

La promiscuidad catalítica de CaLB y su potencial en síntesis orgánica

Guadalupe J. Santoyo-Canchola^{a,b}; José D. Rivera-Ramírez^{b*}

^aPrograma de Doctorado en Ciencias en Procesos Biotecnológicos. Departamento de Ingeniería Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara, Jalisco, México 44430.

^bLaboratorio de Química Farmacéutica departamento de Famacobiología, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara, Jalisco, México 44430.

*domingo.rivera@academicos.udg.mx

Resumen

La lipasa CaLB es empleada actualmente en una amplia variedad de transformaciones orgánicas y condiciones de reacción que van desde sustituciones nucleofílicas en el acilo, adiciones tipo Michael y formación de enolatos, cada una con la posibilidad de operar a nivel de quimio-, regio- y estereoselectividad, en medios acuosos y no acuosos. Estos niveles de reactividad y tolerancia de condiciones tienen su origen en la capacidad de la enzima en reconocer grupos carbonilo y poder estabilizar los oxianiones y enolatos correspondientes a cada tipo de transformación, así como su estabilidad en disolventes y temperaturas superiores a las fisiológicas.

Palabras Claves: *CaLB, promiscuidad catalítica, síntesis orgánica, adición de Michael, reacciones no convencionales.*

Abstract

The CaLB lipase enzyme is currently utilized in a wide range of organic transformations and reaction conditions. These include nucleophilic acyl substitutions, Michael-type additions, and enolate formation, each offering the potential for chemo-, regio-, and stereoselectivity, and can operate in both aqueous and non-aqueous media. This versatility and ability to tolerate varying conditions stem from the enzyme's capacity to identify carbonyl groups and stabilize the oxyanions and enolates required for each type of transformation, as well as its stability in solvents and at temperatures higher than physiological ones.

Key Words: *CaLB, catalytic promiscuity, organic synthesis, Michael addition, unconventional reactions*

Introducción

La promiscuidad catalítica se observa cuando una enzima realiza transformaciones sobre sustratos orgánicos no naturales en medios acuosos o no acuosos. Con este concepto se ha podido explicar cómo las enzimas pueden tolerar y transformar diferentes grupos funcionales y sustratos. Esto no implica modificaciones en la naturaleza reactiva de la enzima (una técnica conocida como evolución dirigida de proteínas), sino que los sustratos o condiciones de reacción tolerados por una enzima “promiscua” aún satisfacen un rango específico de su capacidad catalítica como conectividad de grupos funcionales específicos, propiedades estereoeléctricas y/o naturaleza de los estados de transición (Choi et al., 2001; Dwivedee et al., 2018).

Una de las enzimas más útiles en la síntesis orgánica es la isoenzima B de la lipasa *Candida antarctica* (CaLB, nombrada recientemente como *Moesziomyces antarcticus*), que pertenece a la familia de las α/β -hidrolasas. Muchas lipasas se obtienen de levaduras como *Candida lipolítica*, *Candida antarctica* y *Candida rugosa*; la más versátil se obtiene de la levadura *basidomycetus* de *Candida antarctica* la cual se encontró en el suelo hipersalino del lago Vanda en la Antártida cuando se buscaban enzimas extremófilas para usarse en detergentes. Este organismo produce dos isoenzimas, la A y la B, las cuales difieren en cantidad de residuos. CaLA presenta activación interfacial, es Ca^{+2} -dependiente y más termoestable que CaLB. CaLA muestra poca promiscuidad catalítica, pero se ha reportado que es la única que puede resolver alcoholes terciarios impedidos estéricamente, mientras que CaLB es más útil en ésteres no naturales (Monteiro et al., 2021). NOVO® ofrece preparados de ambas enzimas las cuales se sobreexpresan en *Aspergillus oryzae* como organismo huésped. CaLB está constituida por 317 aminoácidos con una masa molecular de 33 KDa y un

plegamiento α,β -hidrolasa; es más rígida que otras lipasas y no presenta el fenómeno de activación interfacial, lo cual la hace un intermediario entre una lipasa y una esterasa, sin embargo se ha reportado que su sitio catalítico puede adoptar conformaciones de diferentes dimensiones, lo que provoca cierta selectividad de algunos sustratos (Ganjalkhany et al., 2012). Tiene un rango de desactivación de 50 a 60°C y hasta 80°C en formas inmovilizadas, además es resistente y activa en disolventes orgánicos y a diferentes actividades de agua (Tjørnelund et al., 2023).

La estructura del sitio activo de esta enzima fue elucidada por Uppenberg (1994, 1995), mide de 12 Å de profundidad y 10 Å de diámetro, aproximadamente. Este sitio se divide en regiones de acuerdo con su función en el reconocimiento de las características estructurales, reactivas o quirales de los sustratos (Figura 1). Así, en el fondo del hueco se encuentran la triada catalítica (**A**; Asp187, His224, Ser105) y el sitio oxianiónico (**B**; Gln106, Thr 40). Las regiones que contribuyen al acomodo de los dos sustratos son la región del acilo (**C**; Leu140, Leu144), donde los sustratos acilo acomodan su cadena lateral y la región del alcohol (**D**; Leu278), por donde entra el segundo sustrato para deacilar a la enzima. Esas dos regiones surgen paralelamente del fondo del sitio a la superficie y están separadas por dos cadenas hidrofóbicas (**E**; Ile189 e Ile285). Una cavidad pequeña (**F**; Trp104) da origen a la estereoselectividad; en la cual el sustituyente corto del enantiómero mejor reconocido se acopla bien; este residuo precede a la serina activa y forma un puente de hidrógeno desde el átomo de nitrógeno de su indol hasta el oxígeno de la histidina. El resto de los residuos son sitios hidrofóbicos que dan estructura al sitio catalítico (**G**; Val190, Val154, Asp134, Gln157; Ala141, Thr138, Ala151, Ser, 150, Ala287, Val286) (Błaszczyk & Kielbasiński, 2020).

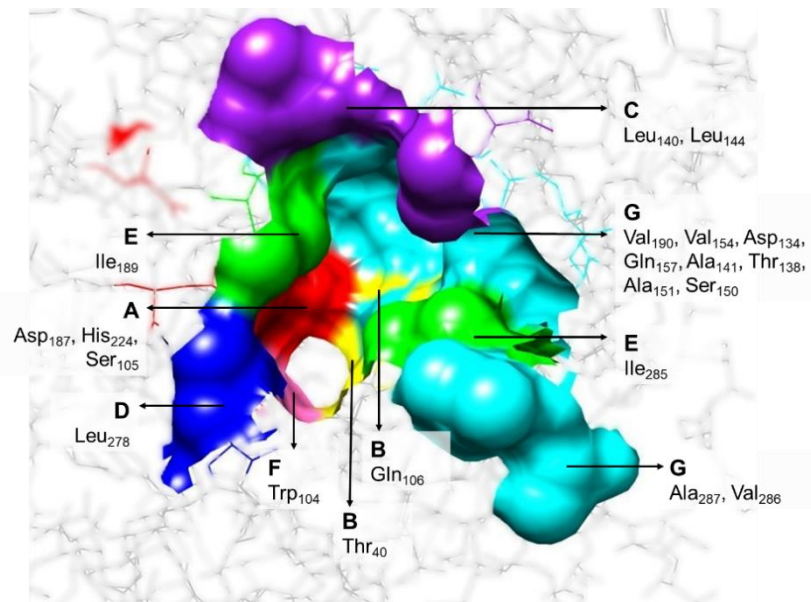


Figura 1. Topología del sitio catalítico de CaLB

El entendimiento de la capacidad sintética y catalítica de las enzimas y en especial de las lipasas cuando se emplean fuera de sus condiciones o de sus sustratos naturales sigue siendo un área de oportunidad. Actualmente no es posible afirmar que la aplicación de enzimas en transformaciones orgánicas es un tema totalmente optimizado como para emplearse como tecnología en todos los campos productivos como la industria de los alimentos, la farmoquímica o la de químicos finos. De esta área de oportunidad surge la inspiración de proponer la presente revisión, para poder brindar a químicos sintéticos, biocatalíticos y biotecnólogos, información que nos permita entender más y mejor a las enzimas, a las lipasas y en especial a CaLB.

