

Metodologías de Modelado Molecular en Biocatálisis para la explicación racional de resultados

- La Biocatálisis ha encontrado en el Modelado Molecular una herramienta de gran utilidad, pues permite interpretar de manera racional el proceso de interacción entre una enzima y su sustrato, y proporciona datos fiables que permiten predecir el comportamiento del sistema. Por otra parte el auge experimentado por la Biología estructural ha permitido incrementar en los últimos años el número de estructuras en 3D para su utilización en modelado. Sin duda, los grandes avances en el campo de la Bioinformática, asociados al empleo de medios computacionales cada vez más sofisticados, auguran que en poco tiempo nuestra capacidad de extraer conclusiones racionales de los procesos biocatalizados debería aumentar de forma considerable en los próximos años y este área de investigación debería experimentar un considerable aumento.

José María Sánchez Montero,
Grupo de Biotransformaciones (BTG). Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica.
Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense de Madrid.
 Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria, 28040 Madrid.
 Tel. 91 394 18 21 · Fax 91 394 18 22
jsanchez@farm.ucm.es

Naturalmente el objetivo de este artículo no es hacer un estudio exhaustivo de todas las metodologías de modelado molecular, ni tratarlas siquiera desde un punto de vista matemático. El gran auge del modelado molecular y la biocatálisis tiene un común denominador y es el rápido avance producido en biología estructural, lo que ha puesto de manifiesto la estructura tridimensional de muchos bioca-

talizadores. Su conocimiento es fundamental para ambas disciplinas. En muchas ocasiones la predicción de la actividad y selectividad de un biocatalizador ante un sustrato no natural puede ser compleja. En este sentido, el Modelado Molecular es la herramienta que conecta estas estructuras con las observaciones experimentales. El Modelado Molecular puede definirse como una descripción simplificada o idealizada de un sistema molecular o proceso entre moléculas, ideada para facilitar cálculos y predicciones. Desde el punto de vista de la utilización de estas enzimas o células para llevar a cabo reacciones fuera de su medio natural, es decir en los seres vivos, la Biocatálisis se enriquece cuando los fenómenos que generan y modulan la actividad catalítica de las enzi-

mas se estudian con una visión multidisciplinar. Las tecnologías y herramientas moleculares han avanzado rápidamente en los últimos 50 años, de tal manera que es posible plantear hipótesis, diseñar experimentos e interpretar resultados utilizando información tanto experimental como teórica.

Las Biotransformaciones serían, aquellos procesos en los que se emplean biocatalizadores para la transformación de sustratos no naturales para dicho biocatalizador y se obtienen productos de alto valor añadido.

La Biocatálisis, al igual que la química orgánica, que ha evolucionado a partir de una descripción empírica a una disciplina basada en el mecanismo y una ciencia basada en la estructura, está también evolucionando a un diseño racional de la ciencia

basada en la estructura. El comienzo de la biocatálisis estuvo marcado por aproximaciones empíricas como el cribado, (screening) o simples extrapolaciones de sustratos conocidos. El modelado molecular puede ayudarnos a responder a importantes preguntas que se plantean al llevar a cabo un proceso biocatalizado: i) Explicar a nivel molecular el comportamiento, en muchos casos conocido de una enzima. ii) Sugerir como cambia la selectividad de una reacción por modificación del sustrato, enzima o condiciones de reacción. iii) Predecir cuantitativamente el grado de estereoselectividad de una reacción catalizada por una enzima.

En la Tabla I podemos ver la evolución de las distintas técnicas computacionales. Podemos decir de un modo general, que las dos estrategias seguidas habitualmente en modelado, son las denominadas directas e indirectas. En la primera se tienen que conocer las características tridimensionales de un receptor generalmente a partir de datos cristalográficos y se interpreta la actividad o inactividad de las moléculas en términos de complementariedad con el receptor. Esto es lo que se conoce por el término de "docking". Su objetivo es la obtención de la estructura del complejo receptor-ligando de energía más baja (se debe cumplir que $\Delta E < 0$), y el análisis de las principales interacciones implicadas en la unión fármaco-receptor.

