

función monodeterminantal SCF-HF (tal como explicábamos en el capítulo III).

Tabla 4.1. Energía (u.a.), energía relativa a R (kcal/mol) en paréntesis, y el promedio del gradiente de longitudes ($\text{mdyn} \times 10^4$) de reactivos (R), estado de transición (ET) y producto (P), calculados con los diferentes conjuntos de base.

Conjunto de base	R	ET	P
STO-3G (I)	-279.105583 (0.0) 3.77	-279.033863 (45.00) 1.29	-279.125941 (-12.78) 3.84
3-21G (II)	-281.254803 (0.0) 2.28	-281.180099 (46.88) 2.95	-281.257030 (-1.40) 4.91
4-21G (III)	-282.162640 (0.0) 3.97	-282.088258 (46.67) 1.83	-282.163920 (-0.80) 4.43
4-31G (IV)	-282.408258 (0.0) 3.46	-282.325439 (51.97) 2.76	-282.413157 (-3.07) 2.94
6-31G (V)	-282.693799 (0.0) 3.19	-282.611550 (51.61) 4.84	-282.700270 (-4.06) 3.55
6-311G (VI)	-282.767370 (0.0) 3.32	-282.686289 (50.88) 1.10	-282.774281 (-4.34) 3.10
6-31G* (VII)	-282.849417 (0.0) 4.69	-282.755630 (58.85) 4.17	-282.836131 (-8.34) 3.09

Podemos esperar que simplemente considerando la energía de correlación en el ET, influiremos en la barrera energética. El ET, cuya estructura corresponde a una especie con distancias interatómicas que corresponden a enlaces a medio formar, quedará así mejor descrito. Las energías de los puntos estacionarios correspondientes a moléculas estables, R y P, no se verán afectadas seriamente ya que el método HF es suficiente para su descripción. El resultado que debemos esperar es una reducción en las diferencias energéticas entre el ET y R. Antes de adentrarnos en lo que constituiría un segundo paso en la sofisticación de nuestros cálculos, discutiremos las estructuras obtenidas y la influencia que tiene sobre ellas la elección de la base.

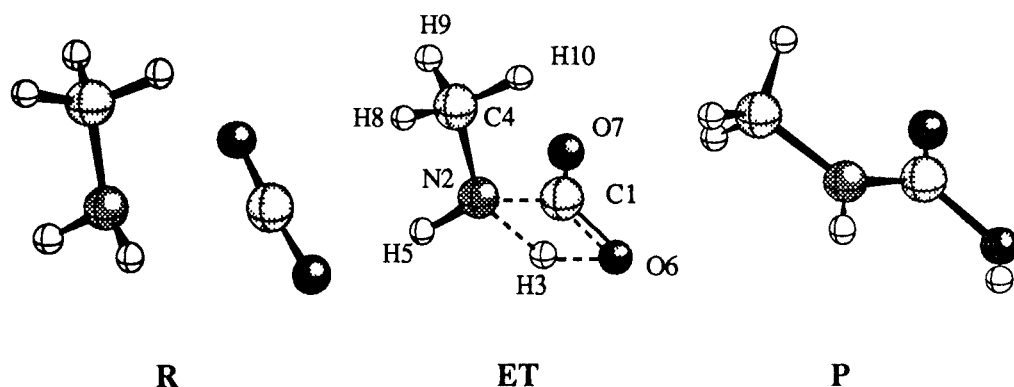


Figura 4.3 Representación de las estructuras de los puntos estacionarios para la reacción de adición del $\text{CO}_2 + \text{CH}_3\text{NH}_2$.

Estructuras de los Puntos Estacionarios

Los puntos estacionarios en la reacción de adición del CO_2 al CH_3NH_2 en vacío se ilustran en la figura 4.3. Sobre la estructura del ET hemos etiquetado los átomos según el modelo y la matriz Z empleada. De los resultados obtenidos se deduce que la reacción ocurre a través de un ET formado por

cuatro centros y controlado por la posición de los átomos C1, N2, H3 y O6. Los valores de las distancias entre estos cuatro átomos se dan en la tabla 4.2.

Tabla 4.2.- Distancias atómicas (en Å) más importantes de las estructuras optimizadas de reactivos, ET y productos obtenidas con los diferentes conjuntos de base.

	I	II	III	IV	V	VI
Reactivos:						
C1-N2	2.7650	2.6339	2.6638	2.7698	2.8109	2.8328
N2-H3	1.0333	1.0050	1.0025	0.9966	0.9969	0.9961
H3-O6	3.1414	3.0939	3.1061	3.0530	3.0881	3.1237
C1-O6	1.1884	1.1570	1.1590	1.1590	1.1622	1.1601
Estado de transición:						
C1-N2	1.6810	1.5678	1.5653	1.5285	1.5217	1.5092
N2-H3	1.1639	1.2930	1.3023	1.3029	1.2998	1.2930
H3-O6	1.3252	1.2848	1.2843	1.2847	1.2859	1.2830
C1-O6	1.2883	1.2919	1.3012	1.2930	1.2979	1.2970
Productos:						
C1-N2	1.4544	1.3599	1.3617	1.3523	1.3560	1.3540
N2-H3	2.2690	2.3966	2.3934	2.4176	2.4235	2.4115
H3-O6	0.9884	0.9637	0.9609	0.9508	0.9505	0.9463
C1-O6	1.3942	1.3654	1.3738	1.3581	1.3621	1.3595

En la tabla 4.3. se presentan las variables geométricas de los tres puntos estacionarios obtenidos con la mejor de las bases empleadas: 6-31G*. Las magnitudes de los valores en el ET muestran esta adición en una avanzada etapa de la reacción (entre un 70 y 90 %), excepto para la distancia N2-H3, cuyo valor está más próximo a los reactivos que a los productos. Una importante conclusión es que los parámetros geométricos obtenidos con los

diferentes conjuntos de base no difieren significativamente como se deduce de la tabla 4.2.

Tabla 4.3.- Variables geométricas de las estructuras optimizadas de reactivos , ET y productos, obtenidas con el cálculo HF/6-31G*. Distancias de enlace en Å, ángulos de enlace y ángulos dihedros en grados.

	Reactivos	ET	Productos
<u>Distancias:</u>			
C1-N2	2.9409	1.5188	1.3649
N2-H3	1.0017	1.2656	2.3039
H3-O6	3.2588	1.2739	0.9480
C1-O6	1.1441	1.2650	1.3387
C1-O7	1.1439	1.1797	1.1859
N2-H5	1.0019	1.0056	0.9956
N2-C4	1.4556	1.4654	1.4504
C4-H8	1.0838	1.0822	1.0850
<u>Ángulos de enlace:</u>			
H3-N2-C1	106.29	70.29	55.89
C4-N2-H3	110.84	126.14	174.79
O6-C1-N2	91.35	98.18	114.33
O7-C1-O6	176.66	137.45	121.23
H8-C4-N2	109.20	110.21	112.39
H5-N2-H3	106.83	115.57	69.60
<u>Ángulos dihedros:</u>			
H8-C4-N2-C1	58.22	62.40	70.46
O6-C1-N2-H3	9.58	1.74	7.73
O7-C1-O6-H3	173.67	176.81	161.83
H5-N2-C1-O7	74.65	72.54	153.70

Vector de transición y Constantes de Fuerza

A fin de distinguir qué variables controlan el proceso de adición, podemos utilizar las componentes del vector de transición para el ET. El

cálculo del vector de transición para el ET se muestra en la tabla 4.4, y se puede observar cómo las componentes de éste son prácticamente independientes de la elección del conjunto de base, excepto para los resultados en STO-3G. En nuestro modelo, únicamente seis variables (coordenadas q_i) contribuyen más de un 10% al vector de transición: la formación del enlace C1-N2, la rotura del enlace N2-H3 y el cambio de la distancia C1-O6 (cambio que corresponde al paso de enlace doble a enlace simple) son las distancias predominantes. Los ángulos que describen la posición del H3: H3-N2-C1, C4-N2-H3 y H5-N2-H3, son también importantes. La posición relativa de los cuatro átomos que controlan la reacción es nuevamente determinante. Localizado el ET analíticamente, tanto en coordenadas cartesianas como en coordenadas internas, encontramos idénticos resultados al obtenido numericamente por medio de la subrutina VA05. En este cálculo hemos tenido que utilizar el programa GAUSSIAN90. El valor propio negativo tan grande sugiere una zona cuadrática del ET muy convexa.

La precisión y exactitud de las constantes de fuerza obtenidas en los cálculos *ab initio* ha sido origen de muchas controversias¹⁴⁻¹⁶. Aún más, el método empleado para calcularlas (por comparación entre dos puntos consecutivos del proceso SCF) sólo proporciona una estimación grosera de estas cantidades, aunque debemos reconocer que se puede extraer una valiosa información de las transformaciones estructurales. Las constantes de fuerza para las variables que toman parte en el vector de transición obtenido por el procedimiento VA05 se presentan en la tabla 4.4. Podemos observar cómo únicamente la constante de fuerza del modo normal de vibración correspondiente al stretching N2-H3 es negativo. Este resultado, junto con el hecho de que sus componentes en el vector de transición representan el máximo valor, confirman esta distancia como la componente más importante de la coordenada de reacción en la región cuadrática del ET.

Tabla 4.4.- Componentes del vector de transición del ET calculado con los diferentes conjuntos de base. Entre paréntesis la constante de fuerza K (mdyn/Å).

	I	II	III	IV	V	VI	VII
<u>Valor propio:</u>	-5.340	-4.112	-4.040	-4.817	-4.917	-5.162	-5.557
<u>Distancias:</u>							
C1-N2	-0.548 (0.75)	-0.360 (2.98)	-0.350 (3.10)	-0.371 (2.43)	-0.366 (2.44)	-0.328 (2.75)	-0.335 (2.55)
N2-H3	0.628 (1.22)	0.791 (-0.47)	0.798 (-0.53)	0.774 (-0.81)	0.771 (-0.85)	0.744 (-0.73)	0.714 (-0.66)
C1-O6	0.256 (9.66)	0.160 (10.42)	0.158 (10.02)	0.139 (10.43)	0.133 (10.55)	0.153 (8.22)	0.177 (8.87)
<u>Ángulos:</u>							
H3-N2-C1	-0.338 (2.41)	-0.344 (3.27)	-0.339 (3.10)	-0.364 (2.83)	-0.372 (2.75)	-0.446 (1.94)	-0.469 (1.49)
C4-N2-H3	-0.287 (3.99)	-0.271 (3.51)	-0.267 (3.54)	-0.299 (3.08)	-0.304 (3.02)	-0.314 (3.02)	-0.323 (2.97)
H5-N2-H3	-0.135 (1.81)	-0.123 (2.34)	-0.121 (2.35)	-0.103 (2.32)	-0.098 (2.30)	-0.092 (2.10)	-0.102 (2.10)

Para verificar la capacidad de los diferentes conjuntos de base, podemos comparar los valores del vector de transición y, excepto para los resultados en base mínima o STO-3G, se observan situaciones similares en todos los cálculos. Mientras el enlace C1-N2 alcanza un valor para la constante K significativamente menor al promedio de los valores para los restantes enlaces, el enlace C1-O6 exhibe un valor de K positivo y elevado.

El establecimiento de una posible relación entre la energía de activación (E_a) y la energía de reacción (ΔE) se puede plantear utilizando la relación de Miller más sencilla¹⁷:

$$X^* = \frac{E_a}{2E_a - \Delta E} \quad (4.1)$$

Los valores del parámetro X^* obtenidos mediante la ecuación de Miller oscilan entre 0.44 y 0.50. Dado que la reacción es exotérmica, el postulado de Hammond¹⁸ se cumple. No obstante, las distancias atómicas revelan que el ET se encuentra en una etapa avanzada de la reacción, lo cual es contrario a los resultados que se desprenden de la ecuación 4.1. Esta expresión la hemos utilizado por su simplicidad, si bien otras ecuaciones¹⁹ siguen la misma tendencia.

Diagramas de More O'Ferrall-Jencks

Los órdenes de enlace se utilizan como una medida del progreso de una reacción en teorías de correlación estructura-reactividad²⁰ a fin de buscar las analogías de las estructuras de ETs para una familia de compuestos. Recientemente, Lendvay²¹ ha puesto de manifiesto la importancia de los órdenes de enlace y su aplicación al estudio teórico de reacciones químicas.

Con el propósito de profundizar en la reorganización electrónica que tiene lugar durante la reacción, han sido analizados los órdenes de enlace de reactivos, productos y ET. En el ET, los órdenes de enlace de las distancias N2-C1 y H3-O6 alcanzan valores alrededor de 0.7 y 0.3 respectivamente, mientras que las distancias N2-H3 y C1-O6 decrecen a 0.4 y 1.3 respectivamente. Estos resultados revelan el mecanismo de reacción como un proceso asincrónico.

Otra forma de explicar el camino de reacción puede ser por medio del análisis de algunos órdenes de enlace seleccionados²². La diferencia en la estructura del ET calculada por medio de los diferentes conjuntos de base se puede plasmar en términos de diagramas de Moore O'Ferrall-Jencks modificados tal como se presenta en la figura 4.4.

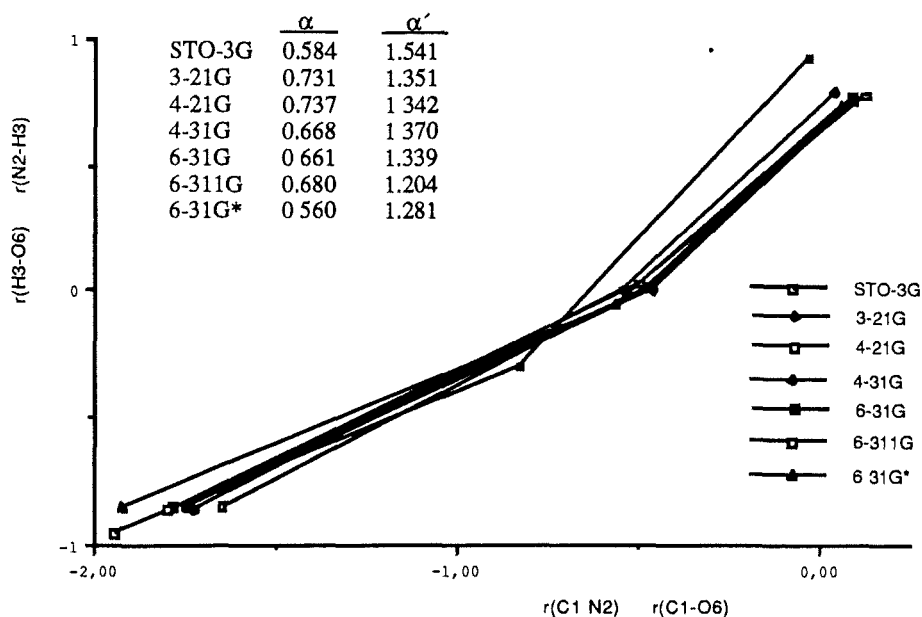


Figura 4.4.- Diagrama modificado de More O'Ferrall-Jencks para la reacción de adición del CO_2 sobre CH_3NH_2 obtenido con las diferentes bases I-VII.

La esquina inferior izquierda representa los reactivos, mientras que la esquina superior derecha los productos. Las esquinas superior izquierda e inferior derecha corresponderían a intermedios hipotéticos: estructuras iónicas (catiónicas o aniónicas) que aparecerían si la reacción discurriera por etapas. La reacción sigue una línea que conecta la posición de los reactivos, el ET y los productos. La recta diagonal que conecta R y P representaría un proceso sincrónico. El análisis del diagrama 4.4 muestra un mecanismo asincrónico y el camino de reacción descrito por las pendientes α (R-TS) y α' (TS-P) es, a excepción nuevamente del resultado en STO-3G, independiente del conjunto de base. Los valores calculados de α y α' oscilan en los intervalos 0.56-0.74 y 1.20-1.54 respectivamente. En el ET, las transformaciones de los enlaces C1-O6 (de doble enlace pasa a enlace sencillo), N2-H3 (rotura de enlace) y el N2-C1 (formación de enlace) están próximas al 70% de su valor final, mientras que

el enlace H3-O6 está sólo alrededor del 30% de su formación. Esta descripción nuevamente muestra el ET en una etapa avanzada en el camino de reacción, más cercana a productos que a reactivos. Este resultado es contrario, sin embargo, a lo que sugiere el postulado de Hammond¹⁸ para reacciones exotérmicas, pero en concordancia con los resultados estructurales previamente discutidos.

