} - r_{\text{NuC}}$ (ver figura 18). La coordenada de reacción para describir el cambio entre el intermediario tetraédrico y el EP corresponde a la diferencia entre las distancias interatómicas entre el oxígeno del enlace éster y el carbono carbonílico del grupo acilo, y el protón del grupo nucleofílico (en el ES) y el oxígeno del enlace éster del grupo acilo. Es decir, $r_{\text{CO}} - r_{\text{HO}}$ (ver figura 18).

Figura 18

Distancias interatómicas utilizadas en la definición de las coordenadas de reacción



6.3 Resultados

En las siguientes figuras se muestra el componente de energía potencial de las barreras energéticas de la descomposición del intermediario tetraédrico, hacia el ES y EP, las cuales se identifican en la figuras como B1 y B2, respectivamente. También se muestra la energía del intermediario tetraédrico. La energía se presenta relativa a la energía del ES. En las figuras, dat, pro, des, mín y máx, corresponden respectivamente al número de simulaciones, el promedio y la desviación estándar de la barrera, y el mínimo y máximo valor de la barrera entre las diferentes valores obtenidos en las simulaciones.

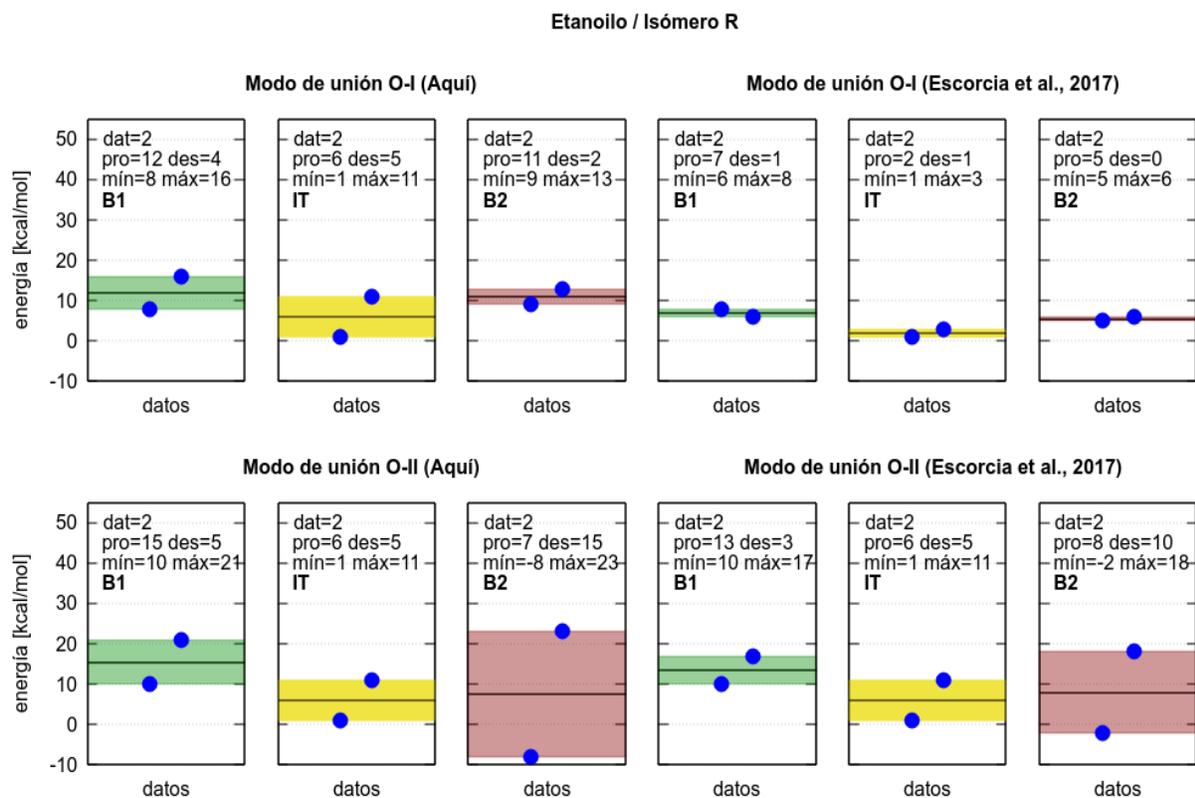
En las figuras 19 y 20, se comparan los resultados obtenidos por (Escorcía et al., 2017) y los obtenidos en la presenta investigación. Para esto, se aplicó la metodología descrita anteriormente utilizando como estructura inicial, la utilizada en (Escorcía et al., 2017). A diferencia de la metodología utilizada aquí, (Escorcía et al., 2017) utilizaron la región QM utilizada en 5.3 Conformaciones reactivas del intermediario tetraédrico: Enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis y el método DFT (density functional theory) B3LYP/TZVP para describir la estructura electrónica.

En las figuras 21-24, se muestran los resultados para los dos grupos acilo e isómeros utilizando como estructuras iniciales en el mapeo adiabático las obtenidas en la presente investigación. El anterior protocolo se aplicó también para analizar las rutas de reacción de la acilaciones con los grupos octanoilo y hexadecanoilo. Pero, no se lograron converger las optimizaciones involucradas en el mapeo adiabático para todos los caminos de reacción, lo cual no permite evaluar el cambio en la quimio- o enantioselectividad al utilizar estos grupos acilo.

Figura

19

Barreras de activación para la descomposición del isómero R del intermediario tetraédrico formado con el grupo etanoilo. Comparación de resultados reportados en (Escorcía et al., 2017)



Figura

20

Barreras de activación para la descomposición del isómero S del intermediario tetraédrico formado con el grupo etanoilo. Comparación de resultados reportados en (Escorcía et al., 2017)

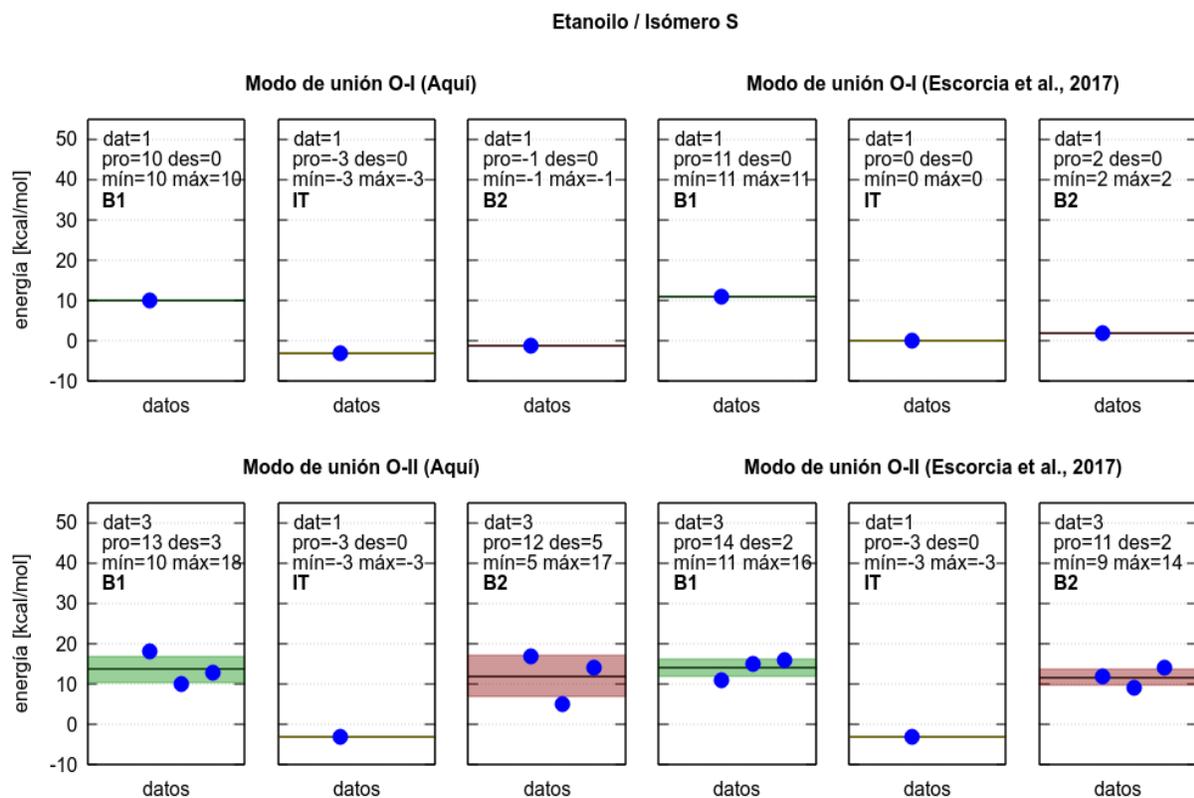


Figura 21

Barreras de activación para la descomposición del isómero R del intermediario tetraédrico formado con el grupo etanoilo

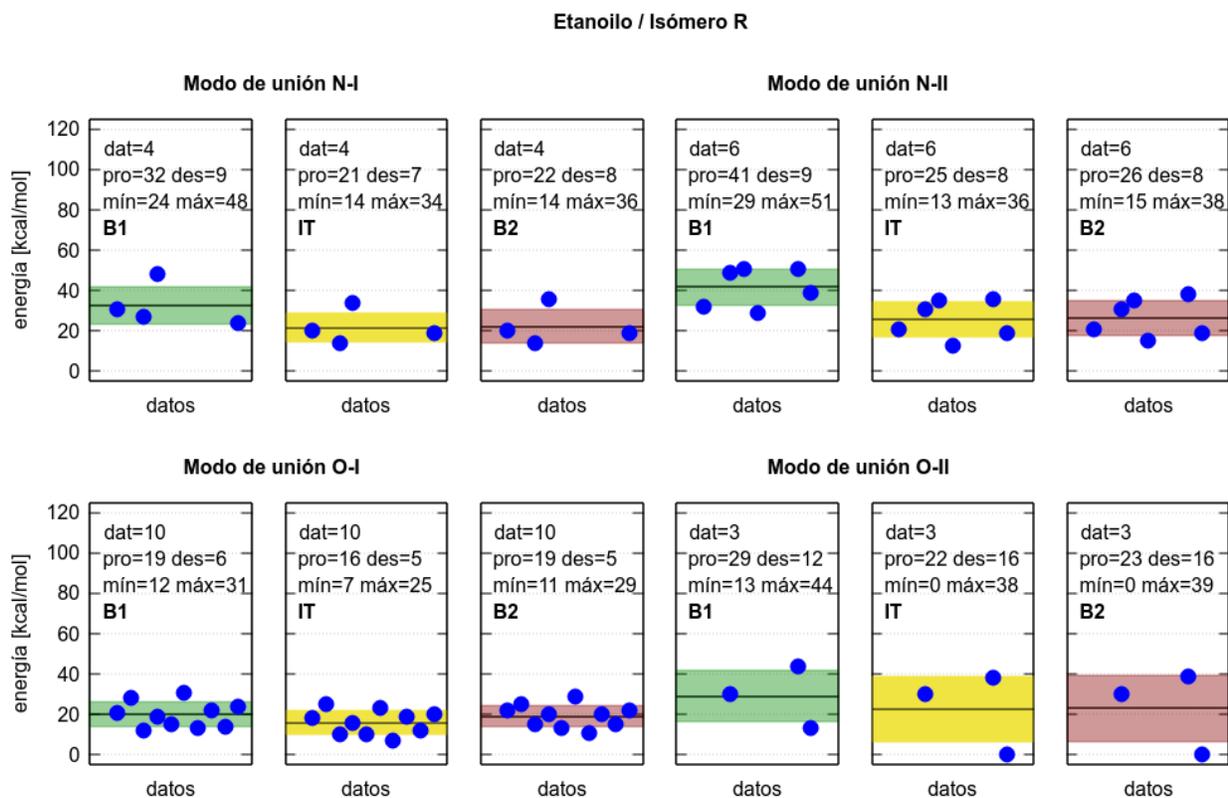


Figura 22

Barreras de activación para la descomposición del isómero S del intermediario tetraédrico formado con el grupo etanoilo