Reacción natural y promiscua I: Mecanismo de sustitución nucleofílica en el acilo

La función del sitio oxianiónico es acoplarse a los sustratos carbonílicos naturales o no naturales y estabilizar su par de electrones; también estabiliza los electrones en estados de transición en las especies oxianiónicas en reacciones naturales o promiscuas. La tríada catalítica por su parte tiene la capacidad de llevar a cabo dos mecanismos importantes dependiendo de si la reacción es natural o promiscua.

La transformación “natural” de esta enzima cumple con las características cinéticas de un mecanismo *bi-bi-ping-pong* y desde el punto de vista químico se trata de una sustitución nucleofílica en el acilo (S_NA ; Figura 2A). Este mecanismo ha sido ampliamente estudiado y comprobado en diversos sustratos; actualmente es posible encontrar que existen tres descripciones que básicamente operan bajo la misma maquinaria catalítica: a) a través de un intermedio switteriónico, b) un mecanismo concertado y c) el más aceptado, a través de un intermedio neutro (Lima et al., 2019). En este último mecanismo, los tres aminoácidos de la tríada catalítica trabajan juntos y el grupo hidroxilo de Ser105 es activado por Asp187 e His224 para realizar una sustitución nucleofílica en el sustrato y formar un intermedio acil-enzima unido covalentemente (también llamado intermedio de Michaelis o producto de catálisis covalente, Figura 2A: A1, A2 y A3). Si se agrega un segundo sustrato nucleofílico (A4), el intermedio acil-enzima se sustituye para formar un producto de S_NA , también llamado aducto 1,2, producto de nucleólisis o en su caso producto de solvolisis. En esta segunda transformación, la diada Asp187 e His224 extrae el hidrógeno del nucleófilo y restaura al grupo hidroxilo en Ser105, que regenera la tríada y libera el producto (A5).

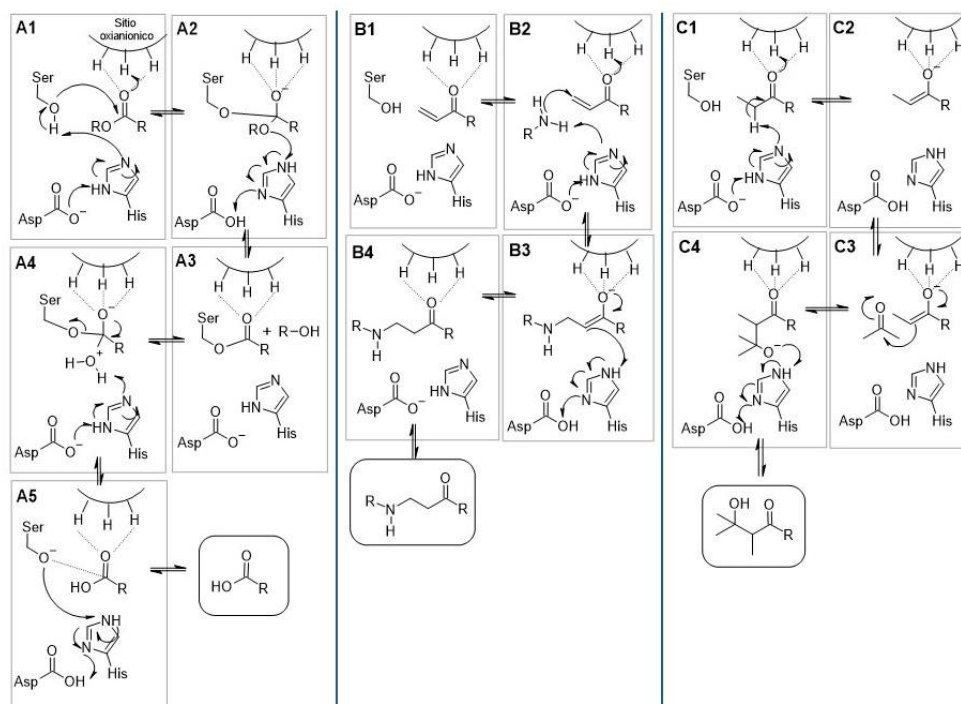


Figura 2. Tres mecanismos de transformación de CaLB: A: Transformación natural: S_NA; B: Adición de Michael y C: formación de enolatos

En la reacción natural de esta enzima el primer sustrato corresponde a tri-acilglicerol y el segundo a agua, por lo que la reacción global es la hidrólisis de tri-acilglicerol. Su uso en síntesis es debido a que el mecanismo S_NA tiene su versión promiscua al conservarse cuando se usan sustratos no naturales como ésteres, ácidos carboxílicos y anhídridos, empleando como nucleófilos alcoholes, aminas, agua o tioles y se ha empleado para formar polímeros y productos farmacéuticos. Dicho mecanismo también se conserva cuando se emplean condiciones como solución acuosa, disolventes orgánicos o líquidos supercríticos. También puede operar a nivel de reconocimiento quiral, por lo que se ha aprovechado para resolver mezclas racémicas de sustratos carbonílicos, o de segundos sustratos nucleofílicos como alcoholes o aminas (Gotor-Fernández et al., 2006).

En la Figura 3 se observan ejemplos de reacciones de hidrólisis (Figura 3A) (Velonia et al., 2005), esterificación y transesterificación (Figura 3B) (Lima, et al., 2022, Lau et al., 2004 Yu & Lutz, 2011) y aminólisis (Baldessari & Mangone, 2001. Conde et al., 2000. De Zoete et al., 1996. Garcia et al., 1993. Gill & Patel, 2006) (Figura 3E), algunas de las cuales son regioselectivas (Lavandera et al., 2004), y quimioselectivas (Garcia et al., 1994). Se han reportado polimerizaciones vía esterificación (Figura 3C y 3D) (García-Arrazola et al., 2009. Mei et al., 2003) y conservación de la actividad hidrolítica en líquidos iónicos (Campodónico et al., 2023), una variedad de disolventes (Zieniuk et al., 2020) o incluso en sinergia con MOFs (Zhang et al., 2022).

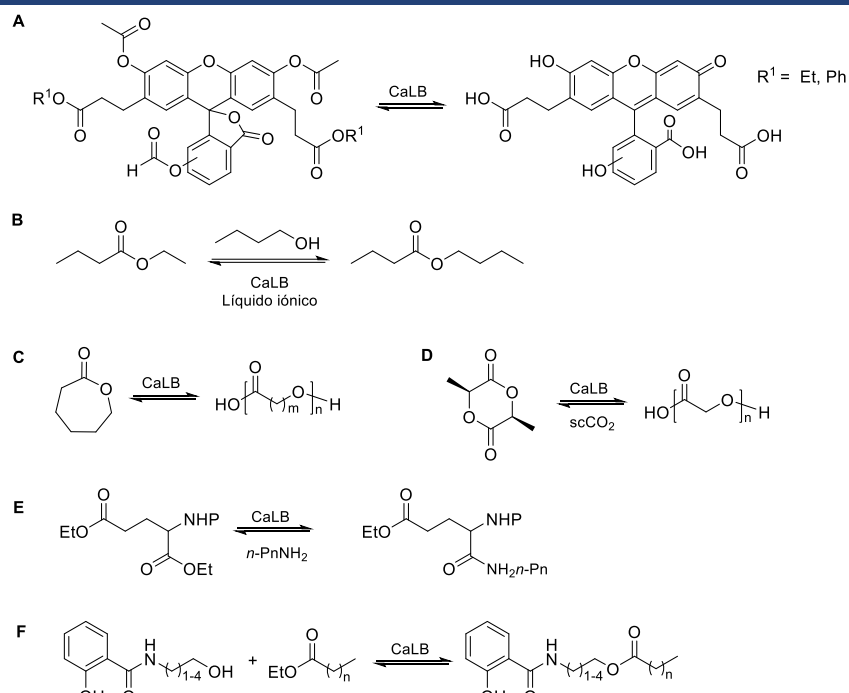
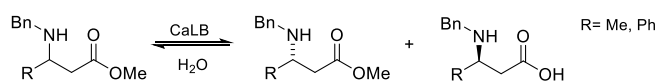


Figura 3. Ejemplos de reacciones de sustitución nucleofílica en el acilo catalizadas por CaLB. A: hidrólisis, B, C y D: esterificación, E: aminólisis.