De la figura 4.4 se deduce fácilmente que los resultados son similares para todos los cálculos. Sin embargo, al comparar los valores de α' , mientras los calculados en base STO-3G dan una pendiente de 1.54, el resto de bases oscila en un margen de 1.20 a 1.37. Estos resultados están en concordancia con estudios teóricos llevados en otros mecanismos de reacción^{23,24}.

Análisis de Población

En el análisis de la distribución electrónica a lo largo del camino de reacción, es importante marcar énfasis en el papel del par electrónico del N2, como la fuerza conductora del proceso de redistribución electrónica. Este par electrónico solitario corresponde al HOMO de los reactivos con una energía 0.15 u.a. mayor que el siguiente orbital molecular ocupado. Este resultado explicaría el hecho de que la formación del enlace N2-C1 preceda la formación del enlace H3-O6 en el camino de reacción.

Las cargas atómicas netas calculadas con ayuda del análisis de población de Mulliquen se presentan en la tabla 4.5. Otto y Ladik²⁵ mostraron que este método proporciona una correcta descripción cualitativa del proceso. Los cambios más significativos en la distribución de cargas, para cualquier conjunto de base, se observa en los átomos N2 y O6, cuyos valores negativos alcanzan el máximo en el ET. La carga del H3 sin embargo, alcanza en este mismo punto su valor más positivo. Este hecho sugiere que un hidrógeno positivo, más que una especie radical, es el transferido.

Tabla 4. 5.- Cargas atómicas netas (u.a.) distribuidas en reactivos (R), ET y productos (P), calculados con las distintas funciones de base. ($\Sigma\text{CH}_3 = \text{C}_4 + \text{H}_8 + \text{H}_9 + \text{H}_{10}$)

	STO-3G			3-21G			4-21G		
	R	ET	P	R	ET	P	R	ET	P
C1	0.46	0.41	0.39	1.11	1.06	1.10	1.24	1.09	1.20
N2	-0.38	-0.38	-0.35	-0.81	-0.92	-0.90	-0.82	-0.90	-0.89
H3	0.15	0.30	0.21	0.31	0.48	0.41	0.32	0.49	0.42
O6	-0.23	-0.38	-0.29	-0.57	-0.73	-0.72	-0.63	-0.75	-0.74
O7	-0.23	-0.29	-0.27	-0.57	-0.61	-0.64	-0.63	-0.66	-0.68
H5	0.15	0.19	0.17	0.31	0.37	0.35	0.32	0.39	0.36
ΣCH_3	0.09	0.15	0.14	0.23	0.34	0.34	0.22	0.34	0.34

	4-31G			6-31G			6-311G		
	R	ET	P	R	ET	P	R	ET	P
C1	1.00	0.99	1.10	0.90	0.94	1.04	0.81	0.89	0.98
N2	-0.87	-0.98	-0.91	-0.88	-0.99	-0.89	-0.84	-0.94	-0.84
H3	0.33	0.54	0.42	0.33	0.54	0.42	0.31	0.50	0.40
O6	-0.51	-0.75	-0.74	-0.46	-0.74	-0.73	-0.41	-0.68	-0.70
O7	-0.51	-0.57	-0.61	-0.46	-0.53	-0.57	-0.41	-0.49	-0.53
H5	0.32	0.40	0.37	0.33	0.40	0.37	0.31	0.38	0.35
ΣCH_3	0.24	0.37	0.37	0.23	0.37	0.36	0.23	0.34	0.33

6-31G*

	R	ET	P
C1	0.92	0.94	0.98
N2	-0.86	-0.91	-0.81
H3	0.34	0.55	0.46
O6	-0.46	-0.73	-0.71
O7	-0.46	-0.55	-0.57
H5	0.34	0.41	0.37
ΣCH_3	0.18	0.31	0.28

IV. 1. 3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CORRELACIÓN ELECTRÓNICA

Los valores de energías obtenidos no parecen ser significativos dado que hemos aplicado unos esquemas de cálculo que no son del todo adecuados para la distribución electrónica del ET obtenido. Suponiendo que el paso de reactivos al ET implica la formación y rotura de ciertos enlaces químicos, podemos esperar que tomando en consideración la energía de correlación la descripción de éste quede mejorada, y por tanto observemos un descenso en la barrera energética. En este sentido, realizaremos por un lado cálculos basados en la teoría de perturbaciones Moller Plesett de segundo orden, MP2²⁶ y, por otro lado, también podemos tratar de mejorar nuestros resultados previos haciendo cálculos de interacción de configuraciones CISD²⁷.

Método de Cálculo y Resultados

La determinación exacta de las propiedades del ET se ha obtenido con el mismo algoritmo descrito en la sección 3.4. Las coordenadas que describen el sistema se han separado en dos subespacios: q_i y q_j , donde las primeras representan el espacio de control, responsable del único valor propio negativo en la matriz de constantes de fuerza asociada a las variables que describen el vector de transición. El resto de coordenadas, q_j , se conoce como espacio complementario^{28a}. En primer lugar el ET se ha localizado con la subrutina VA05, restringida al espacio de control, y el vector de transición se determina diagonalizando la matriz de constantes de fuerza. En segundo lugar optimizamos el espacio complementario utilizando el método OC. Finalmente, se lleva a cabo una optimización VA05 para todo el conjunto de variables. La optimización se da por terminada con el mismo criterio que en los cálculos anteriores; cuando el promedio del gradiente de longitud sea inferior a 5×10^{-4} mdyn.

La base elegida ha sido la 6-31G*, que incluye funciones de polarización para los elementos del segundo periodo. Los cálculos Hartree Fock, HF/6-31G*, se han llevado a cabo utilizando el programa MONSTERGAUSS, mientras que la energía de correlación, calculada con la subrutina MP2²⁶, y los cálculos de interacción de configuración, CISD²⁷, se han realizado utilizando el programa GAUSSIAN90. El ET ha sido calculado también analíticamente utilizando las subrutinas adecuadas del GAUSSIAN90, sin encontrar diferencias importantes de los valores obtenidos con el formalismo VA05 del MONSTERGAUSS.

En la tabla 4.6 se compara los valores de las distancias y ángulos de enlace más importantes para los puntos estacionarios obtenidos en MP2/6-31G*, con los valores correspondientes a los cálculos HF/6-31G*. De estos resultados se observa que las estructuras no se ven afectadas al incluir la energía de correlación al nivel MP2. En la figura 4.5, por medio de una representación de bolas y bastones, presentamos la estructura del ET obtenido en el cálculo MP2/6-31G*, donde el vector de transición se representa esquemáticamente con flechas. El análisis tanto del vector de transición como de los órdenes de enlace revelan un comportamiento muy similar al obtenido en los cálculos SCF-HF, y las mismas conclusiones podrían ser extraídas.

Tabla 4. 6.- Geometrías optimizadas en HF/6-31G* y MP2/6-31G* de reactivos, ET y productos. Distancias de enlace en Å y ángulos en grados.

	<u>Reactivos</u>		<u>ET</u>		<u>Productos</u>	
	HF	MP2	HF	MP2	HF	MP2
<u>Distancias:</u>						
C1-N2	2.9409	2.7964	1.5188	1.5559	1.3649	1.3815
N2-H3	1.0017	1.0180	1.2656	1.2978	2.3039	2.3014
H3-O6	3.2588	3.4223	1.2739	1.2870	0.9480	0.9736
C1-O6	1.1441	1.1785	1.2650	1.2962	1.3387	1.3692
C1-O7	1.1439	1.1794	1.2650	1.2084	1.1859	1.2138
N2-H5	1.0019	1.0180	1.0056	1.0235	0.9956	1.0133
N2-C4	1.4556	1.4656	1.4654	1.4687	1.4504	1.4567
C4-H8	1.0838	1.0914	1.0822	1.0929	1.0850	1.0946
<u>Ángulos:</u>						
H3-N2-C1	106.29	112.07	70.29	69.67	55.89	56.69
C4-N2-H3	110.84	109.87	126.14	127.57	174.79	173.64
O6-C1-N2	91.35	93.73	98.18	97.97	114.33	113.90
O7-C1-O6	176.66	175.69	137.45	137.43	121.23	121.41
H8-C5-N2	109.20	108.79	110.21	109.89	112.39	112.54
H5-N2-H3	106.83	105.83	115.57	115.90	69.60	70.54

Tabla 4. 7.- Energías absolutas en Hartrees. Entre paréntesis energías relativas a R en kcal/mol.

	<u>Reactivos</u>	<u>ET</u>	<u>Productos</u>
HF/6-31G*	-282.849417 (0.0)	-282.755630 (58.85)	-282.836131 (-8.34)
MP2/6-31G*	-283.640354 (0.0)	-283.569243 (44.62)	-283.622461 (-11.23)
CISD	-283.644246 (0.0)	-283.571271 (45.79)	-283.631759 (-7.84)

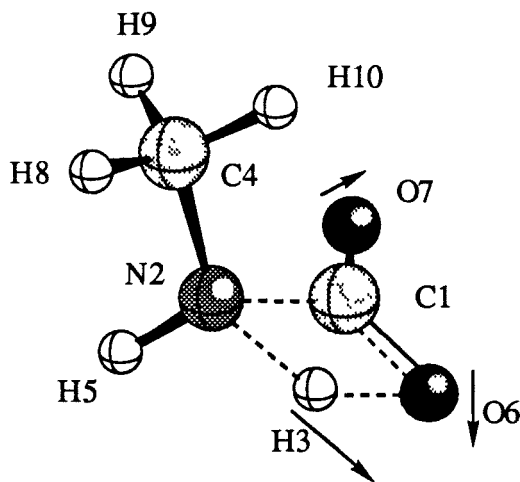


Figura 4.5.- Representación de la estructura del ET para la adición del CO₂ sobre el CH₃NH₂. El vector de transición se representa esquemáticamente con flechas

Las energías obtenidas con los tres métodos de cálculo para los reactivos, ET y productos, se presentan en la tabla 4.7. Aplicando la ecuación de Miller (ecuación 4.1.), los valores del parámetro X^* son 0.47 (HF/6-31G*), 0.44 (MP2/6-31G*) y 0.46 (CISD). Estas diferencias, cuando se considera la energía de correlación, pueden considerarse consistentes con la idea de que el paso de reactivos a ET, seguido por el paso a productos, implica la rotura y formación de enlaces químicos, y por lo tanto una importante redistribución electrónica.

La energía de activación se reduce en más de 10 kcal/mol al mejorar el nivel de cálculo tal como preveíamos. No obstante, los valores continúan siendo elevados, lo que nos hace suponer que los alrededores del centro activo de la biotina deben jugar un papel decisivo en la reacción de fijación del CO₂ en este enzima.

El cálculo de las cargas atómicas realizado con la ayuda del análisis de población de Mulliken para los cálculos MP2/6-31G* se presentan en la tabla 4.8. Los resultados no difieren de los presentados en la tabla 4.5 en más de un 2%, por lo que las conclusiones que de ella se extraen son idénticas.

Tabla 4. 8.- Cargas atómicas netas (u.a.) distribuidas en reactivos, ET y productos, calculados a nivel MP2/6-31G*. ($\Sigma\text{CH}_3 = \text{C4}+\text{H8}+\text{H9}+\text{H10}$)

	Reactivos	E.T.	Productos
C1	0.95	0.96	0.99
N2	-0.86	-0.91	-0.79
H3	0.34	0.55	0.46
O6	-0.48	-0.74	-0.72
O7	-0.48	-0.56	-0.58
H5	0.34	0.40	0.37
ΣCH_3	0.18	0.31	0.28

Existen problemas todavía sin resolver sobre la capacidad de las funciones Hartree-Fock monodeterminantales para representar adecuadamente procesos de formación y rotura de enlaces homolíticos. Aunque cálculos de estabilidad de segundo orden muestran que la función de onda monodeterminantal RHF para el ET es estable²⁸, estudios de multiconfiguraciones MC-SCF podrían representar con mayor exactitud el posible carácter birradical del ET.

IV. 1. 4.- SEGUNDO MODELO: $\text{CO}_2 + \text{CH}_3\text{NHCONH}_2$

Hemos visto que los métodos *ab initio* son potencialmente exactos, pero están limitados por el tamaño del sistema molecular. Los métodos semiempíricos se pueden utilizar para sistemas más grandes, pero en estos casos, sólo comparando los resultados con los obtenidos experimentalmente o con cálculos *ab initio*, puede ser juzgada su precisión. En estudios recién-

tes^{24,28b} hemos comprobado varias similitudes en estructuras de ET de reacciones análogas. Estas semejanzas sugieren que es posible compilar un conjunto de estructuras de ET tal como Reynolds y Thomson propusieron en 1987²⁹. Habiendo determinado estos valores comunes, sería muy útil estudiar el ET de las reacciones de adición a fin de determinar las posibilidades y las razones de las semejanzas con esas estructuras medias. Tal análisis, junto con la evolución de los algoritmos de optimización, programas y ordenadores, facilitarían la localización de estructuras de ET. Houk y sus colaboradores³⁰ han observado este tipo de características para reacciones pericíclicas.

Dado que los métodos de orbitales moleculares semiempíricos y *ab initio* proporcionan información de estructuras de ET, sería interesante comprobar los resultados de ambos en la búsqueda de estos puntos estacionarios. En este sentido, podemos ampliar el modelo empleado en la primera aproximación y hacer un estudio del mecanismo de reacción del proceso de adición del CO₂ sobre CH₃NHCONH₂. Por un lado podremos comprobar si efectivamente el ET conserva una serie de rasgos característicos independientemente del modelo y del método quimicocuántico empleado. Por otro lado estaremos dando un paso adelante en la elucidación de la reacción molecular que tiene lugar en el centro activo de la vitamina H o biotina.

Basándonos en los pocos resultados experimentales sobre la geometría de la (+)-biotina, figura 4.1, en el modelo de reacción propuesto se ha suprimido el heterociclo del átomo de azufre, sustituyendo el C₃ por un grupo metilo y el C₄ por un átomo de hidrógeno.

Método de cálculo

Todos los cálculos se han llevado a cabo utilizando el programa MONSTERGAUSS y el GAUSSIAN92. Hemos empleado los métodos semiempíricos MINDO/3, MNDO, AM1 y PM3, y los métodos *ab initio* SCF-HF en base 3-21G, 6-31G y 6-31G*. La energía de correlación se ha considerado a nivel de la teoría de perturbaciones Moller-Plesset de segundo orden utilizando la base 3-21G. Con el objeto de estudiar el efecto que tiene el

mejorar las funciones de base sobre la energía, hemos realizado cálculos de la energía a partir de estructuras previamente optimizadas. Así, se ha calculado la energía MP2/6-31G* sobre las geometrías obtenidas en los cálculos HF/3-21G, HF/6-31G, HF/6-31G* y MP2/3-21G, y la energía MP2/6-31G** sobre la geometría MP2/3-21G. Estos cálculos tienen la notación (1)/(2), donde (1) es el cálculo de la energía y (2) la geometría utilizada (el último de los cálculos se representaría con esta notación como MP2/6-31G**//MP2/3-21G).