En la Figura 1, podemos ver

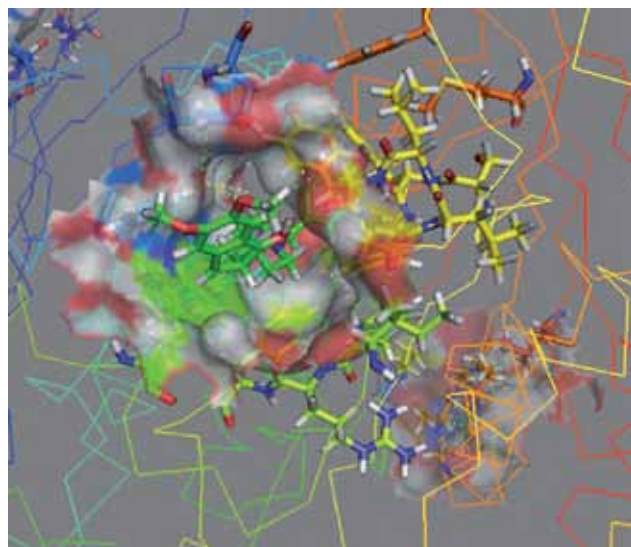


Figura 1. Interacción del cloruro de donepezilo bloqueando el centro activo de la acetilcolinesterasa de *Torpedo californica*

la interacción que se produciría entre la acetil colinesterasa de *Torpedo californica* (receptor) y el cloruro de donepezilo (ligando), para el tratamiento de las fases iniciales de la enfermedad de Alzheimer. El fármaco bloquea el sitio catalítico de la enzima lo que impediría que se produjese la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina que es su sustrato natural. Este conocimiento permitiría diseñar nuevos análogos más potentes.

La segunda estrategia, (estructura tridimensional del receptor no conocida), se basa en el análisis comparativo de las características estructurales de sustancias conocidas activas o inactivas con el fin de definir un farmacóforo (parte de la molécula que produce los efectos fisiológicos específicos de un medicamento) apropiado para la actividad biológica estudiada siendo la aplicación más destacada las relaciones cuantitativas estructura actividad en tres dimensiones (QSAR 3D).

La predicción cuantitativa *in silico* de la actividad enzimática y la selectividad sigue siendo un objetivo de gran interés en biocatálisis.

Los estudios de las dos últimas décadas han demostrado

cómo las enzimas pueden utilizarse adecuadamente, tanto en disolución acuosa como en entornos no convencionales para éstas, como por ejemplo disolventes orgánicos, líquidos iónicos etc., lo que permite poner en práctica nuevas metodologías, incluso en los ambientes más extremos.

Las simulaciones moleculares nos permiten la construcción de modelos virtuales de sistemas químicos. El principal interés del modelado molecular en biocatálisis es el conocimiento a nivel molecular de las interacciones enzima-sustrato. En muchos casos persiguiendo como meta, la predicción de la actividad y selectividad, como comentamos anteriormente. Hay distintos algoritmos que nos sirven para predecir el Docking de un sustrato en el centro activo de una enzima, así como para el cálculo de su energía de interacción y para la simulación

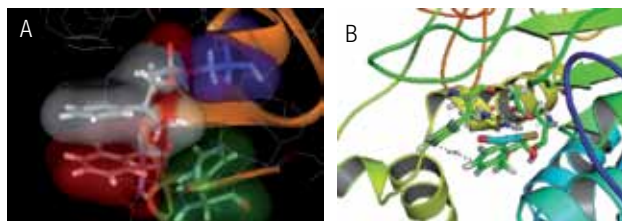


Figura 2. (A) docking manual para el 2-fenil-1,3-propanodiol. (B) docking automático para el 2-fenil-1,3-propanodiol.

de su energía de solvatación. La aplicación de estos métodos a la biocatálisis está basada en el cálculo de la energía libre de la reacción que a su vez deriva de la simulación del estado de transición.

Un ejemplo de lo anteriormente dicho se muestra a continuación:

En la acilación de diferentes (1,n)-alcanodiolos utilizados como intermedios en la preparación de una gran variedad de compuestos de interés como agentes antibacterianos entre otros, se utilizó la lipasa de páncreas porcino mediante la realización de un docking manual de la estructura descrita del centro activo, para el 2-fenil-1,3-propanodiol (Fig 2A). Se postuló el posible papel del residuo Phe216 como importante para el correcto reconocimiento del sustrato, ajustando las dimensiones de los sustratos a un triángulo cuyas dimensiones coinciden con los residuos Ser153, His264 (correspondientes a la tríada catalítica) y la mencionada Phe 216. Un estudio más refinado de docking ha confirmado dicha hipótesis, al verificarse las distancias previstas y las interacciones propuestas (Fig 2B).

Cuando los fenómenos son demasiado complejos para ser

simulados, otros métodos de cálculo, tales como la quimiometría pueden ser utilizados. Quimiometría es la ciencia de las mediciones realizadas sobre un sistema o proceso químico sobre el estado del sistema por aplicación de métodos matemáticos o estadísticos. Consta de una serie de técnicas heterogéneas, entre las cuales el diseño estadístico de experimentos y análisis estadísticos multivariante son los más importantes para la aplicación en Biocatálisis.

Un diseño estadístico experimental permite conocer los factores que tienen mayor impacto sobre los resultados. Usando este método, muchas variables pueden ser estudiadas al mismo tiempo, y utilizando esta información, las condiciones experimentales se pueden mejorar hasta llegar a las condiciones óptimas.