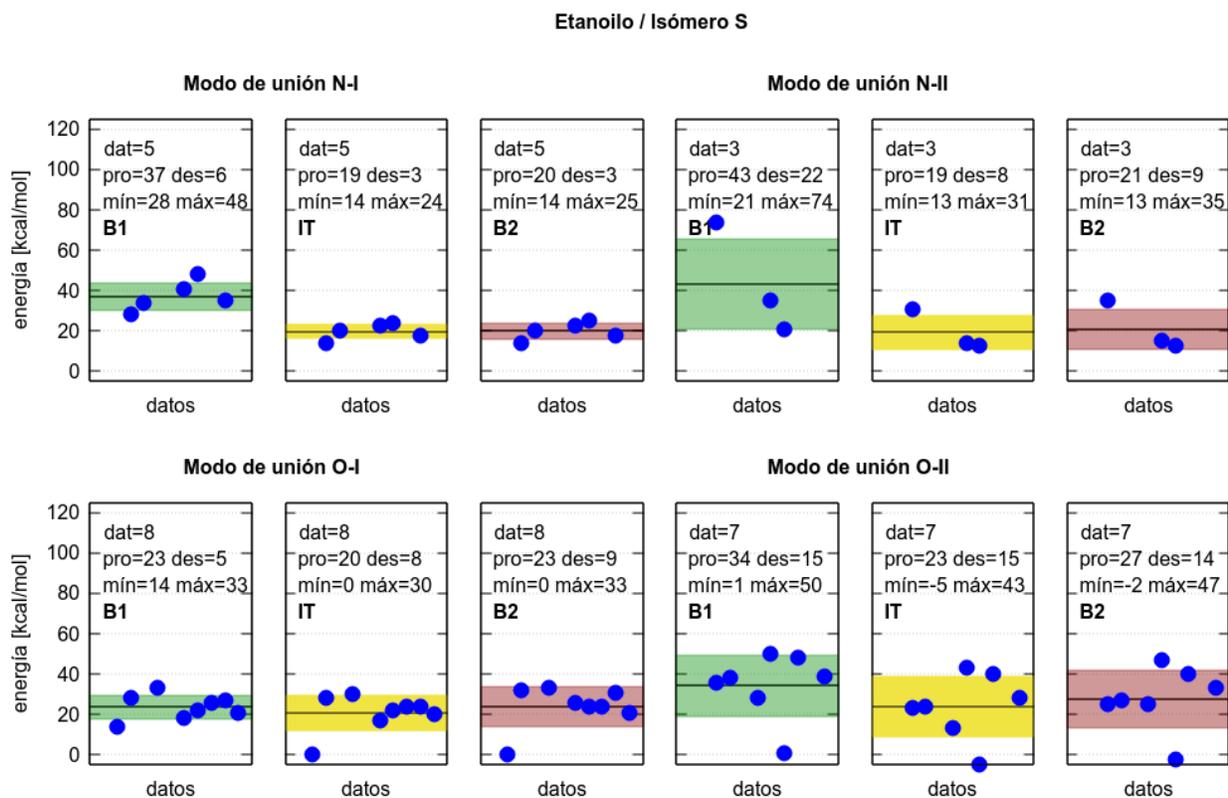


Figura 23

Barreras de activación para la descomposición del isómero R del intermediario tetraédrico formado con el grupo butanoilo

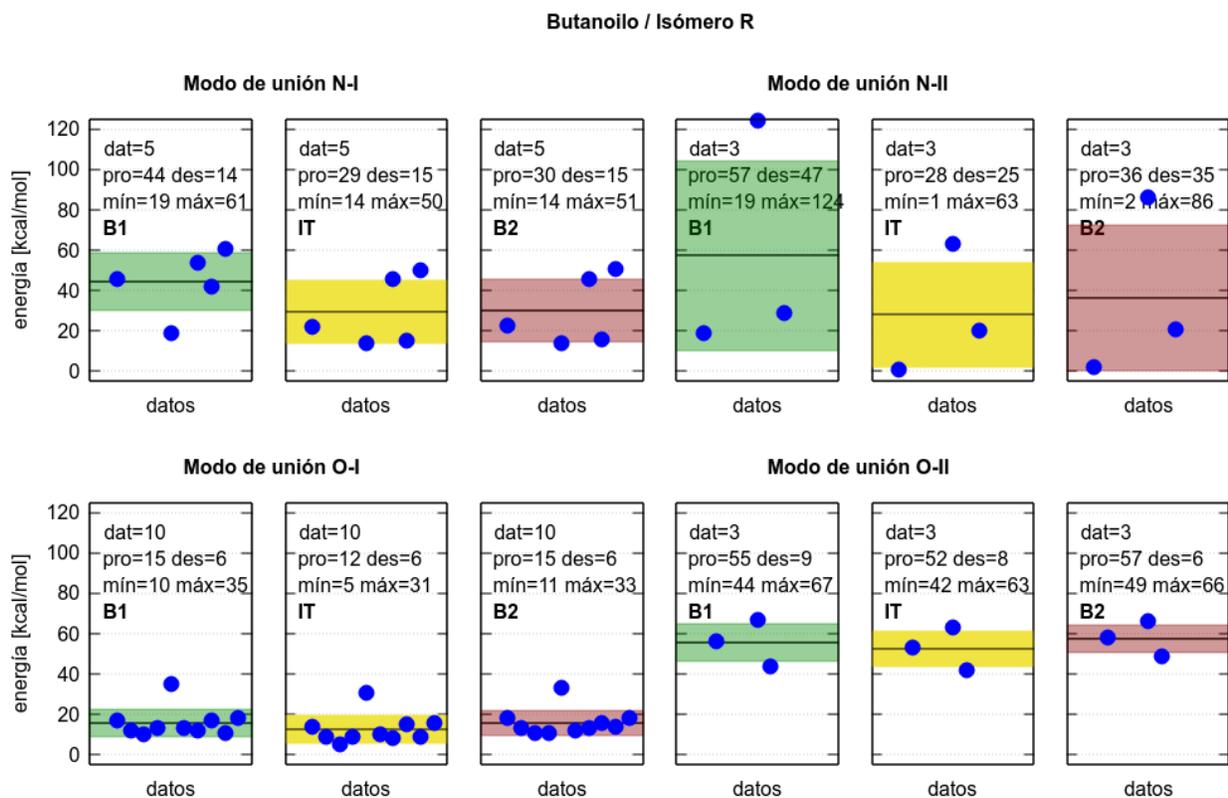
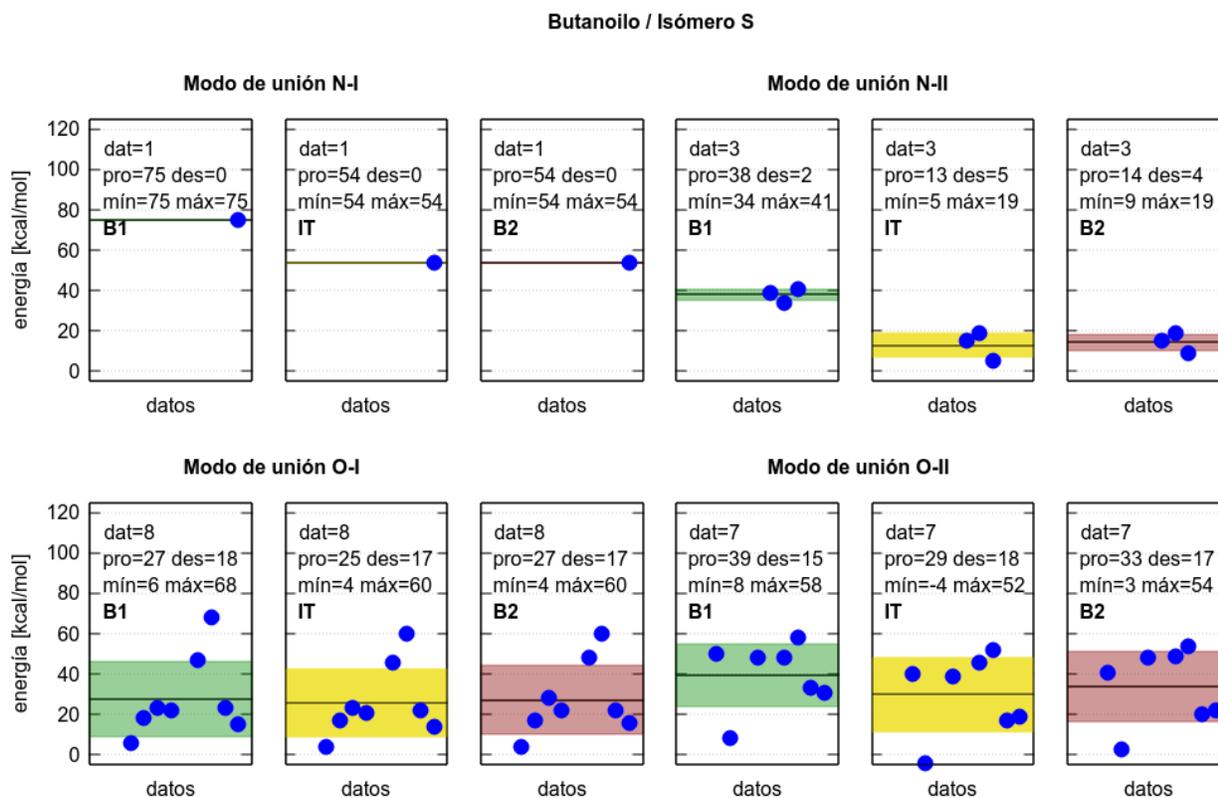


Figura 24

Barreras de activación para la descomposición del isómero S del intermediario tetraédrico formado con el grupo butanoilo



6.4 Discusión

La enantioselectividad de la acilación del propranolol catalizada por CalB es selectiva hacia la esterificación de (*R*)-propranolol cuando se utiliza el grupo etanoilo (Escorcía et al., 2013). Previamente se utilizó un método QM/MM para calcular la contribución de la energía potencial a las barreras de activación involucradas en esta reacción (Escorcía et al., 2017). Los métodos QM/MM han sido utilizados satisfactoriamente para el estudio de caminos de reacción (Grillo et al., 2020) y se han aplicado al estudio de la enantioselectividad (Polyak et al., 2013; Szaleniec et al., 2014; Tang et al., 2017). Generalmente, la región QM se describe por medio de DFT, el cual es capaz de reproducir las pequeñas diferencias en las energías de activación que describen la enantioselectividad, lo cual en parte se debe a la cancelación de errores sistemáticos (Sheng et al., 2020). Utilizando DFT (B3LYP/TZVP), (Escorcía et al., 2017) encontraron que la ruta de esterificación del propranolol presenta un menor costo energético para (*R*)-propranolol.

Al utilizar el método semiempírico SCC-DFTB, en este estudio encontramos que en general se reproducen los resultados obtenidos por (Escorcía et al., 2017), ver figuras 19 y 20. Sin embargo, no se reproduce la pequeña diferencia en las rutas de reacción que señala al (*R*)-propranolol como el isómero más reactivo hacia la esterificación con etanoilo. Los resultados obtenidos por (Escorcía et al., 2017) muestran que el camino de reacción para la conformación en modo de unión I para el (*R*)-propranolol tiene la menor barrera de activación B1. Sin embargo, la desviación de las dos conformaciones hace que el promedio de dicha barrera sea mayor, con lo cual no es posible identificar a dicho isómero como el más reactivo.

A pesar de lo anterior, los resultados obtenidos con el método semiempírico se ajustan al resultado experimental si se aumenta el número de rutas de reacción analizadas. En las figuras 21

y 22, se comparan las dos posibles rutas de acilación, en cada ruta se analizan las conformaciones en modo de unión I y II. Para el (*R*)-propranolol (figura 21), se encuentra que la ruta energéticamente más favorable es la esterificación en modo de unión I, en la cual la primera barrera de activación es de ~ 19 Kcal/mol seguida por una barrera de ~ 3 Kcal/mol. Para el (*S*)-propranolol (figura 22), la ruta más accesible es también la esterificación en modo de unión II. Sin embargo, la primera barrera de activación es ~ 23 Kcal/mol seguida por una barrera de ~ 3 Kcal/mol. Lo cual da una diferencia de ~ 4 Kcal/mol en la primera barrera, muy cercano al valor de 4.5 Kcal/mol reportado por (Escorcía et al., 2017).

(Escorcía et al., 2017) resaltó que el intermediario tetraédrico no es una buena aproximación al estado de transición. Esto se ve claramente en las figuras 19 y 20, si se supone que el intermediario tetraédrico es el estado de transición, la ruta más favorable es la de (*S*)-propranolol que de hecho tendría una menor energía que el ES (lo cual se debe a no incluir la entropía (Valderrama et al., 2021)). Al aumentar el número de rutas de reacción en el análisis, la energía promedio del intermediario indica el resultado experimental. En las figuras 21 y 22, la energía del intermediario tetraédrico para la acilación con etanoilo es ~ 16 Kcal/mol y ~ 20 Kcal/mol para el (*R*)- y (*S*)-propranolol, respectivamente, lo cual daría una diferencia de ~ 4 Kcal/mol entre las dos “barreras de activación”. Esto indica que el intermediario tetraédrico sería una buena aproximación al estado de transición de la esterificación. Sin embargo, si se analizan únicamente los intermediarios, incluyendo la ruta de amidación, entonces la ruta más accesible en realidad correspondería a dicha ruta para (*S*)-propranolol (en modo I o II, pues las barreras son similares: ~ 19 Kcal/mol). Pero, la amidación muestra una diferencia significativa entre la primera barrera B1 y el intermediario (más de 10 Kcal/mol para cada modo de unión). De esta forma, con la metodología empleada aquí se apoya lo señalado por (Escorcía et al., 2017)

(aunque las razones difieren), es decir, que el intermediario tetraédrico no es una buena aproximación al estado de transición, al menos desde el punto de vista de la energía potencial.