En primer lugar, la caracterización exacta del ET se ha obtenido siguiendo el mismo algoritmo que en el modelo anterior. En segundo lugar, los puntos estacionarios, reactivos libres (FR: donde se ha calculado ambas moléculas por separado), reactivos (R: donde el sistema está tratado como una supermolécula), ET y productos (P) se han caracterizado calculando las frecuencias armónicas de vibración empleando la subrutina FREQ del GAUSSIAN92. Las optimizaciones se han dado por terminadas cuando el gradiente promedio de longitudes quede por debajo de 5×10^{-4} mdyne en el MONSTERGAUSS, o cuando el valor esperado máximo del desplazamiento sea inferior a 0.0018 \AA y el valor máximo de la fuerza $0.00045 \text{ hartree/bohr}$ utilizando la subrutina de optimización de gradientes analíticos de Berny^{31,32} del GAUSSIAN92.

Como hemos explicado en el apartado III.3, se puede obtener una visión muy didáctica del proceso de una reacción química a través de una SEP por medio de la coordenada de reacción intrínseca o IRC. Básicamente, este camino propuesto por vez primera por Fukui³³, es la unión de los dos caminos de máxima pendiente que descienden desde el ET hacia ambos lados; reactivos y productos. El primer algoritmo para seguir el IRC desde el ET fue desarrollado por Ishida y sus colaboradores³⁴ en 1977, y en la actualidad es un método muy empleado³⁵. En este estudio hemos empleado el método de Gonzalez y Schelegel³⁶ contenido en el GAUSSIAN92 a fin de verificar que los ET obtenidos unen las estructuras de reactivos y productos.

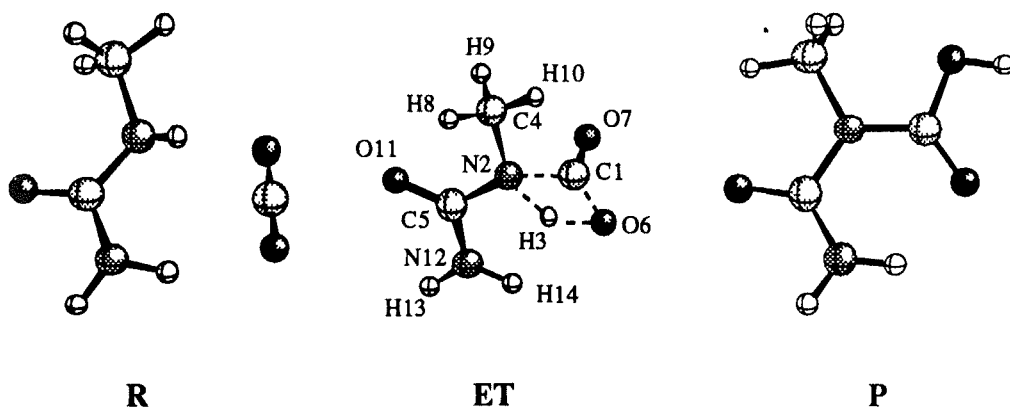


Figura 4.6. Representación de las estructuras de los puntos estacionarios para la reacción de adición del $\text{CO}_2 + \text{CH}_3\text{NHCONH}_2$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los puntos estacionarios obtenidos en la reacción de adición se ilustran en la figura 4.6., donde hemos numerado los átomos. El proceso de adición corresponde a una transformación química la cual viene descrita nuevamente en términos de una ruptura de un enlace N-H (N2-H3), el paso de un enlace doble C=O a enlace simple (C1=O6) y la formación de dos enlaces H-O y C-N (H3-O6 y C1-N2).

Estructuras de los puntos estacionarios

En la tabla 4.9 se presenta las geometrías de los puntos estacionarios obtenidas con los diferentes métodos semiempíricos y *ab initio*. El valor promedio calculado a partir de todos los resultados, y la desviación estándar se presenta también en la tabla 4.9 con el objeto de comparar la capacidad de

los diferentes métodos semiempíricos para describir adecuadamente las geometrías de reactivos, ET y productos.

Del análisis de los diferentes parámetros geométricos se deduce que la reacción ocurre, tal como cabía prever, a través de un ET de cuatro centros. El proceso depende de la posición de los cuatro átomos, C1, N2, H3 y O6, o dicho de otro modo, de los cuatro enlaces C1-O6, C1-N2, N2-H3 y H3-O6. .

En la estructura del ET, las variables geométricas para este proceso de adición se encuentran en una etapa avanzada de la reacción (entre un 60 y un 80%) mientras que la formación del enlace H3-O6 está alrededor del 40%.

Los parámetros geométricos de los puntos estacionarios de la tabla 4.9 no difieren significativamente y las desviaciones estándar para todos ellos, σ , es baja. En los reactivos, R, el valor elevado de σ para las distancias C1-N2 y H3-O6, así como para los ángulos H3-N2-C1 y O6-C1-N2, se debe a los valores tan elevados que proporcionan los cálculos semiempíricos para estos parámetros. Una excepción es el método AM1, que da valores cercanos a los *ab initio*. El aspecto tan plano de la SEP para distancias tan grandes es el responsable de estos resultados. Para evitar este problema, las moléculas de reactivos han sido calculadas separadamente: FR. El análisis estructural de estos resultados obtenidos con todos los métodos revela diferencias mínimas entre este punto estacionario y los reactivos considerados como una supermolécula: R. Obviamente, para las estructuras FR, las distancias C1-N2 y H3-O6 son infinito, y la inclusión de los ángulos de enlace entre átomos de las dos moléculas no tiene sentido.

Tabla 4.9.a. Estructuras optimizadas de reactivos (R) obtenidas con los diferentes métodos. Distancias de enlace en Å y ángulos de enlace en grados. Valor promedio (\bar{x}) y desviación estandar (σ) para los diferentes parámetros.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	\bar{x}	σ
<u>Distancias de enlace</u>										
C1-N2	6.6183	5.7482	3.5598	5.5135	3.5626	4.4053	3.1783	3.3793	4.4957	1.217
N2-H3	1.0280	1.0054	0.9974	0.9982	0.9974	0.9915	0.9970	1.0117	1.0033	0.011
H3-O6	5.1410	6.4367	2.4241	5.8033	2.4246	2.4200	3.2299	2.3328	3.7766	1.617
C1-O6	1.1802	1.1869	1.1919	1.1827	1.1920	1.1647	1.1459	1.2007	1.1806	0.016
C1-O7	1.1794	1.1858	1.1871	1.1791	1.1871	1.1564	1.1411	1.1920	1.1760	0.017
N2-C4	1.4103	1.4633	1.4340	1.4732	1.4339	1.4502	1.4521	1.4753	1.4490	0.021
C4-H8	1.1188	1.1143	1.1223	1.0976	1.1224	1.0834	1.0830	1.0950	1.1046	0.016
<u>Ángulos de enlace</u>										
H3-N2-C1	68.86	143.31	56.59	132.75	56.56	19.18	88.92	52.55	77.34	39.51
C4-N2-H3	110.41	111.93	114.83	111.84	114.85	118.65	115.29	119.42	114.65	3.01
O6-C1-N2	10.23	81.12	53.08	68.17	52.98	23.16	85.18	64.35	54.78	24.70
O7-C1-O6	179.84	178.70	179.55	178.45	179.65	179.78	178.73	179.26	179.24	0.51
H8-C5-N2	111.63	108.39	108.10	108.31	108.10	110.95	108.73	111.21	109.43	1.44

Tabla 4.9.b. Estructuras optimizadas del ET obtenidas con los diferentes métodos. Distancias de enlace en Å y ángulos de enlace en grados. Valor promedio (\bar{x}) y desviación estandar (σ) para los diferentes parámetros.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	\bar{x}	σ
<u>Distancias de enlace</u>										
C1-N2	1.5752	1.5891	1.5129	1.5621	1.5720	1.5480	1.5389	1.6299	1.5660	0.033
N2-H3	1.2374	1.2780	1.3488	1.4259	1.2895	1.2953	1.2666	1.3509	1.3115	0.056
H3-O6	1.2504	1.3812	1.4072	1.4550	1.2928	1.2929	1.2755	1.2885	1.3304	0.069
C1-O6	1.2737	1.2798	1.2927	1.2796	1.3012	1.3003	1.2681	1.3460	1.2967	0.023
C1-O7	1.2003	1.2090	1.2276	1.2115	1.1830	1.1924	1.1734	1.2166	1.2017	0.017
N2-C4	1.4596	1.4930	1.4535	1.4863	1.4839	1.4811	1.4706	1.5003	1.4785	0.015
C4-H8	1.1159	1.1116	1.1221	1.0991	1.0803	1.0789	1.0797	1.0901	1.0972	0.016
<u>Ángulos de enlace</u>										
H3-N2-C1	73.39	76.35	77.88	77.65	70.58	71.44	69.48	68.66	73.18	3.46
C4-N2-H3	112.40	113.07	114.91	115.94	124.47	119.63	122.23	129.84	119.06	5.73
O6-C1-N2	91.11	94.17	97.84	98.63	96.05	96.72	97.91	95.68	96.01	2.29
O7-C1-O6	145.43	141.27	134.47	136.03	138.87	137.94	137.92	137.81	138.72	3.14
H8-C5-N2	115.54	111.99	108.27	112.00	109.03	109.86	109.80	108.42	110.61	2.29

Tabla 4.9.c. Estructuras optimizadas de productos obtenidas con los diferentes métodos. Distancias de enlace en Å y ángulos de enlace en grados. Valor promedio (\bar{x}) y desviación estandar (σ) para los diferentes parámetros.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	\bar{x}	σ
<u>Distancias de enlace</u>										
C1-N2	1.3927	1.4093	1.3866	1.4219	1.3563	1.3597	1.3647	1.3774	1.3836	0.022
N2-H3	3.0927	3.1718	3.1321	3.1540	3.0796	3.0850	3.0311	3.1101	3.1070	0.042
H3-O6	0.9520	0.9504	0.9730	0.9524	0.9668	0.9702	0.9515	0.9932	0.9637	0.014
C1-O6	1.3363	1.3537	1.3476	1.3494	1.3494	1.3437	1.3252	1.3962	1.3502	0.019
C1-O7	1.2238	1.2339	1.2460	1.2298	1.2178	1.2256	1.1983	1.2516	1.2283	0.015
N2-C4	1.4371	1.4752	1.4461	1.4820	1.4812	1.4789	1.4701	1.4918	1.4703	0.018
C4-H8	1.1203	1.1130	1.1228	1.0988	1.0783	1.0773	1.0836	1.0911	1.0981	0.017
<u>Ángulos de enlace</u>										
H3-N2-C1	26.48	22.47	21.25	20.62	24.03	23.98	22.44	23.73	23.12	1.73
C4-N2-H3	98.82	100.66	96.96	99.16	95.25	95.11	96.48	95.91	97.29	1.89
O6-C1-N2	108.78	114.98	114.34	115.71	111.28	112.09	111.62	110.04	112.36	2.29
O7-C1-O6	130.03	121.71	116.18	118.91	121.09	127.14	121.22	121.55	122.23	4.12
H8-C5-N2	113.71	110.20	109.24	112.00	109.85	109.85	110.15	110.13	110.64	1.38

Energías de los puntos estacionarios

En la tabla 4.10 se presenta los valores de la energía para las distintas geometrías optimizadas. Considerando R como los reactivos, las energías de activación oscilan entre 71.57 y 47.21 kcal/mol, y las de reacción entre -10.00 y 6.21 kcal/mol. El valor más pequeño de energía de activación se obtiene cuando empleamos el método MP2/3-21G, mientras que el más grande corresponde a los cálculos semiempíricos MNDO. Comparando las energías de reacción se obtiene el mayor valor en los cálculos HF/6-31G*, y el menor en el método HF/3-21G, cuyo resultado representa una reacción exotérmica. Por otro lado, si consideramos como reactivos las estructuras FR, las energías de activación siguen la misma tendencia, aunque lógicamente con valores algo menores. Los resultados de las energías de reacción no siguen una tendencia concreta; el mayor valor corresponde a los cálculos MINDO/3, y el menor al HF/3-21G.

Cálculos de estabilidad de segundo orden muestran que para la estructura del ET una función de onda monodeterminantal RHF es estable. No obstante dadas las características de nuestro sistema, sería más apropiado llevar a cabo un análisis de la población de los diferentes orbitales naturales UHF. Utilizando la subrutina POP=NO del GAUSSIAN92, hemos comprobado cómo la ocupación de algunos de los orbitales de valencia en el TS difiere de los valores propios de un sistema de capa cerrada (es decir; 0 ó 2). Estos resultados sugieren que, como nos ocurría en el primer modelo molecular, la función de onda para la estructura particular de nuestro ET requeriría más de una configuración. Dicho en otras palabras; sería más correcto hacer cálculos multiconfiguracionales, CAS-SCF, para representar correctamente el ET.

El introducir la energía de correlación a nivel MP2 vuelve a tener el efecto esperado: la energía de activación calculada en MP2/6-31G*//HF/6-31G* comparada con el valor obtenido en HF/6-31G* se ve reducida en más de 10 kcal/mol (ver tabla 4.10). Y si optimizamos la geometría a nivel MP2, incluso utilizando una función de base pequeña, 3-21G, el efecto es más acentuado: la barrera energética se reduce en más de 20 kcal/mol.

Las diferencias de energía entre R y P calculadas en HF/3-21G y HF/6-31G* alcanzan valores de -10.0 y 6.21 kcal/mol, respectivamente, y utilizando los cálculos MP2 cambian a 3.93 y 4.13 respectivamente. Una tendencia similar se observa si consideramos las diferencias entre FR y P. En este caso las energías de reacción por los métodos HF citados valen -14.85 y 3.78, mientras que cuando los mismos se hacen considerando la energía de correlación vuelven a dar cantidades inferiores a las obtenidas considerando R como reactivos.

Nuestro estudio es un buen ejemplo de las teorías de Levy y Perdew³⁷, que comprobaron cómo para formalismos aproximados como los Hartree-Fock, el cambio en el error de las energías, cuando la geometría se altera, es cero debido al término de perturbaciones de segundo orden en Hamiltonianos coulombianos. Esto significa que las energías absolutas son, por regla general, irreales, mientras que los valores de los resultados de las geometrías suelen ser suficientes. A fin de comprobar al menos algún ejemplo de la sensibilidad de la altura de la barrera energética, se ha llevado a cabo cálculos de la energía con diferentes métodos pero utilizando la misma geometría teórica del ET. En este sentido las energías relativas del ET respecto de las obtenidas para los FR, obtenidas con los métodos MP2/6-31G*//MP2/3-21G, MP2/6-31G*//HF/3-21G, MP2/6-31G*//HF/6-31G y MP2/6-31G*//HF/6-31G*, revelan que las diferentes geometrías del mismo ET están energeticamente próximas a los valores MP2. Los valores obtenidos para la energía de activación han sido: 47.46, 43.40, 44.13 y 54.27 kcal/mol, respectivamente.

