

PREDICCIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE LA LIPASA *CÁNDIDA*  
*ANTÁRCTICA* B EN MEZCLAS RACÉMICAS DE PROPANOLOL.

YORGUIN LEONEL VILLARREAL SOLANO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA, COLOMBIA.

2010

PREDICCIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE LA LIPASA *CÁNDIDA ANTÁRCTICA B* EN MEZCLAS RACÉMICAS DE PROPANOLOL.

YORGUIN LEONEL VILLARREAL SOLANO

Trabajo de grado presentado para optar por el título de Químico

Director:

Dr. CRISTIAN BLANCO TIRADO

Codirector:

MARIO ALBERTO BARÓN RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA, COLOMBIA.

2010

## **AGRADECIMIENTOS**

Antes que todo quiero agradecer a DIOS por todo el amor que me ha dado para tener fortaleza para desarrollar el proyecto y por las oportunidades que me ha dado en la vida para crecer como persona y como profesional.

Este trabajo fue gracias a mis padres, a mis hermanos, a mi cuñada, a mi sobrinito Diego Alejandro, mi primo Julián Camilo y demás familiares por su motivación y apoyo incondicional. También, agradezco a todos mis compañeros y ex compañeros del grupo GIFTEX, especialmente a Mario Barón, Cesar Luna, Juliana Ulloa y Luisa Delgado quienes aportaron, me apoyaron y acompañaron durante todo mi proyecto y en mi crecimiento personal. Igualmente al profesor Cristian Blanco, por ser un excelente guía en este proyecto, una gran persona fuera del ámbito académico, y por brindarme la oportunidad de demostrar mis capacidades profesionales. Al profesor Rodrigo Torres y a la profe Martha Daza, por sus aportes brindados, y a todas las personas que de una u otra forma colaboraron en este proyecto.

Agradezco también el apoyo de todos mis amigos quienes me recordaron que en la vida hay que mantener un equilibrio, no todo puede ser trabajo pero tampoco diversión, principalmente quiero resaltar a Javier Meléndez (mago), Deisy Rodríguez, Martha Prada, Lelys Victoria Vargas, Andrea Carvajal (Andrea duh!!), Ludwing Calderón, Sergio Manosalva (checho), Ángela Vásquez, Juan F. Cancino, Alejandra Herrera, Daniel Bernal y por último y no menos importante a mis dos mejores amigos Fabio Pérez y Diana Chiky.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	<b>17</b>
1.1. Quiralidad.	19
1.1.1. Resolución de racematos.	19
1.2. Lipasas.	19
1.2.1. Lipasa <i>Cándida Antártica</i> B.	23
1.3. Métodos computacionales.	24
1.3.1. Generalidades.	24
1.3.2. Docking molecular.	25
1.3.3. Determinación del estado de transición.	28
<b>2. ESTADO DEL ARTE.</b>	<b>32</b>
<b>3. METODOLOGÍA.</b>	
3.1. Determinación de la estereoespecificidad de la lipasa.	
3.1.1. Elección de las estructuras de partida.	41
3.1.2. Evaluación de las interacciones proteína-sustrato (ligando).	41
3.2. Determinación de los estados de transición	43
3.3. Determinación de las constantes cinéticas de la reacción	43
3.3.1. Cálculos termodinámicos	44
3.3.2. Teoría del estado de transición	44
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>45</b>
4.1. Enantiopreferencia en la absorción del propranolol en la CALB	45

4.1.1. Docking molecular de sustratos en la CALB en medio acuoso.	46
4.1.1.1. Docking molecular del (R/S)-propanolol en la acil-enzima (CALB).	46
4.1.1.2. Docking molecular del (R/S)-propanolol acetato en la enzima (CALB).	49
4.1.2. Docking molecular de sustratos en la CALB en medio orgánico, tolueno.	53
4.1.2.1. Docking molecular del (R/S)-propanolol en la acil-enzima (CALB).	53
4.1.2.2. Docking molecular del (R/S)-propanolol acetato en la enzima (CALB).	56
4.1.3. Confrontación de resultados docking.	58
4.2. Cinética y termodinámica de la reacción de esterificación del (R/S)-propanolol en la CALB.	60
4.2.1. Cinética y termodinámica de esterificación en medio acuoso.	60
4.2.2. Cinética y termodinámica de esterificación en medio orgánico, tolueno.	67
4.3. Determinación de las constantes cinéticas de la reacción (esterificación e hidrólisis) en agua y tolueno.	74
4.3.1. Constantes cinéticas de la reacción en medio acuoso, esterificación.	74
4.3.2. Constantes cinéticas de la reacción en medio acuoso, hidrólisis.	75
4.3.3. Constantes cinéticas de la reacción en medio tolueno, esterificación.	76
4.3.4. Constantes cinéticas de la reacción en medio tolueno, Hidrólisis.	77
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>79</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b>	<b>80</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>81</b>

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Estructuras utilizadas en Rebolledo et. al.	<b>33</b>
<b>Tabla 2.</b> Biotransformaciones realizadas a 28°C. 1 = transesterificación con vinyl acetato como donador acilo y 2 = hidrólisis. g En presencia de trietilamina.	<b>34</b>
<b>Tabla 3.</b> Termodinámica de la esterificación del (R/S)-propanolol a diferentes temperaturas (298-318K).	<b>65</b>
<b>Tabla 4.</b> Espontaneidad de la reacción de esterificación del R/S-propanolol a diferentes temperaturas (298- 318K) en medio tolueno.	<b>72</b>
<b>Tabla 5.</b> Resultados cinéticos de la reacción de esterificación del propanolol. $K_1$ = constante cinética de la 1ª etapa; $k_2$ = constante cinética de la 2ª etapa.	<b>74</b>
<b>Tabla 6.</b> Resultados cinéticos de la hidrólisis del propanolol acetato. $K_{-1}$ = constante cinética de la 1ª <sub>inv.</sub> etapa; $k_{-2}$ = constante cinética de la 2ª <sub>inv.</sub> etapa.	<b>75</b>
<b>Tabla 7.</b> Resultados cinéticos de la reacción de esterificación del propanolol. $K_1$ = constante cinética de la 1ª etapa; $k_2$ = constante cinética de la 2ª etapa.	<b>76</b>
<b>Tabla 8.</b> Resultados cinéticos de la hidrólisis del propanolol acetato. $K_{-1}$ = constante cinética de la 1ª <sub>inv.</sub> etapa; $k_{-2}$ = constante cinética de la 2ª <sub>inv.</sub> etapa.	<b>78</b>

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Enantiómeros, imágenes especulares no superponibles.	<b>17</b>
<b>Figura 2.</b> Propanolol	<b>18</b>
<b>Figura 3.</b> Resolución cinética de mezclas racémicas.	<b>19</b>
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de la transesterificación de alcoholes catalizada por la lipasa <i>Mucor miehe</i> . Donde a-f representan las seis etapas de la catálisis	<b>21</b>
<b>Figura 5.</b> Geometría de la Lipasa <i>Cándida Antártica B</i> .	<b>24</b>
<b>Figura 6.</b> Diagrama de la coordenada de reacción. $\Delta G_0$ , representa la energía de activación.	<b>29</b>
<b>Figura 7.</b> a) Transesterificación, b) Hidrólisis.	<b>33</b>
<b>Figura 8.</b> Modelo del sitio activo, representando los distintos modos de enlace de los sustratos quirales R- y S- (R = H, Ac)	<b>35</b>
<b>Figura 9.</b> Modos conformacionales de los enantiómeros en el centro activo. 1) cavidad oxígeno aniónica; 1) Ausencia de interacciones con la cavidad oxígeno aniónica; 2) Cavidad hidrofóbica; 3) Entrada de la cavidad hidrofílica; 3) cavidad hidrofílica; 4) Ausencia de interacciones con la histidina.	<b>37</b>
<b>Figura 10.</b> Proceso de esterificación de alcoholes (L=Lipasa). Etapas: a. Lipasa esterificada, alcohol; b. Complejo enzima esterificada-alcohol; c. Estado de transición 1; d. Intermediario tetraédrico 1; e. Estado de transición 2; f. Complejo enzima-éster; g. Lipasa, é.	<b>40</b>
<b>Figura 11.</b> A) interacción lipasa acetilada-sustrato, B) interacción lipasa-sustrato esterificado.	<b>43</b>
<b>Figura 12.</b> Superficie hidrofóbica de la cavidad del centro activo de la CALB. Las marcaciones verdes, representan la ubicación de la Ser105 y la His224, aminoácidos claves en la catálisis enzimática.	<b>45</b>
<b>Figura 13.</b> Energías docking obtenidas para el (R/S)-propanolol en la acil-enzima (CALB) y el (R/S)-propanolol acetato en la enzima (CALB).	<b>47</b>

- Figura 14.** Conformaciones de docking molecular en el centro activo de la acil-CALB: a y c) R-propanolol; b y d) S-propanolol. a y b) Docking molecular acil-CALB rígida; c y d) Docking molecular centro activo acil-CALB flexible. **48**
- Figura 15.** Conformaciones de docking molecular en el centro activo de la CALB: a y c) R-propanolol acetato; b y d) S-propanolol acetato. a y b) Docking molecular enzimarígida; c y d) Docking molecular centro activo CALB flexible. **50**
- Figura 16.** Ubicación del sustrato dentro del centro activo de la CALB. a y c) R-propanolol acetato; b y d) S-propanolol acetato. a y b) Docking molecular enzima rígida; c y d) Docking molecular centro activo CALB flexible. **51**
- Figura 17.** Energías docking obtenidas para el (R/S)-propanolol en la acil-enzima (CALB) y el (R/S)-propanolol acetato en la enzima (CALB). **54**
- Figura 18.** Conformaciones de docking molecular en el centro activo de la acil-CALB: a y c) R- propanolol; b y d) S-propanolol. a y b) Docking molecular acil-CALB rígida; c y d) Docking molecular centro activo acil-CALB flexible. **55**
- Figura 19.** Conformaciones de docking molecular en el centro activo de la CALB: a y c) R- propanolol acetato; b y d) S-propanolol acetato. a y b) Docking molecular enzima rígida; c y d) Docking molecular centro activo CALB flexible. **56**
- Figura 20.** Perfil energético de la reacción de esterificación del (R/S)-propanolol, en el centro activo de la CALB. **61**
- Figura 21.** Estado de transición de la 1<sup>a</sup> etapa (propanolol-intermediario tetraédrico). **62**
- Figura 22.** Estado de transición de la 2<sup>a</sup> etapa (intermediario tetraédrico-propanolol acetato). **63**
- Figura 23.** Efecto de la temperatura en el  $\Delta G$  de reacción del (R/S)-propanolol en agua. **66**

- Figura 24.** Perfil energético de la reacción de esterificación del R/S- 68  
propanolol dentro de la CALB en tolueno.
- Figura 25.** Estado de transición de la 1<sup>a</sup> etapa (propanolol-intermediario 69  
tetraédrico).
- Figura 26.** Estado de transición de la 2<sup>a</sup> etapa (intermediario tetraédrico- 70  
propanolol acetato).
- Figura 27.** Efecto de la temperatura en el  $\Delta G$  de reacción del (R/S)- 73  
propanolol en agua.

## RESUMEN

**TÍTULO:** PREDICCIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE LA LIPASA CÁNDIDA ANTÁRCTICA B EN MEZCLAS RACÉMICAS DE PROPANOLOL.\*

**AUTOR:** YORGUIN L. VILLARREAL SOLANO, MARIO A. BARÓN RODRÍGUEZ, CRISTIAN BLANCO TIRADO\*\*

**PALABRAS CLAVES:** ENANTIOSELECTIVIDAD, ESTADO DE TRANSICIÓN, COMPUTACIONAL, PROPANOLOL.

El propanolol es un medicamento utilizado en tratamientos cardiovasculares como bloqueador beta-adrenérgico. Este amino-alcohol presenta quiralidad. El S-propanolol tiene actividad beta-bloqueante mientras el R-propanolol provoca efectos secundarios. De esta manera, se hace necesario desarrollar un método de separación de estos enantiómeros.

La reacción de acetilación de compuestos orgánicos utilizando lipasas es una de las mejores opciones. De esta manera, es importante desarrollar un modelo para predecir mediante técnicas computacionales la acetilación enantioselectiva del (R/S)-propanolol mediante la lipasa *Cándida antártica* B (CALB).

Primero se realizó docking molecular rígido y flexible en agua y tolueno de las etapas de absorción del sustrato en el sitio activo de la lipasa, i.e. el (R/S)-propanolol en el sitio activo de la CALB esterificada (Ser105) y el (R/S)-propanolol acetato en la CALB nativa. Posteriormente se evaluó el perfil energético de la reacción para cada enantiómero (acetilación e hidrólisis ya que las enzimas son catalizadores reversibles). Se optimizaron los intermediarios tomando exclusivamente el centro activo y se determinaron los estados de transición, para posteriormente evaluar la cinética (constantes cinéticas) y termodinámica de reacción.

Los resultados en docking evidencian que en agua se presentan conformaciones productivas con el propanolol acetato – sitio activo de la CALB nativa. Las interacciones propanolol – sitio activo de la CALB esterificada evidencian solo interacciones electrostáticas. En tolueno solo se encontraron conformaciones productivas para el R-propanolol acetato.

El perfil de la reacción indicó que en agua la CALB es cinéticamente favorable para la hidrólisis del R-propanolol acetato, siendo coherente con resultados experimentales. En tolueno se obtuvo que cinéticamente la reacción es enantioselectiva con el enantiómero S (acetilación e hidrólisis), sin embargo la reacción controlada termodinámicamente es preferente con el enantiómero R.

Este modelo es solo el comienzo para prever la enantioselectividad de lipasas para resolver mezclas de amino-alcoholes quirales, ya que los resultados pueden ser comparables con datos experimentales.

---

\*Proyecto de grado

\*\* Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director Dr. Cristian Blanco Tirado.

## ABSTRACT

**TITLE:** PREDICTION FROM CANDIDA ANTARCTICA LIPASE B ANTIOSELECTIVITY IN RACEMIC MIXTURES OF PROPANOLOL\*

**AUTHOR:** YORGUIN L. VILLARREAL SOLANO, MARIO A. BARÓN RODRÍGUEZ, CRISTIAN BLANCO TIRADO

**KEY WORDS:** ENANTIOSELECTIVITY, TRANSITION STATE, COMPUTATIONAL, PROPANOLOL.

### DESCRIPTION:

Propranolol is a drug used in cardiovascular treatments like as a  $\beta$ -adrenergic blocker. This amino-alcohol shows chirality. S-propranolol has  $\beta$ -blocker activity while the R-propranolol provokes secondary effects. In this way, it's necessary to develop a method to resolve these enantiomers.

The acetylation reaction of organic compounds using lipases is the one of the best options. It is important to develop a model to predict through computational techniques the enantioselective acetylation of (R/S)-propranolol using *Candida Antarctica* lipase B (CALB).

First rigid and flexible molecular docking was carried out in water and toluene from the absorption stages of substrate on the lipase's active site, i.e. (R/S)-propranolol on the CALB<sub>esterified</sub> (Ser105) active site and (R/S)-propranolol acetate on the CALB<sub>native</sub>. Later the energetic profile was evaluated for each enantiomer (acetylation and hydrolysis because the enzymes are reversible catalyzers). The intermediates were optimized by taking only the active site, and the transition states were determined to evaluate later the kinetic and thermodynamic properties of the reaction.

Docking results show that in water the propranolol acetate-CALB<sub>native</sub> active site conformations are productive. The propranolol-CALB<sub>esterified</sub> active site interactions show only electrostatic interactions. Productive conformations for R-propranolol acetate were found only in toluene.

The reaction profile in water indicated that CALB is kinetically favorable for the hydrolysis of R-propranolol acetate, this is in accord with experimental results. In toluene it was found that kinetically the reaction is enantioselective with the S enantiomer (acetylation and hydrolysis), but if the reaction is controlled by thermodynamics the R enantiomer is preferred.

This model is a preliminary way to predict the enantioselectivity of the lipases in order to resolve racemic mixtures for chiral amino-alcohols, because the results can be compared with experimental data.

---

\*Degree project

\*\* Santander Industrial University, Science Faculty, School Chemistry, Director Dr. Cristian Blanco Tirado.

## INTRODUCCIÓN

El propanolol es un medicamento utilizado en tratamientos cardiovasculares como bloqueador de receptores beta-adrenérgicos para controlar la hipertensión [1,2]. El propanolol es sintetizado y administrado como mezcla racémica debido a que es un compuesto quiral. El S-propanolol es un potente antagonista de los receptores beta-adrenérgicos [3], mientras que el R-propanolol no lo es; más aún, el R-propanolol provoca problemas bronquiales, ansiedad, constipación y espermicidio. Por tal razón, es importante la administración del S-propanolol como compuesto enantioméricamente puro [4,5].

Uno de los métodos, quizás el más eficiente, para obtener compuestos enantioméricamente puros es mediante la resolución cinética de mezclas racémicas [6]. Esto ocurre debido a que la velocidad de reacción de los enantiómeros es diferente ante un reactivo homoquiral, i.e., la resolución cinética ocurre cuando  $k_R \neq k_S$  ( $k$ = constante cinética de la reacción) [7].

Las lipasas, por su alta enantioselectividad, son utilizadas en la industria farmacéutica para la resolución cinética de mezclas racémicas de ésteres y alcoholes [8]. El procedimiento se lleva a cabo a través de reacciones enantioselectivas de transesterificación o hidrólisis.

Las etapas de la transesterificación son bien conocidas, sin embargo el mecanismo por el cual la lipasa es altamente enantioselectiva aún se desconoce. Con miras a entender cómo es el mecanismo, a nivel molecular, de la resolución cinética de la mezcla racémica del propanolol utilizando la lipasa *Cándida Antártica* B (CALB) [9] se propuso estudiar: i) La absorción del (R/S)-propanolol en la enzima esterificada y del éster de (R/S)-propanolol en la enzima libre utilizando docking molecular [10] y ii) La reacción de transesterificación del (R/S)-propanolol en el centro activo de la CALB mediante la teoría del estado de transición, utilizando métodos semi-empíricos para la optimización de geometrías y para la determinación de estados de transición.

Con el objeto de establecer las bases moleculares de la resolución cinética de la mezcla racémica del (R/S)-propranolol mediante el uso de la CALB, nuestro estudio se enfocó en describir las interacciones entre el propranolol y el centro activo de la lipasa, definir la coordenada de reacción (complejo enzima esterificada-sustrato  $\leftrightarrow$  estado de transición 1  $\leftrightarrow$  intermediario tetraédrico  $\leftrightarrow$  estado de transición 2  $\leftrightarrow$  complejo enzima-producto) y determinar las constantes cinéticas de reacción para el proceso de transesterificación propuesto.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Desarrollar un modelo teórico que describa la resolución racémica de propanolol, utilizando la lipasa Cándida Antártica B (CALB) como catalizador en medio acuoso y tolueno

### Objetivos específicos

Determinar por mecánica molecular y métodos semi-empíricos la estereoespecificidad de la lipasa sobre el (R/S) propanolol en medio acuoso y tolueno.

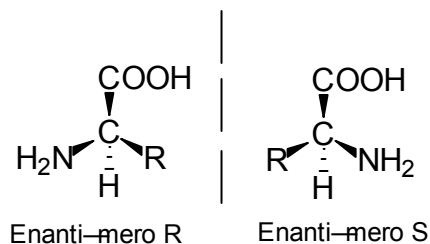
Determinar una aproximación del estado de transición de cada reacción por métodos semi-empíricos (PM6).

Determinar las constantes cinéticas de reacción para cada uno de los sustratos, por medio de la teoría del estado de transición.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Quiralidad

La quiralidad está involucrada en un gran número de procesos biológicos. Un compuesto quiral está constituido por uno o más átomos, principalmente carbonos, que presentan sustituyentes diferentes. Si los sustituyentes se reorganizan de diferente manera generan un estereoisómero, i.e., isómeros no superponibles. Si estos estereoisómeros son imágenes especulares se clasifican como enantiómeros (**Figura 1**) [11].



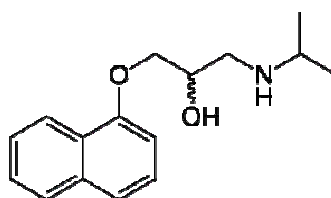
**Figura 1.** Enantiómeros, imágenes especulares no superponibles.

Debido a la alta enantio-selectividad inherente en la mayoría de los procesos biológicos que involucran proteínas, ácidos ribonucleicos, lípidos y glucósidos quirales, es muy poco probable que los enantiómeros de una molécula quiral posean la misma interacción con los centros activos y por ende el mismo efecto biológico. Mientras un enantiómero tiene un efecto específico, su homólogo puede no presentar actividad biológica en absoluto o, peor aún, puede presentar efectos adversos.

En algunos casos, no obstante, la quiralidad de los medicamentos no constituye un factor determinante en la actividad de las drogas. Por ejemplo, el S-ibuprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo, se comercializa con su enantiómero el R-ibuprofeno. La mezcla racémica, es decir, 50% del S-ibuprofeno y 50% de R-

ibuprofeno, se distribuye porque el R-ibuprofeno es un compuesto inactivo y, además, el ibuprofeno sufre inversión quiral en el organismo. En este caso, la administración de la mezcla racémica no presenta contraindicaciones. Sin embargo, en muchos otros casos el enantiómero de una molécula con función específica resulta tóxico [12]. El primer caso completamente documentado es el de la talidomida en forma racémica. Esta droga era comúnmente utilizada para aliviar los síntomas asociados a mareos y náuseas en las mujeres embarazadas. Sin embargo se demostró muy rápidamente que causaba efectos teratogénicos en los hijos recién nacidos de pacientes bajo su influencia. A comienzos de los 60 se demostró que el responsable de este efecto era el enantiómero S del fármaco [13]. Desde entonces el desarrollo de nuevas drogas involucra la separación de los diferentes enantiómeros de las sustancias con actividad farmacéutica. Como vemos a continuación el propranolol es un caso atractivo para desarrollar modelos de separación racémica, que permitan mejorar sus cualidades farmacéuticas.