El aumento de la longitud del grupo acilo desde etanoilo hasta butanoilo acentuó la diferencia entre el costo de energético al recorrer el camino de reacción más favorable y el resto de caminos de reacción para cada enantiómero al comparar las cuatro rutas O-I, O-II, N-I y N-II (figuras 23 y 24). Además, la enantioselectividad determinada por la energía potencial aumenta, manteniéndose el (*R*)-propranolol como el isómero más reactivo. La diferencia energética entre las rutas de acilación de cada enantiómero, determinadas por la primera barrera de activación, es de ~4 Kcal/mol para la acilación con etanoilo y de ~12 Kcal/mol para el butanoilo.

6.5 Conclusión

Se investigó la energía potencial de los caminos de reacción para la acilación de propranolol catalizada con lipasa B de *Candida antarctica*. Se determinó que empleando una metodología QM/MM (SCC-DFTB/CHARMM) se puede reproducir la enantioselectividad experimental hacia (*R*)-propranolol cuando se emplea el grupo etanoilo siempre y cuando se calculen múltiples caminos de reacción a partir de diferentes conformaciones. Al comparar la acilación utilizando etanoilo y butanoilo, se determinó que el grupo acilo de mayor tamaño producirá una mayor enantioselectividad hacia la esterificación de (*R*)-propranolol además de una mayor reactividad teniendo en cuenta solo la contribución de energía potencial.

7. Conclusiones

En la presente investigación se utilizó un enfoque computacional para determinar la relación entre la selectividad de la acilación catalizada, mediante lipasa B de *Candida antarctica*, de (*RS*)-propranolol y el tamaño del grupo acilo empleado. Los resultados obtenidos exponen ventajas y desventajas de diferentes metodologías computacionales utilizadas en el estudio de catálisis enzimática como el análisis de la población de conformaciones reactivas y los perfiles de energía potencial a lo largo de la ruta de reacción. Además, se analizan conceptos que permiten profundizar el entendimiento de las reacciones de acilación catalizadas por lipasas como preorganización electrostática, modos de unión y enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis. Se espera que el estudio realizado aquí contribuya al desarrollo de metodologías de resolución cinética de mezclas racémicas al mostrar la posibilidad de modificar, por medio del tamaño del grupo acilo, la selectividad de reacciones de acilación de sustratos quirales catalizadas por lipasas.

En la primera parte de la investigación se analizó el complejo enzima/sustrato formado entre la lipasa B de *Candida antarctica* acilada y cada isómero de propranolol de acuerdo a los objetivos específicos 1 y 2. Se determinó que al definir conformaciones reactivas con base en parámetros geométricos se puede reproducir la quimioselectividad hacia la esterificación de la acilación de propranolol con etanoilo determinada experimentalmente. El estudio de sistemas con la lipasa acilada con los grupos acilo butanoilo, octanoilo y hexadecanoilo indica que la quimioselectividad aportada por el complejo enzima/sustrato favorecerá la ruta de la amidación al utilizar grupos acilo largos. La selectividad hacia la esterificación al utilizar etanoilo y

butanoilo se correlaciona con la estabilización electrostática en la energía potencial que provee el sitio activo de la enzima. Dicha energía potencial no explica la favorabilidad de la amidación para los grupos octanoilo y hexadecanoilo. Además, se determinó que el mecanismo clásico en comparación con el mecanismo transbordador de protón es el mecanismo de acilación catalizada por lipasas más favorable para la acilación de propranolol. En cuanto a la enantioselectividad que el complejo enzima/sustrato aporta a la reacción, el modo de unión que adopta dicho complejo indica que el aumento de la longitud del grupo acilo de etanoilo hasta butanoilo y octanoilo favorece la esterificación del isómero S.

En la segunda parte de esta investigación se analizó el intermediario tetraédrico de la esterificación con el grupo etanoilo y butanoilo de acuerdo al objetivo específico 2. Los enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis de los intermediarios tetraédricos muestran una diferente población al comparar los isómeros de propranolol. Sin embargo, dicha diferencia no clarifica la enantioselectividad observada experimentalmente al acilar el propranolol con el grupo etanoilo por lo que no se puede determinar si el aumento del tamaño del grupo acilo afectará la enantioselectividad por medio de esta metodología.

En la tercera parte de esta investigación se estudió el cambio en la energía potencial a lo largo de la reacción de acuerdo a los objetivos específicos 3 y 4. Al comparar la acilación del propranolol con etanoilo y butanoilo, se determinó que el grupo butanoilo producirá una mayor enantioselectividad hacia la esterificación de (*R*)-propranolol que el grupo etanoilo.

8. Divulgación

Parte de la investigación presentada en este documento fue divulgada en:

1. XVIII Congreso Colombiano de Química (Noviembre 6-8 del 2019, Colombia). **Charla:** Influencia del grupo acilo en la quimioselectividad de la acilación biocatalizada de (*RS*)-propranolol. Gilberto A. Zapata-Romero, Markus Doerr, Martha Daza.
2. 60th Sanibel Symposium (Febrero 16-21 del 2020, Estados Unidos). **Póster:** Lipase-catalyzed acylation of (*RS*)-propranolol: effect of the acyl group on the chemoselectivity. Gilberto A. Zapata-Romero, Markus Doerr, Martha Daza.
3. Simpósio de estrutura eletrônica e dinâmica molecular (Noviembre 23 - Diciembre 5 de 2020, Brazil – Online). **Charla:** Lipase-catalyzed O-acylation of (*RS*)-propranolol is determined by the acyl group length VIII. Gilberto A. Zapata-Romero, Markus Doerr, Martha Daza.
4. Simpósio de estrutura eletrônica e dinâmica molecular (Noviembre 23 - Diciembre 5 de 2020, Brazil – Online). **Póster:** Enantioselective lipase-catalyzed O-acylation of (*RS*)-propranolol: analysis of the hydrogen bonds essential for catalysis. Gilberto A. Zapata-Romero, Markus Doerr, Martha Daza.
5. I Simposio de química-UIS (Diciembre 3-4 del 2020, Colombia – Online). **Charla:** Contribución de la estabilización electrostática a la quimioselectividad de la acetilación de propranolol catalizada por lipasa B de *Candida antarctica*. Gilberto A. Zapata-Romero, Markus Doerr, Martha Daza.

6. I Encuentro de Modelamiento Molecular Colombia (Diciembre 4 del 2020, Colombia – Online). **Charla:** Efecto de la longitud del grupo acilo en los puentes de hidrógeno esenciales para la acilación de propranolol, catalizada por lipasa B de *Candida antarctica*. Gilberto A. Zapata-Romero, Markus Doerr, Martha Daza.
7. Journal of Molecular Modeling (Junio 11 del 2021, Online). **Artículo:** Effect of the acyl-group length on the chemoselectivity of the lipase-catalyzed acylation of propranolol – a computational study. Markus Doerr, Alexander Romero, Martha Daza.

Referencias bibliográficas

- Agustian, J., Kamaruddin, A. H., & Bhatia, S. (2010). Single enantiomeric β -blockers—The existing technologies. *Process Biochemistry*, 45(10), 1587–1604. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.06.022>
- Ainsley, J., Lodola, A., Mulholland, A. J., Christov, C. Z., & Karabancheva-Christova, T. G. (2018). Combined Quantum Mechanics and Molecular Mechanics Studies of Enzymatic Reaction Mechanisms. In T. G. Karabancheva-Christova & C. Z. Christov (Eds.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 113, pp. 1–32). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.07.001>
- Alkadi, H., & Jbeily, R. (2018). Role of Chirality in Drugs: An Overview. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 18(2), 88–95. <https://doi.org/10.2174/1871526517666170329123845>
- Barbosa, O., Ariza, C., Ortiz, C., & Torres, R. (2010). Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B). *New Biotechnology*, 27(6), 844–850. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.07.015>
- Barbosa, O., Ortiz, C., Torres, R., & Fernandez-Lafuente, R. (2011). Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: Enantiospecific production of atenolol acetate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(3–4), 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.04.008>
- Bar-Even, A., Milo, R., Noor, E., & Tawfik, D. S. (2015). The Moderately Efficient Enzyme: Futile Encounters and Enzyme Floppiness. *Biochemistry*, 54(32), 4969–4977. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00621>
- Bartsch, S., Kourist, R., & Bornscheuer, U. T. (2008). Complete Inversion of Enantioselectivity towards Acetylated Tertiary Alcohols by a Double Mutant of a *Bacillus Subtilis* Esterase.

- Angewandte Chemie International Edition*, 47(8), 1508–1511.
<https://doi.org/10.1002/anie.200704606>
- Benamara, N. E., Merabet-Khelassi, M., Lakoud, S. G., Aribi-Zouiouche, L., & Riant, O. (2021). Enantioselective Enzymatic Synthesis of (*R*)-Phenyl Alkyl Esters and Their Analogue Amides using Fatty Acids as Green Acyl Donors. *ChemistrySelect*, 6(48), 13941–13946. <https://doi.org/10.1002/slct.202103831>
- Bianco, G., Forli, S., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Covalent docking using autodock: Two-point attractor and flexible side chain methods. *Protein Science*, 25(1), 295–301. <https://doi.org/10.1002/pro.2733>
- Billeter, S. R., Turner, A. J., & Thiel, W. (2000). Linear scaling geometry optimisation and transition state search in hybrid delocalised internal coordinates. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2(10), 2177–2186. <https://doi.org/10.1039/a909486e>
- Blaser, H.-U. (2013). Chirality and its implications for the pharmaceutical industry. *Rendiconti Lincei*, 24(3), 213–216. <https://doi.org/10.1007/s12210-012-0220-2>
- Błaszczuk, J., & Kielbasiński, P. (2020). Quarter of a Century after: A Glimpse at the Conformation and Mechanism of *Candida antarctica* Lipase B. *Crystals*, 10(5), 404. <https://doi.org/10.3390/cryst10050404>
- Bondar, A.-N., Fischer, S., Smith, J. C., Elstner, M., & Suhai, S. (2004). Key Role of Electrostatic Interactions in Bacteriorhodopsin Proton Transfer. *Journal of the American Chemical Society*, 126(44), 14668–14677. <https://doi.org/10.1021/ja047982i>
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., 3rd, Mackerell, A. D., Jr, Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., ... Karplus, M. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, 30(10), 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>

- Bruice, T. C. (2002). A View at the Millennium: The Efficiency of Enzymatic Catalysis. *Accounts of Chemical Research*, 35(3), 139–148. <https://doi.org/10.1021/ar0001665>
- Bürgi, H. B., Dunitz, J. D., & Shefter, E. (1973). Geometrical reaction coordinates. II. Nucleophilic addition to a carbonyl group. *Journal of the American Chemical Society*, 95(15), 5065–5067. <https://doi.org/10.1021/ja00796a058>
- Bürgi, H. B., Dunitz, J. D., & Shefter, E. (1974). Chemical reaction paths. IV. Aspects of O...C=O interactions in crystals. *Acta Crystallographica, Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, B30, 1517–1527. <https://doi.org/10.1107/S0567740874005188>
- Burley, S. K., Berman, H. M., Bhikadiya, C., Bi, C., Chen, L., Costanzo, L. D., Christie, C., Duarte, J. M., Dutta, S., Feng, Z., Ghosh, S., Goodsell, D. S., Green, R. K., Guranovic, V., Guzenko, D., Hudson, B. P., Liang, Y., Lowe, R., Peisach, E., ... Ioannidis, Y. E. (2019). Protein Data Bank: The single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D520–D528. <https://doi.org/10.1093/nar/gky949>
- Camilloni, C., & Pietrucci, F. (2018). Advanced simulation techniques for the thermodynamic and kinetic characterization of biological systems. *Advances in Physics: X*, 3(1), 1477531. <https://doi.org/10.1080/23746149.2018.1477531>
- Casas-Godoy, L., Gasteazoro, F., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A., & Sandoval, G. (2018). Lipases: An Overview. In G. Sandoval (Ed.), *Lipases and Phospholipases* (Vol. 1835, pp. 3–38). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_1
- Cen, Y., Li, D., Xu, J., Wu, Q., Wu, Q., & Lin, X. (2019). Highly Focused Library-Based Engineering of *Candida antarctica* Lipase B with (S)-Selectivity Towards *sec*-Alcohols. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 361(1), 126–134. <https://doi.org/10.1002/adsc.201800711>
- Cen, Y., Singh, W., Arkin, M., Moody, T. S., Huang, M., Zhou, J., Wu, Q., & Reetz, M. T. (2019). Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism

- created by laboratory evolution. *Nature Communications*, 10(3198), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11155-3>
- Chen, C.-S., & Sih, C. J. (1989). General Aspects and Optimization of Enantioselective Biocatalysis in Organic Solvents: The Use of Lipases. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 28(6), 695–707. <https://doi.org/10.1002/anie.198906951>
- Chen, H., Meng, X., Xu, X., Liu, W., & Li, S. (2018). The molecular basis for lipase stereoselectivity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8), 3487–3495. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8858-z>
- Chen, H., Wu, J., Yang, L., & Xu, G. (2014). Characterization and structure basis of *Pseudomonas alcaligenes* lipase's enantiopreference towards d,l-menthyl propionate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 102, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.01.020>
- Chênevert, R., Pelchat, N., & Morin, P. (2009). Lipase-mediated enantioselective acylation of alcohols with functionalized vinyl esters: Acyl donor tolerance and applications. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20(10), 1191–1196. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2009.03.027>
- Christelle, B., Eduardo, B. D. O., Latifa, C., Elaine-Rose, M., Bernard, M., Evelyne, R.-H., Mohamed, G., Jean-Marc, E., & Catherine, H. (2011). Combined docking and molecular dynamics simulations to enlighten the capacity of *Pseudomonas cepacia* and *Candida antarctica* lipases to catalyze quercetin acetylation. *Journal of Biotechnology*, 156(3), 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.09.007>
- Čižmáriková, R., Habala, L., Valentová, J., & Markuliak, M. (2019). Survey of Pharmacological Activity and Pharmacokinetics of Selected β -Adrenergic Blockers in Regard to Their Stereochemistry. *Applied Sciences*, 9(4), 625. <https://doi.org/10.3390/app9040625>
- Colton, I. J., Yin, D. T., Grochulski, P., & Kazlauskas, R. J. (2011). Molecular Basis of Chiral Acid Recognition by *Candida rugosa* Lipase: X-Ray Structure of Transition State Analog

- and Modeling of the Hydrolysis of Methyl 2-Methoxy-2-phenylacetate. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(13), 2529–2544. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100459>
- Cui, Q., Elstner, M., Kaxiras, E., Frauenheim, T., & Karplus, M. (2001). A QM/MM Implementation of the Self-Consistent Charge Density Functional Tight Binding (SCC-DFTB) Method. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(2), 569–585. <https://doi.org/10.1021/jp0029109>
- Culka, M., Gisdon, F. J., & Ullmann, G. M. (2017). Computational Biochemistry—Enzyme Mechanisms Explored. In T. Karabancheva-Christova (Ed.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 109, pp. 77–112). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2017.04.004>
- De Oliveira, E. B., Humeau, C., Chebil, L., Maia, E. R., Dehez, F., Maigret, B., Ghoul, M., & Engasser, J.-M. (2009). A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1–3), 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.011>
- Dettoni, L., Jelsch, C., Guiavarc'h, Y., Delaunay, S., Framboisier, X., Chevalot, I., & Humeau, C. (2018). Molecular rules for selectivity in lipase-catalysed acylation of lysine. *Process Biochemistry*, 74, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.021>
- Devendran, S., & Yadav, G. D. (2014). Microwave assisted enzymatic kinetic resolution of (±)-1-phenyl-2-propyn-1-ol in nonaqueous media. *BioMed Research International*, 2014, 482678. <https://doi.org/10.1155/2014/482678>
- Dubey, K. D., Wang, B., & Shaik, S. (2016). Molecular Dynamics and QM/MM Calculations Predict the Substrate-Induced Gating of Cytochrome P450 BM3 and the Regio- and Stereoselectivity of Fatty Acid Hydroxylation. *Journal of the American Chemical Society*, 138(3), 837–845. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b08737>

- Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2011). NNScore 2.0: A Neural-Network Receptor–Ligand Scoring Function. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(11), 2897–2903. <https://doi.org/10.1021/ci2003889>
- Elstner, M., Porezag, D., Jungnickel, G., Elsner, J., Haugk, M., Frauenheim, Th., Suhai, S., & Seifert, G. (1998). Self-consistent-charge density-functional tight-binding method for simulations of complex materials properties. *Physical Review B*, 58(11), 7260–7268. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.58.7260>
- Ema, T. (2004). Mechanism of Enantioselectivity of Lipases and Other Synthetically Useful Hydrolases. *Current Organic Chemistry*, 8(11), 1009–1025. <https://doi.org/10.2174/1385272043370230>
- Ema, T., Maeno, S., Takaya, Y., Sakai, T., & Utaka, M. (1996). Significant effect of acyl groups on enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterifications. *Tetrahedron: Asymmetry*, 7(3), 625–628. [https://doi.org/10.1016/0957-4166\(96\)00049-3](https://doi.org/10.1016/0957-4166(96)00049-3)
- Ema, T., Yamaguchi, K., Wakasa, Y., Yabe, A., Okada, R., Fukumoto, M., Yano, F., Korenaga, T., Utaka, M., & Sakai, T. (2003). Transition-state models are useful for versatile biocatalysts: Kinetics and thermodynamics of enantioselective acylations of secondary alcohols catalyzed by lipase and subtilisin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22(3–4), 181–192. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00034-1](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00034-1)
- Escorcía, A. M., Daza, M. C., & Doerr, M. (2014). Computational study of the enantioselectivity of the O-acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 108, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.06.010>
- Escorcía, A. M., Molina, D., Daza, M. C., & others. (2013). Acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B: An experimental and computational study. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 98, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.09.019>

- Escorcía, A. M., Sen, K., Daza, M. C., Doerr, M., & Thiel, W. (2017). Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Insights into the Enantioselectivity of the O-Acetylation of (R,S)-Propranolol Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B. *ACS Catalysis*, 7(1), 115–127. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b02310>
- Eum, H., Kazlauskas, R. J., & Ha, H.-J. (2014). Molecular Basis for the Enantio- and Diastereoselectivity of *Burkholderia cepacia* Lipase toward γ -Butyrolactone Primary Alcohols. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 356(17), 3585–3599. <https://doi.org/10.1002/adsc.201400510>
- Feng, Y., Wang, Y., Chu, H., Fan, Y., Cao, X., Liu, Y., Li, G., & Xue, S. (2019). Stereoselective catalysis controlled by a native leucine or variant isoleucine wing-gatekeeper in 2-haloacid dehalogenase. *FEBS Letters*, 593(3), 308–318. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13309>
- Fernández-Pérez, M., & Otero, C. (2001). Enzymatic synthesis of amide surfactants from ethanolamine. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(6), 527–536. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00293-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00293-9)
- Fernández-Pérez, M., & Otero, C. (2003). Selective enzymatic synthesis of amide surfactants from diethanolamine. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(5), 650–660. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00184-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00184-4)
- Ferrari, F., Paris, C., Maignet, B., Bidouil, C., Delaunay, S., Humeau, C., & Chevalot, I. (2014). Molecular rules for chemo- and regio-selectivity of *Candida antarctica* lipase B in peptide acylation reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 101, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.12.007>
- Ferrario, V., Ebert, C., Nitti, P., Pitacco, G., & Gardossi, L. (2015). Modelling and Predicting Enzyme Enantioselectivity: The Aid of Computational Methods for the Rational use of Lipase B from *Candida antarctica*. *Current Biotechnology*, 4(2), 87–99. <https://doi.org/10.2174/2211550104666150610205931>

- Foley, A. M., Gavin, D. P., Joniec, I., & Maguire, A. R. (2017). Impact of variation of the acyl group on the efficiency and selectivity of the lipase-mediated resolution of 2-phenylalkanols. *Tetrahedron: Asymmetry*, 28(9), 1144–1153. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.08.002>
- Gao, B., Jiang, S., Wang, L., Zhang, L., & Wei, D. (2018). Energy and conformation determine the enantioselectivity of enzyme. *Biochemical Engineering Journal*, 129, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.10.017>
- Gardossi, L., Bianchi, D., & Klibanov, A. M. (1991). Selective acylation of peptides catalyzed by lipases in organic solvents. *Journal of the American Chemical Society*, 113(16), 6328–6329. <https://doi.org/10.1021/ja00016a091>
- Gaussian 09, Revision C.01*, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2010. (2010).
- Gawley, R. E., & Aubé, J. (2012). Introduction, General Principles, and Glossary of Stereochemical Terms. In *Principles of Asymmetric Synthesis* (pp. 1–62). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-044860-2.00001-5>
- Gonzalez-Sabín, J., Gotor, V., & Rebolledo, F. (2002). *CAL-B-catalyzed resolution of some pharmacologically interesting b-substituted isopropylamines*. 6.
- Goswami, A., Guo, Z., Parker, W. L., & Patel, R. N. (2005). Enzymatic resolution of sec-butylamine. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16(9), 1715–1719. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2005.03.012>
- Gotor, V., Brieva, R., & Rebolledo, F. (1988). Enantioselective acylation of amino alcohols by porcine pancreatic lipase. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 14, 957–958. <https://doi.org/10.1039/c39880000957>
- Graber, M., Rouillard, H., Delatouche, R., Fniter, N., Belkhiria, B., Bonnet, A., Domon, L., & Thiéry, V. (2016). Improved racemate resolution of pentan-2-ol and trans -(Z)-cyclooct-

- 5-ene-1,2-diol by lipase catalysis. *Journal of Biotechnology*, 238, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.09.010>
- Gracia, L. (2020). *Clustering*. <https://github.com/luisico/clustering>
- Grillo, I. B., Urquiza-Carvalho, G. A., Bacheга, J. F. R., & Rocha, G. B. (2020). Elucidating Enzymatic Catalysis Using Fast Quantum Chemical Descriptors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(2), 578–591. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00860>
- Gu, J., Liu, J., & Yu, H. (2011). Quantitative prediction of enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B by combining docking simulations and quantitative structure–activity relationship (QSAR) analysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72(3–4), 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.011>
- Guedes, I. A., de Magalhães, C. S., & Dardenne, L. E. (2014). Receptor-ligand molecular docking. *Biophysical Reviews*, 6(1), 75–87. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0130-2>
- Guieysse, D., Salagnad, C., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., & Tran, V. (2003). Towards a novel explanation of *Pseudomonas cepacia* lipase enantioselectivity via molecular modelling of the enantiomer trajectory into the active site. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14(13), 1807–1817. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(03\)00374-4](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(03)00374-4)
- Gupta, P., & Mahajan, N. (2018). Biocatalytic approaches towards the stereoselective synthesis of vicinal amino alcohols. *New Journal of Chemistry*, 42(15), 12296–12327. <https://doi.org/10.1039/c8nj00485d>
- Hæffner, F., Norin, T., & Hult, K. (1998). Molecular Modeling of the Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Transesterification Reactions. *Biophysical Journal*, 74(3), 1251–1262. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77839-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77839-7)
- Hamnevik, E., Enugala, T. R., Maurer, D., Ntuku, S., Oliveira, A., Dobritzsch, D., & Widersten, M. (2017). Relaxation of nonproductive binding and increased rate of coenzyme release in an alcohol dehydrogenase increases turnover with a nonpreferred alcohol enantiomer. *The FEBS Journal*, 284(22), 3895–3914. <https://doi.org/10.1111/febs.14279>

- Harris, K. R., Alexander, J. J., Goscinska, T., Malhotra, R., Woolf, L. A., & Dymond, J. H. (1993). Temperature and density dependence of the selfdiffusion coefficients of liquid n-octane and toluene. *Molecular Physics*, 78(1), 235–248. <https://doi.org/10.1080/00268979300100201>
- Hedstrom, L. (2002). Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews*, 102(12), 4501–4524. <https://doi.org/10.1021/cr000033x>
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., & Goodsell, D. S. (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, 28(6), 1145–1152. <https://doi.org/10.1002/jcc.20634>
- Hug, S. (2013). Classical Molecular Dynamics in a Nutshell. In L. Monticelli & E. Salonen (Eds.), *Biomolecular Simulations: Methods and Protocols* (Vol. 924, pp. 127–152). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-017-5_6
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Jayakumar, R., Vadivel, R., & Ananthi, N. (2018). Role of Chirality in Drugs. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 5(3), 555661. <https://doi.org/10.19080/OMCIJ.2018.05.555661>
- Ji, L., Xiaoling, T., & Hongwei, Y. (2010). Prediction of the enantioselectivity of lipases and esterases by molecular docking method with modified force field parameters. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(4), 687–696. <https://doi.org/10.1002/bit.22596>
- Jindal, G., & Warshel, A. (2017). Misunderstanding the preorganization concept can lead to confusions about the origin of enzyme catalysis. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 85(12), 2157–2161. <https://doi.org/10.1002/prot.25381>
- Johansson, M. P., Kaila, V. R. I., & Sundholm, D. (2013). Ab Initio, Density Functional Theory, and Semi-Empirical Calculations. In L. Monticelli & E. Salonen (Eds.), *Biomolecular*

- Simulations: Methods and Protocols* (Vol. 924, pp. 3–27). Humana Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-017-5_1
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookes, D. H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D. W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D. R., Nielsen, J. E., Head-Gordon, T., Geng, W., ... Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science*, 27(1), 112–128.
<https://doi.org/10.1002/pro.3280>
- Kanerva, L. T., Kosonen, M., Vanttinen, E., Huuhtanen, T., & Dahlqvist, M. (1992). Studies on the chemo-and enantio-selectivity of the enzymatic monoacylations of amino alcohols. *Acta Chemica Scandinavica*, 46, 1101–1101. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.46-1101>
- Karbstein, K., & Herschlag, D. (2003). Extraordinarily slow binding of guanosine to the *Tetrahymena* group I ribozyme: Implications for RNA preorganization and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2300–2305.
<https://doi.org/10.1073/pnas.252749799>
- Kaushik, S., Marques, S. M., Khirsariya, P., Paruch, K., Libichova, L., Brezovsky, J., Prokop, Z., Chaloupkova, R., & Damborsky, J. (2018). Impact of the access tunnel engineering on catalysis is strictly ligand-specific. *The FEBS Journal*, 285(8), 1456–1476.
<https://doi.org/10.1111/febs.14418>
- Kazlauskas, R. (2000). Molecular modeling and biocatalysis: Explanations, predictions, limitations, and opportunities. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(1), 81–88.
[https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)00056-3](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)00056-3)
- Kazlauskas, R. J., Weissfloch, A. N. E., Rappaport, A. T., & Cuccia, L. A. (1991). A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*.