Todos los métodos estadísticos multivariable tienen la capacidad de extraer la información relevante contenida en un sistema complejo descrito por un amplio número de variables (hasta varios miles) y esta información se representa en un espacio de dimensionalidad reducida, haciendo así posible su interpretación. Los métodos estadísticos multivariable es-

ESTRUCTURA DEL LIGANDO	ESTRUCTURA DEL RECEPTOR CONOCIDA	ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DESCONOCIDA
CONOCIDA	<ul style="list-style-type: none"> > Interacciones ligando-receptor > Dinámica Molecular y técnicas de Docking 	<ul style="list-style-type: none"> > Modelos de Farmacóforos > Búsquedas 3D basadas en el ligando/farmacóforo > QSAR 2D y 3D
DESCONOCIDA	<ul style="list-style-type: none"> > Diseño de Novo > Búsquedas 3D basadas en el diseño 	<ul style="list-style-type: none"> > Generar estructuras en 3D > Medidas de similitud y diversidad Molecular > Química Combinatoria

Tabla 1. Evolución de las técnicas computacionales en función del conocimiento de la estructura del ligando y el receptor.

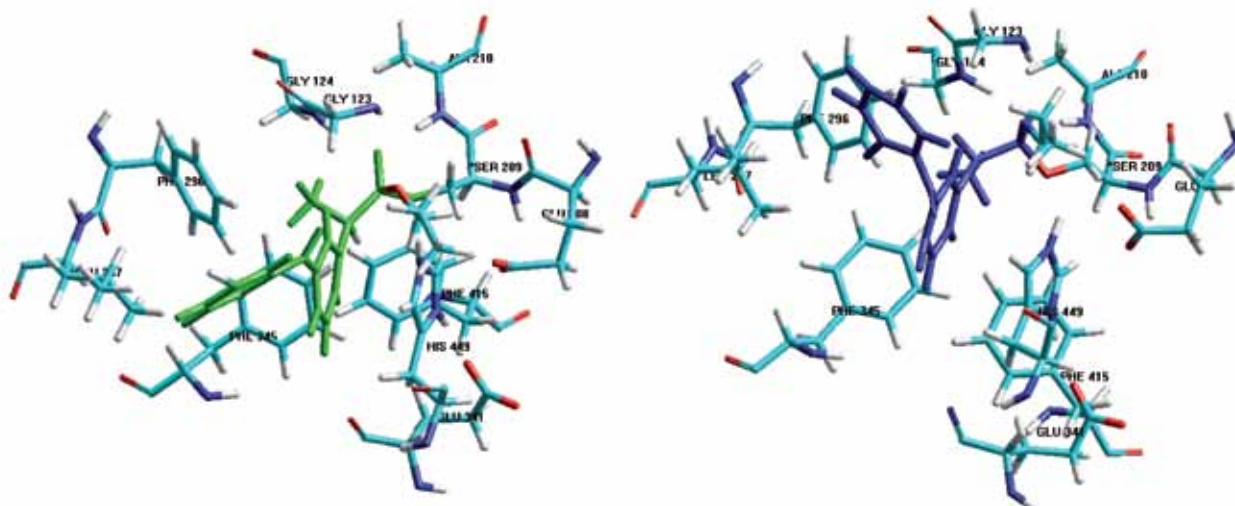


Figura 3. Simulación del complejo tetraédrico acil enzima, entre el *R*-ketoprofeno y el *S*-ketoprofeno.

tán basados en diferentes bases matemáticas. En particular los métodos QSAR usan las propiedades estructurales de las moléculas (generalmente adquiridas por métodos de simulación) como la base de partida para el análisis estadístico, que eventualmente encuentra correlaciones entre la estructura molecular y respuestas medibles experimentalmente. Debido a su capacidad inherente de simplificar el análisis de sistemas complejos, la quimiometría encuentra una amplia aplicación para el estudio y optimización de procesos industriales.

1.-Modelado Molecular e ingeniería racional de enzimas

Algunos de los logros más relevantes de las técnicas computacionales en Biocatálisis provienen de la ingeniería racional de enzimas. Esta aproximación a la evolución del biocatalizador es a veces vista en competencia con la evolución dirigida. La modelización molecular es muy adecuada para optimizar interacciones enzima -sustrato así como el mecanismo catalítico de la enzima. Sin embargo, el diseño computacional en general es mucho menos eficiente en la identificación de los efectos de las mutaciones que se

encuentran alejadas del centro activo: estas mutaciones pueden todavía alterar la estructura de la proteína y modificar el comportamiento del catalizador o la estabilidad de la enzima. En este contexto, la evolución dirigida puede ofrecer una solución al problema.