### El propranolol



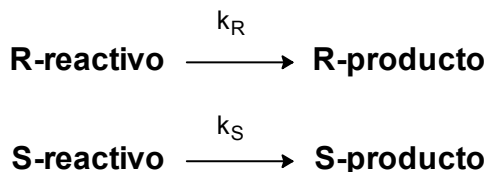
**Figura 2.** Propranolol

El propranolol, fármaco beta-bloqueante no selectivo, bloquea la acción de la epinefrina en los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$ -adrenérgicos [1,2]. Sólo el S-propranolol es un potente antagonista de los receptores adrenérgicos, mientras que R-propranolol no lo es [3]. Más aún, este último puede causar asma bronquial, ansiedad, nerviosismo, constipación o espermicidio. Aunque los efectos adversos en el organismo humano están bien documentados, el propranolol se sigue administrando en forma racémica en el tratamiento de la hipertensión [4]. Por esta razón, diversos grupos de investigación han intentado desarrollar metodologías eficientes que permitan la separación de estos enantiómeros con el objeto de

administrar el S-propanolol, enantioméricamente puro en pacientes con hipertensión arterial.

### 1.1.1. Resolución de racematos

La separación de enantiómeros no es un proceso sencillo debido a que los enantiómeros poseen propiedades físicas y químicas similares. Debido a esta similitud de propiedades no se pueden separar con métodos convencionales como destilación, cristalización, entre otras. Actualmente se hace reaccionar la mezcla racémica con un reactivo homoquiral, aprovechando que los enantiómeros tiene diferentes constantes de velocidad de reacción ( $k_R \neq k_S$ , **Figura 3**) frente a este tipo de reactivos [8]. De esta manera se promueve la resolución cinética de la mezcla [6].



**Figura 3.** Resolución cinética de mezclas racémicas.

Una forma de resolver cinéticamente mezclas racémicas es utilizando un catalizador enantioselectivo como agente homoquiral [14]. El procedimiento más común en la industria farmacéutica es la transesterificación de alcoholes catalizada por lipasas [7], debido a que estas enzimas son altamente enantioselectivas [14,15].

## 1.2. Lipasas

Las lipasas, triacilglicerol hidrolasas, son enzimas acuo-solubles que catalizan la hidrólisis de ésteres de lípidos insolubles en agua. Las lipasas presentan un rol

esencial en la digestión, transporte y procesamiento de los lípidos en la digestión (e.g. grasas, aceites, triacilglicéridos) [11,16,17].

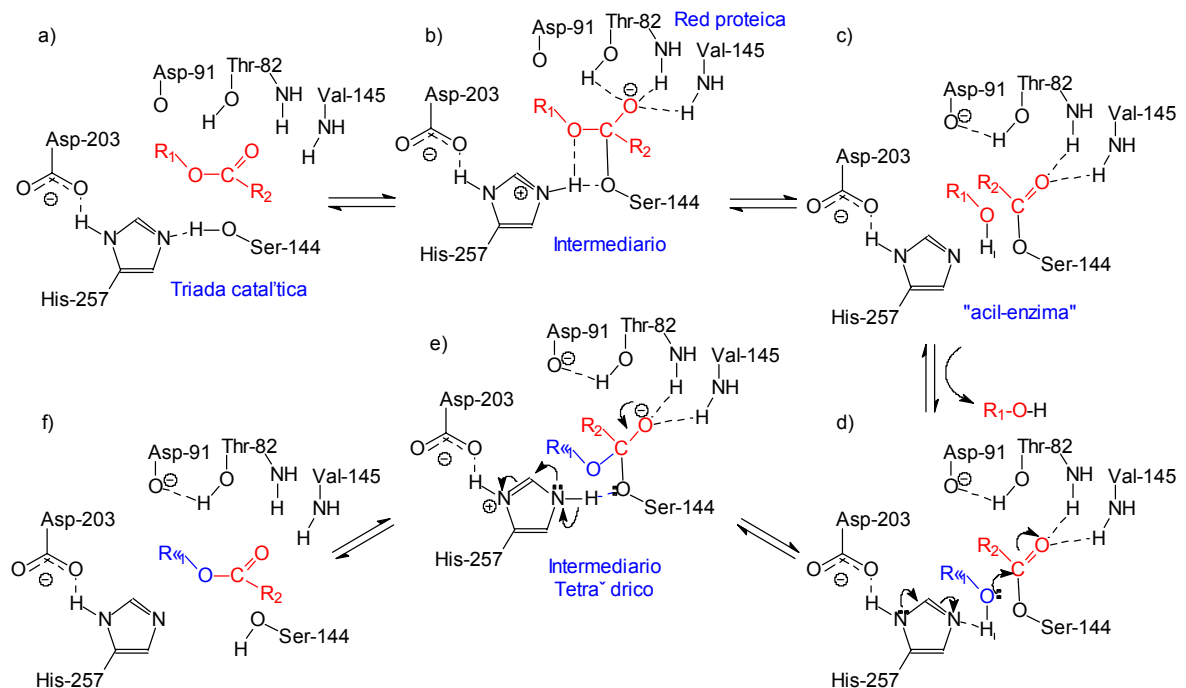
Las lipasas son proteínas globulares que se caracterizan por poseer un centro activo y un “**lid**”, o tapa, que protege el centro activo del medio. El centro activo está constituido por una triada catalítica; de Ser, His y Asp, y dos cavidades donde se acomodan las cadenas adyacentes del grupo reactivo del sustrato. El lid, elemento móvil, consiste en una o dos hélices alfa, adheridas por cadenas flexibles [18]. Cuando el “**lid**” se abre hace accesible el centro activo al sustrato. La apertura del “**lid**” es inducida por interacciones con interfases orgánicas, e.g. el sustrato. En ocasiones interfaces acuo-lipídicas se usan con el objeto de mantener abierto el lid incrementando la actividad de las lipasas [19].

Las lipasas se pueden clasificar según la forma de túnel que comunica el “**lid**” con el centro activo.

- i) Familia de la *Rhizomucor* incluyendo *Thermomyces*. Posee el centro activo y el **lid** sobre la superficie de la enzima.
- ii) Familia de la *Cándida Antártica* y las *Pseudomonas*. Posee un túnel que tiene forma de embudo, así los sustratos deben introducirse en el túnel antes de llegar al centro activo. La lipasa *Cándida Antártica* B (CALB) presenta un **lid** muy pequeño.
- iii) Familia de la *Cándida Rugosa*. El centro activo se encuentra al final de un túnel en forma cilíndrica. [19]

La mayoría de las lipasas acepta una amplia gama de sustratos sintéticos y naturales; además presentan alta enantioselectividad, por tanto se han establecido como valiosos catalizadores en síntesis orgánica, especialmente en reacciones de transesterificación, hidrólisis y aminólisis [8,17].

## Mecanismo de transesterificación de alcoholes



**Figura 4.** Mecanismo de la transesterificación de alcoholes catalizada por la lipasa *Mucor miehe*. Donde a-f representan las seis etapas de la catálisis [20].

Las lipasas pertenecen a la familia de las serina hidrolasas ya que la serina es muy importante en la catálisis enzimática. Estas enzimas se han usado extensamente como biocatalizadores en la transesterificación de alcoholes. Debido a las capacidades enzimáticas de las lipasas varios autores han propuesto diversos mecanismos para entender como ocurre la transesterificación. Por ejemplo, el mecanismo de hidrólisis de la superfamilia de serina hidrolasa fue propuesto por Chapus *et al.* 1976 [21,22]. También Schulz *et al.* 2000 y Castellanos *et al.* 2004 propusieron el mecanismo de la reacción de transesterificación mediada por lipasas, como aparece en la **Figura 4** [20, 23].

El mecanismo propuesto por Castellanos *et al.* 2004 (**Figura 4**) describe varios aspectos importantes en la reacción de transesterificación de alcoholes catalizada

por lipasas. El mecanismo de la transesterificación empieza por la formación del complejo de Michaelis (a), enzima – donador acilo (rojo), seguido de la formación del primer intermediario tetraédrico (b), por medio de la formación del primer estado de transición, donde el sustrato es enlazado covalentemente al oxígeno gamma ( $O_\gamma$ ), de la serina catalítica. Se forman los puentes de hidrógeno entre  $H_{N_\epsilon}$  con el  $O_\gamma$  de la serina catalítica y con el oxígeno adyacente al carbono carbonilo del donador acilo. Adicionalmente, el enlace  $\pi$  del grupo carbonilo se rompe; generando un oxígeno con alta densidad de carga negativa, el cual es estabilizado por la red proteica, i.e., la cavidad oxígeno aniónica, mediante puentes de hidrógeno. Después, ocurre la transferencia del  $H_{N_\epsilon}$  al oxígeno adyacente al carbono carbonilo proveniente del donador acilo (rojo), se rompe el enlace C-O del donador acilo, a causa de esto se regenera el enlace  $\pi$  del grupo carbonilo y se forma el complejo acil-enzima - alcohol (rojo)(c), que posteriormente se libera. Antes de la siguiente etapa, el alcohol, a esterificar (azul), ingresa al centro activo y se acomoda de tal manera que presenta las siguientes interacciones: i) puente de hidrógeno entre el H del alcohol con el nitrógeno  $N_\epsilon$  de la histidina catalítica y ii) dipolo-dipolo entre el par electrónico libre del oxígeno del grupo OH del alcohol, y el carbono electrodeficiente del grupo carbonilo de la serina acilada. El siguiente estado de transición (tercero en el proceso) involucra un proceso concertado de tres sucesos i) la transferencia del protón del grupo OH (azul) hacia el  $N_\epsilon$  de la histidina, ii) la formación del enlace del oxígeno del alcohol (azul) con el carbono carbonilo de la serina acilada y iii) la localización de los electrones asociados al enlace  $\pi$ , del enlace carbonilo, en el oxígeno carbonílico. Estos rearrreglos moleculares son estabilizados por resonancia electrónica en el anillo de la histidina (e). El último proceso, a partir de la etapa e, se lleva a cabo a través del cuarto estado de transición que involucra la transferencia del  $H_{N_\epsilon}$  hacia el  $O_\gamma$  de la serina y la formación del enlace  $\pi$  del grupo carbonilo, debilitando el enlace sigma entre el  $O_\gamma$  de la serina y el carbono carbonilo del grupo acilo. De esta manera se recupera la enzima en su estado

nativo y se produce la acilación ó transesterificación, de alcoholes (azul) (f) mediada por lipasas. Es necesario tener en cuenta que el proceso es reversible debido al equilibrio dinámico de la reacción.

Se ha encontrado que esta reacción mediada por lipasas presenta alta enantioselectividad especialmente en el transcurso de las etapas d a f del mecanismo propuesto (**figura 4**), ya que la constante de velocidad de reacción de cada enantiómero es diferente [24].

### **1.2.1. Lipasa *Cándida Antártica B***

La lipasa *Cándida Antártica B* (CALB, **Figura 5**) hidroliza una extensa variedad de ésteres manteniendo su actividad catalítica, además presenta alta enantioselectividad para alcoholes secundarios [8]. Las propiedades enantioselectivas se atribuyen a la restricción física del centro activo (núcleo estéreo-específico) y a un largo túnel hidrofóbico en forma de embudo estrecho [25].

La CALB presenta alta enantioselectividad tanto en medio acuoso como orgánico [8]. Sin embargo, se desconocen las causas moleculares de esta selectividad. Es posible que dentro del centro activo se presente una cavidad hidrofóbica que permita interacciones selectivas del sustrato [26].



**Figura 5.** Geometría de la Lipasa *Cándida Antártica B*.

### **1.3. Métodos computacionales**

#### **1.3.1. Generalidades**

En la actualidad, las herramientas computacionales son muy importantes en la industria química ya que es posible estudiar y describir el comportamiento de sistemas o reacciones químicas utilizando los métodos de la química teórica y computacional. Esta nueva área en química se conoce como química “in silico”. Utilizando estas técnicas es posible evitar gastos innecesarios de reactivos, disminuir costos y disminuir el impacto ambiental causado por los residuos. Los métodos computacionales más utilizados para evaluar el comportamiento de sistemas biomoleculares son:

- i) Métodos de mecánica molecular: Describen los sistemas mediante modelos clásicos (campo de fuerza), estos métodos son ampliamente utilizados para sistemas macromoleculares de más de 1.000 átomos.
- ii) Métodos de mecánica cuántica: Describen los sistemas mediante modelos cuánticos (*ab initio* y semi-empíricos). Estos modelos son ampliamente utilizados para sistemas de menos de 1.000 átomos [27].

### 1.3.2. Docking molecular

Una de las técnicas más utilizadas para evaluar las interacciones entre compuesto con promisorio actividad biológica y un receptor es el docking molecular, debido a que la función principal de los fármacos es enlazarse en el sitio activo del receptor. El docking molecular consiste en calcular la energía de interacción entre las dos moléculas, i.e. receptor y ligando, en función de la energía libre de Gibbs [27].

Dado el gran tamaño de los sistemas macromoleculares, así como el gran número de posibles conformaciones del sistema y posibles interacciones del ligando con el receptor, es claro que es necesario utilizar un modelo que evalúe con eficiencia y reproducibilidad las diferentes interacciones sustrato-sitio activo.

La mecánica molecular describe los sistemas mediante campos de fuerza, i.e. interacciones enlazantes tales como: enlaces, torsiones, ángulos e interacciones no enlazantes tales como: puentes de hidrógeno, van der Waals y electrostáticas, basados en métodos clásicos (**Ecuación 1.**) [28]. Los campos de fuerza (AMBER [29], CHARMM, GROMOS, UFF, MM4) se han desarrollado con base en datos espectroscópicos, datos experimentales y cálculos *ab initio*, razón por la cual en muchos casos se ha demostrado que brindan respuestas formalmente correctas, a pesar de que no incluyen en la descripción de las propiedades moleculares el movimiento electrónico.

El campo de fuerza AMBER94 fue validado para ser utilizado en sistemas biomacromoleculares. La función del potencial está dada por la ecuación:

$$E_{Total} = \sum_{enlaces} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angular} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{torcional} \frac{V_r}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

**Ecuación 1.** Función de energía del campo de fuerza AMBER94.

Donde el primer término representa las energías de los enlaces;  $K_r$  es la constante y  $r_{eq}$  es la distancia de equilibrio del enlace. El segundo término representa la energía angular, donde  $K_\theta$  es la constante y  $\theta_{eq}$  es el ángulo de equilibrio entre tres átomos. El tercer término representa la energía de torsión, donde  $V_r$  es la componente de Fourier,  $\phi$  es el ángulo de torsión y  $\gamma$  es el factor de desfase. El último término incluye: i) las interacciones de Van der Waals, donde  $A_{ij}$  y  $B_{ij}$  son parámetros de interacciones de repulsión y atracción, respectivamente,  $R_{ij}$  es la distancia interatómica. y ii) las interacciones electrostáticas, donde  $q$  es la carga puntual de cada átomo y  $\epsilon$  representa la constante dieléctrica del medio [29].

El cálculo de la energía docking, como energía libre de Gibbs, se puede obtener mediante:

$$\Delta G_{docking} = E_{pl} - E_p - E_l - k_B \Delta S_{pl}$$

**Ecuación 2.** Función de energía libre de docking molecular.

Donde  $E_{pl}$ ,  $E_l$  y  $E_p$  son las energías de los sistemas proteína-ligando, ligando y proteína, respectivamente (**Ecuación 1.**), el último término incluye la entropía del sistema, para el cual  $k_B$  representa la constante de Boltzmann y  $\Delta S_{pl}$  es el cambio de entropía asociado a la absorción del sustrato en el ligando.

La energía  $E$ , de la (**Ecuación 2.**), es la sumatoria de la energía potencial, energía de solvatación (**Ecuación 3.**) y energía de las interacciones puentes de hidrógeno (**Ecuación 4.**).

$$\Delta G_{solv} = W_{solv} \sum_{ij} (S_i V_i + S_j V_j) e^{-((r_{ij}^2) / (2\sigma^2))}$$

**Ecuación 3.** Energía libre de solvatación. Donde,  $i$  es el índice de átomos del ligando,  $j$  el índice de átomos del receptor,  $W_{solv}$  el coeficiente de solvatación,  $V$  el volumen atómico fragmentario,  $r$  la distancia entre los átomos  $i$  y  $j$ ,  $\sigma$  la constante de distancia gaussiana (3,5 Å) y  $S$  el término de solvatación según el átomo.

$$\Delta G_{\text{Hbond}} = \sum_{ij} V_0 \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}} \right) F(\theta, \varphi, \gamma)$$

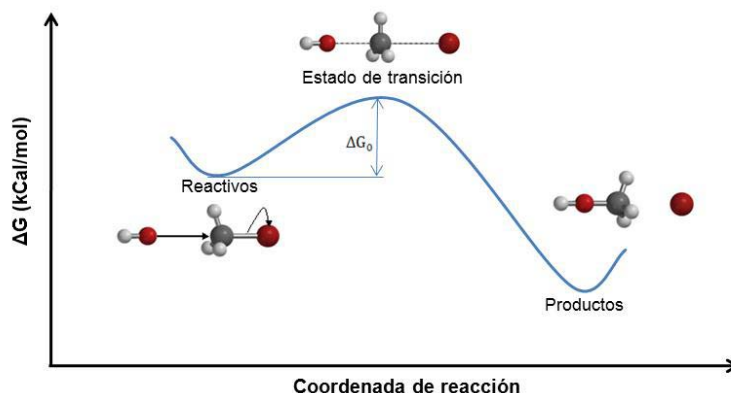
**Ecuación 4.** Energía libre de interacción tipo puentes de hidrógeno. Donde  $V_0$  es la energía estándar para la formación de un puente de hidrógeno,  $C_{ij}$  y  $D_{ij}$  son parámetros para las interacciones de repulsión y atracción respectivamente,  $r$  es la distancia entre los átomos  $i$  y  $j$ , y  $F(\theta, \varphi, \gamma)$  es una función dada en términos angulares.

Los programas convencionales de docking molecular utilizan métodos estandarizados para ubicar el ligando en las diferentes posiciones del receptor molecular. Uno de los métodos más utilizados es el Algoritmo genético [30], que se basa principalmente en la teoría evolucionista de Charles Darwin. Consiste principalmente en tomar los resultados obtenidos por el método de Monte Carlo para entrecruzar dos conformaciones ó modificar distancias interatómicas, ángulos rotacionales ó diedros, seguido de la evaluación de energía de la conformación creada, si la energía es menor que la de su predecesor esta conformación reemplaza la anterior, de lo contrario se elimina. Por último, se sigue evaluando las conformaciones aceptadas de la misma forma hasta que la variación energética entre las conformaciones iniciales y creadas sea menor que 0,01 Kcal/mol. Finalmente se seleccionan las conformaciones de menor energía libre de interacción molecular [30,31].

### 1.3.3. Determinación del estado de transición

#### Teoría del estado de transición

La teoría del estado de transición (TST) parte de la hipótesis de que las reacciones se llevan a cabo mediante el cruzamiento de la superficie de energía transversal correspondiente al estado de transición a partir de los reactantes siguiendo el camino de mínima energía o coordenada de reacción. De esta manera, la etapa que controla la velocidad de la reacción está relacionada con la probabilidad de superar la barrera energética mediante la interconversión de un modo vibracional en uno traslacional en el estado de transición (**Figura 6.**) [32].



**Figura 6.** Diagrama de la coordenada de reacción.  $\Delta G_0$  representa la energía de activación.

Partiendo de un ensamble microcanónico podemos definir la constante de la velocidad de formación del estado de transición como:

$$K_1^\ddagger = \frac{Q_{(AB)^\ddagger}}{Q_A Q_B} e^{-\Delta G_0/RT}$$

**Ecuación 5.** Constante de velocidad de formación del complejo activado.

Donde  $\Delta G_0$  es la energía estándar de activación de la reacción, R es la constante de los gases, T es la temperatura,  $Q_{(AB)^\ddagger}$ ,  $Q_A$ ,  $Q_B$  son las funciones de partición del estado de transición, del compuesto A y del compuesto B, respectivamente.

Por otro lado, la frecuencia o constante de velocidad específica de la reacción de descomposición del estado de transición se puede demostrar que tiene la siguiente expresión:

$$K^* = \frac{K_b T}{h}$$

**Ecuación 6.** Constante de velocidad de descomposición del estado de transición. Donde  $K_b$  es la constante de Boltzmann ( $1.38 \times 10^{-23}$  J/K), y  $h$  es la constante de Planck ( $6.624 \times 10^{-34}$  J\*s).

Si comparamos la ecuación general de la velocidad con la expresión de Arrhenius, podemos deducir que:

$$k(T) = K^* K_1^*$$

**Ecuación 7.** Constante cinética.

Es decir que la constante de velocidad de la reacción depende de:

- La constante de velocidad específica de la reacción de descomposición del estado de transición.
- La constante de equilibrio de la reacción de formación del estado de transición  $K^*$ .