- The Journal of Organic Chemistry*, 56(8), 2656–2665.
<https://doi.org/10.1021/jo00008a016>
- Kidwai, M., Poddar, R., & Mothsra, P. (2009). N-acylation of ethanolamine using lipase: A chemoselective catalyst. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 5, 1–7.
<https://doi.org/10.3762/bjoc.5.10>
- Kirilina, A., Sahin, S., Mäki-Arvela, P., Wärnå, J., Salmi, T., & Murzin, D. Yu. (2010). Kinetics and modeling of (R,S)-1-phenylethanol acylation over lipase. *International Journal of Chemical Kinetics*, 42(10), 629–639. <https://doi.org/10.1002/kin.20504>
- Koes, D. R., Baumgartner, M. P., & Camacho, C. J. (2013). Lessons Learned in Empirical Scoring with smina from the CSAR 2011 Benchmarking Exercise. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(4), 1893–1904. <https://doi.org/10.1021/ci300604z>
- Kokkonen, P., Bednar, D., Pinto, G., Prokop, Z., & Damborsky, J. (2019). Engineering enzyme access tunnels. *Biotechnology Advances*, 37(6), 107386.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.008>
- Lafaquière, V., Barbe, S., Puech-Guenot, S., Guieysse, D., Cortes, J., Monsan, P., Siméon, T., André, I., & Remaud-Siméon, M. (2009). Control of Lipase Enantioselectivity by Engineering the Substrate Binding Site and Access Channel. *ChemBioChem*, 10(17), 2760–2771. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900439>
- Le Joubioux, F., Achour, O., Bridiau, N., Graber, M., & Maugard, T. (2011). Kinetic study of 2-butanol O-acylation and sec-butylamine N-acylation catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70(3–4), 108–113.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.02.012>
- Liang, H., Qin, X., Tan, C. P., Li, D., & Wang, Y. (2018). Choline-Chloride-Based Eutectic Solvent for the Efficient Production of Docosahexaenoyl and Eicosapentaenoyl Ethanolamides via an Enzymatic Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(46), 12361–12367. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04804>

- Lonsdale, R., Harvey, J. N., & Mulholland, A. J. (2012). A practical guide to modelling enzyme-catalysed reactions. *Chemical Society Reviews*, 41(8), 3025–3038. <https://doi.org/10.1039/C2CS15297E>
- Lundell, K., Lehtinen, P., & Kanerva, L. T. (2003). Chemo- and Enantioselective Acyl Transfers by Lipases and Acylase I: Preparative Applications in Hydroxymethylpiperidine Chemistry. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 345(67), 790–796. <https://doi.org/10.1002/adsc.200303018>
- Marton, Z., Léonard-Nevers, V., Syrén, P.-O., Bauer, C., Lamare, S., Hult, K., Tranc, V., & Graber, M. (2010). Mutations in the stereospecificity pocket and at the entrance of the active site of *Candida antarctica* lipase B enhancing enzyme enantioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 65(1–4), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.01.007>
- Mathpati, A. C., & Bhanage, B. M. (2018). Prediction of enantioselectivity of lipase catalyzed kinetic resolution using umbrella sampling. *Journal of Biotechnology*, 283, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.024>
- Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D., & Monsan, P. (1997). Lipase-catalysed synthesis of biosurfactants by transacylation of N-methyl-glucamine and fatty-acid methyl esters. *Tetrahedron*, 53(22), 7629–7634. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)00458-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)00458-4)
- Maurer, D., Enugala, T. R., Hamnevik, E., Bauer, P., Lüking, M., Petrović, D., Hillier, H., Kamerlin, S. C. L., Dobritzsch, D., & Widersten, M. (2018). Stereo- and Regioselectivity in Catalyzed Transformation of a 1,2-Disubstituted Vicinal Diol and the Corresponding Diketone by Wild Type and Laboratory Evolved Alcohol Dehydrogenases. *ACS Catalysis*, 8(8), 7526–7538. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b01762>
- Meng, X., Guo, L., Xu, G., Wu, J.-P., & Yang, L.-R. (2014). A new mechanism of enantioselectivity toward chiral primary alcohol by lipase from *Pseudomonas cepacia*.

- Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 109, 109–115.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.08.014>
- Metz, S., Kästner, J., Sokol, A. A., Keal, T. W., & Sherwood, P. (2014). ChemShell—A modular software package for QM / MM simulations. *WIREs Computational Molecular Science*, 4(2), 101–110. <https://doi.org/10.1002/wcms.1163>
- Min, B., Park, J., Sim, Y.-K., Jung, S., Kim, S.-H., Song, J. K., Kim, B. T., Park, S. Y., Yun, J., Park, S., & Lee, H. (2015). Hydrogen-Bonding-Driven Enantioselective Resolution against the Kazlauskas Rule To Afford γ -Amino Alcohols by *Candida rugosa* Lipase. *ChemBioChem*, 16(1), 77–82. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402563>
- Miton, C. M., Jonas, S., Fischer, G., Duarte, F., Mohamed, M. F., van Loo, B., Kintses, B., Kamerlin, S. C. L., Tokuriki, N., Hyvönen, M., & Hollfelder, F. (2018). Evolutionary repurposing of a sulfatase: A new Michaelis complex leads to efficient transition state charge offset. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(31), E7293–E7302. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607817115>
- Monticelli, L., & Tieleman, D. P. (2013). Force Fields for Classical Molecular Dynamics. In L. Monticelli & E. Salonen (Eds.), *Biomolecular Simulations: Methods and Protocols* (Vol. 924, pp. 197–213). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-017-5_8
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Nagao, A., & Kito, M. (1989). Synthesis of O-Acyl-L-Homoserine by lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66(5), 710–713. <https://doi.org/10.1007/BF02669958>
- Nechab, M., Azzi, N., Vanthuyne, N., Bertrand, M., Gastaldi, S., & Gil, G. (2007). Highly Selective Enzymatic Kinetic Resolution of Primary Amines at 80 °C: A Comparative

- Study of Carboxylic Acids and Their Ethyl Esters as Acyl Donors. *The Journal of Organic Chemistry*, 72(18), 6918–6923. <https://doi.org/10.1021/jo071069t>
- Oger, C., Marton, Z., Brinkmann, Y., Bultel-Poncé, V., Durand, T., Graber, M., & Galano, J.-M. (2010). Lipase-Catalyzed Regioselective Monoacetylation of Unsymmetrical 1,5-Primary Diols. *The Journal of Organic Chemistry*, 75(6), 1892–1897. <https://doi.org/10.1021/jo902541c>
- Öhrner, N., Orrenius, C., Mattson, A., Norin, T., & Hult, K. (1996). Kinetic resolutions of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the *Candida antarctica* lipase B. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(5), 328–331. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00031-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00031-2)
- Orrenius, C., Hbffner, F., Rotticci, D., öhrner, N., Norin, T., & Hult, K. (1998). Chiral Recognition Of Alcohol Enantiomers In Acyl Transfer Reactions Catalysed By *Candida Antarctica* Lipase B. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16(1), 1–15. <https://doi.org/10.3109/10242429809040107>
- Ottosson, J., & Hult, K. (2001). Influence of acyl chain length on the enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B and its thermodynamic components in kinetic resolution of sec-alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4–6), 1025–1028. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00088-6)
- Palocci, C., Falconi, M., Alcaro, S., Tafi, A., Puglisi, R., Ortuso, F., Botta, M., Alberghina, L., & Cernia, E. (2007). An approach to address *Candida rugosa* lipase regioselectivity in the acylation reactions of trytilated glucosides. *Journal of Biotechnology*, 128(4), 908–918. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.08.019>
- Park, A., Kim, S., Park, J., Joe, S., Min, B., Oh, J., Song, J., Park, S., Park, S., & Lee, H. (2016). Structural and Experimental Evidence for the Enantiomeric Recognition toward a Bulky sec -Alcohol by *Candida antarctica* Lipase B. *ACS Catalysis*, 6(11), 7458–7465. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b02192>

- Pietrucci, F. (2017). Strategies for the exploration of free energy landscapes: Unity in diversity and challenges ahead. *Reviews in Physics*, 2, 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.revip.2017.05.001>
- Plastina, P., Meijerink, J., Vincken, J.-P., Gruppen, H., Witkamp, R., & Gabriele, B. (2009). Selective Synthesis of Unsaturated N-Acylethanolamines by Lipase-Catalyzed N-Acylation of Ethanolamine with Unsaturated Fatty Acids. *Letters in Organic Chemistry*, 6(6), 444–447. <https://doi.org/10.2174/157017809789124885>
- Polyak, I., Reetz, M. T., & Thiel, W. (2013). Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Study on the Enantioselectivity of the Enzymatic Baeyer–Villiger Reaction of 4-Hydroxycyclohexanone. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(17), 4993–5001. <https://doi.org/10.1021/jp4018019>
- Poppe L., Nagy J., Hornyánszky G., & Boros Z. (2016a). Stereoselective and Stereospecific Reaction. In *Stereochemistry and Stereoselective Synthesis* (pp. 137–187). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Poppe L., Nagy J., Hornyánszky G., & Boros Z. (2016b). Types and Classification of Selectivities. In *Stereochemistry and Stereoselective Synthesis* (pp. 127–136). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Quan, J., Wang, N., Cai, X.-Q., Wu, Q., & Lin, X.-F. (2007). Controllable selective enzymatic synthesis of N-acyl and O-acylpropranolol vinyl esters and preparation of polymeric prodrug of propranolol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.06.008>
- Quintana, P. G., García Liñares, G., Chanquia, S. N., Gorojod, R. M., Kotler, M. L., & Baldessari, A. (2016). Improved Enzymatic Procedure for the Synthesis of Anandamide and N-Fatty Acylalkanolamine Analogues: A Combination Strategy to Antitumor Activity: Biocatalytic Generation of Endocannabinoids. *European Journal of Organic Chemistry*, 2016(3), 518–528. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201501263>

- Quiroga, R., & Villarreal, M. A. (2016). Vinardo: A Scoring Function Based on Autodock Vina Improves Scoring, Docking, and Virtual Screening. *PLoS One*, *11*(5), e0155183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155183>
- Rajin, M., Zulkifli, A., Abang, S., Anissuzzaman, S. M., & Kamaruddin, A. H. (2020). Effect of Reaction Parameters on the Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of (RS)-Metoprolol. *ASEAN Journal of Chemical Engineering*, *20*(1), 20–30. <https://doi.org/10.22146/ajche.51857>
- Ranaghan, K. E., & Mulholland, A. J. (2017). Chapter 11 QM/MM Methods for Simulating Enzyme Reactions. In *Simulating Enzyme Reactivity: Computational Methods in Enzyme Catalysis* (pp. 375–403). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781782626831-00375>
- Rincón, D. A., Doerr, M., & Daza, M. C. (2021). Hydrogen Bonds and $n \rightarrow \pi^*$ Interactions in the Acetylation of Propranolol Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B: A QTAIM Study. *ACS Omega*, *6*(32), 20992–21004. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02559>
- Rotticci, D., Hæffner, F., Orrenius, C., Norin, T., & Hult, K. (1998). Molecular recognition of sec-alcohol enantiomers by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *5*(1–4), 267–272. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(98\)00047-2](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(98)00047-2)
- Sadiq, S. K., & Coveney, P. V. (2015). Computing the Role of Near Attack Conformations in an Enzyme-Catalyzed Nucleophilic Bimolecular Reaction. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *11*(1), 316–324. <https://doi.org/10.1021/ct5008845>
- Saladino, G., Estarellas, C., & Gervasio, F. L. (2017). Recent Progress in Free Energy Methods. In S. Chackalamannil, D. Rotella, & S. E. Ward (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry III* (pp. 34–50). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12356-X>
- Santaniello, E., Casati, S., Ciuffreda, P., Meroni, G., Pedretti, A., & Vistoli, G. (2009). A molecular modelling approach to rationalize the stereochemical outcome of the