Estudios recientes han puesto de manifiesto la utilización de los métodos de simulación molecular en la inducción de la promiscuidad catalítica de las enzimas, es decir reacciones para las que en principio un ligando no es el sustrato natural de esa enzima.

2. Reconocimiento Enzima - Sustrato y selectividad de la enzima

Las técnicas de modelización molecular se han convertido en herramientas de rutina en la descripción de las interacciones enzima-sustrato. Más temas de interés tales como la mejora de la estabilidad de la enzima y la modelización del efecto del disolvente sobre las reacciones biocatalizadas han sido investigadas en una proporción menor. En el primer caso, esto se debe a que la estabilización de la enzima se consigue más a menudo a través de diferentes rutas (por ejemplo, mediante evolución di-

rigida).

La mayoría de los estudios computacionales realizados en el campo de la Biocatálisis se concentran en la predicción de la selectividad de la enzima. Esto implica el cálculo de la constante de la selectividad (k_{cat} / K_M), que depende de la energía libre del estado de transición de la reacción. En este sentido, los denominados métodos *ab initio* de la Mecánica Cuántica (QM) son capaces de reproducir los datos experimentales sin emplear parámetros empíricos. Como es lógico al aumentar el número de núcleos y de electrones, es mayor el número de funciones de base precisas para construir los orbitales moleculares (O.M.s), con las consiguientes dificultades de cálculo que acarrea. En razón de la evaluación completa o no de todas las integrales electrónicas, se puede hablar de métodos *ab initio* y de métodos semiempíricos. El inconveniente principal de la utilización de los métodos *ab initio* es que la complejidad del cálculo restringe sus aplicaciones a dianas químicas a nivel de unas pocas decenas de átomos. Por tanto, la complejidad de un sistema biocatalítico limita drásticamente la posibilidad de aplicar métodos de QM, forzando a la Química Compu-

tacional hacia el uso de métodos de Mecánica Molecular Clásica (MM), basados en un conjunto de ecuaciones y parámetros denominados Campos de Fuerza).

La MM considera los átomos de una molécula como un conjunto de masas interactuando vía fuerzas armónicas o elásticas. Esto permite la simulación de macromoléculas (es decir, proteínas), pero la naturaleza empírica de los campos de fuerza que deben ser correctamente parametrizados, hace que el tratamiento de cualquier efecto electrónico sea inviable. Se han ajustado empíricamente las ecuaciones y los parámetros para que coincidan con los resultados experimentales. A un conjunto de ecuaciones y parámetros se denomina campo de fuerza y la mayoría de programas de Modelado Molecular pueden elegir entre varios campos de fuerza, como por ejemplo MM2 (o MM3), AMBER etc.

Los métodos mecacuánticos (QM) pueden superar estas limitaciones, ya que se basan en la solución de la ecuación de Schrödinger y aunque este enfoque sigue siendo computacionalmente demasiado caro para ser útil como herramienta de predicción de rutina, el con-

tinuo crecimiento del poder computacional se espera que hagan más asequibles los cálculos de QM

Una solución intermedia se basaría en la utilización de métodos híbridos de QM-MM, los cuales tratan la parte reactiva relativamente pequeña de los sistemas biocatalíticos a nivel de QM y todo lo demás por MM, ofreciendo una buena alternativa de cálculo.

3. Simulación de análogos del estado de transición

La cinética de las reacciones biocatalizadas depende de la energía libre de sus estados de transición, en las que las especies químicas no son estables. Sin embargo, los métodos de MM solo pueden usarse cuando las estructuras son estables y además son incapaces de tratar la ruptura y formación de enlaces. La estrategia más común para modelar *in silico*, las interacciones entre las enzimas hidrolíticas y sus sustratos a nivel de la MM es la simulación del intermedio tetraédrico, que es una especie química estable unida covalentemente al residuo catalítico de la proteína y que imita el estado de transición de la reacción.

En la Figura 3 se representa el complejo acil enzima de la lipasa de *Candida rugosa*, y el *R*-y *S*-ketoprofeno. Para la obtención de estos complejos en primer lugar se obtuvieron los conformeros de mínima energía por Mecánica Molecular y posteriormente se realizó una dinámica molecular.

En el caso del *R*-ketoprofeno, el anillo de benceno más externo queda hacia fuera del centro activo compuesto por los aminoácidos Ser209, His449, Glu341, mientras que en el *S*-ketoprofeno el anillo queda más hacia el interior del centro activo, y en este caso hay interacciones π -stacking con la Phe-296 y 345, mientras que en el caso del *R*, solo con la Phe-245. Por

tanto podemos concluir que la interacción con el *R* es menos favorable ya que los anillos están prácticamente dispuestos perpendicularmente el uno respecto del otro. De esta forma podríamos predecir la selectividad de esta enzima tanto en las reacciones de hidrólisis de sus ésteres como en la reacciones de síntesis de los ácidos correspondientes.