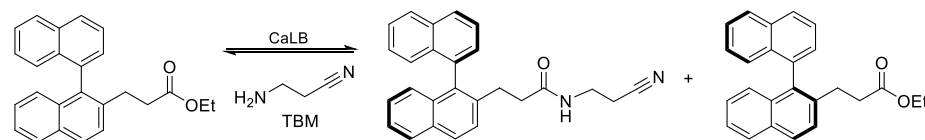
El mecanismo S_NA se ha empleado en la resolución de mezclas racémicas de carbonilos y nucleófilos. Mecanísticamente, esta enzima sigue la regla de Kazlauskas (Kazlauskas et al., 1991; Bornscheuer & Kazlauskas, 2009). Respecto a carbonilos racémicos, se resuelven ésteres vía hidrólisis (Ortega-Rojas, 2019) aminólisis (Aoyagi et al.,

2004; García-Urdiales et al., 1999; De Zoete et al., 1993), transesterificación (Cuiper et al., 1999 ; Flores-Sánchez et al., 2005) y desimetrización (Figura 4) (López-García et al., 2003; Puertas et al., 1996; Sánchez et al., 1999). Se ha demostrado que en la resolución de ésteres, la aminólisis es más eficiente que la hidrólisis.

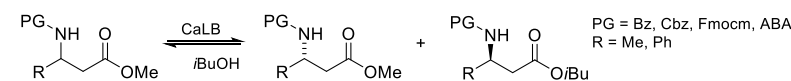
Hidrólisis



Aminólisis



Transesterificación



Desimetrización

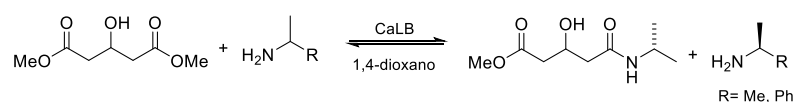


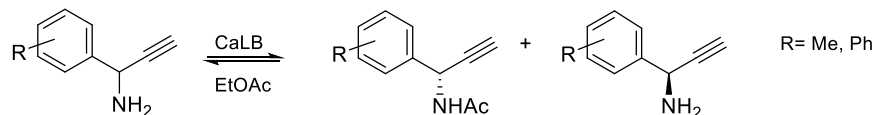
Figura 4. Ejemplos de resolución de ésteres catalizada por CaLB

Artículos

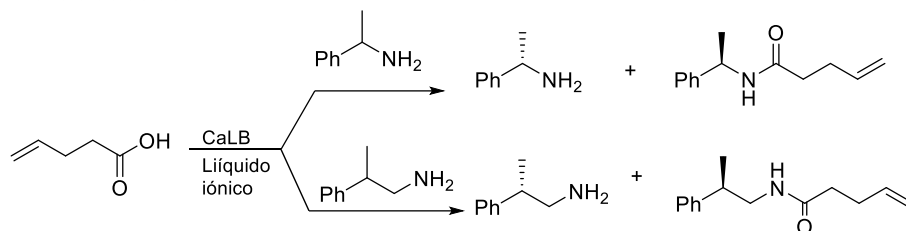
Respecto a la resolución de nucleófilos, los más recurrentes son las aminas y los alcoholes. Así, las aminas se han resuelto vía acetilación (Spelmezan et al., 2020; Campos et al., 2000; Gedey et al., 1999; González-Sabín et al., 2002; González-Sabín et al., 2004; Goswami et al., 2005; Sigmund & DiCosimo,

2004), aminólisis de ácidos (Irimescu & Kato, 2004; Prasad et al., 2005), aminólisis de ésteres (Alfonso et al., 1998; Fitz et al., 2005; Luna et al., 2002; Päiviö et al., 2012; Pozo et al., 1992; Pozo & Gotor, 1995) y resolución cinética dinámica (Figura 5) (Choi et al., 2001; Paetzold & Bäckvall, 2005).

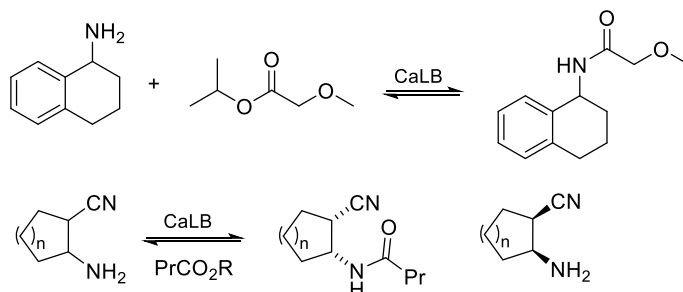
Acetilación



Aminólisis de ácidos



Aminólisis de ésteres



Resolución cinética dinámica

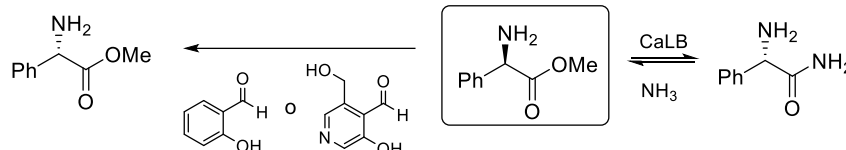
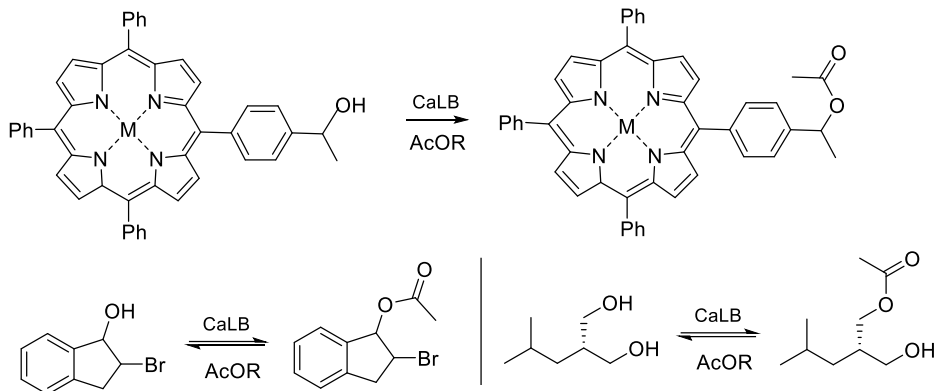


Figura 5. Ejemplos de resolución de aminas quirales inducida por CaLB

En la resolución de alcoholes quirales la transformación más recurrente es la acetilación (Henke et al., 2002; Rotticci et al., 2008). Con esta metodología se han resuelto

alcoholes acíclicos, cíclicos y desimetrización de alcoholes proquirales. Otra metodología útil es la resolución vía transesterificación (Figura 6) (Ottosson et al., 2002).