Si sustituimos la **Ecuación 6.** y la **Ecuación 5.** en la **Ecuación 7.** obtenemos la expresión [32, 33]:

$$k(T) = \frac{K_b T}{h} \frac{Q_{(AB)}^*}{Q_A Q_B} e^{-\Delta G_0^*/RT}$$

**Ecuación 8.** Función de la constante cinética.

De esta manera, es posible determinar constantes cinéticas de una reacción a partir de los estados de transición y de sus funciones de partición.

En la actualidad, la determinación de la termodinámica y cinética de las reacciones químicas son aspectos esenciales para determinar la estabilidad, la espontaneidad y la velocidad de las reacciones químicas. Es así como los modelos teóricos que involucran la ruptura y formación de enlaces son una excelente herramienta para evaluar la termodinámica y cinética de las reacciones químicas [34]. Los métodos mecano-cuánticos, i.e., *ab initio* y semi-empíricos, son muy útiles debido a la posibilidad de evaluar y describir la formación y ruptura de enlaces químicos.

Los métodos semi-empíricos resuelven la ecuación de onda de Schrödinger; sin embargo, para agilizar los cálculos estas metodologías reemplazan algunas integrales de pares electrónicos con valores establecidos por métodos *ab initio* o datos experimentales [28]. Por esta razón, son muy útiles en sistemas moleculares de más de 100 átomos. Además, este método permite calcular propiedades termodinámicas ( $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta S$ ) del sistema a diferentes temperaturas mediante la mecánica estadística. Algunos de los métodos semi-empíricos más utilizados son: PM6, AM1, PM3, MNDO, etc. [34].

El método semi-empírico PM6 [35] contiene una extensa librería de parámetros de tipo empírico y *ab initio*; como información termoquímica (Webbook) [35] y de geometrías moleculares (Universidad de Cambridge, base de datos estructurales) [35]. La función de entalpía de formación en el método semi-empírico PM6 es:

$$\Delta H_{f,298,M}^{\circ} = N_A U_{val,M} - N_A \sum_i E_{val,A_i} + \sum_i \Delta H_{f,298,A_i}^{\circ}$$

**Ecuación 9.** Función de la entalpía de formación.

Donde  $\Delta H_{f,298,M}^{\circ}$  es el calor de formación del sistema a 298°C,  $N_A$  es el número de Avogadro,  $E_{val,A_i}$  es la energía electrónica de valencia del átomo,  $\Delta H_{f,298,A_i}^{\circ}$  es el calor de formación estándar de cada átomo del sistema y  $U_{val,M}$  es la energía electrónica de valencia molecular [35].

Para calcular la energía libre ( $\Delta G = \Delta H_f - T\Delta S$ ), es necesario determinar la entropía del sistema. El cálculo de la entropía esta compuesta por la suma de la entropía vibracional, traslacional y rotacional (**Ecuación 10**), que dependen de las energías vibracionales, momentos de inercia, el número de simetría de la molécula y la temperatura del sistema [36].

$$S = S_{vib} + S_{tras} + S_{rot}$$

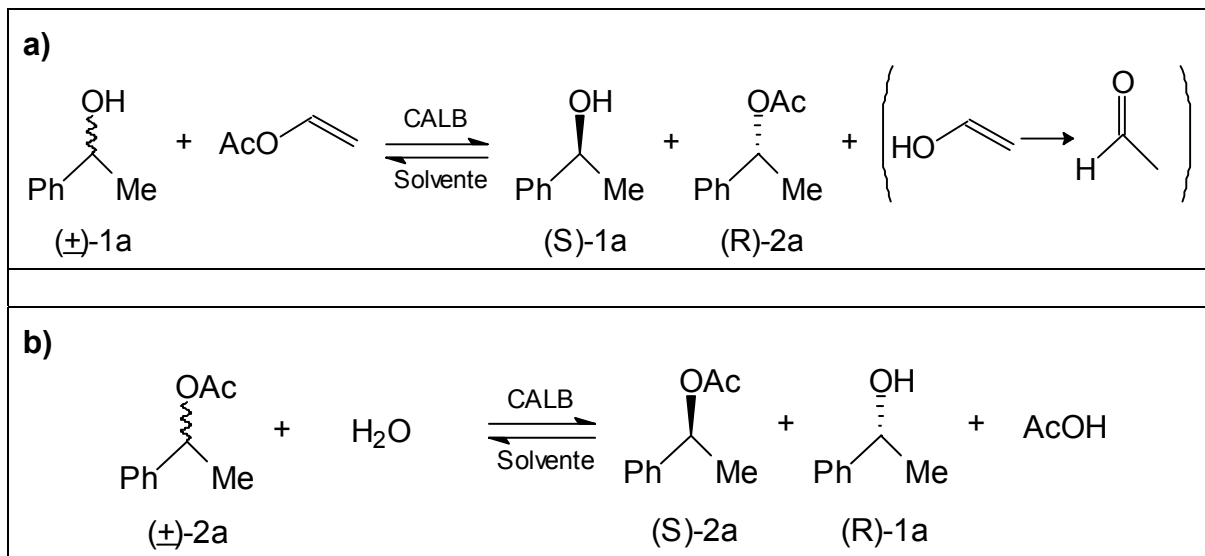
**Ecuación 10.** Entropía.  $S_{vib}$ ,  $S_{tras}$ ,  $S_{rot}$  son las entropías vibracionales, traslacionales y rotacionales respectivamente.

## 2. ESTADO DEL ARTE

En la actualidad se sabe que alrededor del 30% de la población mundial sufre problemas de hipertensión que trae como consecuencia la muerte prematura. Solo el 60% de esta población afectada se encuentran bajo tratamiento [5]. Los tratamientos farmacológicos pueden ser diuréticos (bloqueadores de canales de sodio para disminuir los niveles de potasio en la sangre) [5], vasodilatadores directos, antagonistas del calcio (promueven la liberación de calcio en el tejido cardíaco) [5] y antagonistas de receptores beta adrenérgicos (bloqueantes de receptores) [3].

El S-propranolol es un medicamento que actúa directamente sobre el corazón, en los receptores cardíacos  $\beta$ -1 y  $\beta$ -2 adrenérgicos, disminuyendo la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea (antihipertensivo) y ejerciendo actividad antiarrítmica [4,5]. Sin embargo, la administración de su enantiómero, el R-propranolol, genera asma bronquial y/o bronco espasmo.

Las anteriores son razones suficientes para investigar sobre nuevas tecnologías en la resolución de mezclas racémicas o en la síntesis asimétrica de productos farmacéuticos quirales, en especial el propranolol [2]. Para tratar de solucionar este problema, se han desarrollado investigaciones utilizando enzimas como catalizadores altamente enantioselectivos, con el objeto de obtener enantiómeros puros [37]. Ésta es una de las técnicas más utilizadas debido al bajo impacto ambiental y fácil adquisición de las enzimas (producidas y extraídas de microorganismos). La transesterificación de alcoholes y la hidrólisis de ésteres catalizada por lipasas (**Figura 4**) son los procesos más utilizados para la resolución de racematos (**Figura 7**). Con el objeto de aumentar la enantioselectividad se pueden modificar las condiciones de reacción, i.e., sustrato, medio de reacción y enzima.



**Figura 7.** a) Transesterificación, b) Hidrólisis.

Es así como Hof Robert *et al.*, 1996 [38], Paimies Oscar *et al.*, 2001 [39] y Westermann Bernhard *et al.* (2001) [40] han encontrado que la CALB y la lipasa de la *Pseudomona cepacia* (PCL) presentan mayor enantioselectividad hacia alcoholes secundarios, hemiacetales y dioxolanonas quirales; además, observaron que a mayor tamaño de los sustituyentes del centro quiral es mayor el grado de resolución racémica.

Structure	Identification	Group	
		R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
 1	1a	Ph	Me
	1b	Ph	Et
	1c	4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me
	1d	PhCH <sub>2</sub>	Me
 2	2a	Ph	Me
	2b	Ph	Et
	2c	4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me
	2d	PhCH <sub>2</sub>	Me

**Tabla 1.** Estructuras utilizadas en Rebolledo *et al.* [8].

Con el fin de optimizar la enantioselectividad de la CALB [41] bajo diferentes condiciones de reacción, i.e., transesterificación, hidrólisis o aminólisis [5],

Rebolledo *et. al.*, 2005, separaron mezclas racémicas de diferentes compuestos (**Tabla 1**), en tetrahidrofurano, tolueno y agua. Los resultados obtenidos muestran una enantioselectividad mayor de 200 (**Tabla 2**) [8].

Muestra	Tipo de reacción <sup>a</sup>	Sustrato	Solvente	Enantioselectividad
1	1	( <u>+</u> )-1 <sup>a</sup>	Tetrahidrofurano	>200
2	1	( <u>+</u> )-1 <sup>a</sup>	Tolueno	10
3	1	( <u>+</u> )-1b	Tetrahidrofurano	122
4	1	( <u>+</u> )-1b	Tolueno	>200
5	1	( <u>+</u> )-1d	Tetrahidrofurano	67
6	1	( <u>+</u> )-1d	Tolueno	33
7	2	( <u>+</u> )-2 <sup>a</sup>	Tetrahidrofurano	120
8	2	( <u>+</u> )-2 <sup>a</sup>	Tolueno	67
9	2 <sup>g</sup>	( <u>+</u> )-2 <sup>a</sup>	Tetrahidrofurano	187
10	2 <sup>g</sup>	( <u>+</u> )-2 <sup>a</sup>	Tolueno	68
11	2	( <u>+</u> )-2 <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O <sup>h</sup>	121

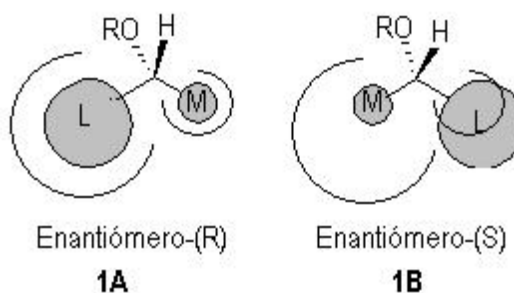
**Tabla 2.** Biotransformaciones realizadas a 28°C. 1 = transesterificación con vinyl acetato como donador acilo y 2 = hidrólisis. <sup>g</sup>En presencia de trietilamina [38].

Con el objeto de entender el mecanismo de resolución de mezclas racémicas utilizando lipasas como catalizadores enantioselectivos se han planteado distintos modelos que van desde la perspectiva termodinámica hasta la cinética, tomando como base datos experimentales.

Los primeros modelos propuestos, están basados en la disposición espacial de las cavidades del centro activo de las enzimas, que indica el tamaño y la forma de las moléculas toleradas. La regla de *Prelog* [42,43] predice la enantioselectividad de la reducción de cetonas de levadura usando alcohol deshidrogenasas, como catalizador. Esta regla consiste en la relación del tamaño de los dos sustituyentes del grupo carbonilo, en la cetona, durante el acceso al centro activo de la enzima.

El modelo clásico más conocido, la regla empírica de Kazlauskas, indica el reconocimiento quiral de las lipasas [7]. Esta regla prevé la enantioselectividad de

alcoholes secundarios en la PCL, debido a la forma del centro activo de la lipasa. Esta regla puede ser aplicada en la mayoría de las lipasas; debido a que estas enzimas poseen en su centro activo dos bolsillos de diferente tamaño (**Figura 8**).



**Figura 8.** Modelo del sitio activo, representando los distintos modos de enlace de los sustratos quirales R- y S- (R = H, Ac) [7].

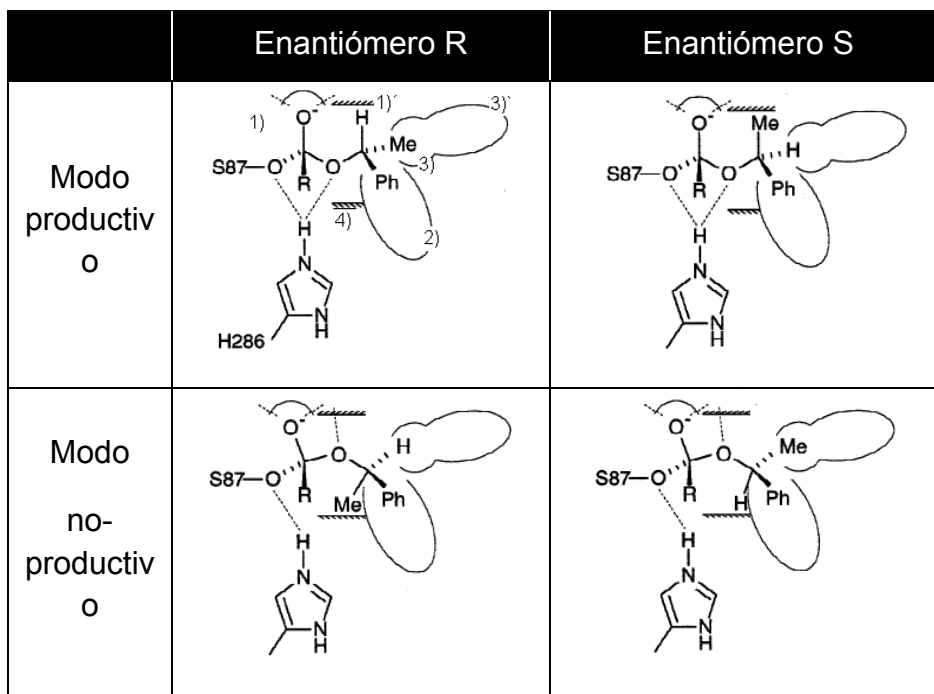
El modelo propuesto por Kazlauskas, *et al.*, 1991 (**Figura 8.**) se basa en la diferencia en el volumen de las cavidades adyacentes a la triada catalítica, de esta manera un mejor ajuste de los grupos adyacentes de un enantiómero permitiría una mayor velocidad de reacción. La **Figura 8.1A**. muestra una acomodación preferencial para que el enantiómero R sea catalizado por la enzima, por otro lado, en la **Figura 7.1B** el enantiómero S se ve obligado a acomodar su voluminoso grupo adyacente, al grupo OH, en la cavidad más pequeña. [8] La regla de Kazlauskas funciona bien para alcoholes secundarios; sin embargo, para los alcoholes primarios no tiene validez [7].

Más tarde, Botta *et al.*, 1997, estudió la hidrólisis de ésteres 2-arilpropionicos quirales en las lipasas *Cándida rugosa* and *Rhizomucor miehei* por docking molecular, utilizando agua como solvente implícito. El modelo consistió en determinar las posibles interacciones (repulsivas y atractivas) que el sustrato presenta en el centro activo, para predecir la posibilidad de la hidrólisis de los sustratos. Los resultados evidencian el cambio conformacional del sitio activo causado por la polaridad del solvente de reacción, esto refleja la importancia de la

polaridad del solvente en la enantioselectividad de la lipasa [44]. Como resultado encontraron que existe probabilidad de hidrólisis de ésteres debido que a hay mayor estabilización en las conformaciones obtenidas, por interacciones con de los aminoácidos vecinos y del protón de la histidina del sitio activo [45].

Hwang *et al.*, 2000, evaluaron el comportamiento del intermediario tetraédrico (**Figura 4e.**) de la hidrólisis de  $\gamma$  y  $\delta$  lactonas quirales utilizando la lipasa de la *Pseudomonas cepacia* (PCL) como catalizador enantioselectivo, mediante simulaciones de dinámica molecular. Los resultados obtenidos, permiten evidenciar una correlación entre el grado de libertad de la His286, producto del impedimento estérico y electrostático ejercido por el sustrato, y la enantioselectividad de la lipasa [37].

Shulz *et al.*, 2000, realizaron estudios de docking molecular de treinta ésteres de ácidos octanóicos en la PCL, con el objeto de evaluar las posibles conformaciones de los sustratos en el centro activo de la lipasa. Los resultados obtenidos muestran la presencia de conformaciones productivas para la hidrólisis del sustrato, i.e., i) el hidrógeno de la histidina catalítica forma puentes de hidrógeno con los oxígenos  $O_{\gamma}$  y  $O$  adyacente al carbono carbonilo, ii) interacción electrostática del  $O$  carbonilo con la cavidad oxígeno aniónica, y modos no productivos. De esta manera, los autores propusieron la existencia de dos modos conformacionales de los enantiómeros al formar el complejo tetraédrico en el centro activo, el modo productivo y el modo no-productivo (**Figura 9**) [23].



**Figura 9.** Modos conformacionales de los enantiómeros en el centro activo. 1) cavidad oxígeno aniónica; 1)' Ausencia de interacciones con la cavidad oxígeno aniónica; 2) Cavidad hidrofóbica; 3) Entrada de la cavidad hidrofílica; 3)' cavidad hidrofílica; 4) Ausencia de interacciones con la histidina.

Oliveira *et al.*, 2001, investigó la resolución de flavonoides en la CALB, este modelo consistió en utilizar docking molecular en tres condiciones diferentes (optimización de la cadena principal y laterales de la CALB fija con el ligando ligeramente fijo, la enzima rígida con el ligando libre, solo se fija la cadena principal de la enzima), para con los resultados finales realizar una dinámica de ellos para estabilizar los posibles puentes de hidrógeno. Principalmente de este modelo se estableció tres parámetros importantes para analizar las conformaciones obtenidas: la distorsión de la proteína, la estabilización de las interacciones de tipo puente de hidrógeno, y la localización de los grupos hidroxilo con respecto a la región compuesta entre la histidina catalítica y el residuo serina [46].

Raza *et al.*, 2001, mediante modelaje molecular estudiaron las formas enlazantes productivas de la esterificación de alcoholes secundarios alifáticos en la CALB. Mediante simulaciones de dinámica molecular a 300 K evaluaron la energía libre de Gibbs de i) el sustrato en el centro activo de la enzima, con la serina acetilada, y ii) el intermediario tetraédrico, como estado de transición. Con estos valores, determinaron la energía de activación y por ende la enantioselectividad. Los valores de energía de activación muestran una enantiopreferencia hacia el estereoisómero R, debido a las interacciones pasivas (interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno no catalíticos) que favorecen las interacciones dinámicas (catalíticas), caso contrario para los enantiómero S. Adicionalmente, el estudio demuestra la importancia de las aguas estructurales para la estabilización de las estructuras estudiadas [23,47].

Más tarde, Ottosson *et. al.*, 2001 [48] se enfocaron en entender la resolución cinética de racematos de alcoholes secundarios alifáticos desde una perspectiva termodinámica, partiendo de la transesterificación de alcoholes mediada por la CALB en hexano y de simulaciones de dinámica molecular del intermediario tetraédrico (**Figura 4e.**). En esta investigación, como en estudios previos, se describió la importancia de la activación entrópica de la enzima en la enantioselectividad. En estudios posteriores, Ottosson *et al.*, 2002 describieron que las contribuciones entálpicas como entrópicas son de igual importancia en la determinación del grado de resolución de las mezclas racémicas [49].

Con el objeto de evaluar el efecto del solvente e inhibidores sobre la conformación del centro activo de la CALB y la lipasa de la *Cándida Rugosa* (CRL), Foresti *et al.*, 2004 estudiaron las conformaciones de las enzimas en presencia de sustratos como etanol y ácido oléico, en medio acuoso y en vacío, mediante métodos QM/MM (PM3/MM2). Los resultados obtenidos muestran que en ausencia de solventes, i.e., en vacío, la absorción de ácido oléico se caracteriza por ser un proceso endotérmico, mientras que en presencia de solventes se convierte en un

proceso exotérmico. Estos resultados evidencian la importancia de realizar las simulaciones con modelos de solvente [50].

Por otra parte, Berendsen *et al.*, 2006 desarrollaron un modelo cinético de la hidrólisis del racemato del 1-metoxi-2-propil-acetato, como éster secundario, a partir de resultados experimentales de su hidrólisis en solución acuosa utilizando la CALB como catalizador. Demostrando que a bajas temperaturas aumenta la enantioselectividad de la CALB, de esta manera se argumenta y corrobora que la temperatura es un factor importante en la enantioselectividad de la lipasa [51].

Con el objeto de construir un modelo teórico, a nivel atómico, de la enantioselectividad de la lipasa *Burkholderia Cepacia* (BCL) en la esterificación de alcoholes secundarios, i.e., etapas d a f de la **figura 4**, Sanje Tomic *et al.*, 2006 evaluaron la reacción de esterificación del 1-fenoxi-2-hidroxitbutano en el sitio activo de la lipasa, i.e., Ser87, His286, Asp264 y los grupos amida protonados de la Leu17 y Gln88, mediante el uso de métodos *ab-initio* y semi-empíricos (AM1). Este estudio analiza la esterificación, como la hidrólisis, partiendo del intermediario tetraédrico de la catálisis enzimática (**Figura 4d.**), sin tener en cuenta el efecto del solvente, la temperatura y el pH. Los resultados revelan la rapidez de la transferencia del hidrógeno, de la His286:H<sub>Nε</sub> al Ser87:O<sub>γ</sub>, y la formación del enlace C-O, del carbono tetraédrico y el Ser87:O<sub>γ</sub>, (con una energía de activación de aprox. 25 Kcal/mol). [37,44] Adicionalmente, este estudio reveló la importancia de los modelos teóricos que involucran la formación y ruptura de enlaces químicos, para describir la enantioselectividad de las enzimas [52].

Con base en resultados experimentales en donde la CALB se caracteriza como la enzima con mayor enantioselectividad en solventes orgánicos (Rebolledo *et al.*, 2005, Berendsen *et al.*, 2006 [51] y Cuiper *et al.*, 1999, entre otros), [40,53,51] es posible diseñar un modelo teórico, a nivel atómico, que pueda describir y predecir la enantioselectividad de la CALB [51]. Este modelo atomístico puede describir el



### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Determinación de la estereoespecificidad de la lipasa.