En otros experimentos llevados a cabo por otros grupos se ha visto que mediante la simulación de análogos del estado de transición para la hidrólisis de una serie de diésteres se pudo demostrar que la enantioselectividad es una función de la longitud de la cadena del ácido.

4. Descripción GRID de la naturaleza química del centro activo

El enfoque GRID que complementa la simulación de análogos del estado de transición permite una descripción más precisa de la interacción enzima-sustrato y fue aplicado en el estudio de la selectividad de la penicilina G amidasa (PGA). Además de proporcionar directrices para el acoplamiento de los sustratos en el centro activo de la enzima, la visualización de los campos de interacción molecular (MIF) generados por diferentes sondas (hidrofóbicas, dadores de enlaces-H, aceptores de enlaces-H y grupos cargados) permitió una exploración fácil y rápida de la naturaleza química del centro activo, consiguiendo así un esquema completo de los requerimientos estructurales del sustrato para el reconocimiento óptimo del mismo. Además, el estudio estableció las normas generales para la enantiodiscriminación ilustrando cómo los enantiómeros tienen diferentes interacciones con dos porciones químicamente distintas del centro activo. Las tasas de acilación determinadas experimentalmente fueron utilizadas para validar el modelo, que pro-

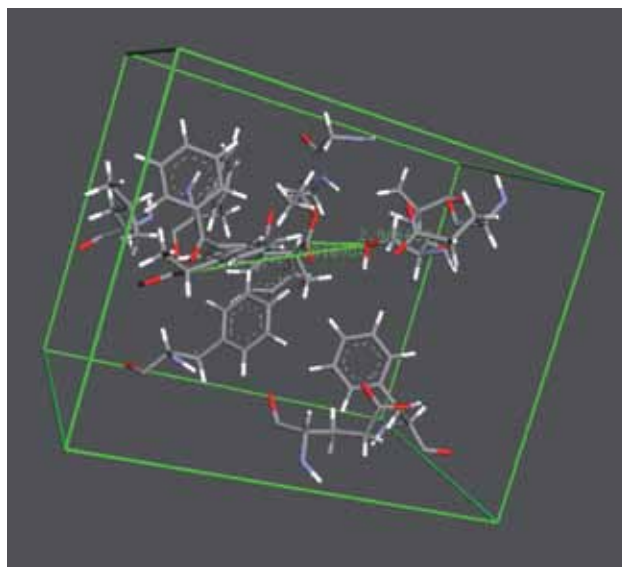


Figura 4. Docking automático entre *R*-ketoprofeno y el *S*-ketoprofeno y el centro activo de la lipasa de *Candida rugosa*.

porciona sólo una predicción cualitativa.

El Docking con los ácidos *S* y *R*-ketoprofeno confirmó los resultados predichos en el apartado anterior, ya que la energía de interacción fue más favorable en el caso del *S* y la distancia respecto al residuo catalítico fue menor en el *S* (2,96 Å del *S* frente a 9 Å del *R*) como puede apreciarse en la figura.

Aunque en los ejemplos ex-

puestos hasta ahora se alcanzaron buenos resultados en la racionalización de las estrategias experimentales, todos fallan en hacer una predicción cuantitativa de la selectividad de la enzima, incluso cuando el análisis GRID se combina con aproximaciones al análogo al estado de transición.

Esta limitación se debe a que todos los enfoques descritos se basan en varias aproximaciones significativas.

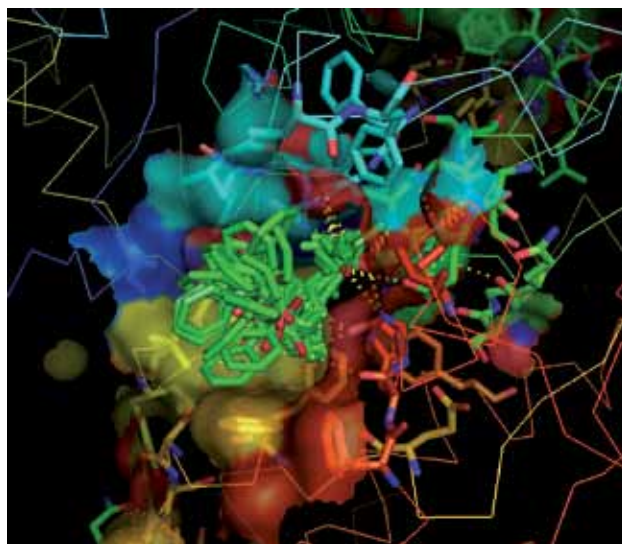


Figura 5. Superposición de conformeros del *R*-ketoprofeno en el centro activo de la lipasa donde se pone de manifiesto las diferentes orientaciones del sustrato.