Acetilación



Transesterificación

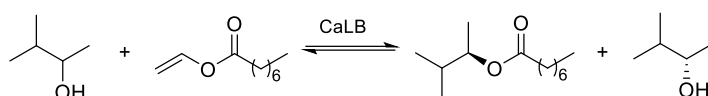


Figura 6. Ejemplos de resolución de alcoholes quirales inducida por CaLB

La resolución mecanoquímica empleando CaLB es un ejemplo de cómo la catálisis enzimática tiene compatibilidad técnica con dispositivos que pudieran ser agresivos desde el punto de vista estructural de los

biocatalizadores. No son pocos los ejemplos donde ha sido posible resolver fármacos (Pérez-Venegas et al., 2018, 2020 y 2022), aminas (Pérez-Venegas, et al. 2017) y alcoholes (Frigs, et al., 2016) (Figura 7).

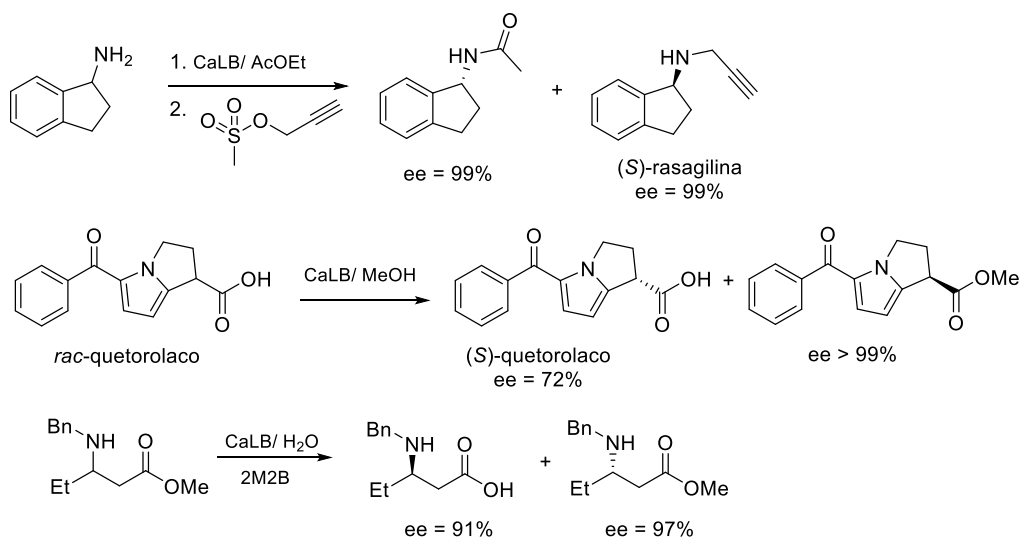


Figura 7. Ejemplos de resolución mecanoquímica empleando CaLB

Reacción promiscua II: Adición de Michael

Se han descrito dos reacciones promiscuas adicionales en el sitio de CaLB, la adición de Michael (adición 1,4) (Figura 2B) y la reacción aldólica (Figura 2C). Ambas transformaciones se logran sin catálisis covalente o formación

de algún intermedio sustrato enzima y se ha propuesto que el residuo Ser105 no participa en estas transformaciones (Torre et al., 2004; Strohmeier et al., 2009).

Las adiciones de Michael son posibles debido a que el sitio oxianiónico puede deslocalizar el

par de electrones del aceptor de Michel, formar una carga parcial positiva en posición β y un anolato, y entonces enlazar al donador de Michael (Figura 2B: B1 y B2). La función de la diada catalítica (Asp187-His224) es intercambiar el hidrógeno del donador al carbanión α y así completar la transformación para liberar el aducto de Michael (Figura 2B: B3 y B4). Gotor ha aportado importantes evidencias de que este mecanismo en particular puede operar con sustratos no carbonílicos (Torre et al., 2004).

Los ejemplos de catálisis de la adición de Michael con CaLB son adiciones de aminas secundarias a acrilonitrilo, aldehídos y esterés, así como formación y adición de enolatos (Cai et al., 2011; Strohmeier et al., 2009) a aldehídos, cetonas, esterés α,β -insaturados y nitros α,β -insaturados para formar enlaces C-C. Se ha documentado también la adición de peróxidos a aldehídos α,β -insaturados, adición de tioles y sulfóxidos a cetonas α,β -insaturadas (Madalińska et al., 2012) y adición de bencilamina a crotonato de metilo (Priego et al. 2009) (Figura 8).

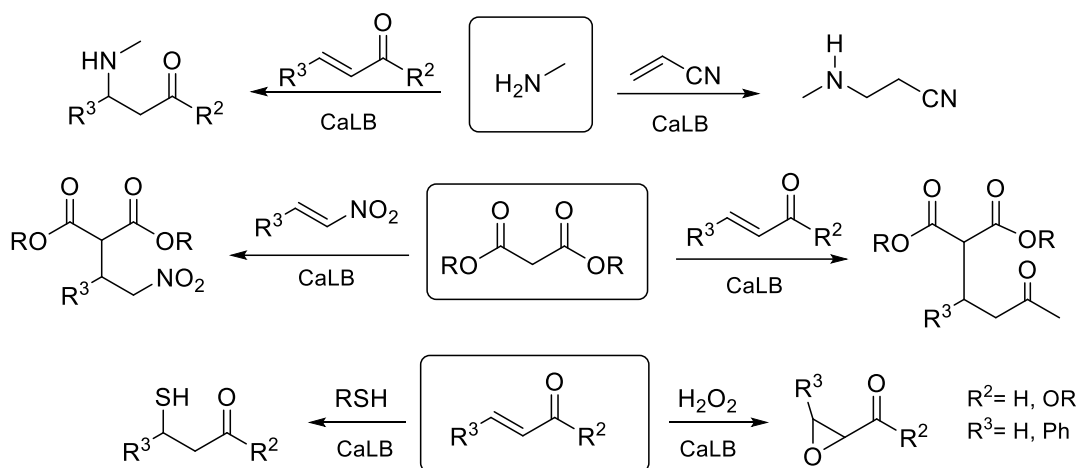


Figura 8. Adiciones de Michael catalizadas por CaLB

Se ha observado que la reacción de adición aza-Michael es quimioselectiva entre la formación β -aminoesteres y amidas cuando se emplean acrilatos y bencilamina (Figura 9). En estos sistemas ha sido posible demostrar que las adiciones tipo Michael catalizadas por CaLB tienden a favorecerse en disolventes apolares y las aminolisis en disolventes polares. El uso del disolvente adecuado utilizando como criterio de selectividad su polaridad puede ser una herramienta útil para

predecir la quimioselectividad de la reacción que llevara a cabo CaLB (Priego et al., 2009 ; Rivera-Ramírez et al., 2015 ; Steunenber et al., 2013). Nazarian y Arab también estudiaron la influencia del disolvente en la adición Aza-Michael mediante la síntesis quimioenzimática de 2-(2-benzoilhidrazinil) succinato de dietilo empleando benhidrazida y maleato de cis-dietilo catalizada por CaLB. (Figura 10) (Nazarian & Arab, 2022).