Tabla 4. 10 .- Energías absolutas de las estructuras optimizadas de reactivos separados (FR), reactivos (R), ET y productos (P) obtenidas con los diferentes métodos en Hartrees. Para los cálculos semiempíricos los valores corresponden a calores de formación. Entre paréntesis energías relativas a R en kcal/mol, y entre corchetes energías relativas a FR

Método	FR	R	ET	P
MINDO/3	-0.263008 (0.12) [0.0]	-0.263198 (0.0) [-0.12]	-0.169530 (58.78) [58.66]	-0.253454 (6.11) [6.00]
MNDO	-0.188827 (1.14) [0.0]	-0.190651 (0.0) [-1.14]	-0.076591 (71.57) [70.43]	-0.199799 (-5.74) [-6.89]
AM1	-0.193179 (2.37) [0.0]	-0.196951 (0.0) [-2.37]	-0.100742 (60.37) [58.00]	-0.196881 (0.04) [-2.32]
PM3	-0.211479 (1.34) [0.0]	-0.213611 (0.0) [-1.34]	-0.136270 (48.53) [47.19]	-0.215600 (-1.25) [-2.59]
HF/3-21G	-448.112098 (4.85) [0.0]	-448.119830 (0.0) [-4.85]	-448.031694 (55.31) [50.45]	-448.135766 (-10.00) [-14.85]
HF/6-31G	-450.414265 (3.17) [0.0]	-450.419319 (0.0) [-3.17]	-450.314494 (65.78) [62.61]	-450.429680 (-6.50) [-9.67]
HF/6-31G*	-450.647901 (2.43) [0.0]	-450.651779 (0.0) [-2.43]	-450.540114 (70.07) [67.64]	-450.641882 (6.21) [3.78]
MP2/3-21G	-448.967682 (14.96) [0.0]	-448.991524 (0.0) [-14.96]	-448.916296 (47.21) [32.25]	-448.985257 (3.93) [-11.03]
MP2/6-31G**// HF/6-31G*	-451.895915 (4.15) [0.0]	-451.902529 (0.0) [-4.15]	-451.809430 (58.42) [54.27]	-451.895949 (4.13) [-0.02]
MP2/6-31G***// MP2/3-21G	-451.952295 (2.35) [0.0]	-451.956039 (0.0) [-2.35]	-451.878183 (48.86) [46.51]	-451.952280 (2.36) [0.01]

Coordenada de reacción intrínseca, IRC

Según el método IRC propuesto por Gonzalez y Schelegel³⁶, generando la matriz de segundas derivadas completa para el ET, el único modo con frecuencia imaginaria negativa determina la dirección inicial que, a partir del ET, seguirá el camino de máxima pendiente decreciente. Las frecuencias imaginarias obtenidas con todos los métodos de cálculo cubren el margen entre 1900 y 2300i cm⁻¹. El único valor negativo de la constante de fuerza diagonalizada en el ET está asociada con el modo vibracional stretching N2-H3. Los movimientos de los átomos O6 y C1 también son importantes en el vector de transición, pero contribuyen menos de un 10%, comparado con valores del 60% o superiores del stretching N2-H3. Esta vibración supone el movimiento de un átomo ligero, H3, por lo que sus valores lógicamente son más significativos.

En la figura 4.7. presentamos el IRC calculado con el método HF/3-21G. Las distancias N2-H3 y C1-N2 se han superpuesto al diagrama de energías, pudiéndose observar, en la vertical del ET, como la primera toma valores cercanos todavía a la distancia de enlace, mientras que el enlace C1-N2 está prácticamente formado y apenas cambia en el intervalo dibujado. Estos resultados gráficos son coherentes con los análisis previos de geometrías y del vector de transición, así como con los resultados del primer modelo.

Orbitales moleculares localizados y análisis de población

El proceso de adición envuelve los siguientes cambios cualitativos en la estructura electrónica: un primer reordenamiento de ocho electrones en cuatro orbitales activos incluyendo los σ y π (el enlace σ inicial N2-H3, su σ^* correspondiente, y el par solitario n no enlazante del O6 junto con sus cuatro electrones) y tal como avanza la reacción, estos orbitales se transforman en los orbitales enlazantes σ y antienlazantes σ^* del enlace O6-H3. Por otro lado, también el par solitario del N2 junto con sus respectivos electrones y los dos electrones del orbital π del enlace C1-O6, en los que los deslocalizados

homólogos enlazantes, antienlazantes y no enlazantes van alterando su carácter a medida que la reacción tiene lugar.

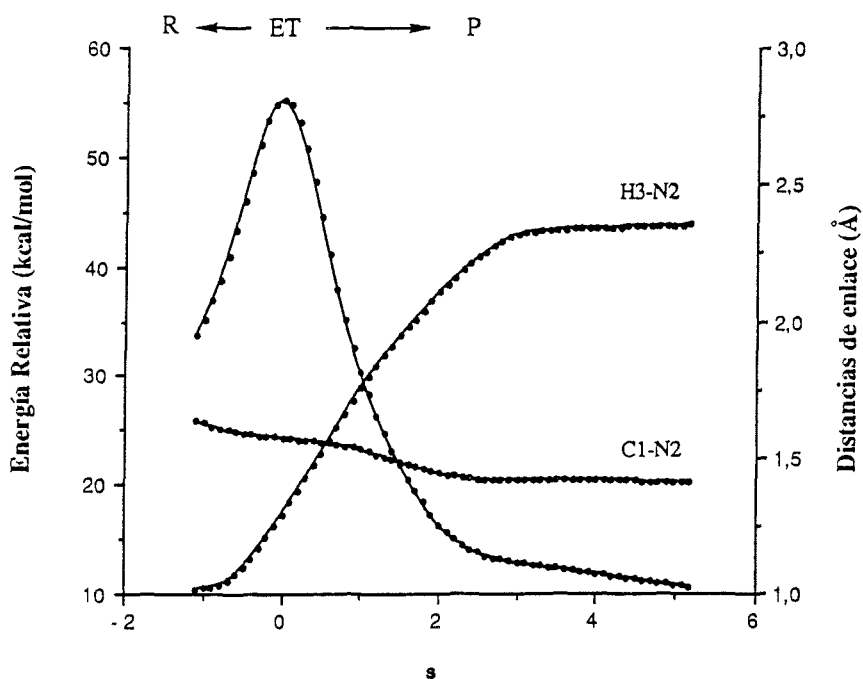


Figura 4.7.- Diagrama del IRC según los cálculos HF/3-21G. Superpuestas aparecen las distancias C1-N2 y H3-N2 en Å. El eje de abscisas corresponde a la coordenada de reacción s .

El análisis de los orbitales moleculares a lo largo del camino de reacción muestra que los orbitales HOMO-1 y HOMO de los reactivos están asociados al par solitario del N₂, y el LUMO y LUMO+1 al sistema π de la molécula de CO₂. Es importante destacar el papel primordial del par solitario del N₂ durante el proceso de redistribución electrónica. La energía correspondiente a este par solitario decrece apreciablemente desde R al ET. Este hecho puede explicar que la formación del enlace N₂-C1 preceda la del H₃-O₆ en el camino de reacción.

Las cargas atómicas netas calculadas con la ayuda del análisis de población de Mulliken y los cambios más significativos son completamente análogos a lo observado en el estudio del primer modelo. Nuevamente, este hecho sugiere la transferencia de un protón, H3.

Diagrama de More O'Ferrall-Jencks modificado

Tal como hicimos en el primer modelo, figura 4.4, las diferencias de las estructuras del ET obtenidas con los diferentes conjuntos de base y métodos semiempíricos se puede visualizar en una versión modificada del diagrama de More O'Ferrall-Jencks tal como presentamos en la figura 4.8.

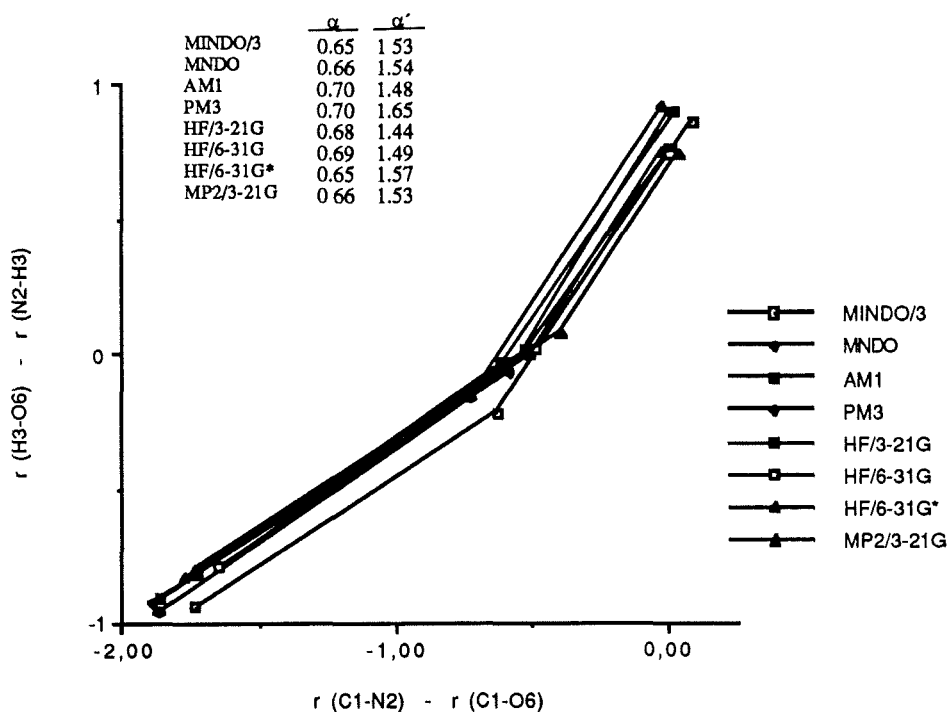


Figura 4. 8.- Diagrama modificado de More O'Ferrall-Jencks obtenido con los diferentes métodos.

En este caso hemos utilizado los órdenes de enlace asociados a los enlaces que se forman y rompen: $r(\text{H3-O6})$ - $r(\text{N2-H3})$ vs. $r(\text{C1-N2})$ - $r(\text{C1-O6})$. Los resultados que observamos en el diagrama muestran la reacción como un proceso asincrónico descrito por las pendientes $a(\text{R-ET})$ y $a'(\text{ET-P})$; prácticamente independientes del método de cálculo. En el ET, la transformación del enlace doble $\text{C1}=\text{O6}$ a enlace sencillo, la rotura del enlace sencillo N2-H3 y la formación del nuevo enlace N2-C1 están cerca del 80%, mientras que la formación del H3-O6 está únicamente al 40% de su valor final.

IV. 1. 5. CONCLUSIONES

La reacción de adición del dióxido de carbono tanto en el primer modelo propuesto como en el segundo, supone la rotura de dos enlaces y la formación de un enlace entre dos especies electrónicamente de capa cerrada, por lo que en principio el estudio de las estructuras estables no supone una limitación de los esquemas SCF-HF. Sin embargo, el análisis de los orbitales moleculares naturales del ET sugiere que para una exacta descripción del proceso necesitaríamos realizar costosos cálculos multiconfiguracionales post Hartree-Fock. No obstante, las estructuras geométricas son invariantes y transferibles de uno a otro modelo.

Desde un punto de vista geométrico, hemos visto que a nivel Hartree-Fock la estructura del ET es independiente de la base empleada, que viene descrita por un anillo de cuatro átomos. Los parámetros geométricos obtenidos de los cálculos semiempíricos tampoco difieren apreciablemente. De esta forma, los métodos semiempíricos parecen ser perfectamente válidos para el estudio de mecanismos moleculares. La distancia H3-O6 resulta ser la componente más importante del vector de transición con el único valor negativo en la matriz de constantes de fuerza diagonalizada. La frecuencia imaginaria oscila entre $1900i$ y $2300i \text{ cm}^{-1}$ para los diferentes modelos. Ésta viene asociada al movimiento de los cuatro átomos C1 , N2 , O6 y H3 , aunque lógicamente, al ser este último mucho más ligero su peso en el vector de

transición es mucho más importante. Siguiendo el IRC o camino de máxima pendiente hacia reactivos y productos desde el punto de silla obtenemos ineludiblemente los reactivos iniciales y los productos de la reacción de adición.

El análisis de los órdenes de enlace viene seriamente afectado si utilizamos el conjunto de funciones de base mínimo: STO-3G. La reacción discurre por un mecanismo asincrónico en el cual la formación del enlace N2-C1 precede a la formación del H3-O6. El cambio del enlace C1=O6 de doble a sencillo también ocurre en una avanzada etapa de la reacción. La descripción por medio de diagramas modificados de More O'Ferrall-Jencks confirma este hecho.

Recientemente se ha llevado a cabo otros estudios teóricos de reacciones similares. Yamataka y sus colaboradores encontraron una estructura de cuatro centros cuando calcularon la estructura del ET para la adición de aminas a grupos carbonilos³⁸ utilizando una base 3-21G. Maggiora y sus colaboradores encontraron que en la reacción de adición del agua al formaldehído, el ET de cuatro centros resulta independiente de la base empleada. La hidratación del dióxido de carbono^{39,40}, el mecanismo molecular de la anhidrasa carbónica^{41,42}, la reacción de decarboxilación del formato dehidrogenasa²⁸ o la reacción de carboxilación del 2,3,4 pentanotriol como modelo del mecanismo catalítico de la Rubisco⁴¹, resultan ser claros ejemplos en los que una componente fundamental de todas las reacciones es la geometría doblada del dióxido de carbono. Podemos asumir que las estructuras correspondientes al ET son invariables.

Al introducir la energía de correlación a nivel de la teoría de perturbaciones de segundo orden, se observa un descenso en la energía de activación. Lógicamente, la descripción del ET se ve mejorada y, en consecuencia, la diferencia energética entre el ET y los reactivos disminuye. No obstante, la barrera energética parece todavía elevada considerando que se trata de reacciones que tienen lugar en un medio biológico. Esto es debido a dos hechos que hemos pasado por alto: 1) el efecto del entorno en el centro activo de la biotina debe ser importante. Desafortunadamente, no existen datos

experimentales suficientes de este enzima. Y 2) considerando la hipótesis de Pauling, el centro activo de un enzima tiene una estructura complementaria al ET de la reacción que cataliza, por lo que los reactivos entrarán deformados. Consecuentemente, la energía de activación calculada como diferencia entre los reactivos libres (o formando un complejo reactivo) y el ET no corresponde con la barrera energética real. Los reactivos tal como los hemos descrito en nuestros modelos no coinciden exactamente con los reactivos de la reacción que tiene lugar en el centro activo del enzima. Recientemente, ha sido propuesta una nueva teoría de la catálisis enzimática desarrollada en nuestro grupo, basada en la deformación del sustrato en el centro activo del enzima⁴³.

En definitiva, resultados obtenidos con métodos *ab initio* Hartree-Fock empleando conjuntos de base superiores a la STO-3G y modelos moleculares sencillos pueden proporcionar una concreta información del ET de un proceso químico. Asimismo, los métodos semiempíricos ofrecen una descripción aceptable del mecanismo molecular enzimático, pudiéndose utilizar modelos moleculares más grandes.

IV. 2. LACTATO DESHIDROGENASA

IV. 2. 1 INTRODUCCIÓN

El lactato deshidrogenasa (LDH, EC 1. 1. 1. 27) es un enzima piridin-dependiente que cataliza la conversión entre el ácido pirúvico y el ácido láctico en organismos superiores¹ (Figura 4.8). Esta reducción constituye la última etapa de la glucólisis en condiciones anaeróbicas. El LDH posee unas características particulares que le hacen idóneo en aplicaciones de interés en síntesis: 1) alta actividad específica de sustrato (400-1500 unidades/mg), 2) elevada enantioselectividad (el producto de la reacción siempre es la estructura L), 3) la constante de equilibrio de la reacción catalizada favorece enormemente la reducción del piruvato, y 4) las técnicas de síntesis del L-lactato, incluyendo la inmovilización y regeneración *in situ* del NADH, están muy desarrolladas²

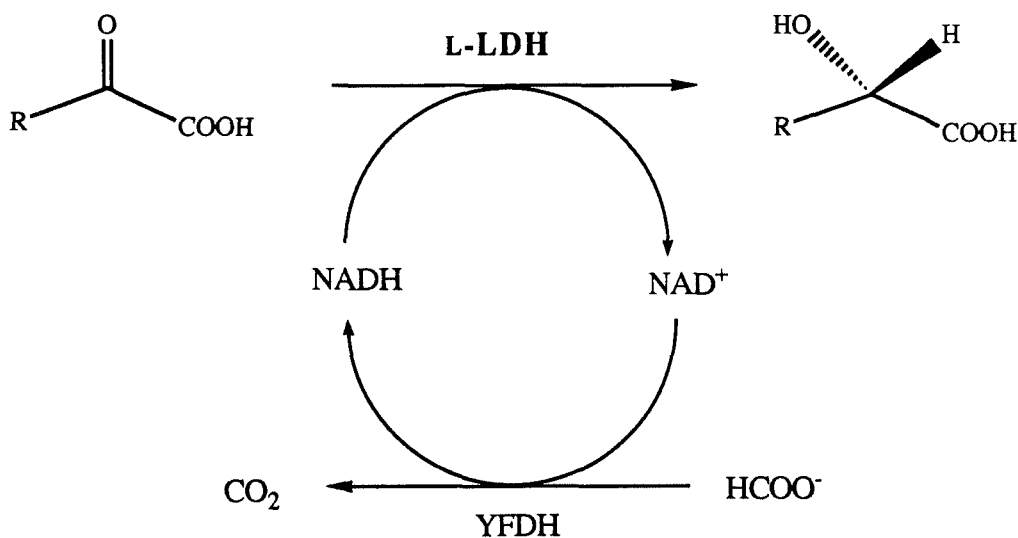


Figura 4.8.- Síntesis de (S)-2-hidroxiácidos catalizada por el L-LDH

La estructura del LDH se resolvió con detalle por análisis de difracción de rayos X³⁻⁵, encontrándose dos tipos de isozimas homogéneos: los encontrados en los tejidos del corazón (con estructura H₄) y en los músculos (con estructura M₄). En ambos casos se trata de tetrámeros⁶ con pesos moleculares alrededor de 36000⁷ u.a. cada unidad. Existe una serie de isozimas heterogéneas que se disponen como una mezcla de ambos tipos (H₃M, H₂M₂ y HM₃). Cada unidad es capaz de enlazarse a una molécula del coenzima NAD y reaccionar independientemente⁸.