El primer problema se puede achacar a la naturaleza simplificada de los cálculos del campo de fuerza empleado. Por otra parte, el segundo gran problema viene del hecho de que las pequeñas diferencias de energía originan grandes variaciones en la selectividad, que pueden ser enmascaradas por las grandes fluctuaciones causadas por el movimiento normal de las proteínas.

5. Predicción de la enantioselectividad de la enzima por métodos de Mecánica Cuántica y / o Mecánica Molecular

El primer y más clásico estudio sobre la predicción cuantitativa de la diferencia de energía libre entre los dos intermedios tetraédricos de dos enantiómeros fue descrito por Colombo y cols. en la resolución de una mezcla racémica de 1-feniletanol por acilación catalizada por subtilisina. El enfoque consistió en un modelo con todos los átomos con solvatación explícita completa, energía libre de perturbación (FEP), simulaciones de MD (dinámica molecular), y cargas atómicas derivadas de metodologías de QM y/o MM.

Los resultados en ese estudio de 1999 probablemente representan la mejor predicción cuantitativa de la enantioselectividad descrita hasta ahora en la bibliografía, pero a pesar de todo, la tasa de error aún puede considerarse como elevada. Sin duda, la principal dificultad a la hora de llevar a cabo una predicción cuantitativa adecuada de la enantioselectividad deriva del hecho de que, aunque se pueda establecer de una forma muy precisa cual es la energía libre del estado de transición del enantiómero preferentemente reconocido dentro del centro activo, el otro enantiómero puede tener diferentes tipos de orientaciones, que implican interacciones con diferentes zonas del centro activo como se puede

visualizar en la Figura 5.

Correlación entre la selectividad de la enzima y descriptores moleculares

Dado que el cálculo preciso de la energía libre de una reacción biocatalizada sigue siendo una tarea difícil, el desarrollo de las alternativas más simples y directas es un área activa de investigación.

Cabe señalar que para que una herramienta de predicción sea atractiva debe ser competitiva con el tiempo empleado en el laboratorio para realizar un experimento. En general, no hay motivos para esperar dos meses para la predicción de una medida que puede ser realizada experimentalmente en dos semanas.

En este sentido, los métodos de MD, FEP, y QM no son probablemente los más apropiados para el desarrollo de modelos de predicción, al menos a la luz de los instrumentos de cálculo comúnmente disponibles.

Como consecuencia, varias estrategias alternativas se han desarrollado, destinadas a simplificar cálculos y evitar el cálculo de la energía del estado de transición de la reacción.

Estas ideas se han aplicado en el estudio de enantioconocimiento de alcoholes terciarios por carboxilesterasas. Demostraron cómo una predicción cuantitativa de la enantioselectividad se puede realizar evitando el cálculo de la energía libre del estado de transición.

El análisis geométrico de los intermedios tetraédricos, construido por Docking manual y simulaciones de MD, puso de manifiesto la correlación cuantitativa entre la enantioselectividad y un descriptor geométrico único, definido como la distancia entre el nitrógeno de la histidina catalítica y uno de los átomos de oxígeno del sustrato. Aunque la validez de este tipo de descriptores no se puede asumir como general, la identificación de correlaciones similares en diferentes sistemas biocatalíticos

representa una ruta original y sencilla para la predicción de la enantioselectividad en un plazo razonable de tiempo.

6. QSAR 3D para la predicción de la enantioselectividad

Los métodos QSAR 3D (relaciones cuantitativas estructura-actividad en tres dimensiones) utilizan los datos provenientes de simulaciones moleculares como entrada para el análisis estadístico multivariante y representan la fusión entre el Modelado Molecular y la Quimiometría. Aunque el uso de QSAR 3D está bien establecido en el diseño de fármacos, la aplicación de estos métodos en Biotransformación se ha llevado a cabo no hace muchos años. Los trabajos pioneros de Tomić y cols representan un ejemplo de cómo las predicciones cuantitativas de k_{cat} / K_M son viables a través de un enfoque QSAR 3D, que correlaciona los descriptores sistema químico con los datos experimentalmente medibles. La predicción cuantitativa de la enantioselectividad de la lipasa de *Bulkholderia cepacia* se logró mediante el desarrollo de un método en el que la energía libre de unión se calcula de manera aproximada a través de una combinación li-