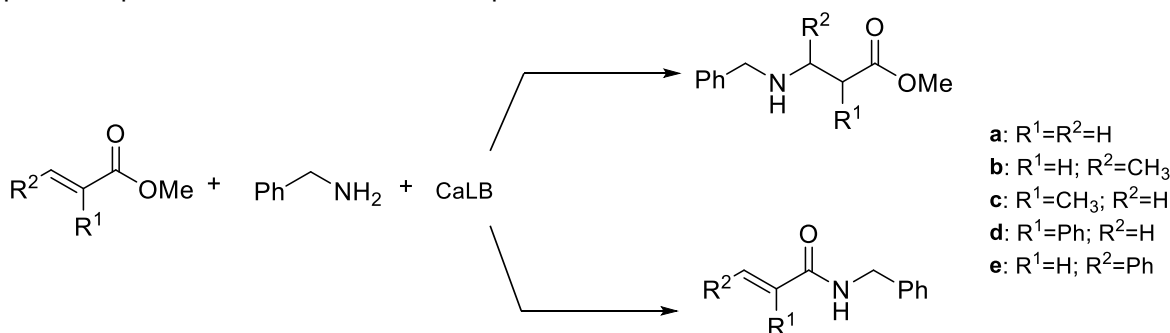


Figura 9. Quimioselectividad en las adiciones de Michael catalizadas por CaLB

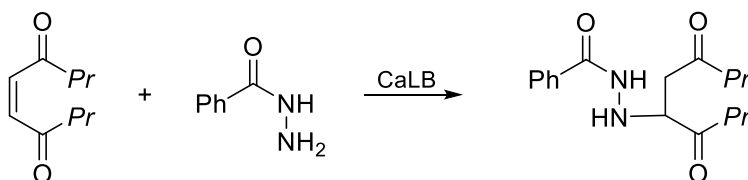


Figura 10. Síntesis quimio-enzimática de 2-(2-benzoylhidrazinil)succinato de dietilo empleando benhidrazida y maleato de *cis*-dietilo catalizada por CaLB

Reacción promiscua III: Formación de enolatos

Debido a que CaLB cataliza adiciones tipo Michael, es posible inferir que estas transcurren a través de la formación de un ión enolato el cual es neutralizado por la incorporación de un hidrógeno por parte de la diada Asp187-His224. Casi al inicio del descubrimiento de la promiscuidad de esta enzima se indagó si podría operar como una aldolasa (Figura 2C), lo cual se demostró posteriormente, sin embargo los rendimientos han sido tan bajos comparados con los obtenidos con otras enzimas que, esta función no se considera demasiado útil para emplearse en síntesis (Branneby et al., 2004; Dwivedee et al., 2018; Li et al., 2008)

En reacciones de tipo aldol catalizadas por CaLB (Figura 2C), la función de la diada Asp187-His224 es extraer el hidrógeno α del

sustrato para que entonces el sitio oxianionico estabilice al enolato (Figura 2C1 y 2 C2). La adición aldólica a un segundo grupo carbonilo liberará el nuevo producto que ahora contiene un nuevo enlace C-C (Figura 2C3 y 2C4). El mecanismo propuesto por Branneby (2004), sugiere que la histidina debe ser desprotonada para poder ser activada, funcionando como un catalizador acido-base general para posteriormente proceder con la reacción (Svedendahl et al., 2008, Patti et al., 2022).

Reacciones promiscuas no convencionales

Las reacciones no convencionales, se deben a la reactividad intrínseca de la enzima con grupos carbonilo que reactivamente interaccionan con otras funcionalidades. Un ejemplo es la adición a dobles enlaces de tioles (Figura 13) (Lou et al., 2008).

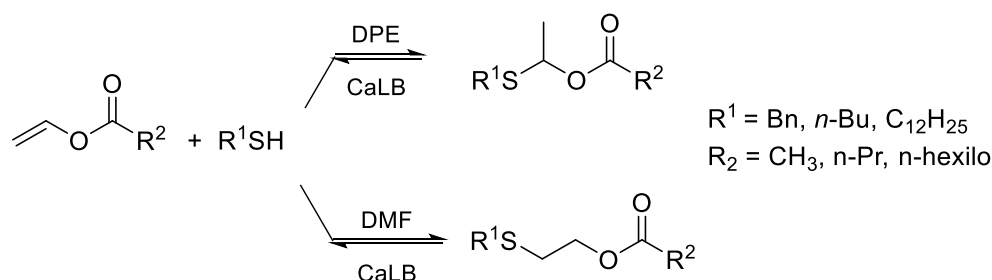


Figura 13. Adición a dobles enlaces catalizada por CaLB.

También ha sido reportada la actividad de epoxidación de CaLB en alquenos cortos, además de ser empleada en la producción de epóxidos mediante la generación de peroxiacidos y su uso en apertura de anillos de epóxidos, convirtiéndola en una gran alternativa para la reacción de epoxidación directa (Galmés et al., 2021; Svedendahl et al., 2008).

Svedendahl et al., (2008) han propuesto un mecanismo para la epoxidación directa de aldehídos α,β -insaturados catalizada por CaLB Ser105Ala mutante (Figura 11), con la cual la reacción procede mediante epoxidación indirecta, concluyendo que al igual que en otras reacciones, el bolsillo oxianion estabiliza la molécula mientras el residuo His224 funciona como un catalizador acido-base (Svedendahl et al., 2008).

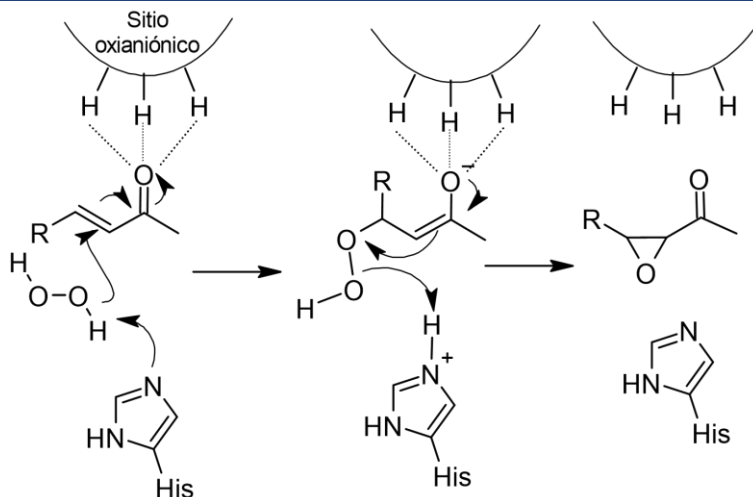


Figura 11. Reacción de epoxidación directa de un aldehído α,β -insaturado catalizada por CaLB Ser105Ala mutante.

Entre las reacciones no convencionales catalizadas por CaLB que han sido reportadas se encuentra además la reacción de aza-Diels-Alder, reacción de importancia en la síntesis de derivados de 2-azabicyclo [2.2.2] octano, componentes análogos de anestésicos locales. Yin et. al. (2017), evaluaron los efectos de diferentes variables

de reacción, tales como pH, temperatura, disolvente empleado, uso de aditivos, concentración de los sustratos por mencionar algunos, sobre el rendimiento de la reacción de aza-Diels-Alder, con el propósito de optimizar las condiciones de reacción empleando aldehídos aromáticos como sustratos (Figura 12) (Yin et al., 2017).

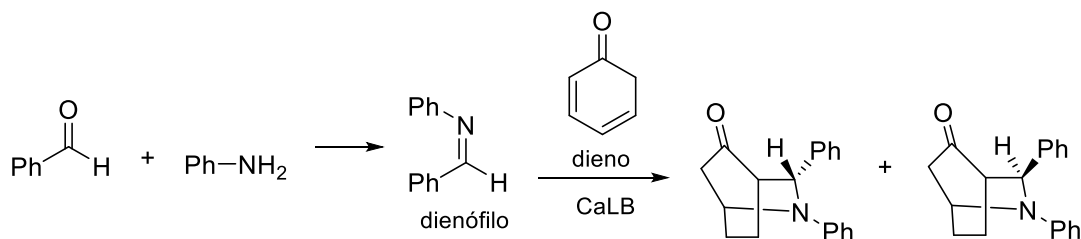


Figura 12. Reacción aza-Diels-Alder de tres componentes catalizada por CaLB

Conclusiones

CaLB cataliza una gran variedad de reacciones que podrían considerarse no convencionales gracias a su conocida promiscuidad catalítica. Dicha flexibilidad se debe a que es capaz de reconocer en su sitio catalítico sustratos carbonílicos y promover las reacciones que competen a estos, además de que esta enzima es compatible con disolventes y una variedad de condiciones de reacción, facilitando dichas reacciones químicas.