- Burkholderia cepacia lipase-catalyzed transesterification of aromatic primary alcohols with vinyl esters with different chain lengths in chloroform. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20(16), 1833–1836. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2009.07.024>
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., & Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*, 34(1), 5–28. <https://doi.org/10.1002/btpr.2581>
- Schulz, T., Pleiss, J., & Schmid, R. D. (2000). Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: A quantitative model. *Protein Science*, 9(6), 1053–1062. <https://doi.org/10.1110/ps.9.6.1053>
- Schulz, T., Schmid, R. D., & Pleiss, J. (2001). Structural basis of stereoselectivity in *Candida rugosa* lipase-catalyzed hydrolysis of secondary alcohols. *Journal of Molecular Modeling*, 7(7), 265–270. <https://doi.org/10.1007/s008940100041>
- Senn, H. M., & Thiel, W. (2009). QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(7), 1198–1229. <https://doi.org/10.1002/anie.200802019>
- Shaik, S., Cohen, S., Wang, Y., Chen, H., Kumar, D., & Thiel, W. (2010). P450 Enzymes: Their Structure, Reactivity, and Selectivity—Modeled by QM/MM Calculations. *Chemical Reviews*, 110(2), 949–1017. <https://doi.org/10.1021/cr900121s>
- Sheng, X., Kazemi, M., Planas, F., & Himo, F. (2020). Modeling Enzymatic Enantioselectivity using Quantum Chemical Methodology. *ACS Catalysis*, 10(11), 6430–6449. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c00983>
- Silber, B., Holford, N. H. G., & Riegelman, S. (1982). Stereoselective disposition and glucuronidation of propranolol in humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(6), 699–704. <https://doi.org/10.1002/jps.2600710623>
- Sousa, S. F., Ribeiro, A. J. M., Neves, R. P. P., Brás, N. F., Fernandes, P. A., Cerqueira, N. M. F. S. A., & Ramos, M. J. (2017). Application of quantum mechanics/molecular mechanics methods in the study of enzymatic reaction mechanisms: Application of QM/MM

- methods. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 7(2), e1281. <https://doi.org/10.1002/wcms.1281>
- Syrén, P.-O., Le Joubioux, F., Ben Henda, Y., Maugard, T., Hult, K., & Graber, M. (2013). Proton Shuttle Mechanism in the Transition State of Lipase-Catalyzed N-Acylation of Amino Alcohols. *ChemCatChem*, 5(7), 1842–1853. <https://doi.org/10.1002/cctc.201200751>
- Szaleniec, M., Dudzik, A., Kozik, B., Borowski, T., Heider, J., & Witko, M. (2014). Mechanistic basis for the enantioselectivity of the anaerobic hydroxylation of alkylaromatic compounds by ethylbenzene dehydrogenase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 139, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.05.006>
- Tang, X., Zhang, R., Li, Y., Zhang, Q., & Wang, W. (2017). Enantioselectivity of haloalkane dehalogenase LinB on the degradation of 1,2-dichloropropane: A QM/MM study. *Bioorganic Chemistry*, 73, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.04.015>
- Tawaki, S., & Klibanov, A. M. (1993). Chemoselectivity of Enzymes in Anhydrous Media is Strongly Solvent Dependent. *Biocatalysis*, 8(1), 3–19. <https://doi.org/10.3109/10242429309030952>
- Tawfik, D. S., & Khersonsky, O. (2010). Enzyme Promiscuity: A Mechanistic and Evolutionary Perspective. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 471–505. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-030409-143718>
- ten Brink, T., & Exner, T. E. (2010). PKa based protonation states and microspecies for protein–ligand docking. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 24(11), 935–942. <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9385-x>
- Thiel, W. (2007). MNDO99 program, version 6.1. 2007; Max-Planck-Institut für Kohlenforschung: Mülheim, Germany, 2007. *Google Scholar There Is No Corresponding Record for This Reference.*

- Torre, O., Gotor-Fernández, V., & Gotor, V. (2006). Lipase-catalyzed resolution of chiral 1,3-amino alcohols: Application in the asymmetric synthesis of (S)-dapoxetine. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17(5), 860–866. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2006.02.022>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Tyzack, J. D., Hunt, P. A., & Segall, M. D. (2016). Predicting Regioselectivity and Lability of Cytochrome P450 Metabolism Using Quantum Mechanical Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(11), 2180–2193. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00233>
- Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S., & Jones, T. A. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, 2(4), 293–308. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00031-9)
- Valderrama, D. I. B., Daza, M. C., & Doerr, M. (2021). Finite-temperature effect in the O-acylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 107, 107951. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2021.107951>
- von der Esch, B., Dietschreit, J. C. B., Peters, L. D. M., & Ochsenfeld, C. (2019). Finding Reactive Configurations: A Machine Learning Approach for Estimating Energy Barriers Applied to Sirtuin 5. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 15(12), 6660–6667. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00876>
- Voss, M., Das, D., Genz, M., Kumar, A., Kulkarni, N., Kustos, J., Kumar, P., Bornscheuer, U. T., & Höhne, M. (2018). In Silico Based Engineering Approach to Improve Transaminases for the Conversion of Bulky Substrates. *ACS Catalysis*, 8(12), 11524–11533. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b03900>

- Warshel, A., Sharma, P. K., Kato, M., Xiang, Y., Liu, H., & Olsson, M. H. M. (2006). Electrostatic Basis for Enzyme Catalysis. *Chemical Reviews*, *106*(8), 3210–3235. <https://doi.org/10.1021/cr0503106>
- Wei, W.-J., Qian, H.-X., Wang, W.-J., & Liao, R.-Z. (2018). Computational Understanding of the Selectivities in Metalloenzymes. *Frontiers in Chemistry*, *6*, 638. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00638>
- Whitten, K. M., Makriyannis, A., & Vadivel, S. K. (2012). Enzymatic synthesis of N-acylethanolamines: Direct method for the aminolysis of esters. *Tetrahedron Letters*, *53*(43), 5753–5755. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.08.042>
- Xu, G., Meng, X., Xu, L.-J., Guo, L., Wu, J.-P., & Yang, L.-R. (2015). Modification and simulation of *Rhizomucor miehei* lipase: The influence of surficial electrostatic interaction on enantioselectivity. *Biotechnology Letters*, *37*(4), 871–880. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1747-3>
- Xu, T., Zhang, L., Su, E., Cui, D., Wang, X., & Wei, D. (2010). Disparity in productive binding mode of the slow-reacting enantiomer determines the novel catalytic behavior of *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *62*(3–4), 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.011>
- Yang, B., Wang, H., Song, W., Chen, X., Liu, J., Luo, Q., & Liu, L. (2017). Engineering of the Conformational Dynamics of Lipase To Increase Enantioselectivity. *ACS Catalysis*, *7*(11), 7593–7599. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b02404>

Apéndices

Apéndice A. Muestreo conformacional del complejo enzima/sustrato

A.1 Dinámica molecular

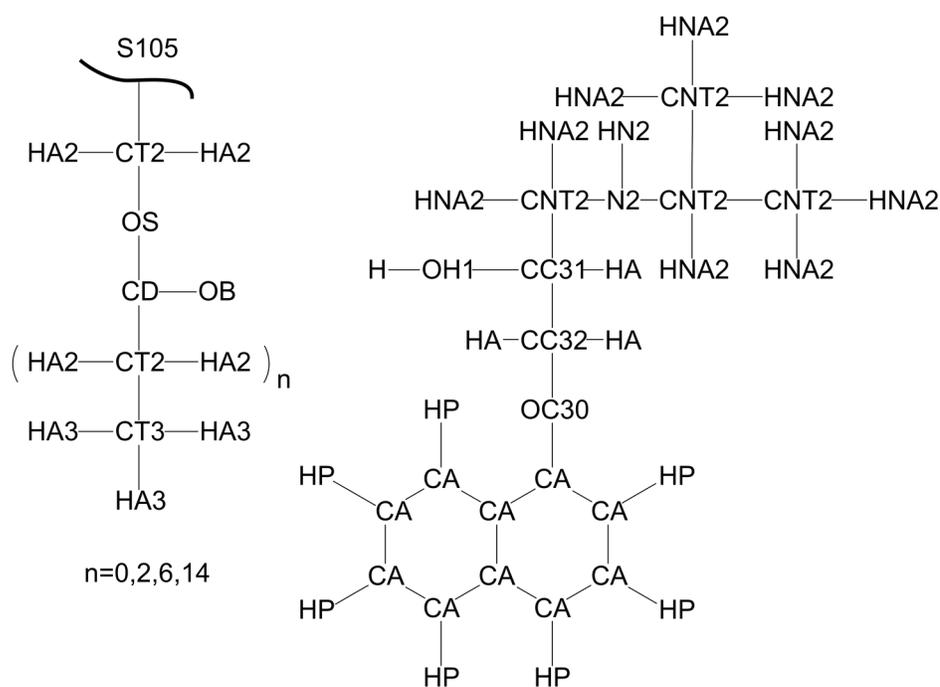
Se utilizó mecánica molecular (MM) para describir la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB), el tolueno y el agua. Al incluir propranolol, se utilizó una metodología mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM) describiendo el propranolol mediante mecánica cuántica (QM). En las simulaciones de dinámica molecular se utilizó el algoritmo de integración de salto de rana con un paso de integración de 0.001 fs. En las simulaciones a temperatura constante, se utilizó el algoritmo termostato de Andersen con una frecuencia de colisión de 1000 ps⁻¹.

Para describir la región QM, se utilizó el método SCC-DFTB (self-consistent-charge density-functional-tight-binding method) (Cui et al., 2001) empleando los parámetros DFTB mio y miomod:nh (Bondar et al., 2004; Elstner et al., 1998) con una tolerancia SCF de 10⁻⁸. Para describir región MM, se utilizó el campo de fuerza CHARMM22 y CHARMM36 (la estructura de los archivos de parámetros difieren pero los parámetros son iguales). Para etanoilo-CalB, los parámetros del campo de fuerza del grupo etanoilo se tomaron del acetato de metilo. La carga del átomo de carbono del metilo se cambió de 0.14 a 0.05 e para mantener la neutralidad al remover el átomo de hidrógeno. Para las demás enzimas acilo-CalB, se introdujo el correspondiente número de grupos metileno tomando los parámetros de una cadena hidrocarbonada lipídica. En

la figura 25 se muestran los tipos de átomos utilizados. Para el agua se utilizó el modelo TIP3P. Para tolueno se utilizaron los parámetros del etilbenceno.

Figura 25

Topología para el propranolol y residuo de serina acilado. Los tipos de átomos corresponden a la nomenclatura utilizada en el campo de fuerza CHARMM36. Para el campo de fuerza CHARMM22 los tipos de átomo HA2 y HA3 del residuo de serina acilado se reemplazan por HA



En la metodología QM/MM, las interacciones de van der Waals se calcularon a nivel MM, es decir, se necesitan definir parámetros de campo fuerza para la región QM. Para esto, utilizando parámetros para especies éter, amina, alcohol y aromáticas, se escogieron los parámetros para el propranolol utilizando los ambientes químicos más similares. Los tipos de átomos se muestran en la figura 25.

Las interacciones no covalentes se calcularon utilizando una esquema basado en átomos. La lista de interacciones no covalentes se generó utilizando un corte de 14 Å y se actualizó utilizando el método heurístico. Las interacciones no covalentes gradualmente se redujeron utilizando una función de cambio sobre la fuerza para distancias interatómicas entre 9-13 Å.

Las distancias de enlace que involucran átomos de hidrógeno se fijaron utilizando el algoritmo SHAKE con una tolerancia de 10^{-8} Å. Se definió una región activa formada por los residuos aminoacídicos a una distancia de 30 Å del carbono alfa del residuo de serina acilada (C α S105). Las posiciones de los átomos de la enzima por fuera de la región activa se fijaron. Nótese que la distancia desde C α S105 al átomo de la enzima más alejado es ca. 32 Å. Para evitar el uso de condiciones periódicas, los átomos pesados (átomos diferentes al hidrógeno) del tolueno y del agua se restringieron por medio de un potencial armónico de simetría esférica impuesto a 40 Å del C α S105 utilizando una constante de fuerza de $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$.