##### 3.1.1. Elección de las estructuras de partida.

Las geometrías de partida para desarrollar el modelo propuesto fueron las siguientes:

a) La geometría de la lipasa B de la *Cándida Antártica* con el lid abierto, previamente estudiada y modificada por modelamiento molecular en el grupo de investigación.

Esto fue: La proteína con código 1LBT (PDB), resuelta por Difracción de Rayos X [26]. La N-glucosamina unida covalentemente a la Asn74 y el ligando fueron removidos. Se adicionaron los hidrógenos referentes a un estado de protonación proteica a pH 7. Se construyó el modelo de la lipasa esterificada, en la Ser105, utilizando el programa *PyMOL* [54].

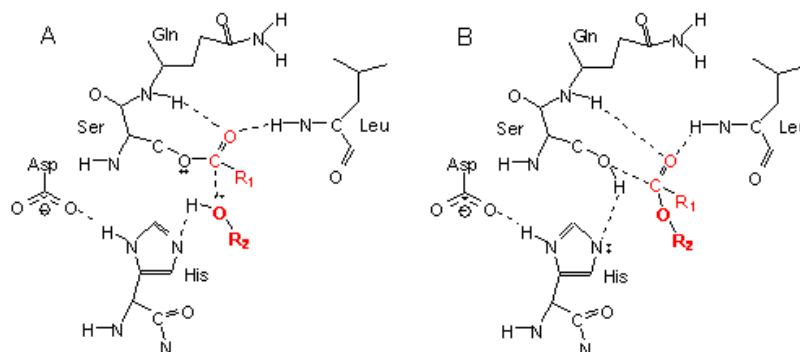
La optimización de geometrías se llevó a cabo mediante minimización de energía; la lipasa, libre o acetilada, se introdujo en una caja cúbica (con una distancia mínima de 1,2 nm entre la proteína y el borde de la caja). Se solvató la proteína con moléculas de H<sub>2</sub>O utilizando el modelo TIP3P [64] ó con tolueno utilizando el modelo propuesto por Marco Fioroni *et al* (2004). [55] Las interacciones de Van Der Waals se evaluaron mediante el potencial de 6 -12 de Lenard-Jones. La optimización de geometría se realizó mediante el método “*Steepest descent*”, [36] bajo condiciones periódicas de contorno y con el campo de fuerza AMBER94, para esta etapa se utilizó el programa GROMACS 3.3.3 [56].

b) La geometría del (R/S)-propanolol y (R/S)-propanolol acetato se generaron utilizando el programa *PyMOL*. Las geometrías de los sustratos se optimizaron, mediante minimización de energía, utilizando el método semi-empírico UHF/PM6 [29] mediante el uso del programa *MOPAC2009* [36].

### 3.1.2. Evaluación de las interacciones proteína-sustrato (ligando).

Se realizó *docking* con el objeto de evaluar las posibles interacciones del sustrato en el sitio activo de la lipasa en solvente implícito agua y tolueno, con el programa AUTODOCK4 [40,41]. Se evaluaron los pasos claves de la catálisis enzimática (**Figura 10**; pasos b.-f.) que comprende las configuraciones lipasa esterificada-alcohol y lipasa-éster, con el fin evaluar la absorción del sustrato en el sitio activo de la lipasa y observar posibles interacciones lipasa-sustrato [10]. El espacio de inserción del sustrato en la enzima correspondió a un cubo, cuya arista es de 15 Å; donde el centro de la celda es el promedio de las posiciones atómicas de los aminoácidos (aa) del sitio activo. Las inserciones del sustrato, en la lipasa rígida, se llevaron a cabo aleatoriamente con el método *Monte Carlo* [57]. Las interacciones entre el sustrato y la enzima, se evaluaron con el campo de fuerza AMBER94; además, para organizar las conformaciones por clusters se utilizó el algoritmo genético Lamarckian (LGA) [30]. En todas las simulaciones se evaluaron quinientas mil (500.000) conformaciones distintas.

Se realizaron dos tipos de simulación de *docking* molecular. El primer tipo es manteniendo rígida la lipasa y el sustrato flexible, i.e. movimientos traslacionales, rotacionales y torsionales de la molécula. Con el objeto de realizar un modelo más próximo a la flexibilidad de la proteína, se realizó el segundo tipo de simulación; donde se mantuvo rígida la lipasa a excepción de los aminoácidos esenciales en el proceso catalítico, i.e., Thr40, Ser105, Gln157, Asp187, His224, Leu278, y el sustrato flexible. Se analizaron los clusters obtenidos teniendo en cuenta las energías de *docking*, de Gibbs, de absorción y las interacciones de dos, tres y cuatro cuerpos (**Figura 11**).



**Figura 11.** A) interacción lipasa acetilada-sustrato, B) interacción lipasa-sustrato esterificado.

### 3.2. Determinación de los estados de transición.

Para los cálculos semi-empíricos, se tomaron los residuos aminoacídicos que forman la triada catalítica (Ser105, Asp187, His224) [26,58], los residuos que están comprometidos en la actividad catalítica (Thr40, Gln157, Leu278) y los sustratos. También se diseñó el intermediario tetraédrico, debido a que se ha determinado experimentalmente [23,46,52]. Así se determinaron dos estados de transición, según la reacción representada en la **Figura 10** pasos c y e.

Los diferentes sistemas se optimizaron usando la metodología PM6/UHF, simulando el solvente acuoso y el tolueno de forma implícita, utilizando el programa MOPAC2009. Durante las optimizaciones se fijaron las posiciones atómicas del *backbone* de cada aminoácido con el objeto de preservar el espacio del sitio activo.

Posterior a la optimización de los reactivos, intermediarios y productos, se localizaron posibles estados de transición, para alcohol-intermediario tetraédrico e intermediario tetraédrico-éster en la enzima, como puntos de silla en la superficie de energía potencial. Teniendo en cuenta que el modelo propuesto de reacción es una sustitución nucleofílica concertada, “SN2” [26], los estados de transición se

localizaron utilizando el método semi-empírico PM6/UHF y la metodología SADDLE [31], con el fin de encontrar la conexión entre las geometrías.

### 3.3. Determinación de las constantes cinéticas de la reacción

#### 3.3.1. Cálculos termodinámicos

Con el objeto de determinar el comportamiento del sistema a diferentes temperaturas (273 a 308 K), se evaluaron propiedades termodinámicas ( $\Delta H$  y  $\Delta S$ ) de los reactivos, productos, intermediarios y estados de transición de cada reacción, con el método semi-empírico PM6 (MOPAC2009). Con estos datos se determinó la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) en cada punto de la reacción y se determinaron las energías de activación en la reacción.

#### 3.3.2. Teoría del estado de transición

Debido a que fue posible obtener las funciones de partición correspondientes a los reactivos, estado de transición y productos [33,59], se determinaron las constantes cinéticas de reacción para cada enantiómero, en cada una de sus etapas como se muestra en la **Figura 10**.

$$k_{(T)} = \frac{k_B Q_{(cen.act.-sus)^*}}{h Q_{cen.act.} Q_{sus}} T^{-2} e^{-\frac{\Delta G_0}{RT}}$$

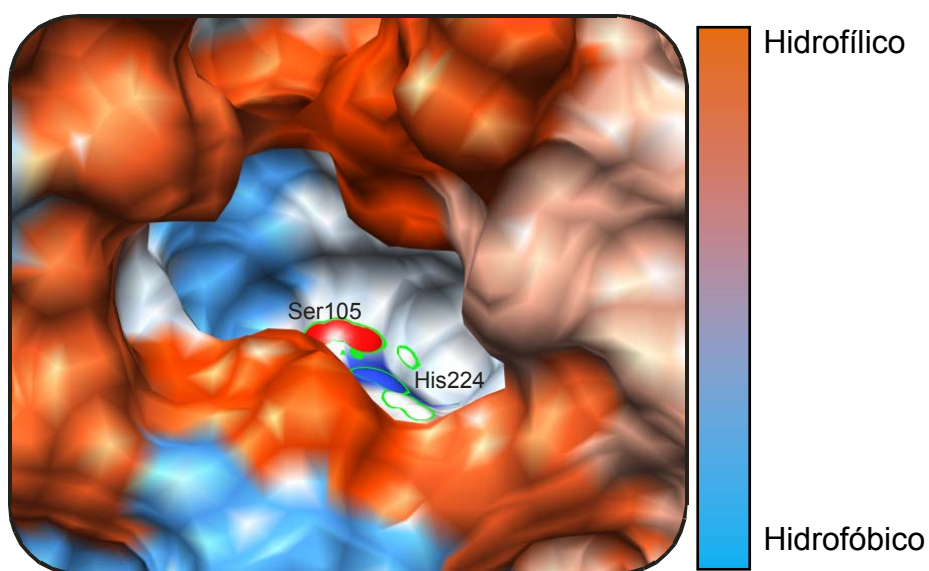
**Ecuación 11.** Determinación de la constante cinética para un enantiómero.  $h$ = constante de Planck,  $k_B$ = constante de Boltzmann,  $T$ = temperatura,  $R$ = constante de los gases,  $\Delta G_0$ = energía de activación a temperatura constante,  $Q_{cen.act.-sus}$ ,  $Q_{cen.act.}$ ,  $Q_{sus}$  = funciones de partición del estado de transición, del centro activo y del sustrato  $j$  respectivamente.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Enantiopreferencia en la absorción del propranolol en la CALB.

#### Hidrofobicidad

Debido a que las características de las cavidades del centro activo de la CALB influyen en la absorción de sustratos, es importante determinar la hidrofobicidad de estas cavidades.



**Figura 12.** Superficie hidrofóbica de la cavidad del centro activo de la CALB. Las marcaciones verdes, representan la ubicación de la Ser105 y la His224, aminoácidos claves en la catálisis enzimática.

En la **Figura 12.** Se observan dos cavidades del centro activo de la CALB; marcados en verde se observan la Ser105 y la His224, aminoácidos catalíticos. Se observa que la cavidad izquierda es altamente hidrofóbica; sin embargo, la zona inferior de esta cavidad es altamente hidrofílica, aunque no es visible en la figura. Este receptor tiene características anfipáticas, i.e. que presenta una doble

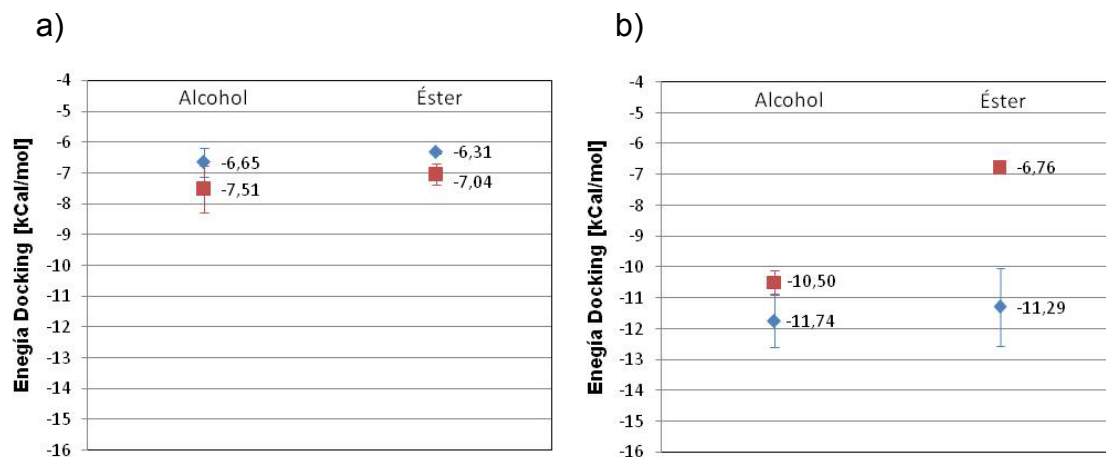
polaridad. Por otra parte, la cavidad derecha posee una tendencia media de hidrofobicidad. Esto indica que puede ser receptor de sustratos con baja polaridad.

Este análisis es importante porque nos permite entender los resultados obtenidos por docking. Específicamente el conocer la superficie hidrofóbica de la enzima nos permite establecer cuáles de las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas son importantes para la orientación del sustrato dentro de la cavidad.

#### **4.1.1. Docking molecular de sustratos en la CALB en medio acuoso.**

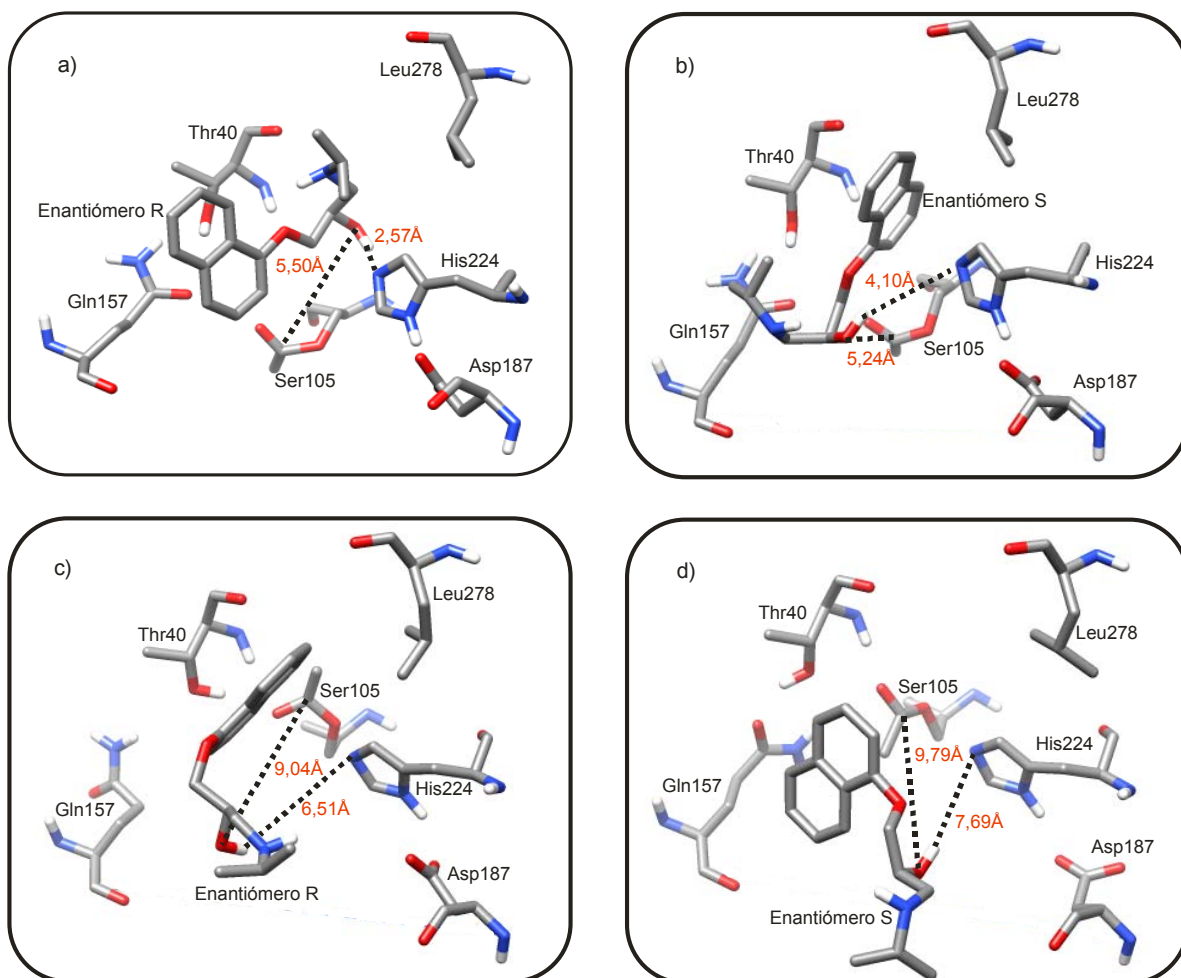
##### **4.1.1.1. Docking molecular del (R/S)-propanolol en la acil-enzima (CALB).**

Las energías de absorción, producto de las simulaciones de docking molecular del (R/S)-propanolol en la acil-CALB rígida, muestran la invariabilidad energética, menor que 1 kCal/mol, entre la absorción del R-propanolol y el S-propanolol (**Figura 13a.**). Sin embargo, las distancias entre los átomos de interés presentan diferencias significativas (**Figura 14.**). La absorción del R-propanolol (**Figura 14a.**) en la acil-CALB adquiere una conformación productiva para la esterificación en la lipasa. Se observa que el hidrógeno, del grupo OH del R-propanolol, se encuentra a 2,57 Å del His224:N<sub>ε</sub>. Por otro lado, la absorción del S-propanolol (**Figura 14b.**) en la acil-CALB adquiere una conformación no productiva. El hidrógeno, del grupo OH del S-propanolol, se encuentra a 4,10 Å, 1,5 Å más lejos que el R-propanolol, del His224:N<sub>ε</sub>. Además, los resultados de docking molecular muestran mayor número de conformaciones del enantiómero R (17/25) dentro del centro activo que el enantiómero S (12/25). Este resultado se debe a que el R-propanolol acomoda mejor el grupo adyacente más voluminoso, el grupo naftilo, mientras que el S-propanolol ubica el grupo naftilo cerca de la His224 del centro activo.



**Figura 13.** Energías docking obtenidas para el (R/S)-propranolol en la acil-enzima (CALB) y el (R/S)-propranolol acetato en la enzima (CALB). a) Docking molecular enzima rígida; b) Docking molecular aa del centro activo flexibles. Se muestra la desviación de los resultados de tres. — Enantiómero R, — Enantiómero S

Las energías de absorción, producto de las simulaciones de docking molecular del (R/S)-propranolol en la acil-CALB con el centro activo flexible, muestran la invariabilidad energética entre la absorción del R-propranolol y el S-propranolol (**Figura 13b.**). Por otro lado, ambos enantiómeros presentan conformaciones no productivas, debido a que sus conformaciones están alejadas, de 6 a 9 Å, de la triada catalítica; sin embargo, el análisis poblacional sugiere que el R-propranolol presenta más conformaciones (7/25) en el centro activo que para el S-propranolol (2/25).



**Figura 14.** Conformaciones de docking molecular en el centro activo de la acil-CALB: a y c) R-propranolol; b y d) S-propranolol. a y b) Docking molecular acil-CALB rígida; c y d) Docking molecular centro activo acil-CALB flexible.

··· Distancia entre los átomos de interés que están involucrados en la transesterificación.

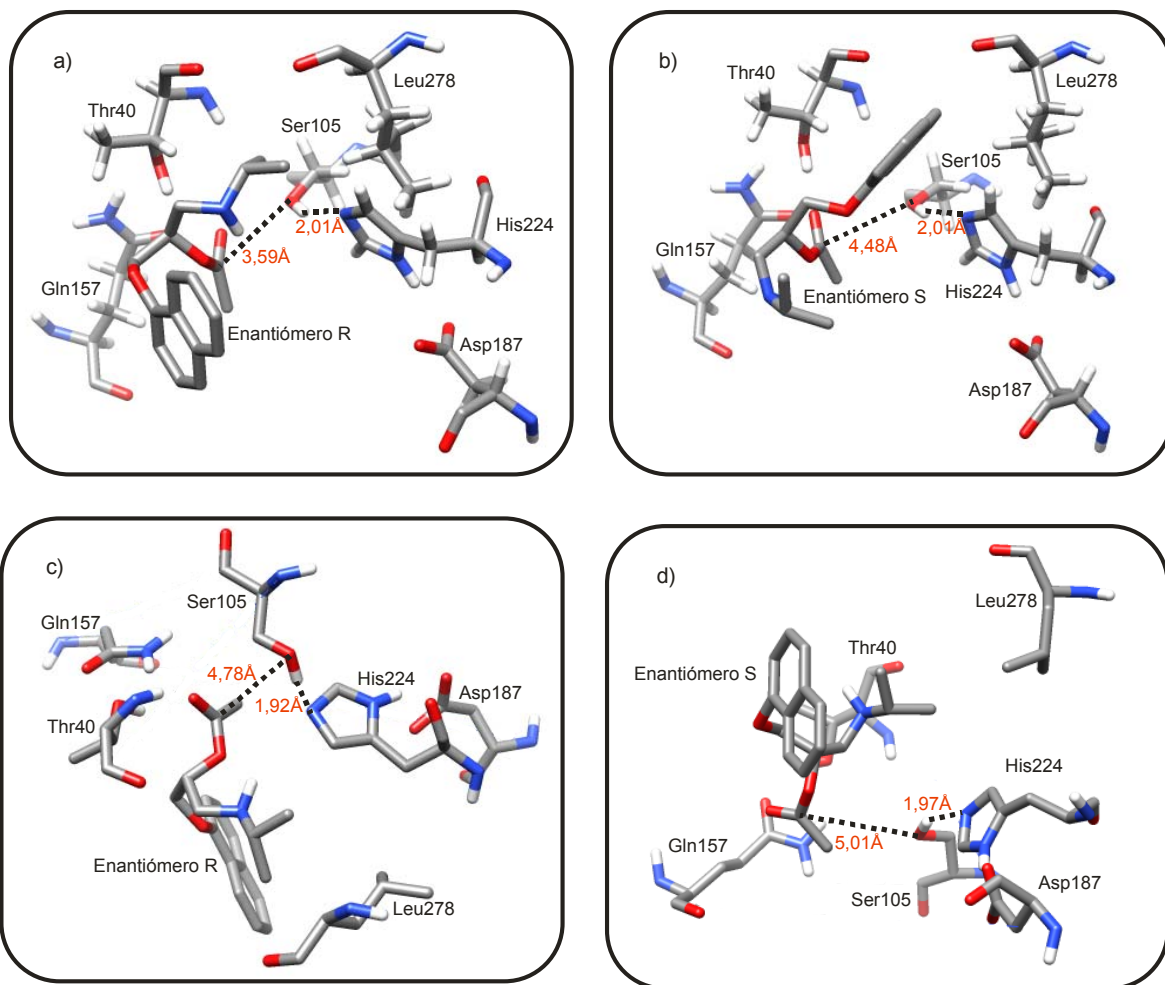
La comparación entre el docking molecular con la acil-enzima rígida y la acil-enzima con el centro activo flexible muestra algunas diferencias conformacionales y energéticas. i) Disminución de la energía de absorción del (R/S)-propranolol, con un intercambio de enantioselectividad. ii) Cambios conformacionales apreciables en los clusters de mínima energía. Los sistemas con la acil-enzima rígida presenta los aminoalcoholes más cerca a la triada catalítica que los sistemas con el centro activo flexible.