Gracias a esta propiedad, CaLB ha sido ampliamente usada en la síntesis de compuestos orgánicos con alto valor añadido,

como productos farmacéuticos y químicos finos, por mencionar algunos.

Se ha demostrado además que las alteraciones enfocadas en el sitio activo de la enzima pueden aumentar más su eficacia y especificidad hacia ciertas reacciones, como lo han demostrado estudios sobre las reacciones de adición aldólica empleando CaLB Ser105Ala mutante.

En resumen, la promiscuidad catalítica del CaLB muestra un gran potencial para expandir los límites de la síntesis orgánica y proporcionar una herramienta poderosa y versátil para la creación más eficiente y sostenible de nuevos compuestos químicos.

Referencias

- Alfonso, I., Astorga, C., Rebolledo, F., & Gotor, V. (1998). Sequential biocatalytic resolution of (f)-trans-cyclohexane-1,2-diamine. Chemoenzymatic synthesis of an optically active polyamine. *Chemical Communications*, 21, 2471–2472. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/CC99600024>
- Aoyagi, N., Kawauchi, S., & Izumi, T. (2004). Different recognitions of (E)- and (Z)-1,1'-binaphthyl ketoximes using lipase-catalyzed reactions. *Tetrahedron Letters*, 45(27), 5189–5192. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.05.051>
- Baldessari, A., & Mangone, C. P. (2001). One-pot biocatalyzed preparation of substituted amides as intermediates of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 335–341. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00018-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00018-7)
- Błaszczczyk, J., & Kiełbasiński, P. (2020). Quarter of a century after: A glimpse at the conformation and mechanism of candida antarctica lipase b. In *Crystals* (Vol. 10, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cryst10050404>
- Bornscheuer, U. T., & Kazlauskas, R. J. (2009). *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
- Branneby, C., Carlqvist, P., Hult, K., Brinck, T., & Berglund, P. (2004). Aldol additions with mutant lipase: Analysis by experiments and theoretical calculations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31(4–6), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.08.005>
- Cai, J.-F., Guan, Z., & He, Y.-H. (2011). The lipase-catalyzed asymmetric C–C Michael addition. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(3–4), 240–244. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.011>
- Campodónico, P. R., Calderón, C., Alcázar, J. J., Olivares, B., Jaldin, L., & Suárez-Rozas, C. (2023). Exploring the behavior of Candida antarctica lipase B in aqueous mixtures of an imidazolium ionic liquid and its surfactant analogue. *Frontiers in Chemistry*, 11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1289398>
- Campos, F., Bosch, M. P., & Guerrero, A. (2000). An efficient enantioselective synthesis of (R,R)-formoterol, a potent bronchodilator, using lipases. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11(13), 2705–2717. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(00\)00238-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166(00)00238-X)
- Carlqvist, P., Svedendahl, M., Branneby, C., Hult, K., Brinck, T., & Berglund, P. (2005). Exploring the active-site of a rationally redesigned lipase for catalysis of Michael-type additions. *ChemBioChem*, 6(2), 331–336. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400213>
- Choi, Y. K., Kim, M. J., Ahn, Y., & Kim, M. J. (2001). Lipase/palladium-catalyzed asymmetric transformations of ketoximes to optically active amines. *Organic Letters*, 3(25), 4099–4101. <https://doi.org/10.1021/ol0168622>
- Conde, S., Lopez-Serrano, P., & Martinez, A. (2000). Regioselective lipase-catalyzed g-monoamidation of d-glutamic acid diesters: effect of the N-protecting group. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11(12), 2537–2545. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(00\)00210-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166(00)00210-X)
- Cuiper, A. D., Kouwijzer, M. L. C. E., Grootenhuis, P. D. J., Kellogg, R. M., & Feringa, B. L. (1999). Kinetic resolutions and enantioselective transformations of 5-(acyloxy)pyrrolinones using Candida antarctica lipase B: Synthetic and structural aspects. *Journal of Organic Chemistry*, 64(26), 9529–9537. <https://doi.org/10.1021/jo991062e>
- De Zoete, M. C., Dalen, A. C. K. Van, Van Rantwijk, F., & Sheldon, R. A. (1993). Ester ammoniolysis: A new enzymatic reaction. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 24, 1831–1832. <https://doi.org/10.1039/C39930001831>
- De Zoete, M. C., Kock-Van Dalen, A. C., Van Rantwijk, F., & Sheldon, R. A. (1996). A new enzymatic one-pot procedure for the synthesis of carboxylic amides from carboxylic acids. In *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (Vol. 2). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1381-1177\(96\)00009-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1381-1177(96)00009-4)
- Dhake, K. P., Tambade, P. J., Singhal, R. S., & Bhanage, B. M. (2010). Promiscuous Candida antarctica lipase B-catalyzed synthesis of β -amino esters via aza-Michael addition of amines to acrylates. *Tetrahedron Letters*, 51(33), 4455–4458. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.06.089>
- Dwivedee, B. P., Soni, S., Sharma, M., Bhaumik, J., Laha, J. K., & Banerjee, U. C. (2018). Promiscuity of Lipase-Catalyzed Reactions for Organic Synthesis: A Recent Update. In *ChemistrySelect*

(Vol. 3, Issue 9, pp. 2441–2466). Wiley-Blackwell.
<https://doi.org/10.1002/slct.201702954>

Fitz, M., Lundell, K., Lindroos, M., Fülöp, F., & Kanerva, L. T. (2005). An effective approach to the enantiomers of alicyclic β -aminonitriles by using lipase catalysis. *Tetrahedron Asymmetry*, 16(22), 3690–3697.
<https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2005.10.017>

Flores-Sánchez, P., Escalante, J., & Castillo, E. (2005). Enzymatic resolution of N-protected- β -amino methyl esters, using lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron Asymmetry*, 16(3), 629–634. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2004.11.082>

Hernández, J. G., Frings, M., & Bolm, C. (2016). Mechanochemical Enzymatic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols under Ball-Milling Conditions. *ChemCatChem*, 8(10), 1769–1772.
<https://doi.org/10.1002/cctc.201600455>

Galmés, M. A., Świderek, K., & Moliner, V. (2021). Computational Studies Suggest Promiscuous *Candida antarctica* Lipase B as an Environmentally Friendly Alternative for the Production of Epoxides. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(7), 3604–3614.
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00425>

Gamboa-Velázquez, G., & Juaristi, E. (2022). Mechanoenzymology in the Kinetic Resolution of β -Blockers: Propranolol as a Case Study. *ACS Organic and Inorganic Au*, 2(4), 343–350.
<https://doi.org/10.1021/acscorginorgau.1c00049>

Ganjalkhany, M. R., Ranjbar, B., Taghavi, A. H., & Tohidi Moghadam, T. (2012). Functional motions of *Candida antarctica* lipase b: A survey through open-close conformations. *PLoS ONE*, 7(7).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040327>

García, M. J., Rebolledo, F., & Gotor, V. (1993). Chemoenzymatic Aminolysis and Ammonolysis of P-Ketoesters. In *Tetrahedron Letters* (Vol. 34, Issue 38). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)61751-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)61751-3)

García, M. J., Rebolledo, F., & Gotor, V. (1994). Lipase-catalyzed aminolysis and ammonolysis of β -ketoesters. Synthesis of optically active β -ketoamides. *Tetrahedron*, 50(23), 6935–6940.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)81346-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)81346-6)

García-Arrazola, R., López-Guerrero, D. A., Gimeno, M., & Bárzana, E. (2009). Lipase-catalyzed synthesis of poly-L-lactide using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 51(2), 197–201.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.08.014>
 García-Urdiales, E., Rebolledo, F., & Gotor, V.