A.2 Estructuras iniciales

Se construyeron ésteres de metilo de cada grupo acilo y se optimizaron las estructuras en el vacío; las estructuras de propranolol también fueron optimizadas. Se utilizó el programa Gaussian (*Gaussian 09, Revision C.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2010.*, 2010) para minimizar la energía utilizando teoría de funcional de densidad (B3LYP/6-31G*).

Se descargó la estructura cristalina de CalB con código 1TCA de Protein Data Bank (Burley et al., 2019). Se removieron unas moléculas de N-acetil-glucosamina que se encuentran

unidas no covalentemente a la proteína, estas moléculas se encuentran lejos del sitio activo. Utilizando el programa PDB2PQR (Jurrus et al., 2018), los átomos de hidrógenos faltantes en la estructura se adicionaron a CalB y al agua cristalográfica. Nótese que las moléculas de agua no se utilizan en las simulaciones de acoplamiento molecular, solo en las simulaciones de dinámica molecular. Los estados de protonación de los residuos se asignaron a pH 7 utilizando PDB2PQR. A este pH, el residuo N-terminal (Lue 1) así como todos los residuos lisina y arginina se determinaron estar cargados positivamente. El residuo C-terminal (Pro 317) y cada residuo de ácido aspártico se determinó estar cargado negativamente con excepción del residuo Asp 134. Las posiciones de los átomos de nitrógeno y oxígeno de la cadena lateral de Gln23, Asn 264 y Asn 196 se eligieron según la sugerencia de PDB2PQR.

Las estructuras de acilo-CalB se construyeron reemplazando el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de Ser 105 por el grupo acilo del ester de metilo. Múltiples conformaciones de la cadena hidrocarbonada del grupo acilo fueron exploradas usando el método cadena lateral flexible (Bianco et al., 2016), implementado en el programa AutoDock (Morris et al., 2009). Se utilizó el algoritmo genético Lamarckiano con una tasa de mutación de 0.1 para hexadecanoilo-CalB y 0.02 para las otras enzimas. Las estructuras fueron agrupadas estructuralmente y de los grupos de mayor población se seleccionaron algunas conformaciones para iniciar simulaciones de dinámica molecular. El número de estructuras seleccionadas fue 1 para etanoilo- y butanoilo-CalB, 2 para octanoilo-CalB y 5 para hexadecanoilo-CalB. Para octanoilo-CalB, el agrupamiento de mayor población tenía el grupo acilo posicionado en uno de los dos bolsillos del sitio activo y en las simulaciones de dinámica molecular el grupo acilo no exploró el otro bolsillo. Por esta razón, se seleccionó una estructura desde un agrupamiento de estructuras con el grupo acilo

situado en el bolsillo no explorado sin importar la población del grupo de estructuras con el fin de aumentar la diversidad estructural de las estructuras iniciales.

Una esfera de tolueno se extrajo de una simulación de tolueno bajo condiciones periódicas. Para esto, 528 moléculas de tolueno se colocaron en una celda de simulación cúbica con una longitud inicial de 45.4 Å. La energía del sistema se minimizó utilizando 20000 pasos del algoritmo SD (steepest descent) y 40000 pasos del algoritmo ABNR (adapted-basis Newton-Raphson). Luego, se realizó una simulación de dinámica molecular NVT de 1 ns, seguido por 2 ns de NPT a 300 K y 1 atm. Se utilizó una constante de acoplamiento de temperatura y presión de 5 ps. Todas las distancias de enlaces con átomos de hidrógeno se restringieron utilizando el algoritmo SHAKE. El método Ewald se aplicó para calcular las interacciones electrostáticas. Las interacciones de van der Waals se calcularon con una corte de 12 Å, utilizando una función de cambio entre 10 y 12 Å. La densidad promedio en la simulación NPT fue 0.84 g/cm³, la cual es similar al valor experimental de 0.86 g/cm³ (Harris et al., 1993). A partir de los últimos 1.9 ns de la trayectoria simulación NPT se extrajo la esfera de tolueno.

La solvatación de la enzima en el tolueno se realizó primero optimizando la posición de los átomos de hidrógeno de las moléculas de agua y acilo-CalB (incluyendo los átomos por fuera de la región activa). Para esto se aplicaron 500 pasos de minimización de energía por medio de SD. Luego, las moléculas de agua y acilo-CalB fueron incrustadas en la esfera de tolueno. La adición de moléculas de tolueno al acilo-CalB y agua se realizó de forma iterativa relajando el sistema en cada paso. La relajación consistió en una minimización de energía seguido de una simulación de dinámica molecular. El tamaño de paso inicial en cada minimización fue 0.01. El procedimiento fue el siguiente:

1. La esfera de moléculas de tolueno se superpuso con las moléculas de agua y acilo-CalB, y se centró en C α S105. Se eliminaron todas las moléculas de tolueno cuyos átomos pesados estuviesen a menos de 2.8 Å de cualquier átomo pesado de una molécula de agua o de acilo-CalB.
2. Se minimizó la energía utilizando 1000 pasos de SD, seguido de 1000 pasos de ABNR. Solo se optimizó la posición de los átomos de las moléculas de tolueno y agua. Se repitió la minimización incluyendo la región activa, se restringió la posición de cada átomo de la región activa por medio de un potencial armónico con constante de fuerza de 30 Kcal mol⁻¹ Å⁻².
3. Se realizó una simulación de dinámica molecular a temperatura constante (300 K) por 15 ns.
4. Se repitieron los pasos 1-3 un total de 11 veces. Entre los pasos 1 y 2, se eliminaron las moléculas de tolueno y agua que tuviesen átomos pesados por fuera de una esfera de 40 Å alrededor de C α S105. La constante de fuerza se ajustó a 50 Kcal mol⁻¹ Å⁻² y se redujo secuencialmente en 5 Kcal mol⁻¹ Å⁻² en cada iteración. En las iteraciones 10 y 11, se utilizó una constante de fuerza de 3 y 1 Kcal mol⁻¹ Å⁻², respectivamente; además, se incrementó el tiempo de la simulación a 30 ps.

A.3 Muestreo de conformaciones acilo-CalB por medio de dinámica molecular

La versión 41b2 del programa CHARMM se utilizó para realizar las simulaciones dinámica molecular. Primero, se ejecutó una dinámica a temperatura constante (300 K) por 3 ns.

Luego, 40 ns a energía constante generando una trayectoria de coordenadas con espaciamiento de 2 ps.

A.4 Selección de conformaciones acilo-CalB para construir el complejo propranolol/acilo-CalB

Las trayectorias de acilo-CalB fueron analizadas utilizando el programa VMD (Humphrey et al., 1996). Las estructuras de las enzimas se alinearon utilizando los átomos pesados con excepción de los átomos del grupo acilo. Luego, un análisis de agrupamiento se realizó por medio del complemento Clustering (Gracia, 2020). Un total de 13 estructuras se eligieron para cada acilo-CalB, las estructuras se seleccionaron de los agrupamientos de mayor población. Las poblaciones relativas de los agrupamientos se reflejaron en el número de estructuras extraídas de cada agrupamiento. A continuación se describe el procedimiento de agrupamiento, en todos los casos se utilizó un límite máximo de agrupamiento igual a 20.

Para etanoilo- y butanoilo-CalB se utilizó un corte de RMSD (desviación cuadrática media) igual a 1 Å. El RMSD se calculó utilizando los átomos de carbono del grupo acilo. Para etanoilo-CalB, se seleccionaron estructuras del único agrupamiento que el algoritmo encontró. Para butanoilo-CalB, se seleccionaron estructuras de los 3 agrupamientos con la mayor población.

Para el octanoilo-CalB, las trayectorias de cada una de las dos simulaciones de dinámica molecular se agruparon de forma separada utilizando los últimos 6 átomos de carbono del grupo acilo para calcular el RMSD. Utilizando un corte de 0.9 Å para la trayectoria atrapada en el bolsillo grande y 0.7 Å para la trayectoria atrapada en el bolsillo mediano, se recolectaron

estructuras de los 3 y 2 agrupamientos de mayor población, respectivamente. El bolsillo grande se define con los residuos 134, 138, 140, 141, 144, 154, 157, 188 y 189 y el bolsillo mediano con los residuos 39, 41, 42, 104, 225, 277, 278, 281, 282 y 285.

Las cinco trayectorias de las simulaciones de dinámica molecular de hexadecanoilo-CalB se unieron y se realizaron tres procesos secuenciales de agrupamiento utilizando las posiciones de los átomos pesados del residuo de serina acilado. En los dos primeros agrupamientos no se incluyeron los últimos 8 y 6 átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada, respectivamente.

1. En el primer agrupamiento se utilizó un corte de RMSD igual a 1.5 Å.
2. El segundo agrupamiento se realizó utilizando el agrupamiento con mayor población obtenido en el paso 1. En este caso, se utilizó un corte de RMSD igual a 0.8 Å.
3. De forma separada, se agruparon las estructuras de los 4 agrupamientos con mayor población obtenidos en el paso 2. Se utilizó un corte de RMSD igual a 1.5 Å. Las estructuras seleccionadas se escogieron del agrupamiento 1 a partir de los 4 agrupamientos de mayor población, del agrupamiento 2 a partir de los 2 agrupamientos de mayor población, y de los agrupamientos 3 y 4 a partir del agrupamiento de mayor población en cada caso.

A.5 Muestreo y selección de conformaciones de propranolol/acilo-CalB por medio de acoplamiento molecular para construir las estructuras iniciales para iniciar el muestreo por dinámica molecular

Utilizando el programa Smina (Koes et al., 2013), los enantiómeros de propranolol se acoplaron de forma individual a las 13 conformaciones de acilo-CalB. Se utilizó la función de

puntuación dkoes con una exhaustividad de 3000. No se limitó el número de conformaciones ni la energía. Se muestreó una región cúbica de 20 Å de lado centrada en CaS105. Se utilizó el programa AutoDock para generar los archivos de entrada de la estructura. Adicionalmente, todas las conformaciones fueron puntuadas utilizando las funciones Vina (Trott & Olson, 2010), AutoDock (Huey et al., 2007), Vinardo (Quiroga & Villarreal, 2016) y NNScore 2.0 (Durrant & McCammon, 2011). Luego, se seleccionaron las conformaciones con una energía de unión negativa en 4 de las 5 puntuaciones. Los átomos de hidrógeno (eliminados en el proceso de acoplamiento molecular), en el caso del propranolol, se adicionaron utilizando el programa SPORES (ten Brink & Exner, 2010). En el caso de la enzima, se utilizaron las posiciones iniciales, pues la enzima permanece rígida. Las posiciones de las moléculas de agua y tolueno se recuperaron de la estructura inicial, las moléculas con átomos pesados a una distancia menor de 2.8 Å al propranolol se eliminaron.

Las conformaciones se ordenaron respecto a la distancia entre el grupo nucleofílico del propranolol y el carbonilo del grupo acilo. Se eligieron 15 conformaciones con el grupo hidroxilo más cerca al grupo acilo que el grupo amino y 15 conformaciones para el caso contrario. Se impuso que cada par de conformaciones tuviese una RMSD mayor de 2.5 Å. El RMSD se calculó utilizando los átomos pesados del propranolol y de la cadena hidrocarbonada del grupo acilo. Las conformaciones previamente se alinearon respecto a los átomos pesados de la triada catalítica sin considerar la cadena hidrocarbonada del grupo acilo.

Para cada conformación, se realizó una optimización de la posición de los átomos del propranolol y cercanos a este en menos de 10 Å. Para esto, se ejecutó una minimización de energía de 45 y 5 pasos de SD y ABNR, respectivamente. Al utilizar SD, se restringieron las

distancias de enlace que involucran átomos de hidrógeno con el algoritmo SHAKE. En cada caso se utilizó un tamaño de paso inicial de 0.01.

A.6 Muestreo de conformaciones propranolol/acilo-CalB por medio de dinámica molecular

Utilizando la versión 43b1 del programa CHARMM se ejecutó una simulación dinámica molecular de calentamiento de 200 fs utilizando una temperatura inicial y final igual a 200 y 303 K, respectivamente. La frecuencia de calentamiento se ajustó a 50 fs y el incremento de temperatura fue de 80 K. En cada incremento, las velocidades de los átomos se asignaron a partir de una distribución Gaussiana. Luego, se realizó una simulación de dinámica molecular a energía constante de 200 ps, los últimos 160 ps se guardaron para el análisis. Este protocolo se ejecutó utilizando 20 distribuciones de velocidades diferentes. En total se muestreó 96 ns por complejo enzima/sustrato. Las conformaciones se guardaron cada 0.2 ps. El número total de conformaciones fue de 480000 por complejo.