El papel tan importante que se le atribuye a la His195^{9a} resulta de su marcada reactividad comparada con cualquier otro residuo de histidina del apoenzima^{9b}. La especificidad del enzima L-lactato viene fuertemente determinada por la Arg171. El mecanismo catalítico propuesto¹⁰ se presenta en la figura 4.9. El H reductor de la posición 4 del NADH se aproxima al grupo carbonilo del piruvato convirtiéndolo en un alcohol secundario del grupo lactato. El protón que se requiere para formar el grupo hidroxilo procede de la Histidina 195, que forma parte de un sistema cargado. La fijación del sustrato se realiza por un par de enlaces por puente de hidrógeno a la Arg171, que aun siendo de gran interés no tiene influencia en la sensibilidad del sustrato de la reacción¹¹.

El interés de nuestro grupo de investigación en el LDH se remonta a unos años atrás, cuando J. Krechl inició la investigación de la reorganización del centro activo en la oxidación del lactato¹², así como en la reducción del piruvato¹³. La atención estaba centrada en el principio de fijación del sustrato en el centro activo. dicha fijación está basada en la interacción de la guanidina de la Arg171 y los grupos carboxilo del sustrato. Se estudiaron en detalle diferentes modelos de esta interacción por cálculos *ab initio*¹¹ y por difracción de rayos X^{14,15}, y por último se investigó el mecanismo de la descomposición parcial de la guanidina con diferentes métodos *ab initio*^{16,17}.

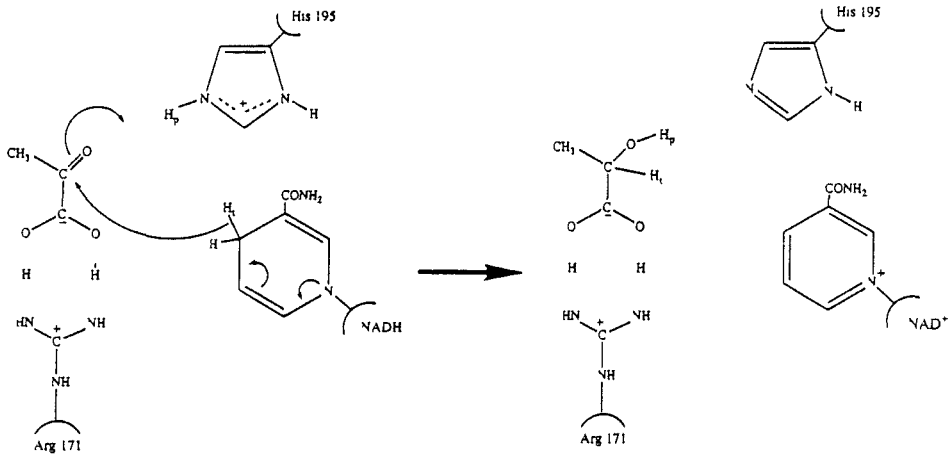


Figura 4.9. Reacción de reducción del piruvato a lactato en el LDH.

En el estudio previo del apartado IV.1, hemos realizado y comparado los resultados de cálculos *ab initio* y semiempíricos y hemos visto como proporcionan resultados de estructuras, análisis de población y energías relativas del ET. A continuación vamos a llevar a cabo un estudio de la reacción catalizada por el LDH a nivel semiempírico con un modelo molecular suficientemente grande. En éste, consideraremos las distintas estructuras que juegan un papel importante en el mecanismo de reacción.

IV. 2. 2. ESTUDIO PM3

Los cálculos se han llevado a cabo utilizando el método semiempírico PM3 contenido en el paquete de programas MOPAC. La optimización de las geometrías se ha realizado por medio del algoritmo de Fletcher-Powell^{18,19}. Para la localización y análisis del ET se ha empleado el programa GAUSSIAN 92, calculando analíticamente la matriz Hessiana. La naturaleza del ET quedó establecida diagonalizando la matriz de segundas derivadas de la energía para determinar la única frecuencia imaginaria negativa.

En principio, la elección del método semiempírico PM3 en lugar del AM1 o MNDO (que en principio son métodos buenos para la descripción de ETs), ha sido consecuencia de los resultados recientemente obtenidos por P. Kollman^{20,21} en cálculos semiempíricos de orbitales moleculares PM3 de mecanismos de reacción de diferentes enzimas. Sin embargo, en el apartado IV.2.3. presentaremos los resultados obtenidos con el método AM1.

El modelo utilizado para reproducir el centro activo del LDH en la reacción de reducción del piruvato ha sido el siguiente: la guanidina que forma parte de la Arg171 se ha conservado y el resto del aminoácido se ha sustituido por un grupo metilo. La His195 la hemos sustituido por el grupo imidazol con un grupo metilo, y una molécula de N-metil-1,4-dihidronicotinamida juega el papel del coenzima NADH. La geometría de partida del sistema completo considerado como una supermolécula de 55 átomos, se ha establecido de acuerdo con resultados previos¹³ basados en estudios de difracción de rayos X⁴⁻⁷. Para ayudarnos a definir la geometría hemos utilizado cinco átomos virtuales. En la figura 4.10 mostramos el modelo completo numerado de acuerdo con la matriz Z empleada.

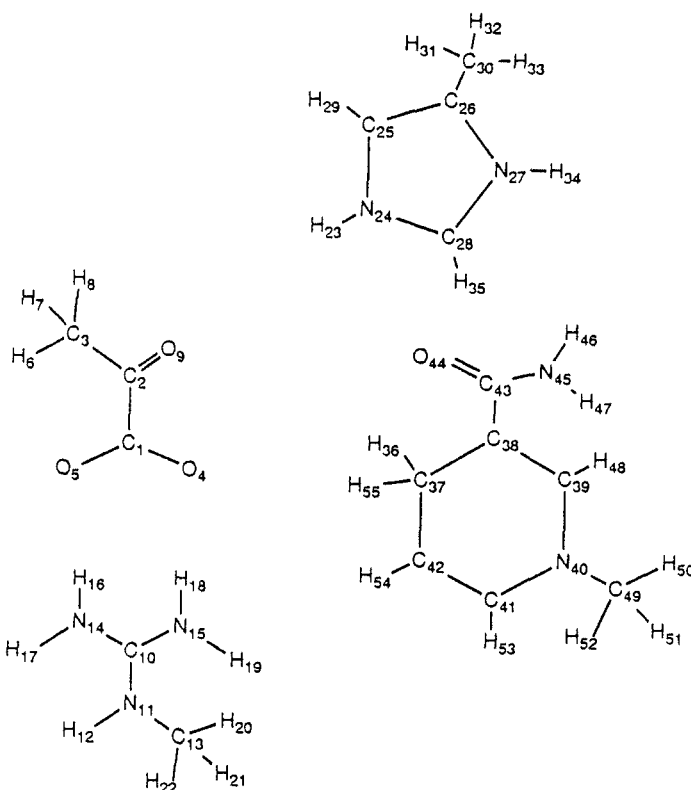


Figura 4.10.- Numeración del modelo molecular para el centro activo del LDH.

El curso de la reacción descrito como un proceso que empieza en una supermolécula en torno al piruvato ("P"), y termina en una reorganización de forma lactato ("L"). El mecanismo puede ser descrito en términos de una transferencia de un hidruro y de un proton: el H36 original del NADH y el H23 que se transfiere desde la histidina para formar el grupo hidroxilo del lactato. En el caso límite, el proceso puede tener lugar por dos caminos por etapas alternativos:

(1) - El H36 se transfiere desde el NADH formando un mínimo relativo estable que llamaremos I1, seguido de la transferencia del H23 desde el grupo imidazol de la histidina para formar el producto final; P.

(2) - El H23 se transfiere desde la histidina para formar un mínimo relativo estable I2, seguido de la transferencia del H36 para formar el producto; P.

Estos dos caminos alternativos los presentamos esquemáticamente en la figura 4.11.

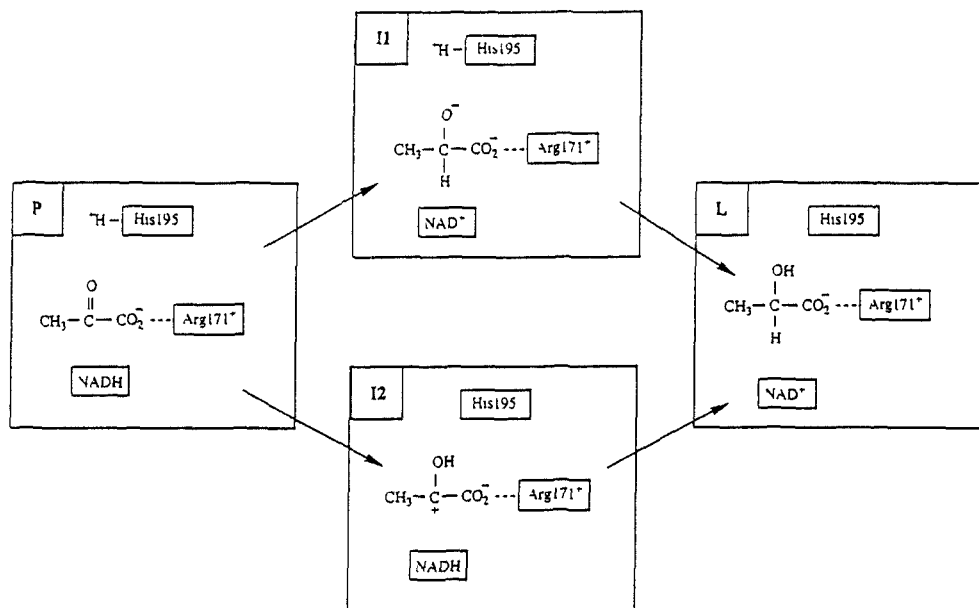


Figura 4.11. Mecanismos por etapas alternativos para la reducción de piruvato a lactato.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La geometría inicial se ha obtenido de la optimización de todos los grados de libertad, a partir de la cual se ha iniciado el estudio del mecanismo de reacción. En una primera aproximación vamos a abordar los dos casos límite propuestos. A partir de los resultados que obtengamos nos plantearemos el estudio detallado del análisis del camino de reacción desde P a L.

Para el proceso de P a I1, la distancia H36-C2 se ha establecido como la coordenada de reacción, y el resto de grados de libertad (158 en total) se han optimizado con el método PM3. En la tabla 4.11, presentamos los resultados de las energías junto con los valores de la coordenada de reacción y la distancia H23-O9. Como se puede observar, la aproximación del hidrógeno reductor H36 desde el NADH al carbono C2 del grupo carbonilo supone un aumento progresivo de la energía, y no parece haber evidencias de que el protón H23 cambie espontáneamente su posición para formar el grupo hidroxilo.

Tabla 4.11.- Valores de la distancia H23-O9 (en Å) y calor de formación (en kcal/mol) para las diferentes estructuras a lo largo del proceso P-I1 descrito por la coordenada de reacción H36-C2 (en Å)

Coordenada de Reacción H36-C2	Distancia H23-O9	Calor de Formación
2.82	1.89	3.20
2.80	2.09	1.79
2.60	2.14	2.53
2.40	2.20	4.22
2.20	2.22	5.52
2.00	2.28	8.93
1.80	2.26	11.67
1.60	2.25	19.48
1.50	2.28	25.75
1.40	2.29	33.65
1.30	2.32	42.70
1.20	2.34	52.92
1.15	2.12	58.19
1.10	2.09	62.93
1.05	2.06	69.57

Tabla 4. 12.- Valores de la distancia H36-C2 (en Å) y calor de formación (en kcal/mol) para las diferentes estructuras a lo largo del proceso I1-L descrito por la coordenada de reacción H23-O9 (en Å)

Coordenada de Reacción H23-O9	Distancia H36-C2	Calor de Formación
2.00	2.72	5.04
1.80	2.72	3.89
1.60	2.77	6.62
1.40	2.78	17.51
1.30	2.90	21.91
1.20	2.91	25.70
1.15	2.93	26.79
1.10	3.09	25.28
1.05	3.10	23.94

Cualquier tendencia a continuar desde la estructura I1 hacia la formación del lactato, forzando la aproximación del H23 al O9, supone una separación entre el H36 y el C2, en contra de lo que cabría esperar. Los resultados se presentan en la tabla 4.12 y podemos deducir que un mecanismo por etapas P-I1-L parece ser irreal.

En el otro mecanismo alternativo, P-I2-L, la protonación del piruvato por el H23 descrito por la distancia H23-O9 es la coordenada de reacción en la etapa P-I2. En la tabla 4.13 presentamos los valores optimizados de la distancia H36-C2 y el calor de formación de las estructuras para las distancias H23-O9 seleccionadas. Como se puede ver, la aproximación del protón H23 al O9 no supone una transferencia espontánea del H36. No obstante, el análisis de la tabla 4.14 muestra como en la etapa siguiente, I2-L, se mantiene la distancia de enlace H23-O9 estable y, a través de una barrera energética razonable, llegamos a la estructura final del lactato.

Tabla 4.13.- Valores de la distancia H36-C2 (en Å) y calor de formación (en kcal/mol) para las diferentes estructuras a lo largo del proceso P-I2 descrito por la coordenada de reacción H23-O9 (en Å)

Coordenada de Reacción H23-O9	Distancia H23-O9	Calor de Formación
1.81	2.72	3.57
1.70	2.82	3.87
1.60	2.83	7.10
1.50	2.86	11.54
1.40	2.86	16.44
1.30	2.87	22.24
1.20	2.95	26.90
1.15	2.96	27.10
1.10	2.98	25.72
1.05	3.01	24.60

Tabla 4. 14.- Valores de la distancia H23-O9 (en Å) y calor de formación (en kcal/mol) para las diferentes estructuras a lo largo del proceso I2-L descrito por la coordenada de reacción H36-C2 (en Å)

Coordenada de Reacción H36-C2	Distancia H23-O9	Calor de Formación
3.01	1.05	24.59
2.80	1.03	24.90
2.60	1.02	25.18
2.40	1.02	26.24
2.20	1.03	27.19
2.00	1.02	26.59
1.80	1.02	30.01
1.60	1.01	35.55
1.40	1.00	45.29
1.20	0.96	35.22
1.15	0.96	19.45
1.10	0.96	19.22
1.05	0.96	20.80

Es evidente que aunque el segundo mecanismo por etapas ofrece mejores resultados, puede ser que éste no represente exactamente la conversión de piruvato a lactato en nuestro modelo de centro activo del LDH. En este sentido, a fin de cuantificar la información obtenida, procederemos a estudiar la superficie de energía potencial definida por ambos parámetros H23-O9 y H36-C2 simultáneamente. Éstos han sido fijados en toda una serie de puntos dentro del rango de 2.00 -0.90 Å y 2.80-0.95 Å respectivamente, y el resto de grados de libertad ha sido optimizado para cada punto. Se ha evaluado y caracterizado como mínimos un total de 300 puntos de la superficie de energías. La superficie completa se presenta en la figura 4.12.a, y en la figura 4.12.b presentamos ampliada la zona correspondiente al lactato.