(1999). Enzymatic ammonolysis of ethyl (\pm)-4-chloro-3-hydroxybutanoate. Chemoenzymatic syntheses of both enantiomers of pyrrolidin-3-ol and 5-(chloromethyl)-1,3-oxazolidin-2-one. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10(4), 721–726.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(99\)00034-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166(99)00034-8)

Gedey, S., Liljeblad, A., Fülöp, F., & Kanerva, L. T. (1999). Sequential resolution of ethyl 3-aminobutyrate with carboxylic acid esters by *Candida antarctica* lipase B. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10(13), 2573–2581.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(99\)00261-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166(99)00261-X)

Gill, I., & Patel, R. (2006). Biocatalytic ammonolysis of (5S)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)-5-ethyl ester: Preparation of an intermediate to the dipeptidyl peptidase IV inhibitor Saxagliptin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16(3), 705–709.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.10.021>

González-Sabín, J., Gotor, V., & Rebolledo, F. (2002). CAL-B-catalyzed resolution of some pharmacologically interesting b-substituted isopropylamines. *TETRAHEDRON: ASYMMETRY*, 13, 1315–1320.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(02\)00336-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166(02)00336-1)

González-Sabín, J., Gotor, V., & Rebolledo, F. (2004). Chemoenzymatic preparation of optically active trans-cyclohexane-1,2- diamine derivatives: An efficient synthesis of the analgesic U(-)-50,488. *Chemistry - A European Journal*, 10(22), 5788–5794. <https://doi.org/10.1002/chem.200400607>

Goswami, A., Guo, Z., Parker, W. L., & Patel, R. N. (2005). Enzymatic resolution of sec-butylamine. *Tetrahedron Asymmetry*, 16(9), 1715–1719.
<https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2005.03.012>

Gotor-Fernández, V., Busto, E., & Gotor, V. (2006). *Candida antarctica* lipase B: An ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. In *Advanced Synthesis and Catalysis* (Vol. 348, Issues 7–8, pp. 797–812).
<https://doi.org/10.1002/adsc.200606057>

Henke, E., Pleiss, J., & Bornscheuer, U. T. (2002). "Activity of lipases and esterases towards tertiary alcohols: New insights into structure-function relationships."

Irimescu, R., & Kato, K. (2004a). Investigation of ionic liquids as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30(5–6), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.05.003>
 Irimescu, R., & Kato, K. (2004b). Lipase-catalyzed

- enantioselective reaction of amines with carboxylic acids under reduced pressure in non-solvent system and in ionic liquids. *Tetrahedron Letters*, 45(3), 523–525.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2003.10.210>
- Kazlauskas, R. J., E Weissfloch, A. N., Rappaport, A. T., & Cuccia, L. A. (1991). A Rule To Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem*, 56(8), 2656–2665.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jo00008a016>
- Lau, R. M., Sorgedragger, M. J., Carrea, G., Van Rantwijk, F., Secundo, F., & Sheldon, R. A. (2004). Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: Effects on structure and activity. *Green Chemistry*, 6(9), 483–487.
<https://doi.org/10.1039/b405693k>
- Lavandera, I., Fernández, S., Ferrero, M., & Gotor, V. (2004). First Regioselective Enzymatic Alkoxy-carbonylation of Primary Amines. Synthesis of Novel 5'- and 3'-Carbamates of Pyrimidine 3',5'-Diaminonucleoside Derivatives Including BVDU Analogues. *Journal of Organic Chemistry*, 69(5), 1748–1751. <https://doi.org/10.1021/jo035678m>
- Li, C., Feng, X. W., Wang, N., Zhou, Y. J., & Yu, X. Q. (2008). Biocatalytic promiscuity: The first lipase-catalysed asymmetric aldol reaction. *Green Chemistry*, 10(6), 616–661.
<https://doi.org/10.1039/b803406k>
- Lima, R. N., dos Anjos, C. S., Orozco, E. V. M., & Porto, A. L. M. (2019). Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. In *Molecular Catalysis* (Vol. 466, pp. 75–105). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.01.007>
- Lima, R. N., Anjos, C. S., & Porto, A. L. M. (2022). Biocatalytic synthesis of lipophilic amides by the lipase of *Candida antarctica* type B. *Molecular Catalysis*, 530, 112635.
<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2022.112635>
- López-García, M., Alfonso, I., & Gotor, V. (2003). Desymmetrization of dimethyl 3-substituted glutarates through enzymatic ammonolysis and aminolysis reactions. *Tetrahedron Asymmetry*, 14(5), 603–609. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(02\)00869-8](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(02)00869-8)
- Lou, F. W., Liu, B. K., Wu, Q., Lv, D. S., & Lin, X. F. (2008). *Candida antarctica* lipase B (CAL-B)-catalyzed carbon-sulfur bond addition and controllable selectivity in organic media. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 350(13), 1959–1962.
<https://doi.org/10.1002/adsc.200800207>
- Luna, A., Alfonso, I., & Gotor, V. (2002). Biocatalytic approaches toward the synthesis of both enantiomers of trans-cyclopentane-1,2-diamine. *Organic Letters*, 4(21), 3627–3629.
<https://doi.org/10.1021/ol026574l>
- Madalińska, L., Kwiatkowska, M., Cierpień, T., & Kielbasiński, P. (2012). Investigations on enzyme catalytic promiscuity: The first attempts at a hydrolytic enzyme-promoted conjugate addition of nucleophiles to α,β -unsaturated sulfinyl acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 81, 25–30.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.05.002>
- Mei, Y., Kumar, A., & Gross, R. (2003). Kinetics and mechanism of *Candida antarctica* lipase B catalyzed solution polymerization of ϵ -Caprolactone. *Macromolecules*, 36(15), 5530–5536. <https://doi.org/10.1021/ma025741u>
- Monteiro, R. R. C., Virgen-Ortiz, J. J., Berenguer-Murcia, Á., da Rocha, T. N., dos Santos, J. C. S., Alcántara, A. R., & Fernandez-Lafuente, R. (2021). Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. *Catalysis Today*, 362, 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.026>
- Nazarian, Z., & Arab, S. S. (2022). Solvent-dependent activity of *Candida antarctica* lipase B and its correlation with a regioselective mono aza-Michael addition - experimental and molecular dynamics simulation studies. *Heliyon*, 8(8).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10336>
- Ortega-Rojas, M. A. (2019). Síntesis y resolución de β -y y -amino ésteres catalizada por CaL-B [UAEM].
<http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/3122>
- Ottosson, J., Fransson, L., King, J. W., & Hult, K. (2002). Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1594(2), 325–334.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00324-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00324-7)
- Paetzold, J., & Bäckvall, J. E. (2005). Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of primary amines. *Journal of the American Chemical Society*, 127(50), 17620–17621.
<https://doi.org/10.1021/ja056306t>
- Päiviö, M., Perkiö, P., & Kanerva, L. T. (2012). Solvent-free kinetic resolution of primary amines catalyzed by *Candida antarctica* lipase B: Effect of immobilization and recycling stability. *Tetrahedron Asymmetry*, 23(3–4), 230–236.