neal de la energía de interacción del complejo enzima-sustrato y la superficie polar y no polar accesible al disolvente. El peso de cada parámetro se calculó por análisis PLS, y el alto coeficiente de correlación de predicción ($Q^2 = 0,84$) confirma la validez de la aproximación. Por otra parte, el QSAR 3D también puede emplearse en Biotransformación en sistemas en los cuales no se conoce la estructura tridimensional del biocatalizador, mediante el empleo de estudios CoMFA (acrónimo de Comparative Molecular Field Analysis). Aplicando esta metodología, se pudo predecir la estructura del sustrato modelo en la biorreducción de diferentes cetonas empleando células enteras de *G. candidum* y *S. octosporus*, representados en la Figura 6. El código de colores es el que sigue: i) Zonas de bajo impedimento estérico (verde). Son zonas donde la presencia de restos químicos del sustrato favorece la interacción enzima-sustrato. ii) Zonas de alto impedimento estérico (amarillo). Son zonas donde la presencia de grupos en el sustrato disminuye la afinidad de la ADH por el sustrato. iii) Zonas electrostáticas: rojas, donde una elevada densidad electrónica

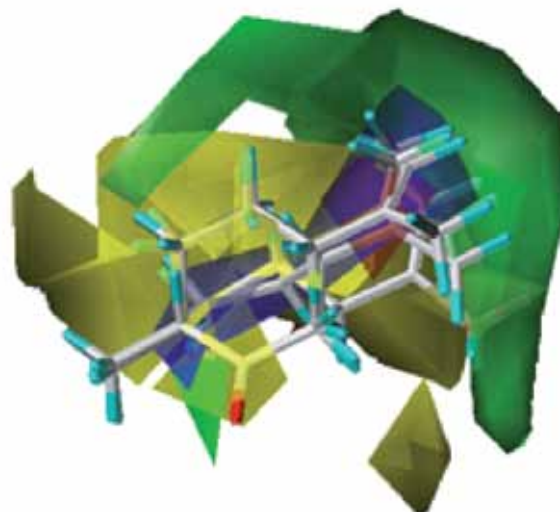


Figura 6. Aplicación del método CoMFA para la predicción de las zonas de reconocimiento de la enzima utilizando diferentes sustratos.

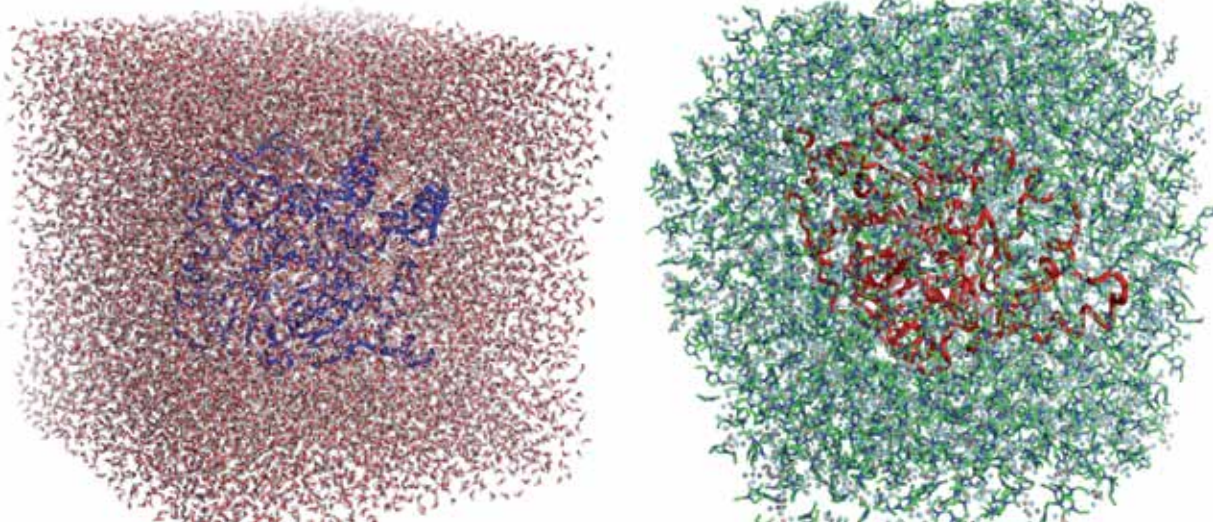


Figura 7. Caja de moléculas de disolvente en la lipasa de *Bacillus thermocatenulatus* (A) líquido iónico (B) agua

favorece la interacción y azules donde una elevada densidad de carga negativa desfavorece la interacción. La principal ventaja de esta metodología para modelar el centro activo de una enzima desconocida es que permite predecir, sin siquiera haberla aislado.

7. Estudio del efecto de los disolventes.

El efecto de la solvatación debe ser estudiado ya que el Modelado Molecular debe intentar interpretar y predecir resultados experimentales y los procesos biocatalíticos se llevan a cabo en presencia de disolventes.