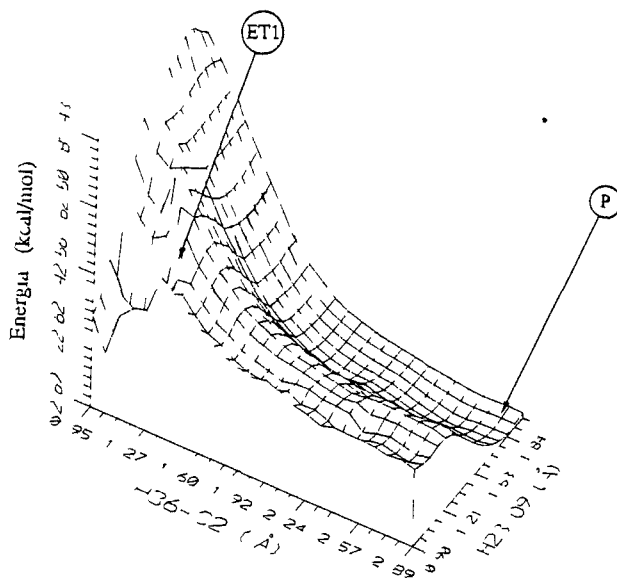


Figura 4.12.a. SEP de la reacción de reducción del piruvato a lactato en el LDH.

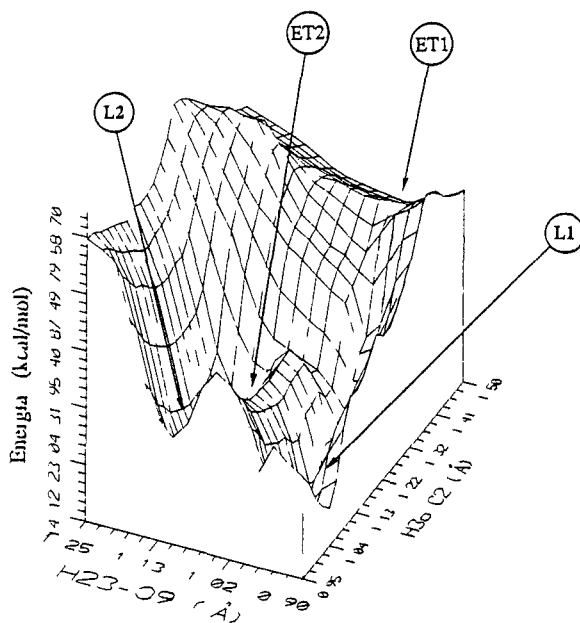


Figura 4.12.b. Detalle de la SEP de la figura 4.12.a. en la zona del lactato.

El análisis de la SEP 4.12.a muestra cómo el mecanismo correspondiente a una reducción inicial, que consistiría en el acortamiento de la distancia H36-C2, nos lleva a un valle cerrado y por lo tanto, no parece ser el camino real para la etapa inicial del proceso. El camino de reacción de mínima energía pasa a través de un valle paralelo al cual se accede por la aproximación del H23 hacia el O9. El sistema tiene que superar una pequeña barrera que conecta ambos valles a través de una cordillera, donde no se ha localizado ningún punto de silla de primer orden. En este sentido, no existe ningún ET que conecte ambas estructuras en esta región de la SEP. Una vez se protona el piruvato, el siguiente paso está controlado por el movimiento del H36 hacia el carbono del grupo carbonilo, C2. La energía del sistema aumenta hasta el ET1 cuya estructura se puede considerar como la del ET del proceso total. Una vez alcanzado el ET1, la energía decrece significativamente hasta alcanzar la estructura del lactato.

Tabla 4. 15.- Valores de las distancias más significativas (en Å) y calor de formación (en kcal/mol) para las diferentes estructuras de los puntos estacionarios de la SEP.

Puntos	Distancias				Calor de Formación
	H36-C2	H36-C37	H23-O9	H23-N24	
P	2.819	1.109	1.812	1.007	3.20
ET1	1.417	1.308	0.993	1.705	44.73
L1	1.119	4.786	0.972	1.804	11.19
ET2	1.100	2.499	1.100	1.735	17.74
L2	1.100	4.794	1.050	2.019	31.62

En la tabla 4.15 se presentan las distancias interatómicas más significativas, y las energías de los puntos estacionarios. Dado que el movimiento del H36 es concertado, los cambios de la distancia H36-C37 y H36-C2 son proporcionales en el ET1. Una vez se alcanza el ET, el modelo de coenzima se mueve sin ninguna conexión con el hidrógeno transferido H36. La protonación descrita por el movimiento del H23 hacia el O9 es el proceso inicial, pero podemos observar cambios sustanciales en la distancia H23-N24 a lo largo de la reacción. Similar información se puede extraer del análisis de los órdenes de enlace y otros parámetros (ver tabla 4.16). La protonación del O9 está prácticamente consumada en las etapas iniciales de la reacción, y el enlace H36-C2 está todavía lejos de la distancia de enlace en el lactato.

Tabla 4. 16.- Valores de los órdenes de enlace para las diferentes estructuras de los puntos estacionarios de la SEP.

Puntos	Órdenes de enlace			
	H36-C2	H36-C37	H23-O9	H23-N24
P	0.00	0.96	0.03	0.91
ET1	0.28	0.65	0.74	0.13
L1	0.95	0.00	0.85	0.06
ET2	0.95	0.00	0.81	0.09
L2	0.95	0.00	0.89	0.02

Estructuras de Transición

En la figura 4.13.b. presentamos la estructura optimizada del ET que controla la reacción de la figura 4.9. Para esta estructura, los gradientes están próximos a cero, y posee una sola frecuencia de vibración imaginaria.

Desplazamientos desde este punto hacia reactivos o productos nos llevaría a estructuras de menor energía (ver figura 4.12.a y 4.12.b). En el ET la posición del H36 que se transfiere está ligeramente doblada con un ángulo C37-H36-C2 de 172.9° . Los resultados son similares a los obtenidos por Wilkie y Williams²² aunque con un modelo relativamente pequeño.

De la SEP de la figura 4.12.a se puede deducir que la reacción está controlada por el movimiento del hidruro H36, y que la estructura del ET no viene afectada por el protón H23. La protonación tiene lugar en la etapa preliminar y resulta necesaria para que se dé la segunda etapa: la transferencia del hidruro.

Conformaciones estructurales del Lactato

Una vez sobrepasado la ET, nosotros esperábamos encontrar un valle con un mínimo de energía para el lactato, pero de hecho encontramos una situación algo más complicada: figura 4.12.b. Existe dos mínimos independientes para la supermolécula en la conformación del lactato: L1 y L2 (figura 4.13.c). Cabe destacar que entre ambos mínimos, L1 y L2, el coenzima gira desde su posición inicial. Si asumimos la reversibilidad de la conversión lactato-piruvato, podemos esperar una posición final del lactato en la cual el carbono C37 se situará de nuevo en una posición adecuada para recibir la transferencia del hidruro H36. Esta reestructuración se puede encontrar en la SEP de la figura 4.12.b indicada por el punto ET2 con una energía marcadamente superior a la de ambos mínimos. Esta estructura ET2 puede ser considerada como la ET que controla el cambio conformacional, y su análisis cumple con todos los requisitos característicos de un punto de silla.

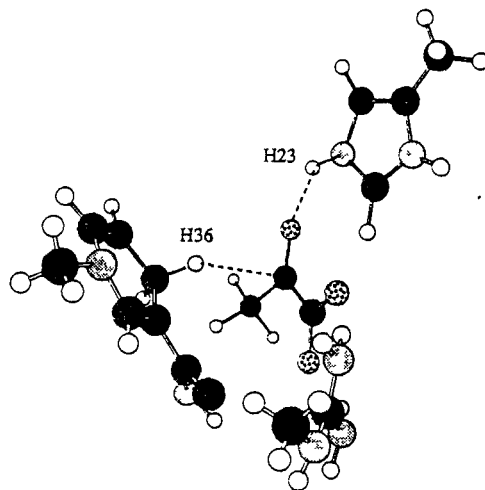


Figura 4.13.a. Estructuras del P optimizadas con el método PM3.

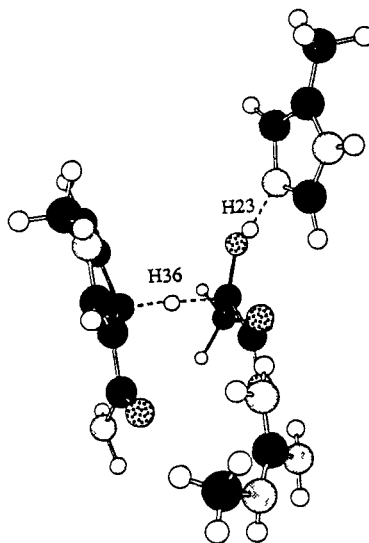


Figura 4.13.b. Estructuras del ET1 optimizadas con el método PM3

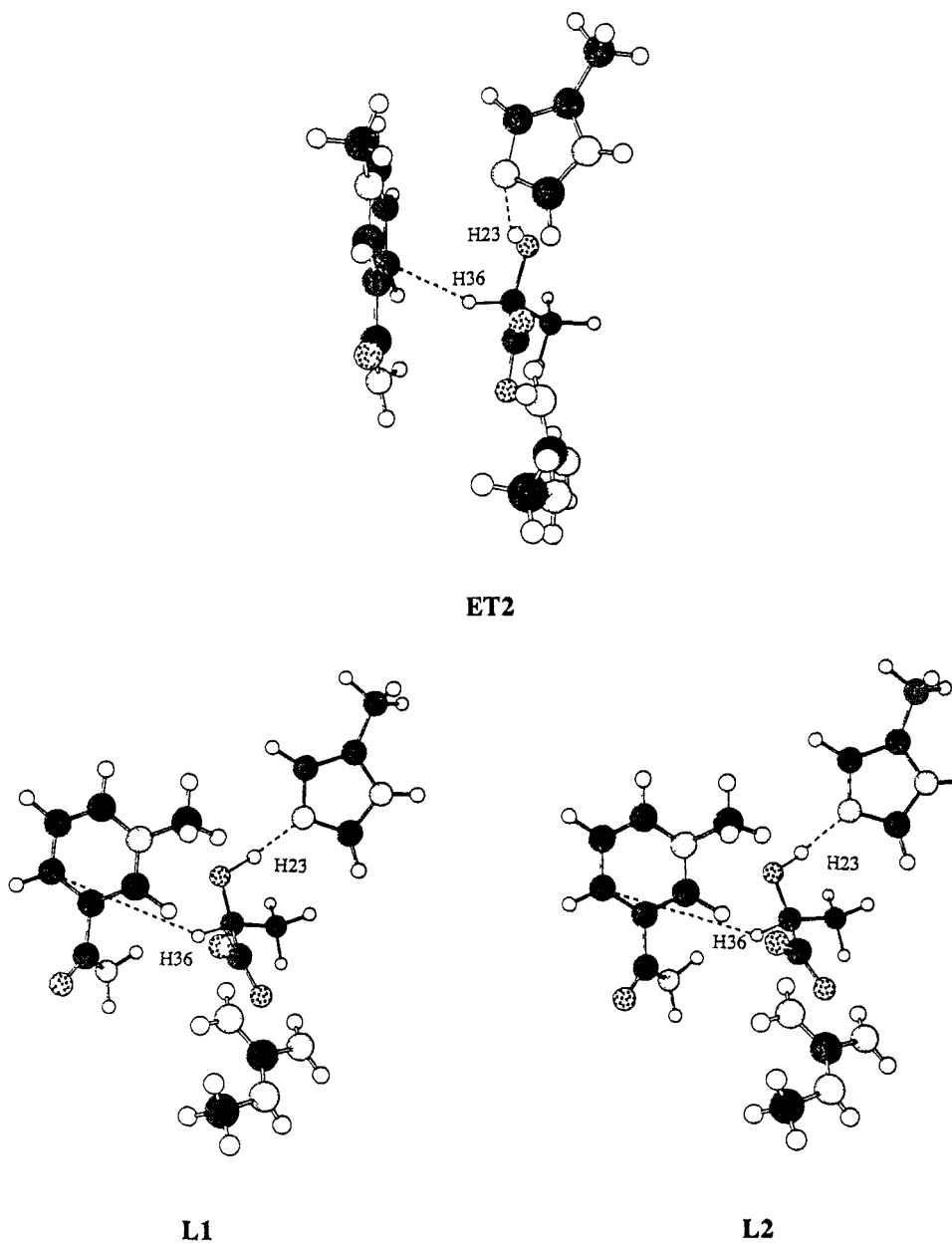


Figura 4.13.c. Estructuras del L1, ET2 y L2 optimizadas con el método PM3.

IV. 2. 3. ESTUDIO AM1 versus PM3

Es un hecho conocido que las transferencias de hidruro y de protones juegan un papel fundamental en sistemas biológicos, y generalizando, estos procesos tienen lugar en el curso de muchas reacciones enzimáticas formando parte del poder catalítico de numerosas familias de enzimas²³. El enzima lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la interconversión entre el piruvato y el lactato utilizando el dinucleótido nicotina adenina (NAD) como cofactor de acuerdo con el equilibrio propuesto en la figura 4. 9.

Los métodos semiempíricos MINDO/3 y MNDO, como comentamos en el capítulo III, fallan a la hora de modelar adecuadamente enlaces por puentes de hidrógeno. El método AM1, aunque en principio diseñado para corregir los defectos del MNDO en éste y otros aspectos, parece no haber alcanzado perfectamente sus objetivos por lo menos en lo que a enlaces por puente de hidrógeno se refiere²⁴. En este sentido, el estudio del mecanismo molecular del LDH lo hemos iniciado en base a cálculos PM3, cuyos resultados parecen ser algo mejores²⁵. No obstante, debido a su reciente aparición, no creemos que haya sido suficientemente probado. Así, a fin de poder contrastar los resultados ya obtenidos en PM3 y poder profundizar algo más en el mecanismo molecular del LDH, vamos a continuar nuestra aproximación a las transformaciones que tienen lugar en el centro activo de este enzima utilizando ambos métodos. Este análisis constituirá al mismo tiempo una buena prueba de los límites de ambos métodos en el estudio de reacciones enzimáticas.

MÉTODO Y MODELO

En este segundo paso el modelo molecular seguirá siendo el descrito en la figura 4.10 para la reacción propuesta en el esquema de la figura 4.9.

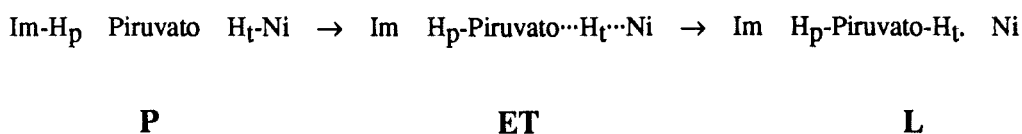
Todos los cálculos se han llevado a cabo utilizando los procedimientos estandar contenidos en el paquete de programas GAUSSIAN 92. Tanto el método AM1 como el PM3 derivan de los mismos conceptos teóricos: utilizan

las mismas aproximaciones de OM-CLOA HF combinados con las NDDG, y difieren, tal como indicamos en el apartado III. 6. 3., en la parametrización. En el AM1, se introducen términos adicionales de gaussianas en las funciones de repulsión de core definidas en MNDO con el objeto de corregir las sobreestimaciones de largo alcance. En el PM3 se aplica una nueva técnica para obtener la optimización de los parámetros²⁶.

Los métodos de optimización y los criterios de convergencia han sido los mismos, y la naturaleza de los ETs se establecieron calculando analíticamente y diagonalizando la matriz de segundas derivadas de la energía .