<https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2012.02.008>

Patti, A.; Sanfilippo, C. Stereoselective Promiscuous Reactions Catalyzed by Lipases. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 2675. <https://doi.org/10.3390/ijms23052675>

Pérez-Venegas, M., & Juaristi, E. (2018). Mechanoenzymatic resolution of racemic chiral amines, a green technique for the synthesis of pharmaceutical building blocks. *Tetrahedron*, 74(44), 6453–6458. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.09.029>

Pérez-Venegas, M., Reyes-Rangel, G., Neri, A., Escalante, J., & Juaristi, E. (2017). Correction: Mechanochemical enzymatic resolution of N-benzylated-β₃-amino esters. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 13, 2128–2130. <https://doi.org/10.3762/bjoc.13.210>

Pérez-Venegas, M., Rodríguez-Treviño, A. M., & Juaristi, E. (2020). Dual Mechanoenzymatic Kinetic Resolution of (±)-Ketorolac. *ChemCatChem*, 12(6), 1782–1788. <https://doi.org/10.1002/cctc.201902292>

Pozo, M., & Gotor, V. (1995). Double Enantioselective Enzymic Synthesis of Carbonates and Urethanes. *Tetrahedron: Asymmetry*, 6(11), 2797–2802. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0957-4166\(95\)00369-Z](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0957-4166(95)00369-Z)

Pozo, M., Pulido, R., & Gotof, V. (1992). Vinyl Carbonates as Novel Alkoxy-carbonylation Reagents in Enzymatic Synthesis of Carbonates. *Tetrahedron*, 48(31), 6477–6484. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)88237-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)88237-5)

Prasad, A. K., Husain, M., Singh, B. K., Gupta, R. K., Manchanda, V. K., Olsen, C. E., & Parmar, V. S. (2005). Solvent-free biocatalytic amidation of carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*, 46(26), 4511–4514. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.04.121>

Priego, J., Ortíz-Nava, C., Carrillo-Morales, M., López-Munguía, A., Escalante, J., & Castillo, E. (2009). Solvent engineering: an effective tool to direct chemoselectivity in a lipase-catalyzed Michael addition. *Tetrahedron*, 65(2), 536–539. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.10.103>

Puertas, S., Rebolledo, F., & Gotor, V. (1996). Enantioselective Enzymatic Aminolysis and Ammonolysis of Dimethyl 3-Hydroxyglutarate. Synthesis of (R)-4-Amino-3-hydroxybutanoic Acid. *J. Org. Chem.* 61(17), 6024–6027. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jo960468d>
Rivera-Ramírez, J. D., Escalante, J., López-

Munguía, A., Marty, A., & Castillo, E. (2015). Thermodynamically controlled chemoselectivity in lipase-catalyzed aza-Michael additions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 112, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.12.009>

Rotticci, D., Ottosson, J., Norin, T., & Hult, K. (2008). *Candida antarctica* Lipase B a tool for preparation of optically alcohols. In *Enzymes in Nonaqueous Solvents* (Vol. 15, p. 261). Humana Press Inc.

Sánchez, V. M., Rebolledo, F., & Gotor, V. (1999). *Candida antarctica* lipase-catalyzed doubly enantioselective aminolysis reactions. Chemoenzymatic synthesis of 3-hydroxypyrrolidines and 4-(Silyloxy)-2-oxopyrrolidines with two stereogenic centers. *Journal of Organic Chemistry*, 64(5), 1464–1470. <https://doi.org/10.1021/jo981630a>

Sigmund, A. E., & DiCosimo, R. (2004). Enzymatic resolution of (RS)-2-(1-aminoethyl)-3-chloro-5-(substituted) pyridines. *Tetrahedron Asymmetry*, 15(18), 2797–2799. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2004.07.043>

Spelmezan, C. G., Bencze, L. C., Katona, G., Irimie, F. D., Paizs, C., & Tos, M. I. (2020). Efficient and stable magnetic chitosan-lipase B from *Candida antarctica* bioconjugates in the enzymatic kinetic resolution of racemic heteroarylethanol. *Molecules*, 25(2). <https://doi.org/10.3390/molecules25020350>

Steunenbergh, P., Sijm, M., Zuilhof, H., Sanders, J. P. M., Scott, E. L., & Franssen, M. C. R. (2013). Lipase-catalyzed aza-michael reaction on acrylate derivatives. *Journal of Organic Chemistry*, 78(8), 3802–3813. <https://doi.org/10.1021/jo400268u>

Strohmeier, G. A., Sovic, T., Steinkellner, G., Hartner, F. S., Andryushkova, A., Purkarthofer, T., Glieder, A., Gruber, K., & Griengl, H. (2009). Investigation of Lipase-Catalyzed Michael-type Carbon-Carbon Bond Formations. *Tetrahedron*, 65(29), 5663–5668. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.05.042>

Svedendahl, M., Carlqvist, P., Branneby, C., Allnér, O., Frise, A., Hult, K., Berglund, P., & Brinck, T. (2008). Direct epoxidation in *Candida antarctica* lipase B studied by experiment and theory. *ChemBioChem*, 9(15), 2443–2451. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800318>

Svedendahl, M., Hult, K., & Berglund, P. (2005). Fast carbon-carbon bond formation by a promiscuous lipase. *Journal of the American Chemical Society*, 127(51), 17988–17989. <https://doi.org/10.1021/ja056660r>

Tjørnelund, H. D., Vind, J., Brask, J., Woodley, J. M., & Peters, G. H. J. (2023). *Candida antarctica* lipase B performance in organic solvent at varying water activities studied by molecular dynamics simulations. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 5451–5462. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.10.049>

Torre, O., Alfonso, I., & Gotor, V. (2004). Lipase catalysed Michael addition of secondary amines to acrylonitrile. *Chemical Communications*, 4(15), 1724–1725. <https://doi.org/10.1039/b402244k>

Uppenberg, J., Ohmer, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthomen, T., & Jones, T. A. (1995). Crystallographic and Molecular-Modeling Studies of Lipase B from *Candida antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket for Secondary Alcohols+>\$. In *Biochemistry* (Vol. 34). <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bi00051a035>

Uppenberg, J., Shamkant, P., Bergfors, T., & Jones, T. A. (1994). Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Biol.*, 235, 790–792. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1035>

Velonia, K., Flomenbom, O., Loos, D., Masuo, S., Cotlet, M., Engelborghs, Y., Hofkens, J., Rowan, A. E., Klaffer, J., Nolte, R. J. M., & De Schryver, F. C. (2005). Single-enzyme kinetics of CALB-catalyzed hydrolysis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 44(4), 560–564. <https://doi.org/10.1002/anie.200460625>

Wu, M. Y., Li, K., He, T., Feng, X. W., Wang, N., Wang, X. Y., & Yu, X. Q. (2011). A novel enzymatic tandem process: Utilization of biocatalytic promiscuity for high stereoselective synthesis of 5-hydroxyimino-4,5-dihydrofurans. *Tetrahedron*, 67(14), 2681–2688. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.01.060>

Yin, D. H., Liu, W., Wang, Z. X., Huang, X., Zhang, J., & Huang, D. C. (2017). Enzyme-catalyzed direct three-component aza-Diels–Alder reaction using lipase from *Candida* sp. 99–125. *Chinese Chemical Letters*, 28(1), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2016.10.015>

Yu, Y., & Lutz, S. (2011). Circular permutation: A different way to engineer enzyme structure and function. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 29, Issue 1, pp. 18–25). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.10.004>

Zhang, X., Qi, F., Qi, J., Yang, F., Shen, J., Cai, X., Liu, Z., & Zheng, Y. (2022). Efficient enzymatic synthesis of L -ascorbyl palmitate using *Candida antarctica* lipase B-embedded metal-organic framework. *Biotechnology Progress*, 38(1). <https://doi.org/10.1002/btpr.3218>

Zieniuk, B., Fabiszewska, A., & Białecka-Florjańczyk, E. (2020). Screening of solvents for favoring hydrolytic activity of *Candida antarctica* Lipase B. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(4), 605–613. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02252-0>