#### 4.1.1.2. Docking molecular del (R/S)-propanolol acetato en la enzima (CALB).

Las energías de absorción, producto de las simulaciones de docking molecular del (R/S)-propanolol acetato en la CALB rígida, muestran una diferencia energética casi despreciable, menor que 1 kCal/mol, entre la absorción del enantiómero R y el S (**Figura 13a.**). Por otro lado, las conformaciones de los enantiómeros difieren apreciablemente; sin embargo, son conformaciones productivas (**Figura 15a, 15b**). Por otra parte, el análisis por clusters, donde el S-propanolol-acetato presenta más conformaciones (7/25) que el R-propanolol acetato (2/25), sugiere que la rigidez del sistema beneficia la absorción del enantiómero S.

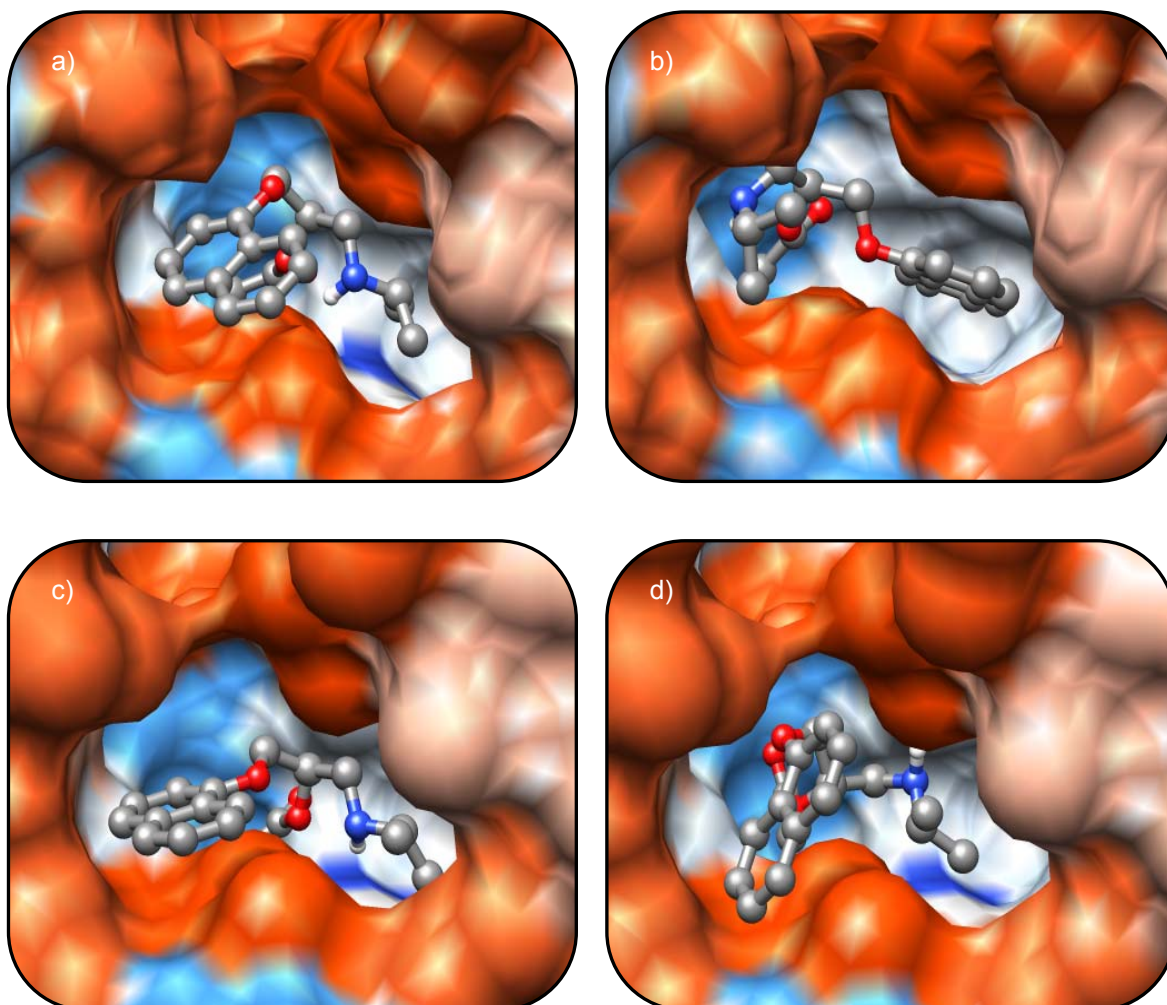
Con el objeto de entender las causas de la preferencia de la CALB hacia el S-propanolol acetato se graficó la conformación más estable del (R/S)-propanolol acetato en la superficie hidrofóbica de la CALB (**Figura 16a, 16b.**). La ubicación del R-propanolol acetato se ve impedido conformacionalmente por la ubicación del grupo naftilo en la boca hidrofílica del centro activo; mientras que el grupo naftilo del S-propanolol acetato se ubica en la cavidad derecha adecuada para un grupo aromático.

Las energías de absorción, de las simulaciones de docking molecular del (R/S)-propanolol acetato en la CALB con el centro activo flexible, muestran una diferencia energética significativa, aprox. 4 kCal/mol, entre la absorción del enantiómero R y el S (**Figura 13b.**). Por otro lado, las conformaciones productivas de los enantiómeros no difieren notablemente (**Figura 15a, 15b**). Sin embargo, la gráfica de las conformaciones enantioméricas en la superficie hidrofóbica de la CALB (**Figura 16c, 16d**), muestra el impedimento conformacional del enantiómero S en el centro activo de la lipasa, ocasionando un aumento en la energía de docking.



**Figura 15.** Conformaciones de docking molecular en el centro activo de la CALB: a y c) R-propranolol acetato; b y d) S-propranolol acetato. a y b) Docking molecular enzima rígida; c y d) Docking molecular centro activo CALB flexible.

··· Distancia entre los átomos de interés que están involucrados en la hidrólisis.



**Figura 16.** Ubicación del sustrato dentro del centro activo de la CALB. a y c) R-propanolol acetato; b y d) S-propanolol acetato. a y b) Docking molecular enzima rígida; c y d) Docking molecular centro activo CALB flexible.

La comparación entre el docking molecular de las simulaciones de la enzima rígida y la enzima con el centro activo flexible muestra algunas diferencias conformacionales y energéticas. i) Disminución de la energía de absorción, exclusivamente del R-propanolol acetato. ii) Cambios conformacionales apreciables en el clusters de mínima energía para el S-propanolol acetato (**Figura 15b, 15d, 16b y 16d**).

Con base en los resultados generales de la **Figura 13.**, energéticamente la CAL-B tiene mayor selectividad y absorción con el R-propranolol y su éster, presentando conformaciones más estables. Esto se debe a la libertad del centro activo, que permite que los aminoácidos que intervienen en la reacción de transesterificación ó hidrólisis, se acomoden de tal forma que el centro activo encuentra conformaciones más estables al ingresar el R-propranolol y su éster. Estos últimos ubican de forma adecuada los anillos aromáticos en la parte exterior del centro activo y/ó en la parte hidrofóbica, caso contrario sucede con el enantiómero S, que ubica su parte hidrofóbica en zonas de menor hidrofobicidad dentro del centro activo formando estructuras docking menos energéticas por ser electrónicamente menos atractivas.

Se observó también que la enzima podría catalizar con mayor facilidad la hidrólisis de los esteres del fármaco (R/S-propranolol acetato) debido a que las conformaciones encontradas se adecuan de forma apropiada en el centro activo, dejando expuesto los átomos involucrados en la reacción a distancias muy cercanas. Caso contrario sucede en el docking con el R/S-propranolol donde hay conformaciones más estables pero mucho más alejadas de la triada catalítica (His224, Ser105, Asp187), el cual dificulta llevar a cabo la esterificación del fármaco. Para comprobar esto es necesario tener en cuenta un perfil de reacción.

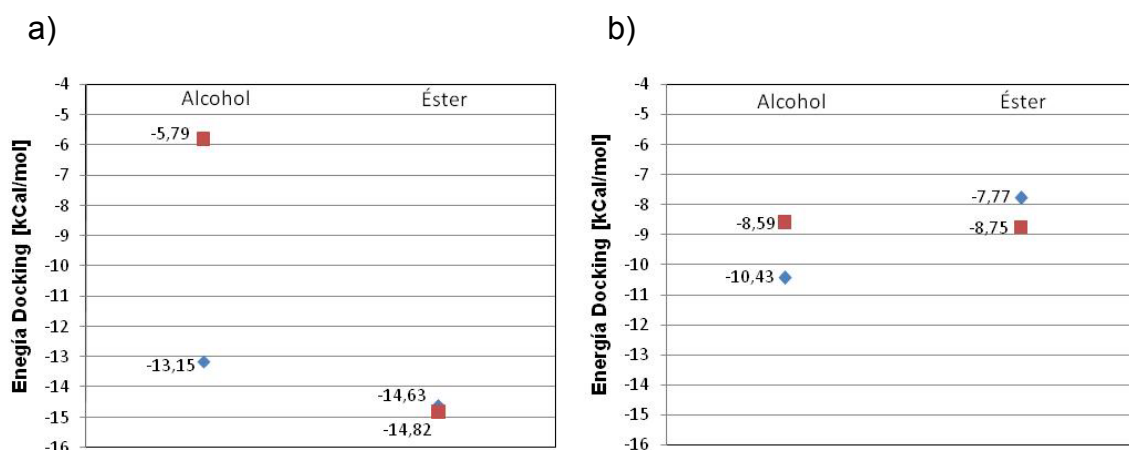
A modo comparativo, las conformaciones obtenidas con docking rígido indican mayor selectividad enzimática para el S-propranolol acetato ya que presentan mayor número de conformaciones favorecidas, y con respecto al enantiómero R, existiría la posibilidad de un equilibrio entre la esterificación y la hidrólisis. Sin embargo, la enzima experimentalmente no se encuentra rígida, por tanto, es posible observar que la absorción se ve favorecida para el enantiómero R en docking molecular con el centro activo de la enzima flexible. En este último docking se concluye que energéticamente la CAL-B es más selectiva para el R-propranolol acetato, presentando conformaciones favorables en la absorción del

acetato implicando que, en gran parte, la selectividad de la enzima puede deberse a la acomodación espacial de los aminoácidos principales y no la conformación general de las cavidades del centro activo.

#### **4.1.2. Docking molecular de sustratos en la CALB en medio orgánico, tolueno.**

##### **4.1.2.1. Docking molecular del (R/S)-propanolol en la acil-enzima (CALB).**

Las energías de absorción, producto de las simulaciones de docking molecular del (R/S)-propanolol en la acil-CALB rígida en solvente orgánico implícito, muestran una variabilidad energética, de 7,36 kCal/mol, entre la absorción del R-propanolol y el S-propanolol (**Figura 17a**). Esto indica que la enzima presentó mayor preferencia hacia el enantiómero R, debido a que las cavidades del centro activo son más favorables para la ubicación espacial del R-propanolol. Sin embargo con respecto a las distancias de los átomos de interés en la reacción, se encontró que tanto para el enantiómero R ó S son similares (**Figura 18a, 18b**). Con base en esto es posible determinar que hay mayor absorción del R-propanolol en el centro activo ya que presenta conformaciones más estables que su homólogo, además, presenta mas clusters (5/25) con conformaciones productivas.

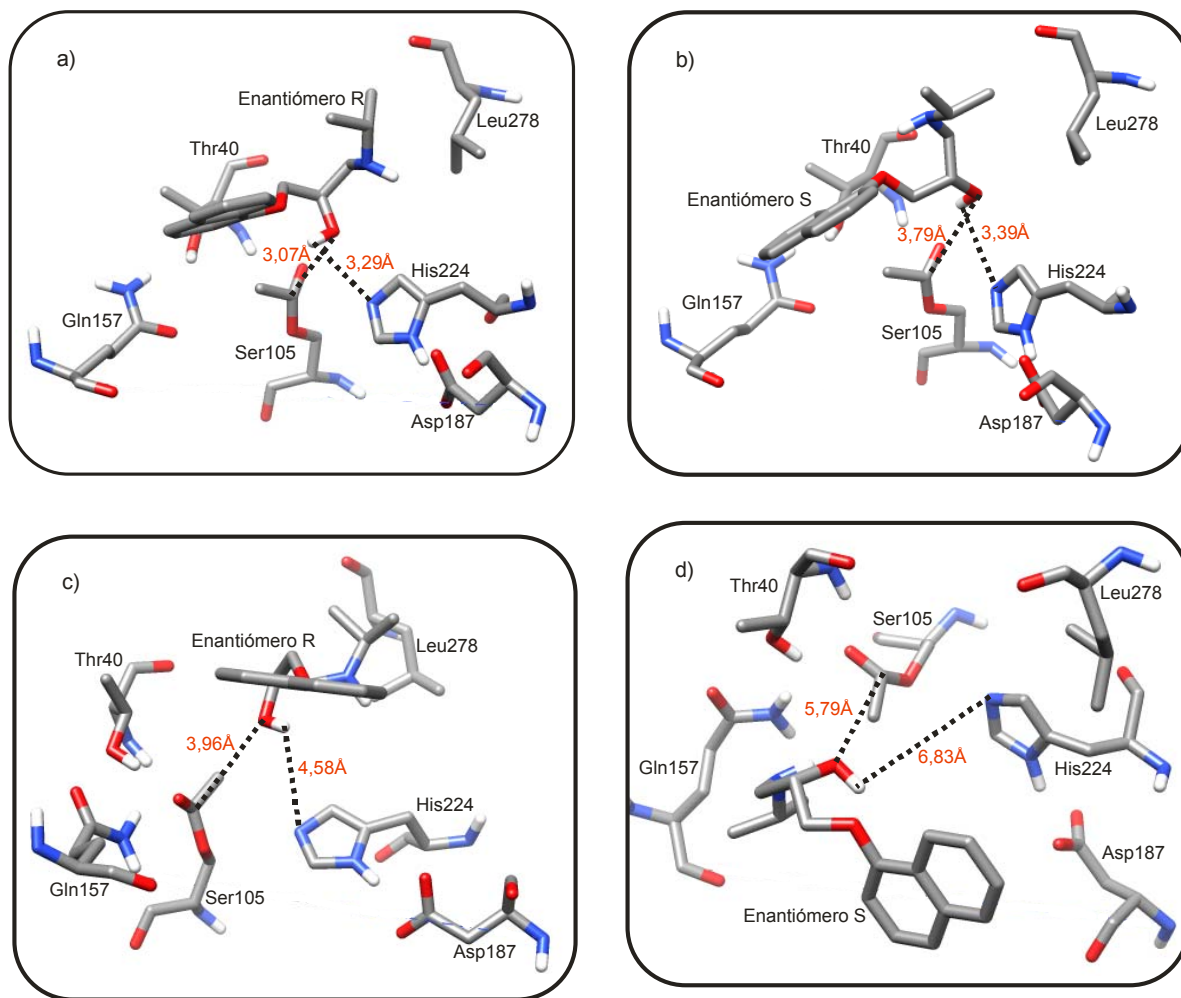


**Figura 17.** Energías docking obtenidas para el (R/S)-propranolol en la acil-enzima (CALB) y el (R/S)-propranolol acetato en la enzima (CALB). a) Docking molecular enzima rígida; b) Docking molecular aa del centro activo flexibles. ◆ Enantiómero R, ■ Enantiómero S

Las energías de absorción, producto de las simulaciones de docking molecular del (R/S)-propranolol en la acil-CALB con el centro activo flexible en solvente orgánico implícito (constante dieléctrica= 2,4), muestran una variabilidad energética, de 1,84 kCal/mol, entre la absorción del R-propranolol y el S-propranolol (**Figura 17a.**). Se encontró que en tolueno las energías docking son más favorables para el enantiómero R, lo mismo sucede con las distancias de los átomos de interés del sustrato con el sitio activo para catalizar la transesterificación (**Figura 18c, 18d**). También se encontró que son mayores las conformaciones del R-propranolol (R-propranolol= 6/25, S-propranolol= 4/25) que pueden ser posibles para llevar a cabo la reacción (esterificación), y se caracterizan por ubicar principalmente los anillos aromáticos del sustrato en la entrada del centro activo, evitando tener contacto con sus alrededores por repulsiones electrofílicas. De forma contraria sucede para el enantiómero S, que ubica el anillo cerca de las paredes de la entrada del centro activo, provocando repulsiones que desfavorecen las energías de docking.

De lo anterior se concluye que podría existir preferencia en la absorción de la CALB con el R-propranolol, en medio tolueno, debido a que la conformación estructural del centro activo es más abierta, permitiendo un mayor acceso de

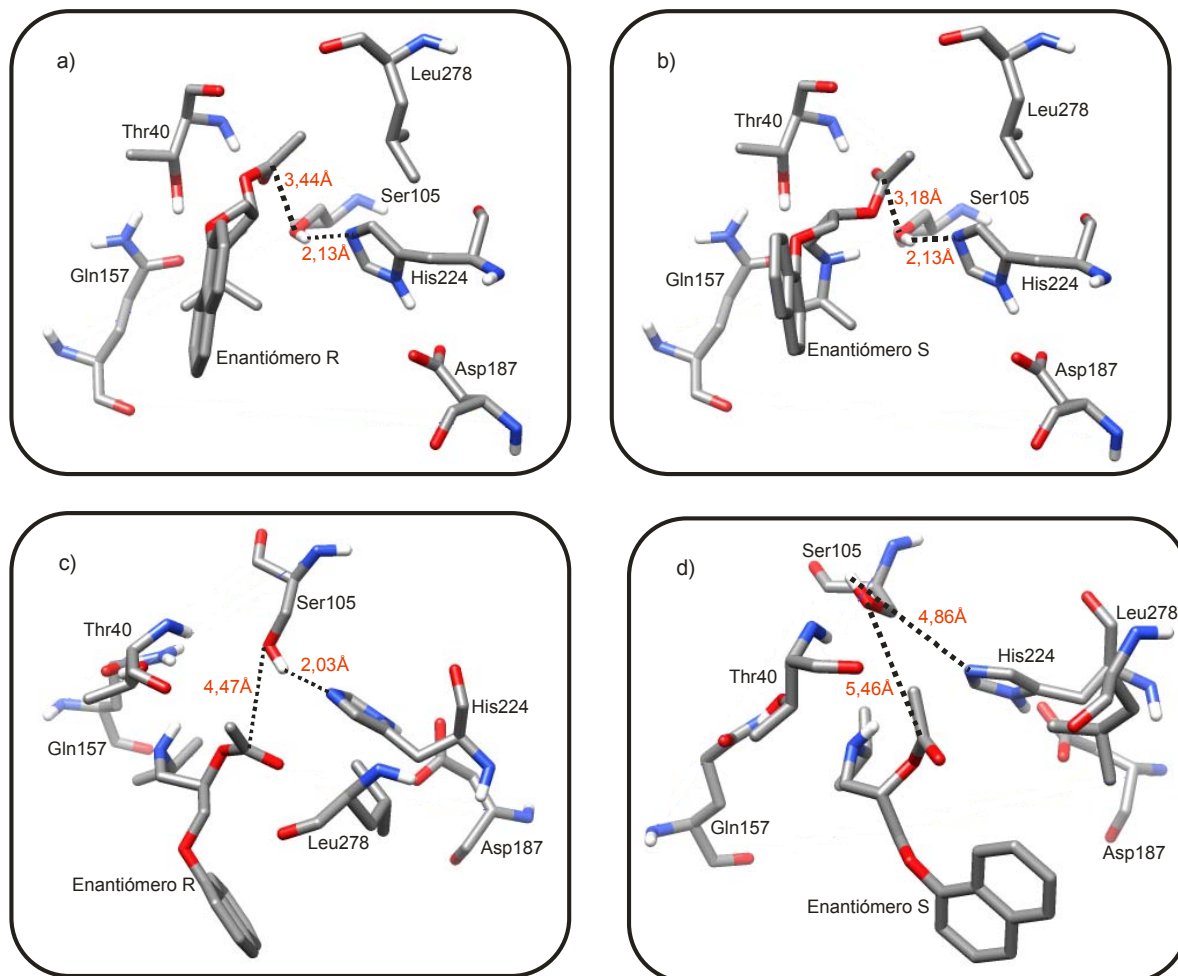
ambos sustratos al centro activo, a diferencia de lo que ocurre cuando se utiliza un medio acuoso. En este último caso las conformaciones obtenidas muestran los sustratos muy alejados de la triada catalítica (Ser105, Asp187 y His224).