Inicialmente, la mayoría de los cálculos de modelado incluyen las moléculas de agua que se encuentran en la estructura del cristal, pero no las moléculas de agua adicionales del disolvente, cuyo efecto generalmente se simula utilizando un parámetro dieléctrico dependiente para intentar imitar la solvatación. Ke y cols. utilizaron un método mejorado para simular el agua disolvente, un modelo electrostático continuo, pero los resultados fueron similares a los obtenidos del modelo más simple. Este tratamiento incompleto de solvatación es claramente una aproximación. Está claro que el

disolvente puede cambiar la selectividad de la enzima, aunque existe aún desacuerdo sobre por qué esto ocurre.

Una de las posibles explicaciones propuesta atribuye la capacidad de estereodiscriminación a la diferente solvatación de los complejos diastereoisoméricos enzima-sustrato. En este sentido, Ke y Klivanov estudiaron la enantioselectividad de la α -quimotripsina en la acilación de un diol proquiral, encontrando que el estado de transición que conducía hacia la acilación en el hidroxilo *pro-R* colocaba un resto de 3,5-dimetoxifenilo en un bolsillo de la enzima, mientras que el estado de transición conducente a la acilación en el hidroxilo *pro-S* dejaba un resto arilo expuesto hacia el disolvente. La propuesta de estos autores correlacionaba la enantioselectividad observada con los coeficientes de actividad termodinámica de la zona aromática expuesta, no como una predicción cuantitativa, sino una correlación directa en el sentido de mejor solvatación de partes expuestas, mayor enantioselectividad. Sin embargo, este método no pudo ser extrapolado a otros sustratos.

La capacidad de ciertas enzimas para trabajar de manera

eficiente en medios no acuosos (disolventes orgánicos, líquidos iónicos o fluidos supercríticos) es ampliamente conocida. Las lipasas son enzimas especialmente interesantes, dado su excepcional actividad en disolventes orgánicos, por lo que el estudio mediante Modelado Molecular de su comportamiento en dichos medios constituye un campo de trabajo muy habitual. Una aplicación interesante la constituyen las enzimas termoresistentes. En este caso cuando se utilizan para trabajar en líquidos iónicos, debido a la naturaleza de estos disolventes pueden resistir temperaturas de hasta 120 °C, muy por encima de su temperatura de estabilidad. Nuestro grupo ha demostrado recientemente al estudiar mediante dinámica molecular el comportamiento de estas enzimas, concretamente con lipasa de *Bacillus thermocatenulatus* en el líquido iónico tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazolio, que la energía necesaria para romper un puente de hidrógeno es el doble en el caso del líquido iónico respecto del agua. La estabilidad en disolvente iónico a alta temperatura se justifica parcialmente por la alta energía necesaria para la ruptura de los puentes de hidrógeno disolven-

te-proteína., aunque efectos hidrofóbicos podrían contribuir muy significativamente a la estabilidad. Para realizar este experimento ha sido necesaria la construcción de una caja de moléculas de líquido iónico para realizar la dinámica molecular tal y como se ve en la Figura 7A, así como una caja de moléculas de agua, Figura 7B. La temperatura de simulación fue de 363 °K

8. Bibliografía

1. Braiuca, P.; Ebert, C.; Basso, A.; Linda, P.; Gardossi, L. Computational methods to rationalize experimental strategies in biocatalysis. *Trends Biotechnol* 2006, 24, 419-425.
2. Sanchez-Montero, J. M. Modelado molecular como herramienta en el diseño racional de fármacos., Mesa Redonda sobre innovación farmacéutica, 2008; Real Academia Nacional de Farmacia: 2009.
3. Kazlauskas, R. J. Molecular modeling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations, and opportunities. *Curr Opin Chem Biol* 2000, 4, 81-8.
4. Sánchez-Montero, J. M. Modelado molecular y biocatálisis. Explicación racional de modelos experimentales.; Real Academia Nacional de Farmacia: 2010.
5. Ramos Martín, J., Nus, M., Sinisterra Gago J. V. and Sánchez-Montero J. M^o. Selective esterification of phthalic acids in two ionic liquids at high temperatures using a thermostable lipase of *Bacillus thermocatenulatus*: A comparative study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2008, 52-53, 162-167.
6. Borreguero, I.; Sánchez-Montero, J. M.; Sinisterra, J. V.; Rumbero, A.; Hermoso, J. A.; Alcántara, A. R. Regioselective resolution of 1,n-diols catalysed by lipases: a rational explanation of the enzymatic selectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2001, 11, 1013-1024.
7. Sánchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V. Biocatálisis aplicada a la Química Farmacéutica. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 2007, 73, 1199-1236.
8. Sánchez-Montero, J. M.; Alcántara, A. R. Aplicaciones del modelado molecular a la biocatálisis. Libro de Texto de la Universidad Nacional de Quilmes, Argentina (Aceptado, En Prensa). 2010