RESULTADOS

A partir de la SEP completa, figura 4.12.a, disponemos de las estructuras de partida de los puntos estacionarios de la reacción: reactivos (P), ET (ET1) y productos (L). Estas estructuras, obtenidas con el método PM3, son las geometrías de partida que introduciremos para la optimización analítica en AM1. La reacción puede ser descrita en términos de la transferencia de un hidruro H36 (H_t) originalmente en el anillo de la nicotinamida (Ni), y un protón H23 (H_p) que se transfiere desde el imidazol (Im) para formar el grupo -OH del lactato. Las estructuras estacionarias localizadas y caracterizadas de la SEP pueden ser representadas de la siguiente manera:



Las otras rutas alternativas para las transferencias de hidruro y protónica consideradas, que podrían suponer otros mínimos de energía con estructuras

del tipo "Im H_p-Piruvato H_t-Ni" o ET para el proceso de transferencia del protón no han sido determinadas en la reacción global. El mecanismo de la reacción está controlado por la transferencia del hidruro, H_t, del NADH hacia el átomo de carbono del grupo carbonilo (C2). Estos resultados complementan un estudio teórico llevado a cabo por Norris y Gready²⁷ del posible mecanismo e intermediarios de esta reacción.

Las estructuras de los puntos estacionarios obtenidas con ambos métodos se presentan en la figura 4.14. Siguiendo cálculos de IRC, el único modo con frecuencia imaginaria de la matriz de segundas derivadas en el punto de silla determina la dirección inicial desde el ET hacia reactivos y productos. En el presente estudio, desplazamientos desde este punto en ambos sentidos, nos acercan hacia las respectivas estructuras de los mínimos P y L. Los cálculos, AM1 están de acuerdo con los resultados presentados en el apartado anterior, IV.1.

En la tabla 4.17 presentamos los parámetros geométricos de interés de las estructuras estacionarias. La transferencia del H_t y la del H_p tienen lugar en planos perpendiculares. La estructura del ET tiene un aspecto torsionado con una disposición *sin* entre el piruvato y el sistema p del anillo reductor²⁸, tal como fue propuesto por Lehn y colaboradores²⁹ para el ataque nucleofílico a un sistema carbonilo p, y como muestran estudios teóricos previos^{30,31}. El enlace H_t-C2 es más largo que el enlace que se rompe H_t-C37. Existe un fuerte acoplamiento entre la posición del H_t en ese puente, la distancia intermolecular C2-C37, y el ángulo descrito por los átomos C37-H_t-C2.

La transferencia del protón tiene lugar a lo largo de un enlace de hidrógeno preexistente entre el grupo dador (el anillo imidazol) y el plano del par solitario sp² del oxígeno del grupo carbonilo (O9 del sustrato piruvato).

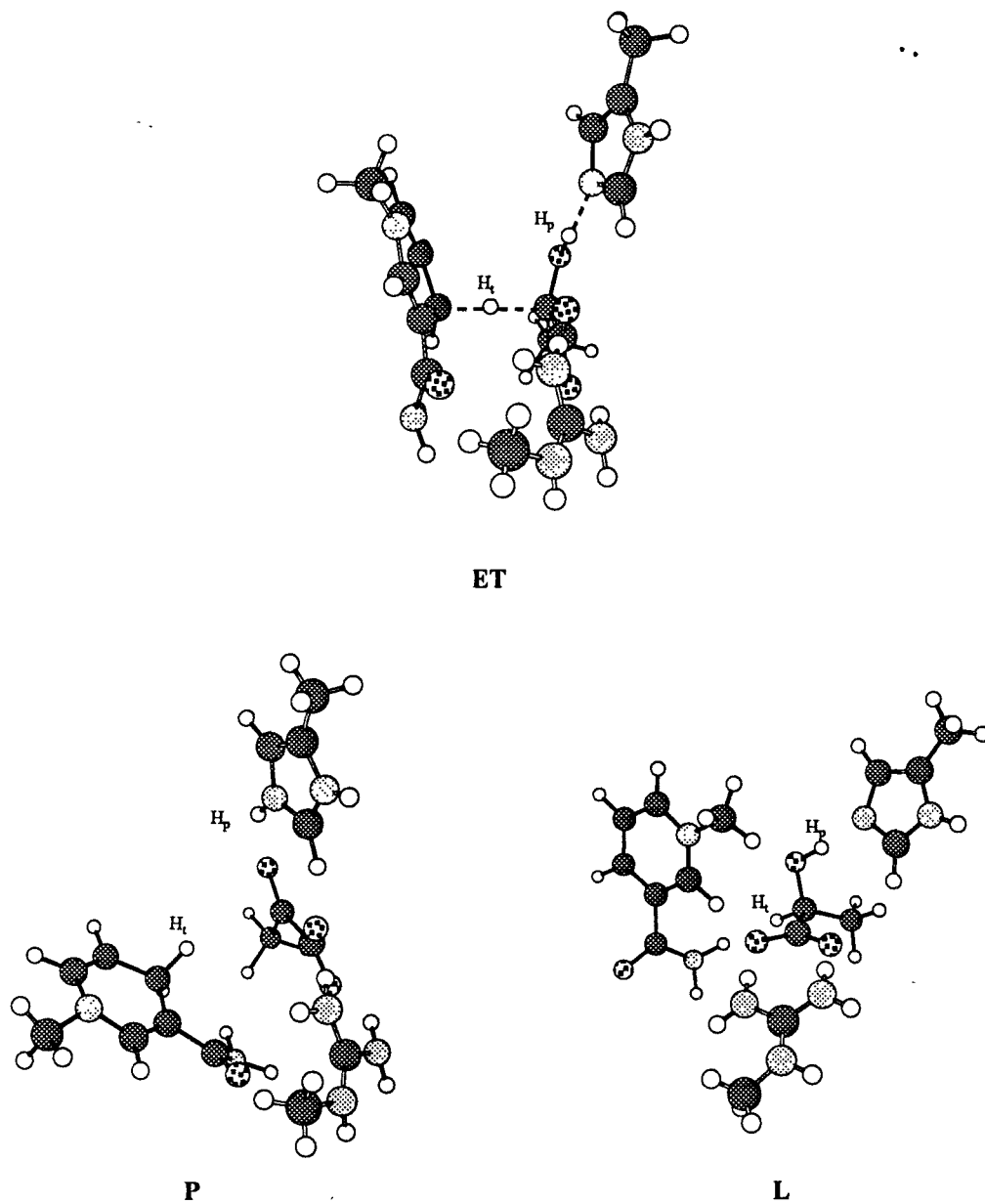
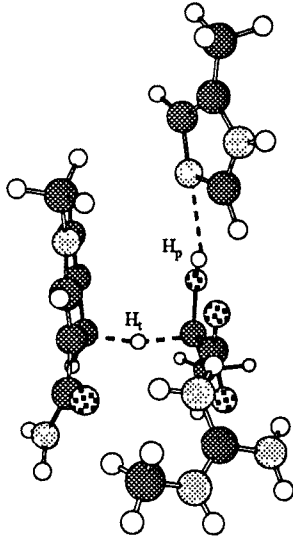
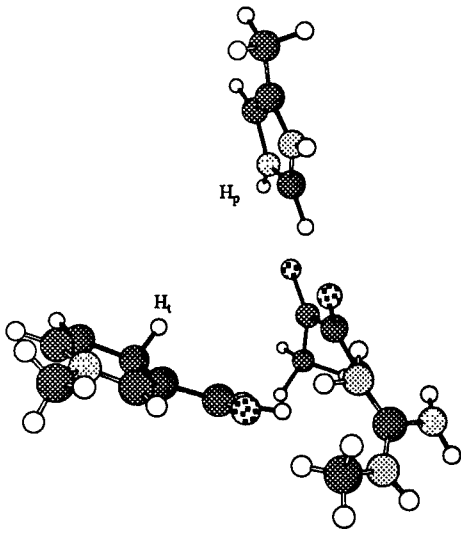


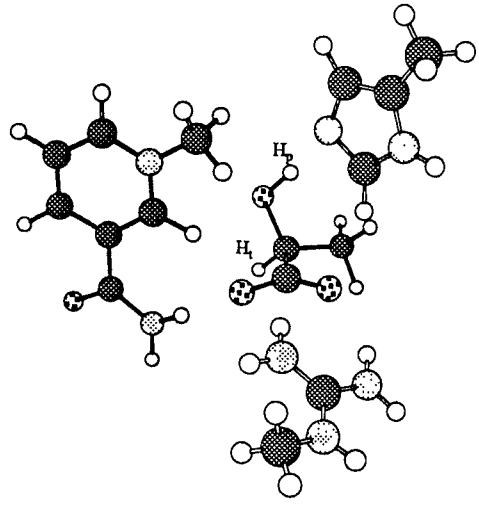
Figura 4.14.a. Estructuras de los puntos estacionarios obtenidas con el método PM3.



ET



P



L

Figura 4.14.b. Estructuras de los puntos estacionarios obtenidas con el método AM1.

Tabla 4. 17. Parámetros seleccionados de las estructuras optimizadas, Reactivos (P), ET y Productos (L) obtenidos con ambos métodos; PM3 vs AM1. Las distancias vienen en Å y los ángulos y ángulos dihedros en grados.

	H36-C2		H36-C37		C37-C2	
	PM3	AM1	PM3	AM1	PM3	AM1
P	2.8492	4.1592	1.1140	1.1374	3.7894	5.0336
TS	1.4173	1.3903	1.3082	1.3479	2.7207	2.7034
L	1.1208	1.1278	4.7231	5.2307	5.4482	5.7102
	H23-O9		H23-N24		O9-N24	
	PM3	AM1	PM3	AM1	PM3	AM1
P	1.8191	2.1909	1.0078	1.0012	2.6766	2.8190
TS	0.9927	0.9820	1.7047	2.5013	2.6471	3.4064
L	0.9717	0.9662	1.7937	2.5401	2.7612	3.3676
	H16-O5		H18-O4			
	PM3	AM1	PM3	AM1		
P	1.7653	2.1219	1.7650	2.0494		
TS	1.7188	2.1231	1.7104	2.0159		
L	1.7260	1.9920	1.7180	2.0055		
	O9-H23-N24		C2-H36-C37		H36-C2-O9-H23	
	PM3	AM1	PM3	AM1	PM3	AM1
P	140.75	119.26	141.98	135.47	83.71	69.12
TS	157.03	153.16	173.15	161.71	88.80	85.91
L	173.44	143.67	125.31	109.69	-168.91	-161.66

Análisis estructural

Analizando la tabla 4.17, las diferencias más notables entre las estructuras de los ETs obtenidas con ambos métodos aparecen en la distancia H_p-N24 , que controla la transferencia del protón, y las distancias responsables de la fijación del sustrato al residuo de la guanidina: $H16-O5$ y $H18-O4$. El AM1 produce distancias más grandes entre el anillo de imidazol y el sustrato (H_p-N24) que el PM3: 2.5 y 1.7 Å respectivamente. Al mismo tiempo, las distancias entre el sustrato y el residuo de la guanidina obtenidas en el PM3 indican la posibilidad de interacciones débiles por enlaces de puente de hidrógeno. Los valores de estas distancias obtenidas en AM1 corresponderían a interacciones mucho más débiles. Este comportamiento del método AM1 había sido mostrado previamente en la literatura^{24,32}.

Por otro lado, ambos métodos muestran que el proceso de transferencia del H_t desde la Ni al piruvato en el ET se encuentra en una etapa temprana de la reacción, mientras que la transferencia del H_p desde el Im al piruvato se ha completado. Ello permite concluir que ambos procesos están cinéticamente acoplados, pero dinámicamente desacoplados, tal como muestran Wilkie y Williams²².

Energías de los puntos estacionarios y vector de transición

Desde un punto de vista energético, la energía relativa del ET respecto a P varía entre 42.0 y 38.0 kcal/mol, mientras que la energía de L respecto a P supone 6.4 y 4.9 kcal/mol para los cálculos PM3 y AM1 respectivamente.

Las frecuencias imaginarias del ET son prácticamente las mismas para los cálculos PM3, $\nu^\# = 1134i \text{ cm}^{-1}$, y los AM1, $\nu^\# = 1057i \text{ cm}^{-1}$. Estos valores, junto con las componentes del vector de transición, los presentamos en la tabla 4.18. Las coordenadas responsables de la frecuencia imaginaria del punto de silla son: i) la distancia C2-H36; es decir la coordenada de avance de la transferencia de hidruro, y ii) la coordenada de rehibridación en los centros dador y aceptor; es decir, el ángulo de enlace H55 y el ángulo dihedro C37.

Estos resultados son muy similares a los obtenidos para estudios de los mecanismos moleculares de las reacciones catalizadas por el LADH³⁴ y por el FDH³⁵.

Tabla 4. 18. Frecuencias armónicas de vibración (cm⁻¹) obtenidas en el ET, y los vectores propios más importantes asociados a ellas.

	PM3	AM1
Frecuencia:	1134.43i	1057.35i
Distancias:		
C2-C1	0.085	0.076
H23-O9	0.098	0.038
H36-C2	-0.263	-0.077
H55-C37	0.080	0.055
Ángulos:		
C2-C1-D1	0.109	0.083
H36-C2-C1	-0.701	-0.527
C37-D5-D1	0.079	0.067
H55-C37-C38	-0.321	-0.295
Ángulos dihedros:		
C2-C1-D1-D2	-0.086	-0.125
H23-O9-C2-C1	0.088	0.129
H36-C2-C1-O4	0.470	0.645
C37-D5-D1-D2	-0.074	-0.115
H55-C37-C38-C39	0.178	0.324

Análisis de población

En la tabla 4.19 se presentan las cargas atómicas netas para las estructuras optimizadas de los puntos estacionarios. Las diferencias entre los resultados AM1 y PM3 aparecen en el valor del átomo N24 del imidazol en la estructura del P: mientras el cálculo PM3 muestra un átomo cargado positivamente, el

AM1 reproduce una carga negativa. Esto se puede explicar por el hecho de que en la estructura del P del cálculo AM1 el anillo del imidazol se encuentra mucho mas alejado que en la estructura análoga en PM3.

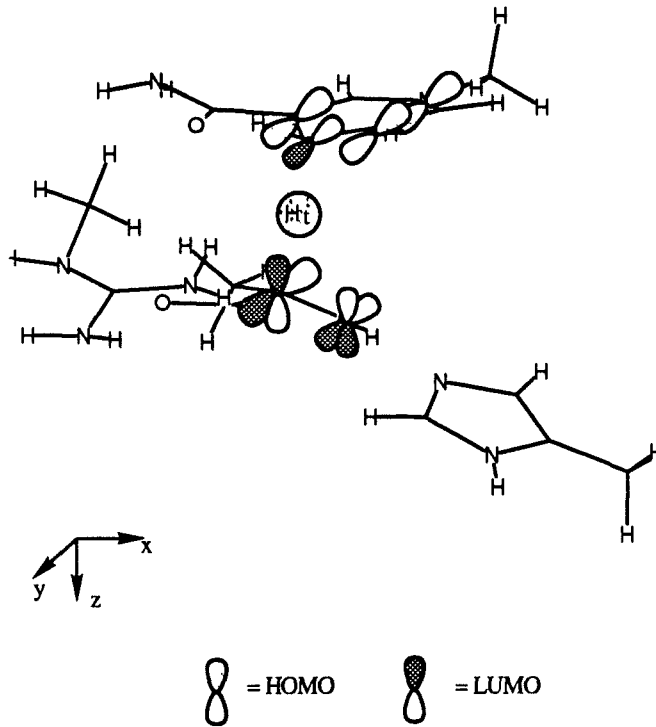


Figura 4.15. Orbitales moleculares frontera, HOMO y LUMO, del ET calculado en PM3.

Tabla 4. 19 Cargas atómicas netas (u.a.) distribuidas en las estructuras optimizadas, Reactivos (P), Estructura de Transición (ET) y Productos (L) obtenidos con la ayuda del análisis de población de Mulliken.