**Figura 18.** Conformaciones de docking molecular en el centro activo de la acil-CALB: a y c) R-propanolol; b y d) S-propanolol. a y b) Docking molecular acil-CALB rígida; c y d) Docking molecular centro activo acil-CALB flexible.

··· Distancia entre los átomos de interés que están involucrados en la transesterificación.

#### 4.1.2.2. Docking molecular del (R/S)-propanolol acetato en la enzima (CALB).



**Figura 19.** Conformaciones de docking molecular en el centro activo de la CALB: a y c) R-propanolol acetato; b y d) S-propanolol acetato. a y b) Docking molecular enzima rígida; c y d) Docking molecular centro activo CALB flexible.

··· Distancia entre los átomos de interés que están involucrados en la hidrólisis.

Las energías de absorción del (R/S)-propanolol acetato en la CALB rígida (**Figura 17a**) no presentan diferencias significativas, ya que muestran conformaciones energéticamente similares. Por otra parte, los átomos que están involucrados en la reacción de hidrólisis son equidistantes (**Figura 19a, 19b**), ajustándose ambos

enantiómeros perfectamente dentro del centro activo de la enzima; posiblemente debido a que el centro activo se encuentra en una forma más abierta, facilitando la entrada para ambos enantiómeros. Este resultado sugiere que la CALB pierde su alta capacidad selectiva.

De lo anterior se concluye que para determinar la preferencia de absorción de los sustratos es importante realizar un docking molecular que permita la libertad de los aminoácidos principales del centro activo con el objeto de aumentar la enantioselectividad del centro activo de la lipasa.

Los resultados obtenidos del docking molecular del (R/S)-propanolol acetato sobre la CALB con el centro activo flexible en solvente orgánico muestran energías de absorción muy similares entre ambos enantiómeros (**Figura 17b**). Sin embargo, las conformaciones encontradas demuestran preferencia sobre el enantiómero R. Las conformaciones del S-propanolol acetato muestran el hidrógeno de la Ser105 se ubica en dirección opuesta a la posición del N<sub>ε</sub> de la His224 dificultando la transferencia del hidrógeno a la His224 (mecanismo de la hidrólisis de ésteres). Ver **Figura 19d**. Por otro lado el enantiómero R es quien presenta conformaciones productivas, en las cuales el hidrógeno de la serina catalítica se ubica en dirección hacia el N<sub>ε</sub> de la His224, el enantiómero se ubica en el centro activo mostrando menores distancias con los átomos de la triada catalítica y la ubicación de la parte hidrofóbica del sustrato en la entrada del centro activo.

Teniendo en cuenta los resultados generales de las energías de absorción de los aminoalcoholes y los aminoésteres en la CALB (**Figura 17a.**) se establece que la mezcla racémica se puede resolver por la hidrólisis de los ésteres, debido a que el R-propanolol presenta más afinidad en el centro activo que el S-propanolol, dificultando su liberación del centro activo.

La enantioselectividad de la lipasa no se debe a la proximidad de los átomos de interés involucrados en la reacción, sino a la diferencia considerable de la energía de absorción entre los enantiómeros que se debe a las interacciones repulsivas y disposición espacial que presenta el grupo amino del aminoalcohol con los diferentes aminoácidos ubicados en la superficie del centro activo.

Para concluir, con base en los resultados obtenidos por docking rígido sería posible obtener mayor resolución de la mezcla racémica si se induce hidrólisis del S-propanolol acetato, debido a que la CALB retiene el R-propanolol en el centro activo.

La **Figura 17b**. muestra el favorecimiento de la absorción del R-propanolol, en modo productivo, en el centro activo de la acil-enzima. Esto induce su retención. Por otro lado el R-propanolol acetato presenta mayor energía de absorción, favoreciendo su liberación. Con respecto al enantiómero S, no se observan diferencias en las energías de absorción del aminoalcohol o el aminoéster en el centro activo de la lipasa. Además, la ubicación del S-propanolol acetato en el centro activo de la enzima es de modo no productivo.

Las **Figura 17a y 17b**. reflejan la comparación entre las energías de absorción de los sustratos cuando la enzima está totalmente rígida y cuando el centro activo de la enzima presenta flexibilidad, en solvente orgánico. Estos resultados sugieren la importancia de la flexibilidad del centro activo en la absorción de sustratos. Las diferencias presentes en la figuras son: i) la inversión en la preferencia de la absorción de los aminoalcoholes, ii) la inducción de la enantioselectividad de los aminoésteres.

Adicionalmente, las diferencias conformacionales de los dos tipos de simulaciones de docking molecular son apreciables. Primero, se observa que en el docking rígido los aminoalcoholes presentan mayor proximidad a la triada catalítica, de

modo productivo, que en el docking con el centro activo flexible. Segundo, en el docking rígido no se presentó enantiopreferencia, energéticamente como conformacionalmente, sin embargo, con el docking molecular, con el centro activo de la lipasa flexible, se presentó enantiopreferencia conformacional, evidenciada por la aparición de un modo no productivo para el S-propanolol acetato.

#### **4.1.3. Confrontación resultados docking**

En los resultados docking molecular se observó el favorecimiento de la absorción, en modo productivo, del (R/S)-propanolol acetato en la CALB, especialmente para el enantiómero R. Sin embargo, es importante comparar las características de absorción en solvente acuoso u orgánico. En agua se encontró que ambos enantiómeros presentan igual cantidad de conformaciones (5/25) absorbidas en el centro activo de la lipasa; sin embargo, energéticamente hay mayor preferencia sobre el enantiómero R. Por otra parte, cuando analizamos los resultados obtenidos en tolueno, se obtuvo que sólo para el enantiómero R hay conformaciones (2/25) de modo productivo. Esto último puede ser un indicio de como experimentalmente ocurre la enantiopreferencia de la CALB hacia aminoalcoholes en solventes orgánicos.

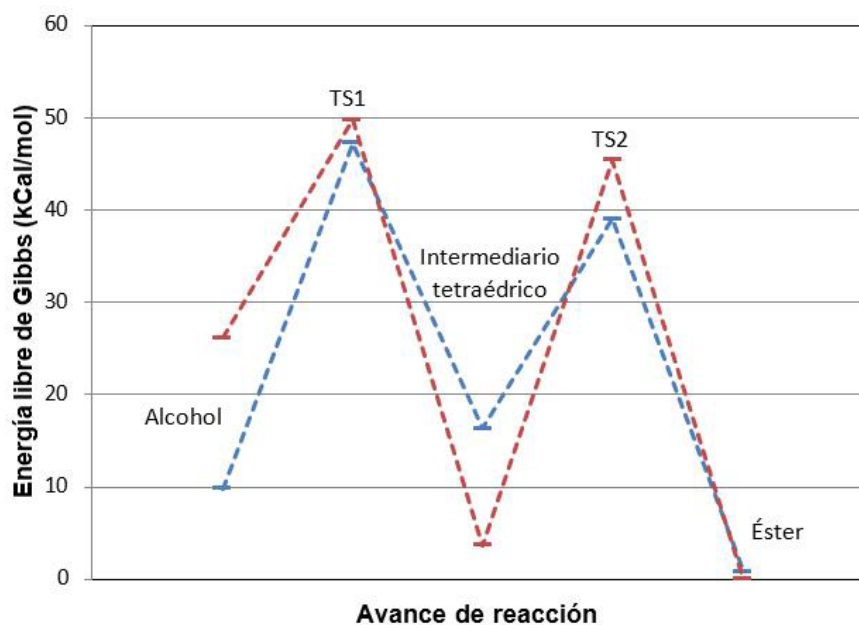
Por otro lado, se observó que las conformaciones de los aminoácidos del centro activo obtenidas en tolueno son mas repetitivas, y consistentes con modos productivos, debido a que el solvente tiene un menor grado de polarización eléctrica, favoreciendo las interacciones del hidrogeno del N<sub>δ</sub> de la His224 con los O<sub>δ</sub> del Asp187, indispensables en la actividad catalítica de la enzima. Esta observación está de acuerdo con los resultados experimentales presentados en la literatura, donde la enantioselectividad de la CALB aumenta en solventes orgánicos como el tolueno [8].

## 4.2. Cinética y termodinámica de la reacción de esterificación del (R/S)-propanolol en la CALB.

Con el fin de esclarecer la resolución cinética de la mezcla racémica del (R/S)-propanolol, se desarrolló un modelo cinético y termodinámico, en agua y tolueno, evaluando el perfil de reacción. El perfil de reacción, asociado a la **Figura 4.d-f**, involucra dos etapas en la reacción de esterificación (1<sup>a</sup> etapa: formación del intermediario tetraédrico a partir del complejo acil-enzima - propanolol; 2<sup>a</sup> etapa: formación del complejo enzima - propanolol acetato a partir del intermediario tetraédrico) con el fin de determinar los estados de transición para analizar las energías de activación y el tipo de conformaciones que se obtienen (productivo ó no productivo). Adicionalmente, se determinó las causas termodinámicas de la reacción de esterificación del (R/S)-propanolol, en el centro activo de la CALB, como la espontaneidad con base en la entalpía y entropía de reacción a diferentes temperaturas.

### 4.2.1. Cinética y termodinámica de esterificación en medio acuoso.

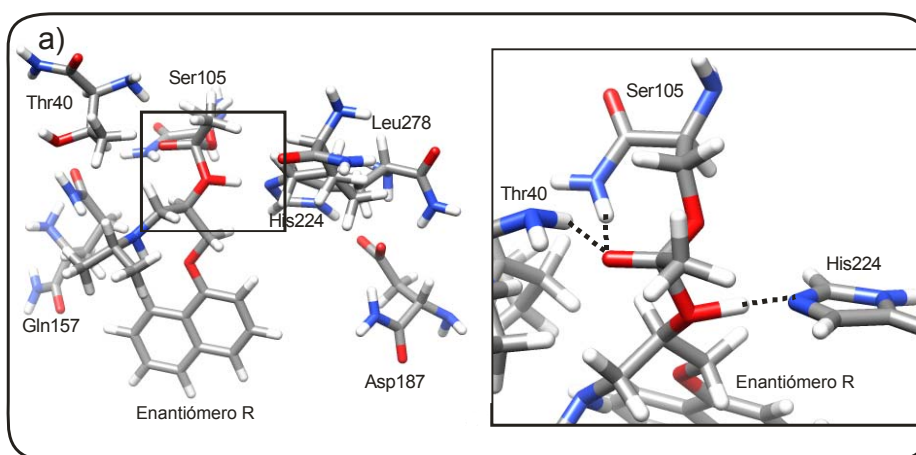
El perfil de reacción en medio acuoso a 298 K se muestra en la **Figura 20**. De la figura se deduce que la reacción de esterificación de los alcoholes es exotérmica. La reacción avanza a través de un intermediario mas estable del isómero R que el del S propanolol. Aunque la reacción favorece cinéticamente el avance del S propanolol, la estabilidad del intermediario R hace que la constante final de reacción sea favorecida para este enantiómero. Después de alcanzar el estado intermedio se observa que la reacción favorece la producción cinética del R-ester debido a que esta ruta presenta menor energía de activación. Finalmente los productos presentan energías estadísticamente idénticas, lo cual hace pensar que la reacción es finalmente controlada por la estabilización termodinámica. Visto de manera reversible, en la **Figura 20** se observa que la reacción favorece la producción del R-propanolol, debido a que las dos barreras energéticas son menores, tanto la formación de intermediario como la de formación del alcohol.

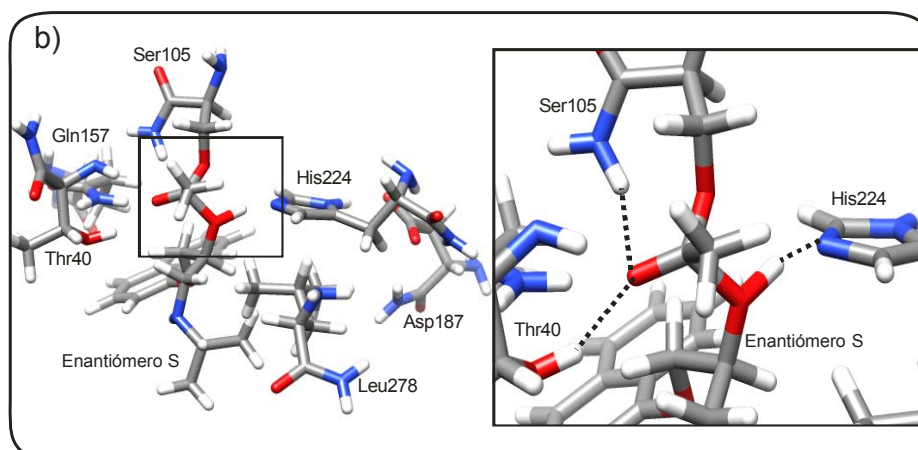


**Figura 20.** Perfil energético de la reacción de esterificación del (R/S)-propanolol, en el centro activo de la CALB.

— Enantiómero R, — Enantiómero S

Con el fin de determinar la cinética de la reacción para la resolución del (R/S)-propanolol, se obtuvo una aproximación de los estados de transición y energías de activación de cada etapa de la reacción (1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> etapa).



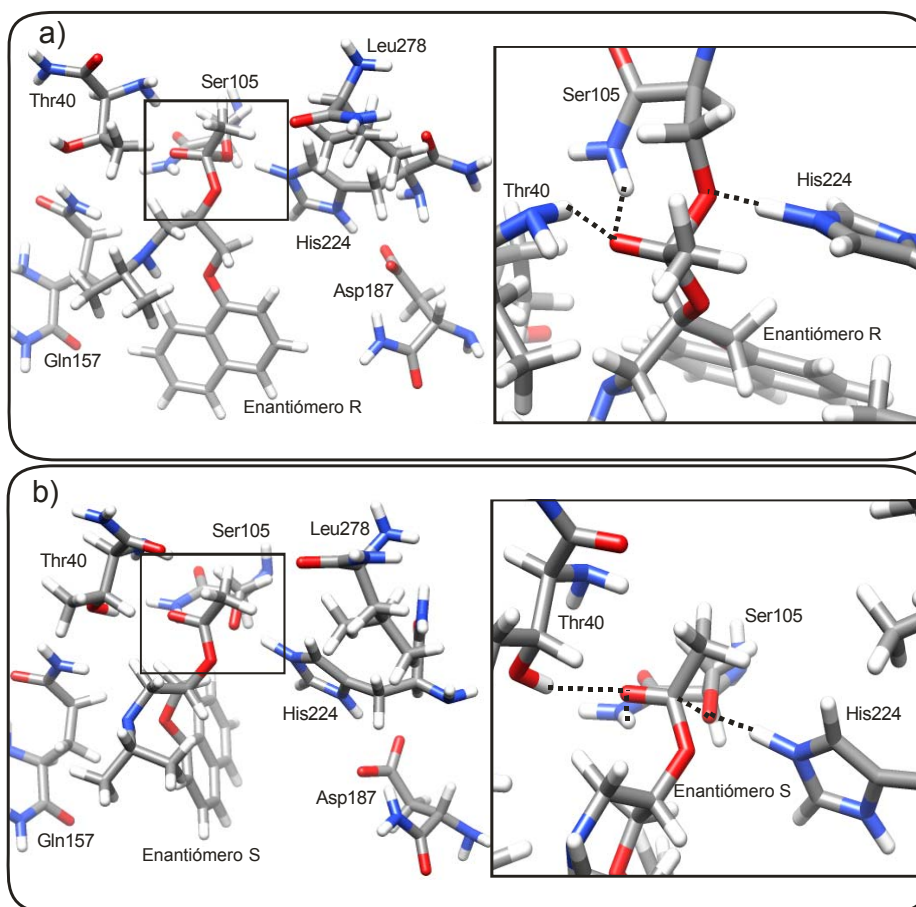


**Figura 21.** Estado de transición de la 1ª etapa (propranolol-intermediario tetraédrico). El cuadro representa una aproximación de los átomos de interés que están involucrados en la formación, estabilización y rompimiento de enlaces para obtener el intermediario tetraédrico. a) enantiómero R, b) enantiómero S. ... representa las interacciones principales.

Primero se buscó una aproximación al estado de transición de la 1ª etapa (TS1) para la esterificación del (R/S) propranolol (**Figura 21.**). Se observó para el sustrato R estabilización del oxígeno del carbonilo por hidrógenos de los grupos amino de la Thr40 y Ser105, pertenecientes a la cadena peptídica de la CALB, lo cual permite alcanzar el estado de transición con mayor facilidad. De igual manera sucede para el enantiómero S, aunque el oxígeno del carbonilo se estabiliza con el hidrógeno del grupo amino Ser105 y con el alcohol del Thr40. Estos resultados visualizados corresponden a los mecanismos propuestos por diferentes autores [27,55,56,61] donde se propone una estabilización del oxígeno del carbonilo durante la reacción catalítica por grupos amino de la cadena peptídica de la enzima, sin embargo, para este estudio se encontró que la estabilización del sustrato S, para este caso específico, se estabiliza con un grupo amino (Ser105) y un alcohol (Thr40).

Con respecto al perfil energético de la 1ª etapa (Alcohol→TS1) se obtuvo que el S-propranolol es cinéticamente favorable, debido a que presenta menor energía de

activación a diferencia de su homólogo, ya que requiere 13,8366 kCal/mol por encima del TS1 del S-propanolol (**Figura 20**).



**Figura 22.** Estado de transición de la 2<sup>a</sup> etapa (intermediario tetraédrico-propanolol acetato). El cuadro representa una aproximación de los átomos de interés que están involucrados en la formación, estabilización y rompimiento de enlaces para obtener el propanolol acetato. a) enantiómero R, b) enantiómero S.

Para analizar la 2<sup>a</sup> etapa, se utilizó la aproximación del estado de transición (TS2) para la obtención de los productos. Al igual que en el caso anterior (1<sup>a</sup> etapa) hay estabilización del oxígeno del carbonilo por 2 grupos amino (Thr40, Ser105) para el enantiómero R, y para el S, el oxígeno se estabiliza por un –OH (Thr40) y un

grupo amino (Ser105), siendo de nuevo acorde a los mecanismos propuestos por otros autores (**Figura 22.**).

Con respecto a esta etapa (intermediario tetraédrico→TS2), se obtuvo que el enantiómero R es preferente cinéticamente en esta etapa de la reacción debido a que el enantiómero S requiere 19,0197 kCal/mol más, para llegar al estado de transición (**Figura 20.**).

En conclusión se encontró que la etapa determinante de la velocidad para la esterificación del R-propanolol es la primera etapa y para el S-propanolol es la segunda etapa por ser las más lentas, por tanto al esterificar los sustratos es posible que no se obtenga una alta resolución de ellos, debido a que en cada etapa un enantiómero tiene menor energía de activación con respecto al otro. Para comprobar esto, es importante determinar las constantes cinéticas en cada etapa de la reacción.

Sin embargo de acuerdo con la literatura [8], la resolución experimental de mezclas racémicas en solvente acuoso se da principalmente por hidrolisis de sus esterés debido a que la lipasa cataliza reacciones reversibles, por lo tanto es necesario evaluar la cinética en dirección contraria a la esterificación. Para lograr esto, evaluamos el perfil de reacción de forma inversa etiquetando la 2<sup>a</sup> etapa como 2<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa y la 1<sup>a</sup> etapa como 1<sup>a</sup><sub>inv.</sub> Etapa.

Primero se analizó la 2<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa ((R/S)-propanolol acetato→TS2) para la obtención del intermediario tetraédrico. En esta etapa se obtuvo que el enantiómero mas favorecido cinéticamente es el R-propanolol acetato debido a que requiere 7,2215 kCal/mol menos que su homólogo para alcanzar el estado de transición (**Figura 20.**).

Para determinar si hay resolución de enantiómeros por hidrólisis, se evaluó también la 1<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa de la reacción (Intermediario tetraédrico-TS1), y se obtuvo de nuevo que la energía de activación del enantiómero R es menor que la de su homólogo, aproximadamente en 15.1553kCal/mol (**Figura 20.**).

Por último se concluyó que el R-propanolol acetato es más favorable cinéticamente que el S-propanolol acetato, debido a que presenta menores energías de activación en ambas etapas de la reacción; por tanto, al hidrolizar el propanolol acetato se debe obtener una resolución racémica, por la formación preferencial del R-propanolol. Estos resultados son coherentes con resultados experimentales en resolución de racematos mediados por lipasas en medio acuoso [8].

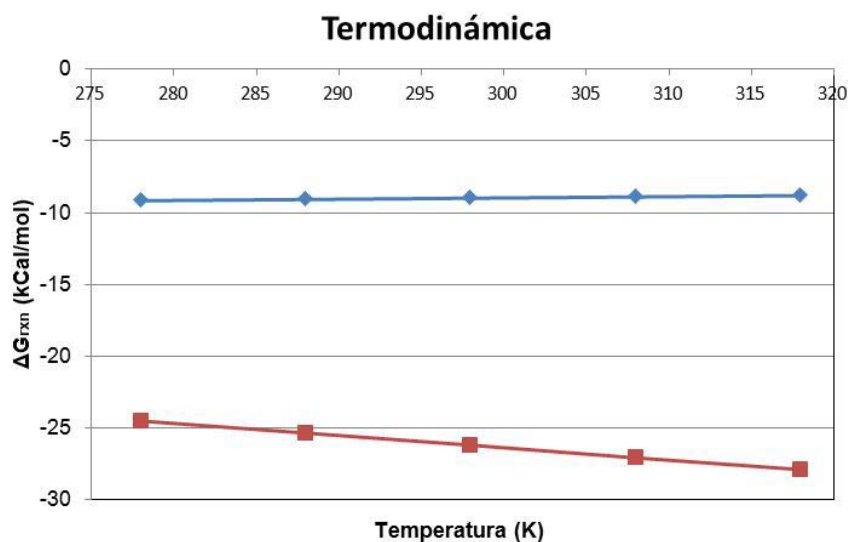
Por otro lado, se evaluó el comportamiento termodinámico de la reacción a diferentes temperaturas, ver **Tabla 3**. De esta manera se puede apreciar cómo afecta la espontaneidad de la reacción las diferentes contribuciones entálpicas y entrópicas, de cada uno de los enantiómeros.