Apéndice B. Muestreo conformacional del intermediario tetraédrico

B.1 Selección de conformaciones de propranolol/acilo-CalB

A partir del conjunto de conformaciones del complejo enzima/sustrato, obtenido como se describe en 4.2.1 Muestreo conformacional, se extrajeron aquellas conformaciones con: (1) una distancia $r_{OC} \leq 4.0 \text{ \AA}$ (distancia entre el oxígeno del hidroxilo del propranolol y el carbono del carbonilo del grupo acilo) y (2) con al menos 2 enlaces de hidrógeno en el hueco oxianiónico. Un enlace de hidrógeno se caracterizó mediante una distancia de enlace entre los átomos pesados $\leq 3.0 \text{ \AA}$ y un ángulo $\geq 160^\circ$ entre los átomos involucrados.

Se seleccionaron las conformaciones con menor r_{OC} de tal forma que se construyó un conjunto de máximo 30 conformaciones, en donde cada par de conformaciones tuviese una RMSD (desviación cuadrática media) mayor de 2.5 \AA . El RMSD se calculó utilizando los átomos pesados del propranolol y de la cadena hidrocarbonada del grupo acilo. Las conformaciones previamente se alinearon respecto a los átomos pesados de la triada catalítica sin considerar la cadena hidrocarbonada del grupo acilo.

B.2 Construcción de estructuras iniciales del intermediario tetraédrico para iniciar el muestreo por medio de simulaciones de dinámica molecular

Utilizando la versión 43b1 del programa CHARMM (Brooks et al., 2009), se adiciona un hidrógeno al residuo de histidina utilizando hbuild. Se impone un potencial semiarmónico a la distancia entre el oxígeno del hidroxilo del propranolol y el carbono carbonílico del grupo acilo

que comienza en 1.4 Å. La constante de fuerza se incrementa gradualmente de 50 hasta 1500 Kcal/mol, triplicandola cada vez. Para cada valor de constante de fuerza se realiza un minimización de energía mediante el algoritmo SD (steepest descent), se aplican 500 pasos utilizando SHAKE para restringir la distancia de enlace en todos los enlaces. Luego se relaja la estructura así:

1. Se minimiza la energía permitiendo el movimiento de los átomos de todos los residuos cuyos átomos pesados estuviesen a 6.0 Å del propranolol. Se utilizan 5000 pasos de SD utilizando SHAKE en el enlace simple entre el oxígeno y carbono del grupo éster del grupo acilo.
2. Se repite el paso anterior utilizando un valor de 10.0 en vez de 6.0 Å.
3. Se repite el paso anterior utilizando un valor de 10.0 en vez de 6.0 Å. Se utiliza el algoritmo de minimización ABNR (adapted-basis Newton-Raphson) en vez de SD y se ejecutan 10000 pasos. Además, se adiciona un potencial semiarmónico entre los átomos del enlace simple entre el oxígeno y carbono del grupo éster del grupo acilo a 1.5 Å con una constante de fuerza de 1000 Kcal/mol.
4. Se remueve el átomo de hidrógeno adicionado a la histidina.
5. Se repite el paso 3 utilizando SD en vez de ABNR.
6. Se repite el paso 3.
7. Se repite el paso 3 utilizando SD en vez de ABNR. Además, se ejecutan 5000 pasos y se remueven los potenciales semiarmónicos.
8. Se repite el paso anterior utilizando ABNR.

B.3 Muestreo de conformaciones del intermediario tetraédrico por medio de simulaciones de dinámica molecular

Los parámetros utilizados en la descripción de las interacciones entre los átomos y los relacionados con los algoritmos utilizados en las simulaciones de dinámica molecular son iguales a los utilizados en Apéndice A. Muestreo conformacional del complejo enzima/sustrato. Existe una diferencia en cuanto a la partición de la región QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanis), aquí se utiliza la región mostrada en la figura 15, en la cual la región QM incluye el propranolol y el grupo acilo. La frontera entre la región QM/MM involucra un enlace covalente, esta frontera se describe mediante el método de átomo de unión (link atom) utilizando un átomo de hidrógeno.

A partir de las estructuras obtenidas anteriormente se seleccionan 10 estructuras aleatoriamente para cada sistema. Utilizando el programa CHARMM se ejecutó una simulación dinámica molecular de calentamiento de 8 fs utilizando una temperatura inicial y final igual a 200 y 303 K, respectivamente. La frecuencia de calentamiento se ajustó a 50 fs y el incremento de temperatura fue de 80 K. En cada incremento, las velocidades de los átomos se asignaron a partir de una distribución Gaussiana. Luego, se realizó una simulación de dinámica molecular a energía constante de 440 ps, los últimos 400 ps se guardaron para el análisis. Este protocolo se ejecutó utilizando 20 distribuciones de velocidades diferentes. En total se muestreó 80 ns por intermediario tetraédrico. Las conformaciones se guardaron cada 0.2 ps. El número total de conformaciones fue de 400000 por intermediario tetraédrico.

Apéndice C. Mapeo adiabático

Se utiliza una metodología Quantum Mechanics/Molecular mechanics (QM/MM) utilizando el método SCC-DFTB (self-consistent-charge density-functional-tight-binding method) (Cui et al., 2001) y el campo de fuerza CHARMM (Brooks et al., 2009). La región QM incluye la triada catalítica y el propranolol. Los enlaces en la frontera QM/MM se describen por medio del método átomo de unión (link atom).

C1. Construcción de las conformaciones del intermediario tetraédrico

Se construyen conformaciones del intermediario tetraédrico a partir del mismo conjunto de conformaciones del complejo enzima/sustrato (ES) utilizado en el Apéndice B. Muestreo conformacional del intermediario tetraédrico. Respecto al protocolo utilizado en dicho apéndice, la construcción del intermediario se realiza de forma que la geometría inicial del complejo ES se deforma de forma más gradual. Además, se define una región activa conformada por todos los átomos de todos los residuos cuyos átomos pesados estuviesen a menos de 6.0 Å del propranolol. Los átomos fuera de esta región se fijan en el espacio. Cada vez que se modifica la geometría del sistema se realiza:

1. 2000 pasos de una minimización de energía por medio del método SD (steepest descent) utilizando un paso inicial de 10^{-4} .
2. Una minimización de energía por medio del método ABNR (adapted-basis Newton-Raphson) hasta lograr convergencia utilizando un paso inicial de 10^{-2} .

3. Cuatro minimizaciones SD secuenciales de 500 pasos, entre cada optimización se actualizan los átomos que componen la región activa. Se utiliza un paso inicial igual a 10^{-3} .
4. Se repite el paso 2.

La tolerancia de convergencia es 10^{-5} para el gradiente y el cambio de energía. Cada minimización se realiza primero para solo los átomos del propranolol y subsecuentemente para los átomos dentro de la región activa. En cada minimización los potenciales armónicos adicionales (vide infra) se introducen primero con una constante de fuerza igual a $500 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ y luego se repite la minimización incrementando secuencialmente la constante a 1500, 4500, 13500 y $40500 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$.

Teniendo en cuenta las distancias definidas en la figura 26, la modificación de la geometría desde el ES hasta el intermediario tetraédrico se realiza así:

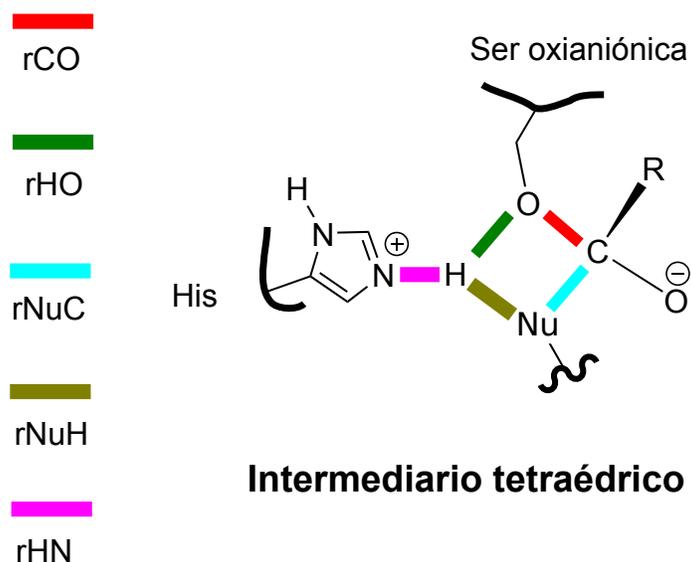
1. Se define un potencial semiarmónico para distancias r_{HN} y r_{NuC} mayores a la actual.
2. Se disminuye r_{HN} trasladando el átomo de hidrógeno en 10^{-2} \AA .
3. Se disminuye r_{NuC} trasladando Nu en 10^{-2} \AA .
4. Se minimiza la energía.
5. Se define un potencial semiarmónico a una distancia menor en $5 \times 10^{-2} \text{ \AA}$ respecto a la actual para r_{CO} , r_{NuC} y r_{HN} en caso que sean mayores a 1.80 \AA para las dos primeras y 1.40 \AA para la última.
6. Se trasladan los átomos O, Nu y H de tal forma que las distancias r_{CO} , r_{NuC} y r_{HN} sean iguales a las distancias donde se define el potencial menos 10^{-2} \AA .
7. Se repite el paso 6 y 7 hasta que r_{CO} y r_{NuC} sean menor o igual a 1.80 \AA y hasta que r_{HN} sean menor o igual a 1.40 \AA .

8. Si se logra completar el paso 7 se procede al paso 14, de lo contrario se continúa con el paso 9.
9. Se repite el paso 5, 6 y 7 cambiando las distancias objetivo 1.80 y 1.40 Å por 1.60 y 1.20 Å, respectivamente.
10. Si se logra completar el paso 7 con las nuevas distancias objetivo se procede al paso 14, de lo contrario se continúa con el paso 11.
11. Se repite el paso 5. Pero esta vez el potencial semiarmónico se impone a una distancia mayor en 5×10^{-2} Å respecto a la actual.
12. Se trasladan los átomos O, Nu y H tal forma que las distancias r_{CO} , r_{NuC} y r_{HN} sean iguales a las distancias donde se define el potencial menos 10^{-2} Å.
13. Se repite 11 y 12 hasta que las distancias sean menores a las del potencial o iguales a las distancias objetivo.
14. Se minimiza la energía sin ningún potencial armónico presente.

Figura 26

Distancias monitoreadas en la construcción del intermediario tetraédrico y en el mapeo

adiabático



A partir de las estructuras resultantes se construye un conjunto de conformaciones del intermediario tal que el RMSD (root mean square deviation) entre cada par de estructuras sea mayor a 2.5 Å. El RMSD se calculó utilizando los átomos pesados del propranolol y de la cadena hidrocarbonada del grupo acilo. Las conformaciones previamente se alinearon respecto a los átomos pesados de la triada catalítica sin considerar la cadena hidrocarbonada del grupo acilo.

C2. Mapeo adiabático del camino de reacción de descomposición del intermediario tetraédrico hacia complejo enzima/sustrato y enzima/producto

Para realizar el mapeo adiabático la región activa se cambia para incluir todos los residuos con átomos alrededor de 7 Å de la triada catalítica y del propranolol, además de estos últimos. El mapeo adiabático se realiza empleando el programa ChemShell (Metz et al., 2014) y el programa MNDO99 (Thiel, 2007). Las minimizaciones de energía se realizan utilizando el algoritmo HDLCopt (hybrid delocalised internal coordinates optimizer) (Billeter et al., 2000). La coordenada de reacción para la ruta entre el intermediario tetraédrico y ES es $r_{\text{NuH}} - r_{\text{NuC}}$ y la coordenada de reacción para la ruta entre el intermediario tetraédrico y EP es $r_{\text{CO}} - r_{\text{HO}}$ (ver figura 26). Cada valor de coordenada de reacción explorado se fija por medio de un potencial armónico con una constante de fuerza de $3.0 E_h a_0^{-2}$ ($6722.6 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$). El mapeo se realiza así:

1. Se minimiza la estructura del intermediario tetraédrico. Se procede con el mapeo solo si las distancias r_{NuC} y r_{CO} son menores o iguales a 1.80 Å.
2. Se actualizan los átomos que componen la región activa.
3. Se impone un potencial a un valor de coordenada de reacción diferente al valor actual en 0.1 Å, mayor para la descomposición hacia el EP y menor para la descomposición hacia el ES.
4. Se realiza una minimización.
5. Los pasos 2-4 se repiten hasta que r_{NuC} (ruta hacia ES) o r_{CO} (ruta hacia EP) sea mayor a 6.0 Å. Esto se realiza para la descomposición del intermediario hacia ES y también hacia EP.
6. Se define una región activa formada por todas las regiones activas utilizadas a lo largo del mapeo adiabático.

7. Se minimiza cada punto del mapeo con la nueva región activa y se evalúa la energía potencial del sistema.
8. A partir del perfil de energía potencial en función de la coordenada de reacción, se identifican de forma visual y se toman datos de la energía en el mínimo correspondiente a ES y intermediario, además de los máximos correspondientes a los dos barreras de activación presentes.