Se encontró que la esterificación del (R/S)-propanolol es más espontánea para el enantiómero S, sin embargo es más exotérmica ( $\Delta H_{rxn}^R = -11,5756\text{kCal/mol}$ ;  $\Delta H_{rxn}^S = -0,9621\text{kCal/mol}$ ) para el R. Si la reacción se evalúa de forma inversa, i.e. la hidrólisis del (R/S)-propanolol acetato, el proceso no es espontáneo y el equilibrio termodinámico favorece al R-propanolol.

Temperatura (K)	$\Delta G_{rxn}$ (kCal/mol)		$\Delta H_{rxn}$ (kCal/mol)		$\Delta S_{rxn}$ (kCal/molK)	
	Sustrato R	Sustrato S	Sustrato R	Sustrato S	Sustrato R	Sustrato S
278	-9,1614	-24,4973	-11,4690	-1,1650	$-8,3010 \cdot 10^{-3}$	$8,3929 \cdot 10^{-2}$
288	-9,0763	-25,3377	-11,5340	-1,0620	$-8,5337 \cdot 10^{-3}$	$8,4291 \cdot 10^{-2}$
298	-8,9896	-26,1833	-11,5980	-0,9630	$-8,7533 \cdot 10^{-3}$	$8,4632 \cdot 10^{-2}$
308	-8,9007	-27,0619	-11,6620	-0,8650	$-8,9653 \cdot 10^{-3}$	$8,4955 \cdot 10^{-2}$
318	-8,8100	-27,8820	-11,7260	-0,7690	$-9,1699 \cdot 10^{-3}$	$8,5261 \cdot 10^{-2}$

**Tabla 3.** Termodinámica de la esterificación del (R/S)-propanolol a diferentes temperaturas (298-318K).

Al graficar los resultados de la **Tabla 3**, se encontró que la temperatura de la reacción tiene mayor influencia en la esterificación del enantiómero S. De acuerdo con la tabla, este comportamiento se debe a que el factor entrópico predomina en la reacción, contrario al comportamiento observado para la esterificación del enantiómero R, donde la reacción es controlada por la disminución de la entalpía de reacción. En la Figura 23 se aprecia la disminución de la energía libre para la reacción de esterificación del S propanolol, mientras que para la reacción de R propanolol no se observa tal cambio. De nuevo la disminución en la energía libre para el enantiómero S es consecuencia del aumento de la temperatura, por consiguiente del aumento en la entropía del sistema. La reacción de esterificación del R propanolol muestra una alta estabilización en entalpía. También se observa que la entropía para esta reacción es negativa, lo cual implica un menor número de configuraciones posibles del producto en los alrededores del centro activo. La dependencia con la temperatura para esta reacción es por lo tanto menor como se observa en la **Figura 23**.



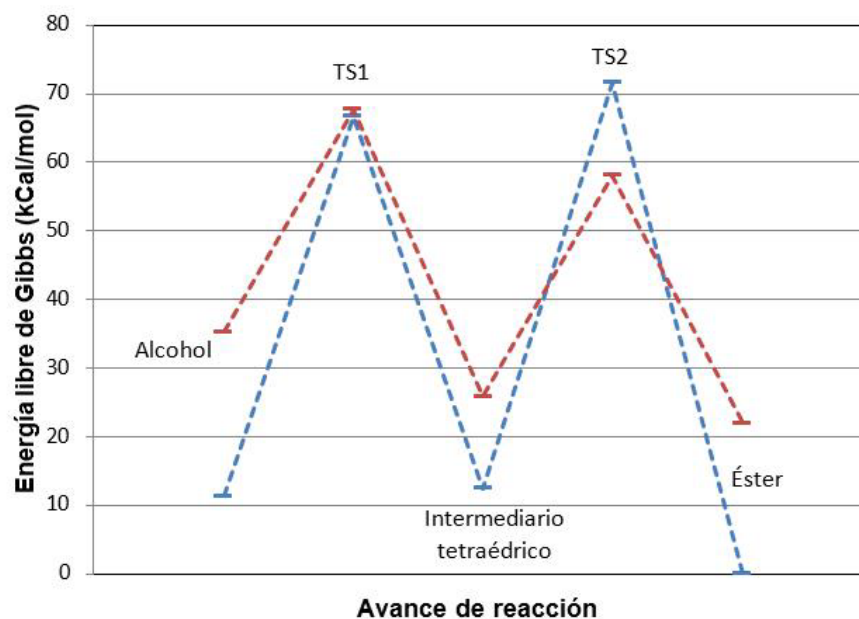
**Figura 23.** Efecto de la temperatura en el  $\Delta G$  de reacción del (R/S)-propanolol en agua.  
— Enantiómero R, — Enantiómero S

Se puede concluir que la temperatura es un factor importante para la esterificación o hidrólisis del R/S-propanolol o R/S-propanolol acetato, respectivamente. Aunque

la esterificación del S-propanolol es más favorable termodinámicamente que la del R-propanolol, del perfil energético se puede deducir que la reacción está controlada por la cinética de reacción del R-propanolol. En el caso reversible, la hidrólisis se ve favorecida cinética y termodinámicamente para la producción del R-propanolol. En condiciones normales de operación en el laboratorio se debe esperar que haya resolución cinética de los enantiómeros R/S propanolol, sin embargo los productos de esterificación se mezclarán nuevamente debido a la poca diferencia en las energías libres de los ésteres. Si se busca llevar a cabo eficientemente la separación se debe llegar a la formación de los ésteres y promover su hidrólisis, ya que este proceso se favorece la producción del R-propanolol. Lo cual está de acuerdo con los resultados experimentales [8].

#### **4.2.2. Cinética y termodinámica de esterificación en medio orgánico, tolueno.**

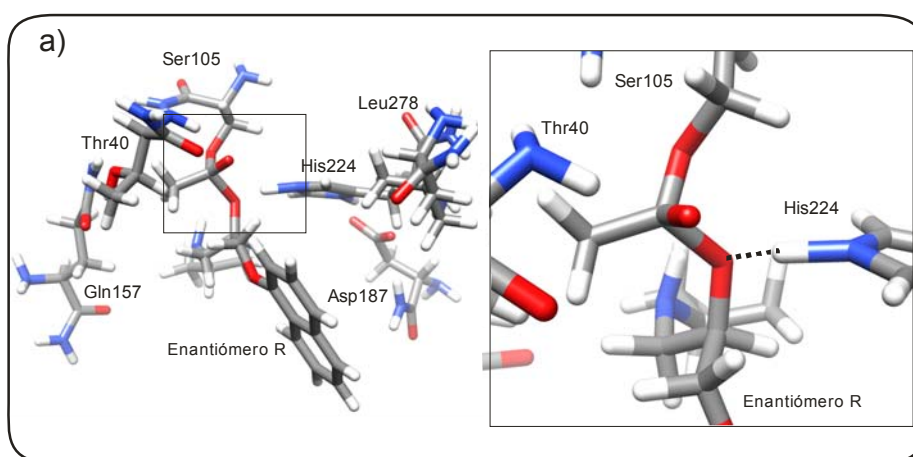
En la **Figura 24** se observa el perfil energético de la esterificación en tolueno a 298 K. Se determinó que la reacción global es más espontánea para el enantiómero S ( $\Delta G_{rxn}^S = -13,2505$  kCal/mol) en comparación con su homólogo R ( $\Delta G_{rxn}^R = -11,3873$  kCal/mol). Los dos procesos de esterificación pasan por un estado intermedio muy estable, dominado por la presencia del intermedio R. En toda la reacción se observa que el R-propanolol es estabilizado termodinámicamente, en comparación con el perfil de la reacción del S-propanolol. Sin embargo la reacción del S-propanolol es favorecida cinéticamente. Si se analiza la reacción de hidrólisis de los ésteres queda en evidencia que la formación del S-propanolol se ve favorecida cinéticamente, mientras que el R-propanolol se produce vía estabilización termodinámica.

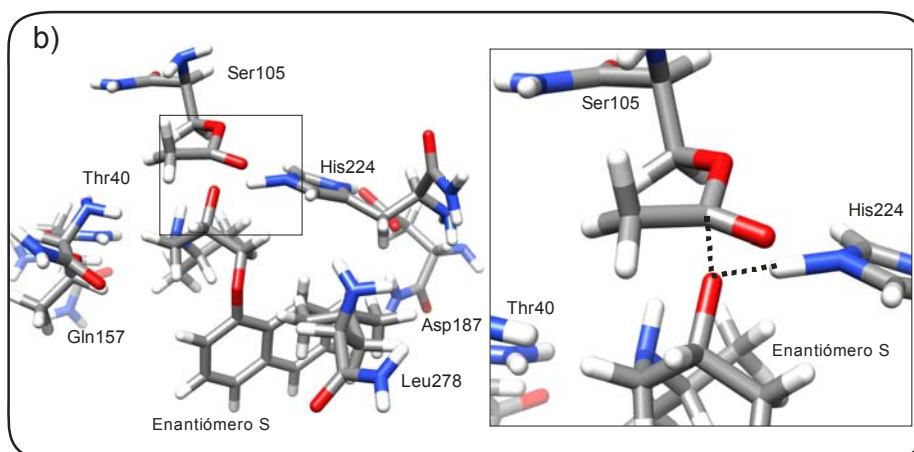


**Figura 24.** Perfil energético de la reacción de esterificación del R/S-propanolol dentro de la CALB en tolueno.

— Enantiómero R, — Enantiómero S

Este comportamiento se pone de manifiesto porque las barreras energéticas son superiores para la hidrólisis del R-propanolol acetato.



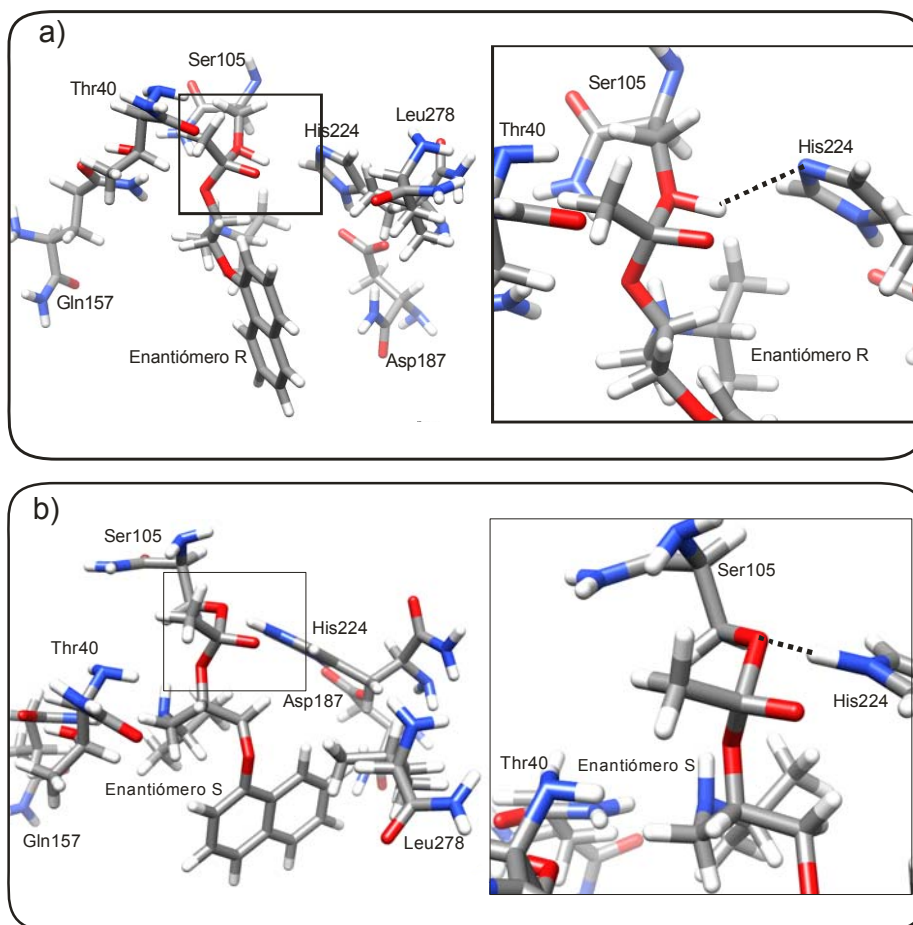


**Figura 25.** Estado de transición de la 1ª etapa (propanolol-intermediario tetraédrico). El cuadro representa una aproximación de los átomos de interés que están involucrados en la formación y rompimiento de enlaces para obtener el intermediario tetraédrico. a) enantiómero R, b) enantiómero S. --- representa las interacciones principales.

Utilizando la teoría del estado de transición se evaluaron los estados de transición que se observan en la **Figura 25**. En esta figura se observa que a diferencia de los estados de transición obtenidos en solvente acuoso, no hay estabilización del oxígeno del carbonilo por hidrógenos de aminoácidos que se encuentren en la superficie del centro activo, esto indica que el medio de reacción es importante para llevar a cabo una reacción u otra, debido a que influye en el comportamiento del sustrato y/o del centro activo de la enzima. Por tanto, la constante dieléctrica del solvente afecta la distorsión de las nubes electrónicas del sistema ya sea favoreciendo o no la afinidad del sustrato con el centro activo, presentando una modificación parcial de los mecanismos propuestos de esterificación o hidrolisis catalizadas por la lipasa.

Con respecto al perfil energético de la 1ª etapa (Alcohol→TS1) de la reacción de esterificación se obtuvo que el S-propanolol está favorecido cinéticamente, porque tiene una energía de activación menor que el R-propanolol ( $\Delta_{R-S}\Delta G=22,8877\text{kCal/mol}$ ). Este resultado podría indicar que esta etapa es altamente selectiva, favoreciendo catalíticamente al S-propanolol (**Figura 24**).

Por otro lado, para determinar la selectividad total de la enzima en la resolución de estos racematos, se evaluó la 2ª etapa, donde a partir de un intermediario estabilizado termodinámicamente se llega a la obtención de los ésteres de los alcoholes. Ver **Figura 26**.



**Figura 26.** Estado de transición de la 2ª etapa (intermediario tetraédrico-propanolol acetato). El cuadro representa una aproximación de los átomos de interés que están involucrados en la formación y rompimiento de enlaces para obtener el propanolol acetato. a) enantiómero R, b) enantiómero S. ... representa las interacciones principales.

Al igual que en la 1ª etapa, no se observó la estabilización del oxígeno del grupo carbonilo en ninguno de los estados de transición (**Figura 26**), debido a que

posiblemente el solvente no genera la suficiente polarización en el centro activo y/o el sustrato, para favorecer la estabilización del oxígeno del grupo carbonilo.

Con relación al perfil energético de la 2<sup>a</sup> etapa (intermediario tetraédrico→TS2) de la reacción de esterificación, se obtuvo mayor preferencia enantioselectiva con el enantiómero S (**Figura 24.**), porque requiere 32,0373 kCal/mol menos que su homólogo para alcanzar el estado de transición.

Con respecto a la reacción global de esterificación de sustratos, se concluye que la etapa determinante para la acetilación del S-propanolol es la primera etapa, y para el R-propanolol es la segunda etapa por ser la etapa más lenta, sin embargo es posible concluir que el centro activo de la CALB tiene enantiopreferencia con el sustrato S, en tolueno, por tener menores energías de activación con respecto al sustrato R.

Por otra parte, es importante evaluar el perfil de reacción de forma opuesta (hidrólisis), con el fin de analizar si también es posible obtener resolución quiral en la obtención de alcoholes. Para esto hay que tener en cuenta que se tomó la 2<sup>a</sup> etapa como 2<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa y la 1<sup>a</sup> etapa como 1<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa.

Se analizó la 2<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa ((R/S)-propanolol acetato→TS2), y se obtuvo que el enantiómero S está favorecido cinéticamente en la reacción por tener una energía de activación menor ( $\Delta G_{act}^S = 36,0401$  kCal/mol) con respecto al R-propanolol acetato ( $\Delta G_{act}^R = 71,5909$  kCal/mol). Para complementar este análisis es importante determinar las constantes de velocidad para confirmar la preferencia enantioselectiva de la CALB para la 2<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa. (**Figura 24.**)

Con el fin de determinar si hay preferencia enantioselectiva con el sustrato S en hidrólisis tolueno, se evaluó la 1<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa de la reacción (Intermediario tetraédrico-TS1) para obtener como producto propanolol. Como resultado se

obtuvo que el centro activo de la CALB preferente con el enantiómero S, debido a que tiene menor energía de activación con respecto a su imagen especular por 12,3616kCal/mol.

Ahora bien, en la Hidrólisis del (R/S)-propanolol acetato, la CALB es enantioselectiva para el enantiómero S al igual que en la reacción de esterificación, ya que tiene energías de activación menores en ambas etapas de la hidrólisis. Por lo tanto ya sea en la hidrólisis del S-propanolol acetato ó en la esterificación del S-propanolol, se obtendrá resolución de la mezcla. Sin embargo es más sencillo obtener mayor resolución de la mezcla racémica por esterificación de sustratos, por ser esta una reacción es espontánea.

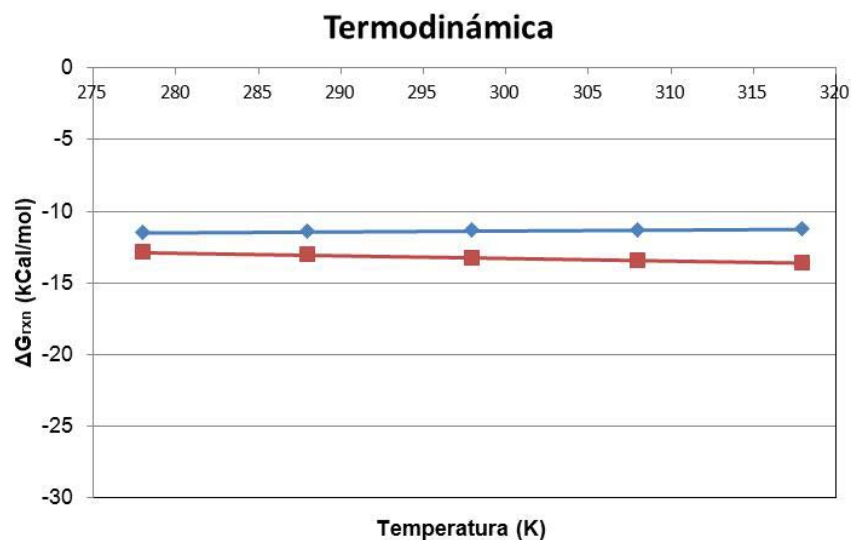
Por otra parte, se analizó el comportamiento termodinámico del sistema en la reacción a diferentes temperaturas (**Tabla 4.**), para determinar que tan influyente es la temperatura en la energía libre de la reacción.

Temperatura (K)	$\Delta G_{rxn}$ (kCal/mol)		$\Delta H_{rxn}$ (kCal/mol)		$\Delta S_{rxn}$ (kCal/molK)	
	Sustrato R	Sustrato S	Sustrato R	Sustrato S	Sustrato R	Sustrato S
278	-11,5136	-12,8897	-13,2560	-7,8770	$-6,2675 \cdot 10^{-3}$	$1,8032 \cdot 10^{-2}$
288	-11,4514	-13,0711	-13,2730	-7,8770	$-6,3250 \cdot 10^{-3}$	$1,8035 \cdot 10^{-2}$
298	-11,3873	-13,2505	-13,2880	-7,8750	$-6,3782 \cdot 10^{-3}$	$1,8039 \cdot 10^{-2}$
308	-11,3232	-13,4312	-13,3030	-7,8740	$-6,4278 \cdot 10^{-3}$	$1,8043 \cdot 10^{-2}$
318	-11,2593	-13,6111	-13,3180	-7,8720	$-6,4738 \cdot 10^{-3}$	$1,8048 \cdot 10^{-2}$

**Tabla 4.** Espontaneidad de la reacción de esterificación del R/S-propanolol a diferentes temperaturas (298-318K) en medio tolueno.

En la **Tabla 4** se determinó que es más espontánea la esterificación del S-propanolol ( $\Delta G_{rxn}^R < \Delta G_{rxn}^S$ ), y que ambas reacciones son exotérmicas ( $\Delta H_{rxn}^R = -13,2876$ kCal/mol;  $\Delta H_{rxn}^S = -7,8765$ kCal/mol) a 298 K siendo más exotérmico para el enantiómero R. Al variar la temperatura, se encontró una ligera preferencia termodinámica con el S-propanolol por ser más espontaneo desde bajas temperaturas (**Tabla 4.**). Si se analiza la reacción para la obtención de alcoholes

(hidrólisis) se determinó que a pesar de ser un proceso no espontáneo hay una preferencia termodinámica que favorecería al enantiómero R.



**Figura 27.** Efecto de la temperatura en el  $\Delta G$  de reacción del (R/S)-propanolol en agua.  
— Enantiómero R, — Enantiómero S

Al graficar la tabla anterior (**Figura 27.**), se presenta que hay poca influencia de la temperatura en la espontaneidad de la reacción, debido a que en un rango de 40K, el  $\Delta G_{rxn}^S$  del S-propanolol disminuye alrededor de 0,7213kCal/mol y en el caso del enantiómero R el  $\Delta G_{rxn}^R$  aumenta 0,2543kCal/mol. El cual es prácticamente invariable. Estos resultados pueden deberse a que el tolueno tiene una constante dieléctrica muy pequeña, es decir tiene un grado de polarización muy pequeño, incapaz de distorsionar las nubes electrónicas del sistema para cambiar considerablemente los valores entálpicos. Por otro lado, a mayores temperaturas no se afecta la contribución del sistema en entropía.

### 4.3. Determinación de las constantes cinéticas de la reacción (esterificación e hidrólisis) en agua y tolueno.

El valor de las constantes cinéticas se obtiene con base en las energías de activación y la termodinámica estadística (funciones de partición), lo cual permite calcular una variable que puede ser comparable con valores medidos experimentalmente. Para este caso, implica determinar la constante cinética de cada etapa, debido a que la esterificación o hidrólisis del enantiómero se lleva a cabo en por lo menos dos etapas.

#### 4.3.1. Constantes cinéticas de la reacción en medio acuoso, esterificación.

En la **Tabla 5** se muestran los valores de las constantes cinéticas de reacción calculadas utilizando los datos obtenidos para el proceso de esterificación de los alcoholes en agua. (**Tabla 5.**)

Enantiómero	Cinética			
	Energía de activación (kCal/mol)		Constantes cinéticas (s <sup>-1</sup> )	
	$\Delta G$ (Alcohol-TS1)	$\Delta G$ (Inter-TS2)	$k_1$	$k_2$
R	37,4384	22,7184	$2,6966 \cdot 10^{-21}$	$1,2179 \cdot 10^{-2}$
S	23,6018	41,7381	$5,2509 \cdot 10^{-1}$	$6,1534 \cdot 10^{-22}$

**Tabla 5.** Resultados cinéticos de la reacción de esterificación del propanolol.  $K_1$ = constante cinética de la 1<sup>a</sup> etapa;  $k_2$ = constante cinética de la 2<sup>a</sup> etapa.

Como resultado, se obtuvo que la constante de velocidad del R-propanolol es muy pequeña en comparación con la del S-propanolol. Este resultado confirma que durante la primera etapa hay mayor selectividad enzimática por el S-propanolol.

Para la 2<sup>a</sup> etapa se determinó que la  $k_2$  del enantiómero R es muy grande en comparación con la de su homólogo, ver **Tabla 5**. De tal manera que la esterificación es más favorable hace la producción de aductos R.

Debido a que la suma de de constantes es esencialmente la misma para las dos especies, durante la esterificación, se puede concluir que en medio acuoso no ocurre la separación. En perfecto acuerdo con los resultados experimentales.

#### 4.3.2. Constantes cinéticas de la reacción en medio acuoso, hidrólisis.

Experimentalmente se ha observado que en medios acuosos las lipasas resuelven mezclas racémicas principalmente por hidrólisis de sustratos, esto se debe a que las enzimas tienen la ventaja de catalizar reacciones en dos direcciones (esterificación ó hidrólisis).

En la **Tabla 6** se encuentran los valores de la constante cinética de reacción para las dos etapas de la reacción. En ambos casos se observa que la reacción favorece la producción del R-propanolol. En este estudio se demuestra que las lipasas tienen la capacidad de separar los esteres mediante resolución cinética.

Enantiómero	Cinética			
	Energía de activación (kCal/mol)		Constantes cinéticas (s <sup>-1</sup> )	
	$\Delta G$ (Éster-TS2)	$\Delta G$ (Inter-TS1)	$k_1$	$k_2$
R	38,1664	30,9800	$1,0844 \cdot 10^{-9}$	$6,4659 \cdot 10^{-20}$
S	45,3879	46,1353	$1,5856 \cdot 10^{-27}$	$3,1516 \cdot 10^{-29}$

**Tabla 6.** Resultados cinéticos de la hidrólisis del propanolol acetato.  $K_{-1}$ = constante cinética de la 1<sup>a</sup> inv. etapa;  $k_2$ = constante cinética de la 2<sup>a</sup> inv. etapa.

Para la 1<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa se obtuvo que indiscutiblemente el centro activo de la CALB es altamente enantioselectivo en esta etapa con el enantiómero R, por tener una constante de velocidad muy grande a comparación de su homólogo (**Tabla 6.**) en un orden de de 10<sup>18</sup>.

Nuestros resultados están de acuerdo con los resultados experimentales en la resolución de racematos en medios acuosos [8].

#### 4.3.3. Constantes cinéticas de la reacción en medio tolueno, esterificación.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en la 1<sup>a</sup> etapa de la esterificación en el apartado 4.2.2., se determinaron las constantes cinéticas del proceso para obtener el intermediario tetraédrico (**Tabla 7.**).

Enantiómero	Cinética			
	Energía de activación (kCal/mol)		Constantes cinéticas (s <sup>-1</sup> )	
	$\Delta G$ (Alcohol-TS1)	$\Delta G$ (Inter-TS2)	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>
R	55,3487	59,1278	6,0884*10 <sup>-33</sup>	1,1705*10 <sup>-33</sup>
S	32,4611	32,2399	1,3191*10 <sup>-12</sup>	2,6347*10 <sup>-9</sup>

**Tabla 7.** Resultados cinéticos de la reacción de esterificación del propanolol. K<sub>1</sub>= constante cinética de la 1<sup>a</sup> etapa; k<sub>2</sub>= constante cinética de la 2<sup>a</sup> etapa.

Primero se calcularon las constantes cinéticas de la 1<sup>a</sup> etapa de la reacción (k<sub>1</sub>), y se obtuvo preferencia enantioselectiva por el sustrato S, debido a que la constante cinética del R-propanolol es demasiado pequeña en comparación con la del S-propanolol.

Con respecto a las constantes cinéticas de la 2<sup>a</sup> etapa, se observó que la constante cinética para el compuesto quiral S es mayor que la de su imagen especular en un orden de 10<sup>24</sup>, indicando nuevamente mayor selectividad del centro activo por el enantiómero S.

Como conclusión se estableció que en la reacción de esterificación la etapa determinante del enantiómero R es la 2<sup>a</sup> etapa por tener una constante cinética más pequeña y una energía de activación mayor que en la 1<sup>a</sup> etapa. Con respecto al enantiómero S se encontró que la etapa determinante de la reacción es la 1<sup>a</sup> etapa por ser la más lenta ( $k_1$ ). Con respecto a la reacción global se obtuvo que hay preferencia enantioselectiva del centro activo con el S-propanolol, debido a que el R-propanolol presenta constantes de velocidad muy pequeñas en ambas etapas, esto indica que la reacción es muy lenta, lo cual favorece indiscutiblemente al enantiómero S por tener constantes de velocidad grandes.

#### 4.3.4. Constante cinéticas de la reacción en medio tolueno, hidrólisis.

Para este análisis se tuvo en cuenta que la 2<sup>a</sup> etapa se toma como 2<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa y la 1<sup>a</sup> etapa como 1<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa con respecto a la esterificación, de igual manera para las constantes cinéticas ( $k_{-2}$  y  $k_{-1}$ ).

Al determinar las constantes cinéticas de cada enantiómero para la 2<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa (**Tabla 8**,  $k_{-2}$ ), se observó que el enantiómero S posee una constante de velocidad muy grande en comparación con la de su homólogo, lo cual indica que realmente es cinéticamente favorable en esta etapa (**Tabla 8**).

Enantiómero	Cinética			
	Energía de activación (kCal/mol)		Constantes cinéticas (s <sup>-1</sup> )	
	$\Delta G$ (Éster-TS2)	$\Delta G$ (Inter-TS1)	$k_{-1}$	$k_{-2}$
R	71,5909	54,2729	$5,4921 \cdot 10^{-30}$	$5,1244 \cdot 10^{-44}$
S	36,0401	41,9113	$9,3491 \cdot 10^{-17}$	$1,2918 \cdot 10^{-18}$

**Tabla 8.** Resultados cinéticos de la hidrólisis del propanolol acetato.  $K_{-1}$ = constante cinética de la 1<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa;  $k_{-2}$ = constante cinética de la 2<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa.

Al evaluar la 1<sup>a</sup><sub>inv.</sub> etapa, se encontró que el enantiómero S tiene una constante cinética ( $k_{-1}$ ) muy alta en comparación con la de su homólogo (**Tabla 8**). Esto implica que la reacción es cinéticamente favorable. Con respecto a la constante cinética ( $k_{-1}$ ) del enantiómero R, se obtuvo que es muy pequeña, lo cual indica que probablemente la reacción es demasiado lenta y no se obtenga una cantidad de producto significativa en un periodo corto de tiempo, favoreciendo así, la selectividad del centro activo de la CALB para obtener resolución de la mezcla racémica de (R/S)-propranolol donde se favorece la producción del S-propranolol.

Podemos concluir que cuando se hidroliza la mezcla de ésteres en disueltos en tolueno, el centro activo de la CALB también es enantioselectivo con el enantiómero S. Entonces, tanto en la hidrólisis del propranolol acetato como en la esterificación del propranolol, hay resolución de la mezcla. La mejor resolución se obtendría por esterificación de los alcoholes. Aunque nuestros resultados contradicen los datos experimentales que muestran que la resolución ocurre vía esterificación, favoreciendo el enantiómero R, creemos que las diferencias se deben a que nuestro modelo no considera que los experimentos se llevan a cabo en un medio de polaridad intermedia, i.e. mezcla tolueno agua.

## 5. CONCLUSIONES

- Se encontró que la selectividad enzimática no sólo depende de la conformación de los bolsillos (hidrofóbico e hidrofílico; regla de kazlauskas), sino también de la flexibilidad de los residuos del centro activo, debido a que la CAL-B presenta conformaciones más estables en presencia del R-propranolol acetato a diferencia de su homólogo, al permitir la flexibilidad de algunos aa en el centro activo. Esta estabilidad conformacional también favorece la hidrólisis del R-propranolol acetato.
- La resolución racémica en medio acuoso, se puede obtener por hidrólisis del (R/S)-propranolol, favorecida cinéticamente, debido a que el enantiómero R presenta constantes cinéticas mayores y energías de activación menores que el S-propranolol acetato. El producto principal, bajo estas condiciones, es el R-propranolol, lo cual concuerda con resultados experimentales [8].
- En medio acuoso no es posible separar la mezcla racémica de los alcoholes. Se observa que las constantes cinéticas totales son muy parecidas para las dos especies.
- Tanto en la hidrólisis como esterificación de los sustratos en solvente orgánico (tolueno), es posible obtener la resolución quiral de la mezcla de (R/S)-propranolol debido a que en ambas direcciones, la CALB favorece la producción del enantiómero S.
- Tanto en la hidrólisis como esterificación de los sustratos en solvente orgánico (tolueno), se obtiene resolución quiral de la mezcla de (R/S)-propranolol obteniendo como producto mayoritario el enantiómero S.
- Los resultados en solvente orgánico se encontró que se favorece termodinámicamente la reacción para la producción del enantiómero R.

## 6. RECOMENDACIONES

- Consideramos que un mayor refinamiento de los resultados, utilizando un nivel de teoría más alto, puede en principio mejorar los resultados de las energías de los estados fundamentales.
- Aplicar esta metodología utilizando la constante dieléctrica promedio de la relación solvente agua-tolueno reportados en datos experimentales, para determinar si el perfil de reacción cambia cinéticamente la enantioselectividad de la lipasa.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hardin, Sonya R.; A trial Fibrillation Among Older Adults. *J. of Gerontological Nursing*. Vol. 34 No. 7 (2008).
2. Chupp, G. et al; M.D. Say What, Beta-Blockers for Asthma? New York. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, Vol. 38 (2008).
3. World Health Organization. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J. of Hypertension*, Vol. 21 (2003) pp1983-1992.
4. Alvarez, L., Zamorano, J., Espasmo coronario tras infusión de propranolol durante un ecocardiograma de estrés con dobutamina, *Revista española de cardiología*, Vol. 55 (2002) pp778-781.
5. Urgell C. Vedia, Bloqueadores betaadrenérgicos: análisis comparativo. *FMC*, Vol. 8 (2002) pp605-612.
6. Burke, D. and Henderson, D.; Chirality: a blueprint for the future. *British journal of anaesthesia*, Vol. 88 (2002) pp563-576.
7. Ghanem, Ashraf; Aboul.Enein, Hassan Y., Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*, Vol. 15 (2004) pp3331-3351.
8. Rebolledo, Francisca; Liz, Ramón, Multi-choice enzymatic resolutions racemic secondary alcohols using Candida Antártica lipase B, *Journal of chemical education*, Vol. 82 (2005) pp930-933.
9. López Belmonte, Trinidad, Estudio de la actividad y enantioselectividad de derivados de la lipasa Rhizomucor Miehei. *Universidad complutense de Madrid*, 2006 pp32-42.
10. Villarreal, Yorguin, Evaluación de la enantioselectividad de la lipasa *Burkholderia cepacia* hacia mezclas racémicas de 1-fenil-etanol y 1-fenil-propan-1-ol por medio del uso de herramientas computacionales, *Memorias V Simposio Colombiano de Catálisis*, 2007.

11. Carey, Francis A., Química orgánica, quinta edición, Mc Graw Hill, (2002) pp259-293.
12. O`Grady, John, Successful treatment of severe atenolol overdose with calcium chloride, *Journal of the Canadian Association of Emergency Physicians*, Vol. 3 (2001) pp224-227.
13. Universidad autónoma de Madrid, España. Actualizado: 2008. Disponible en:  
[http://www.uam.es/departamentos/ciencias/qorg/docencia\\_red/qo/l4/resol.html#comienzo](http://www.uam.es/departamentos/ciencias/qorg/docencia_red/qo/l4/resol.html#comienzo)
14. Irimescu, R. et al.; Enzymatic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols by Esterification with FA Under Vacuum. *JAOCS*, Vol. 80 (2003) pp659-663.
15. Gedey, Szilvia, Structural effects on chemo- and enantioselectivity of Canadian Antarctica lipase B -- Resolution of beta-amino esters. *Canadian Journal of Chemistry*, Vol. 80 (2002) pp565-570.
16. Campbell, Mary K., Bioquímica, cuarta edición, Thomson, (2004) pp575-581.
17. Hasan, Fariha et al., Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review, *Biotechnol Adv*, Vol. 6 (2009) pp782-798.
18. Brzozowski, A. M.; Derewenda, U., Z. S. et al, A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex, *Nature (London)*, Vol. 351 (1991), pp491-494.
19. Derewenda, U; Brzozowski; A. M.; Lawson, D. M.; Derewenda, Z. M., Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase, *Biochemistry*, Vol. 31 (1992) pp1532.
20. Castellanos, F. E.; Gonzalez, R. A.; Perea, R. A.; Síntesis de ésteres alquílicos mediante alcoholisis del aceite de palmiste utilizando como catalizador lipasa de *Mucor miehei*. Universidad industrial de Santander. Escuela de química. Tesis de grado. 2004.

21. Blow, D. M.; Birktoft, J. J.; Role of a Buried Acid Group in the Mechanism of Action of Chymotrypsin Hartley, *Nature (London)*, Vol. 221 (1969) pp337-340.
22. D. Robertus, J. Kraut, R. A. Alden, and J. J. Birktoft, Subtilisin. Stereochemical mechanism involving transition-state stabilization *Biochemistry*, Vol. 11 (1972) pp4293-4303.
23. Schulz, T. et al.; Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: A quantitative model. *Protein Science*, Vol. 9 (2000) pp1053–1062.
24. Segel, Lin; *Biochemical Calculation, Second Edition, John Wiley & Sons, 1976.*
25. Cygler M, Schrag JD, Structure as a basis for understanding the interfacial properties of lipases, *Methods Enzymol.* Vol. 284 (1997) pp3-27.
26. Uppenberg, J. et al.; Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida Antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry*, Vol. 34 (1995) pp16838-16851.
27. Cramer, Christopher J.; Essentials of computational chemistry theories and models, second edition, WILEY, (2004), pp62-64.
28. Cramer, Christopher, Essentials of Computational Chemistry: theories and models, second edition, WILEY, (2004).
29. Cornell, WD, Cieplak P, Bayly C.; A second generation force field for the simulation of proteins and nucleic acids. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 117 (1995) pp5179-5197.
30. Morris, G. M.; Automated docking using lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function, *J. Computational Chemistry*, Vol. 19 (1998) pp1639-1662.
31. Stewart, James; MOPAC manual, Frank J. Seiler Research Laboratory, sexta edición, Colorado Springs, CO, USA, (1997).
32. Billing, Gert D.; Mikkelsen, Kurt V.; Introduction of molecular dynamics and chemical kinetics, WILEY, (1996), pp31-36.

33. Laidler, K., King C.; The Development of Transition-State Theory. *J. Phys. Chem.*, Vol. 87 (1983) pp2657-2664.
34. Young, David, Computational Chemistry, Jhon Wiley & Sons, 2001
35. Stewart, J.; Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J Mol Model*, Vol 13 (2007) pp1173–1213.
36. MOPAC2009, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net) (2009).
37. Hwang, Bum-Yeol; Computer-aided molecular modeling of the enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward  $\gamma$ - and  $\delta$ -lactones. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 10 (2000) pp223–231.
38. Hof, R. et al.; Synthesis and Lipase-Catalyzed Resolution of 5-(Hydroxymethyl)-1,3-dioxolan-4-ones: Masked Glycerol Analogs as Potential Building Blocks for Pharmaceuticals. *J. Org. Chem.*, Vol. 61 (1996) pp3423-3427.
39. Paimies, O., et al.; Dynamic Kinetic Resolution of  $\alpha$ -Azido Alcohols. An Efficient Route to Chiral Aziridines and  $\alpha$ -Amino Alcohols. *J. Org. Chem.*, Vol. 66 (2001) pp4022-4025.
40. Westermann, B.; Enantiomerically Pure Cyclopropyl Hemiacetals: Lipase-Catalyzed Synthesis of Chiral, Nonracemic Ester Homoenolate Equivalents, *Organic letters*, Vol. 3 (2001) pp189-191.
41. Arroyo, M. et al.; Síntesis enantioselectivas catalizadas por lipasas microbianas. *Anales de la real sociedad española de química*, Vol. 2 (2000) pp19-24.
42. Nasipuri, D., Stereochemistry of Organic Compounds: Principles and Applications, segunda edición, New age international Ltda., (1994), pp63-72.
43. Buchholz, Klaus; Kasche, Volker; Biocatalysts and enzyme technology, WILEY-VCH, (2005) pp112.

44. Botta, M., Probing the substrate specificity for lipases. II. Kinetic and modeling studies on the molecular recognition of 2-arylpropionic esters by *Candida rugosa* and *Rhizomucor miehei* lipases. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1337 (1997) pp302–310.
45. Holzwarth H. et al.; Computer-aided modelling of stereoselective triglyceride hydrolysis catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 3 (1997) pp73-82.
46. Oliveira, E. et al.; 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*, Manuscripto aceptado (2009).
47. Raza S. et al.; Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: A molecular dynamics study. *Protein Science*, Vol. 10 (2001) pp329–338.
48. Ottosson J.; Enthalpy and Entropy in Enzyme Catalysis – A Study of Lipase Enantioselectivity. Royal institute of technology. (2001).
49. Ottosson, J. et al.; Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: An experimental and molecular modeling study of a lipase. *Protein Science*, Vol. 11 (2002) pp1462–1471.
50. Foresti, L.; Computational Approach to Solvent-Free Synthesis of Ethyl Oleate Using *Candida rugosa* and *Candida Antarctica B* Lipases. I. Interfacial Activation and Substrate (Ethanol, Oleic Acid) Adsorption. *Biomacromolecules*, Vol. 5 (2004) pp2366-2375.
51. Berendsen, W. R., Kinetic modeling of lipase catalyzed hydrolysis of (*R/S*)-1-methoxy-2-propyl-acetate as a model reaction for production of chiral secondary alcohols. *Journal of Biotechnology*, Vol. 121 (2006) pp213–226.
52. Tomic, S.; Quantum mechanical study of *Burkholderia cepacia* lipase enantioselectivity, *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 38 (2006) pp139–147.

53. Cuiper, Agnes D.; Kinetic Resolutions and Enantioselective Transformations of 5-(Acyloxy)pyrrolinones Using *Candida antarctica* Lipase B: Synthetic and Structural Aspects. *J. Org. Chem*, Vol. 64 (1999) pp9529-9537.
54. DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>.
55. Fioroni, M.; Vogt, D., Toluene Model for Molecular Dynamics Simulations in the Ranges  $298 < T \text{ (K)} < 350$  and  $0.1 < P \text{ (MPa)} < 10$ , *J. Phys. Chem. B.*, Vol. 108 (2004) pp11774-11781.
56. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis *E. Lindahl*. *J. Mol. Model.* 2001. Vol. 7; pp306-317.
57. Metropolis, N. et al.; The Monte Carlo Method. *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 44 (1949) pp335–341.
58. Quantum mechanical study of Burkholderia cepacia lipase enantioselectivity, *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 38 (2006) pp139–147.
59. Straatho P, A.; The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 21 (1997) pp559-571.