	P		ET		L	
	PM3	AM1	PM3	AM1	PM3	AM1
C2	0.30	0.23	0.21	0.10	0.00	-0.07
O9	-0.40	-0.41	-0.27	-0.30	-0.42	-0.42
H23	0.23	0.41	0.15	0.33	0.30	0.27
N24	0.32	-0.30	-0.18	-0.25	-0.19	-0.25
H36	0.11	0.12	0.02	0.02	0.09	0.17
C37	-0.10	-0.14	0.05	0.01	-0.07	-0.05
Pyr a)	-0.80	-0.93	-0.65	-0.80	-1.20	-1.36
Im-H23 b)	0.67	0.55	0.08	0.00	0.03	0.00
Ni-H36 c)	-0.11	-0.11	0.32	0.49	0.95	0.97

a) Pyr = $\sum C1 \rightarrow O9$

b) Im-H23 = $\sum N24 \rightarrow H35$

c) Ni-H36 = $\sum C37 \rightarrow H55$

La reorganización geométrica del ET resulta en una interacción orbital frontera óptima³⁶⁻³⁸. La conformación endo permite un solapamiento máximo entre los orbitales moleculares HOMO y LUMO. Tal como se muestra en la figura 4.15, la interacción del HOMO del hidruro con el LUMO del centro electrofílico, que aceptará el Ht durante la transferencia, ocurre en una disposición doblada, de forma que se maximiza el solapamiento de estos orbitales y se minimiza la interacción. Sin embargo, los resultados AM1 producen un comportamiento diferente: el HOMO está asociado al anillo del imidazol y el LUMO corresponde al centro electrofílico, por lo difícilmente se pueden extraer conclusiones de estos cálculos. Los resultados PM3 se suman a otros ejemplos de la literatura utilizando el mismo método semiempírico³⁸ o métodos *ab initio*²³⁻³⁶, que tienden a demostrar que el principio de máximo solapamiento HOMO-LUMO se puede usar como guía en la localización de ETs de reacciones de transferencia de hidruro.

IV. 2. 4. CONCLUSIONES

El mecanismo molecular para la transformación de piruvato a lactato en el centro activo del LDH ha sido investigado por medio de los dos métodos semiempíricos más recientes, AM1 y PM3. Hemos utilizado un modelo molecular suficientemente grande que nos ha permitido reproducir cada una de las especies que intervienen en el proceso. El estudio se ha basado en primer lugar en el cálculo de la SEP completa por medio del método PM3. Sobre esta superficie se ha determinado el camino de mínima energía y se ha localizado las estructuras de los puntos estacionarios que posteriormente han sido caracterizados en detalle por ambos métodos semiempíricos. Los resultados podemos resumirlos en los siguientes puntos:

I) El modelo empleado describe el proceso global como un mecanismo por etapas en el que inicialmente se transfiere un protón desde la histidina al piruvato para formar el grupo -OH. En la segunda etapa un hidrógeno se transfiere desde el NADH hasta el átomo de carbono del grupo carbonilo del sustrato.

II) El proceso está controlado por el movimiento del hidrógeno reductor del NADH hasta el piruvato (H_t). El ET correspondiente a esta transferencia es la estructura de transición que controla la reacción global: ET1.

III) Los cambios en la distancia entre el H_t y los carbonos de origen (C37 del NADH) y llegada (C2 del piruvato) son proporcionales en el ET. El modelo de coenzima, a partir del ET se separa hasta perder la interacción con el H_t transferido.

IV) Existe dos mínimos independientes para la conformación del lactato cuya diferencia estriba en que el coenzima gira sobre su posición inicial y final, localizándose una estructura de transición, ET2, que une estos dos mínimos

V) Los posibles caminos de reacción obtenidos en PM3 y AM1 son comparables, y muestran que el ET que controla el proceso global está

dominado por la transferencia del hidruro, H_t . Las barreras energéticas son también comparables.

VI) El vector de transición y el camino de reacción muestran que la transferencia del hidruro y la del protón están cinéticamente acopladas, pero dinámicamente desacopladas.

VII) Existen una gran similitud entre los resultados de las estructuras obtenidas del ET y resultados previos de nuestro grupo de investigación sobre otros enzimas de la misma familia de las deshidrogenasas (LADH y FDH), Schulz y colaboradores sobre la glutathione reductasa³⁹ o Wilkie y Williams sobre la misma LDH³². Cálculos *ab initio* con modelos mucho más reducidos proporcionan una separación de alrededor de 2.7 Å entre los átomos de carbono que intervienen en la transferencia del hidruro (C37—C2)^{34,35}. Si consideramos la hipótesis inicial de Pauling³³, para la descripción de la catálisis enzimática, el centro activo moldea los reactivos conforme la estructura del ET. Estrictamente hablando, la energía de enlace de un enzima es la fuerza que conduce la catálisis enzimática⁴⁰, que dispone al sustrato de forma que pueda ocupar el centro activo del enzima. En este sentido, hemos comprobado cómo, de entre las tres estructuras caracterizadas como estacionarias en la SEP, únicamente la del ET cabe perfectamente en el centro activo del LDH. Este hecho es demostrable comparando las estructuras de las figuras 4.14.a y 4.14.b con la figura 1 del trabajo de Norris y Gready²⁷, donde se representan las coordenadas obtenidas por difracción de rayos X para el complejo ternario LDH-oxamató-NADH (Protein Data Bank 1 LDM).

VIII) El proceso de transferencia del protón (H_p) tiene lugar sobre un puente de hidrógeno inicial entre el anillo del imidazol y el oxígeno del grupo carbonilo del piruvato. Mientras los resultados en PM3 indican la posibilidad de una débil interacción intermolecular, el método AM1 ofrece longitudes mucho más grandes. La misma tendencia se observa para la fijación del sustrato sobre la guanidina, controlada por interacciones de puentes de hidrógeno. En este sentido, desde un punto de vista estructural, el método PM3 resuelve mucho mejor este tipo de interacciones.

IX) El análisis de las cargas atómicas es similar en ambos métodos y las únicas diferencias aparecen debido a la mayor separación entre el imidazol y el sustrato que produce el método AM1. En ambos casos queda claro el carácter positivo del H23 y negativo del H36.

X) Del análisis de los orbitales moleculares y por comparación con resultados previos de cálculos *ab initio*, el método PM3 parece ser más apropiado que el AM1 para explicar el hecho de que el principio de máximo solapamiento HOMO-LUMO pueda ser utilizado como una guía para localizar estructuras de ETs en reacciones de transferencia de hidruro.

IV. 3. DIHIDROFOLATO REDUCTASA

IV. 3. 1. INTRODUCCIÓN

El enzima dihidrofolato reductasa (5, 6, 7, 8-tetrahidrofolato: NADP oxidoreductasa, E.C. 1. 5. 1. 3.: DHFR) es un enzima de la familia de las deshidrogenasas que cataliza la reducción NADPH dependiente del 7, 8-dihidrofolato (DHF) a 5, 6, 7, 8-tetrahidrofolato (THF) tanto en bacterias como en vertebrados¹. El DHFR es necesario para mantener las concentraciones intracelulares del THF y sus derivados, los cuales son cofactores esenciales en la síntesis de varios aminoácidos. En este sentido, este enzima ha resultado ser el objeto de numerosos estudios en tratamientos quimioterapéuticos dado que, bloqueándolo con un inhibidor, se consigue detener la réplica del ADN: o dicho de otro modo, la reproducción de células cancerígenas². No obstante, en la actualidad los detalles del mecanismo molecular de la reacción enzimática son todavía una incógnita³⁻⁵, lo que supone un obstáculo en el refinamiento del diseño de estas drogas antitumorales.

El mecanismo de la reacción requiere la adición de un protón y un ión hidruro (desde el NADPH) al deshidrofolato, y está generalmente aceptado que la transferencia del protón precede a la del hidruro y activa el sustrato⁶.

La cuestión clave para entender la transferencia del hidruro desde el C4 del anillo de la dihidropiridina (NADPH) al C6 del anillo ptering (DHF) es la naturaleza del ET (ver figura 4.16). En el apartado IV. 2. hemos visto cómo localizábamos el ET para la transferencia de hidruro en el LDH, y recientemente también han sido localizados otros ET de este tipo de transferencias en diferentes enzimas; alcohol deshidrogenasa del hígado^{7,8} o formiato deshidrogenasa⁹. Estos resultados extrapolados a la reacción del DHFR, considerando siempre las restricciones impuestas por consideraciones estereoquímicas, pueden suponer un modelo para esta etapa de reducción¹⁰.

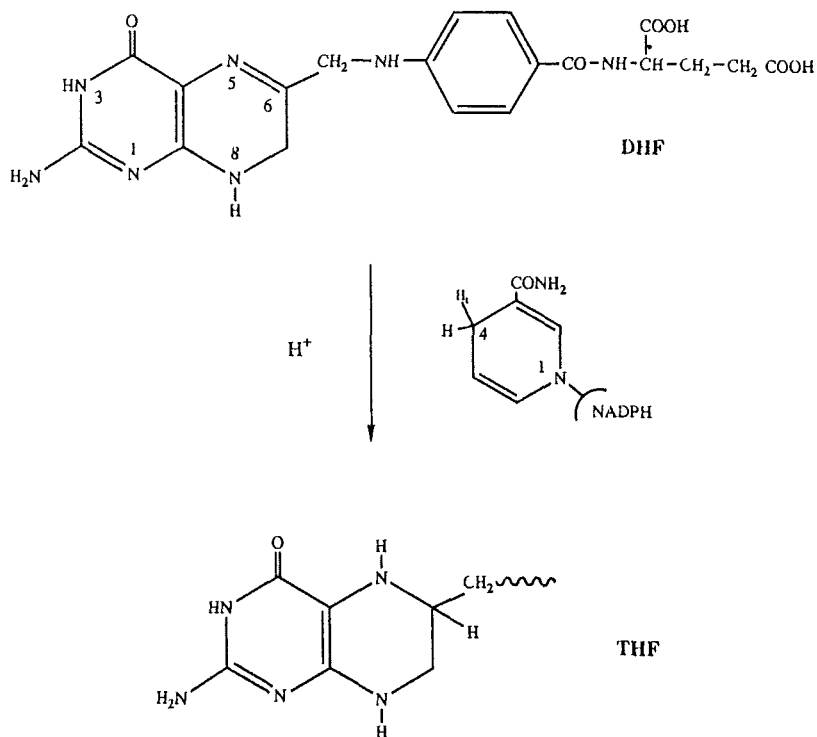


Figura 4.16. Modelo del mecanismo molecular para la transferencia de hidruro en el DHFR.

En este apartado hemos llevado a cabo cálculos semiempíricos AM1 y PM3 a fin de investigar y caracterizar la etapa de la transferencia del hidruro en el centro activo de la DHFR, con especial énfasis en la caracterización del ET. Al mismo tiempo, una comparación entre los resultados de ambos métodos y resultados experimentales puede darnos una indicación muy útil sobre las posibilidades de las técnicas químico cuánticas empleadas.

IV. 3. 2. MODELO MOLECULAR Y RESULTADOS

El modelo molecular empleado para el estudio del ET de la transferencia de hidruro en el DHFR se presenta en la figura 4.17. En ésta podemos encontrar también la numeración empleada en la matriz Z que define la geometría. La estructura del ET considerado como la tranferencia del H_t la obtendremos investigando la SEP definida por las distancias interatómicas C6-C4 y H_t -C4 simultaneamente.

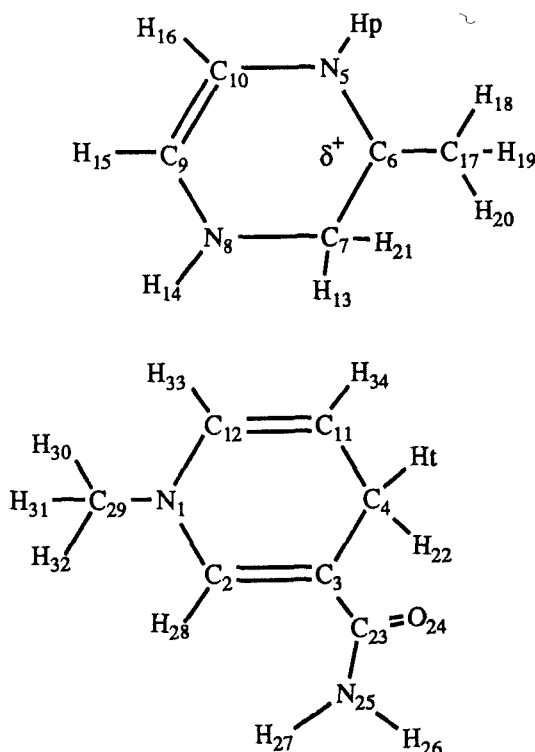


Figura 4.17. Modelo molecular empleado para la reacción de reducción en el DHFR.

Los cálculos AM1 y PM3 han sido llevados a cabo siguiendo los procedimientos habituales. Las geometrías moleculares se han optimizado con

la subrutina de gradientes analíticos de Berny. El criterio de convergencia en la matriz de densidad fue de 10^{-9} u.a. y en los valores de máximo desplazamiento y de máxima fuerza fue de 0.0018 Å y 0.00045 hartree/bohr respectivamente. El estudio de la estructura del ET se ha realizado por medio de la evaluación de la matriz Hesiana y la naturaleza de este punto estacionario se establece calculando y diagonalizando analíticamente esta matriz de segundas derivadas de la energía para determinar la única frecuencia imaginaria. Una vez obtenido el punto estacionario, la Hesiana es recalculada obteniéndose los modos normales.

En la figura 4.18 y tablas 4.20 y 4.21, presentamos la geometría y vector de transición del punto de silla obtenido con ambos métodos.

Tabla 4. 20. Energía (u.a.), gradientes de longitudes promedio (u.a.) y parámetros geométricos seleccionados obtenidos con los métodos AM1 y PM3.

	AM1	PM3
Energía Total (Hartrees):	0.292769	0.284229
Gradiente de longitudes (av):	4.17×10^{-4}	4.47×10^{-4}
Distancias (Å):		
C6-C4	2.6893	2.6801
C6-H _t	1.3148	1.3190
H _t -C4	1.4050	1.3710
H13-O24	3.6115	1.8244
Ángulos de enlace (deg):		
C6-H _t -C4	163.01	170.64
C9-C6-C4	109.47	106.44
N1-C4-C6	115.62	115.96
Ángulos de enlace (deg):		
H _p -N5-C6-C7	164.62	121.44
H14-N8-C9-C10	152.14	-145.46

Tabla 4.21 Cargas atómicas netas, frecuencias imaginarias (cm^{-1}), constantes de fuerza (u.a.) y el vector propio correspondiente (e) asociados al único valor propio negativo para ET.

	AM1		PM3	
Cargas atómicas netas (u.a.):				
H _t	0.04		0.09	
N1	-0.42		0.04	
N4	-0.44		0.02	
C6	0.11		-0.05	
C10	0.01		0.02	
Frecuencias imaginarias	1085.33 i		1297.38 i	
Variable:	<u>e</u>	<u>K</u>	<u>e</u>	<u>K</u>
r C6-D2	0.142	0.475	0.111	0.390
r H14-N8	-0.118	0.432	-0.029	0.485
r H _p -N5	0.067	0.435	0.180	0.484
r C4-C6	0.167	0.122	0.122	0.207
r H22-C4	-0.358	0.338	-0.330	0.328
r H _t -C4	0.799	0.036	0.838	0.332
\angle H _p -N5-D2	0.011	0.252	0.083	0.168
\angle H22-C4-D7	-0.038	0.172	-0.042	1.027
\angle H _t -C4-D7	0.066	0.417	0.013	2.886
\angle H _p -N5-D2-D1	0.017	0.006	0.199	0.159
\angle H22-C4-D7-D8	-0.358	0.057	-0.151	0.179
\angle H _t -C4-D7-D8	0.304	0.334	0.186	6.503

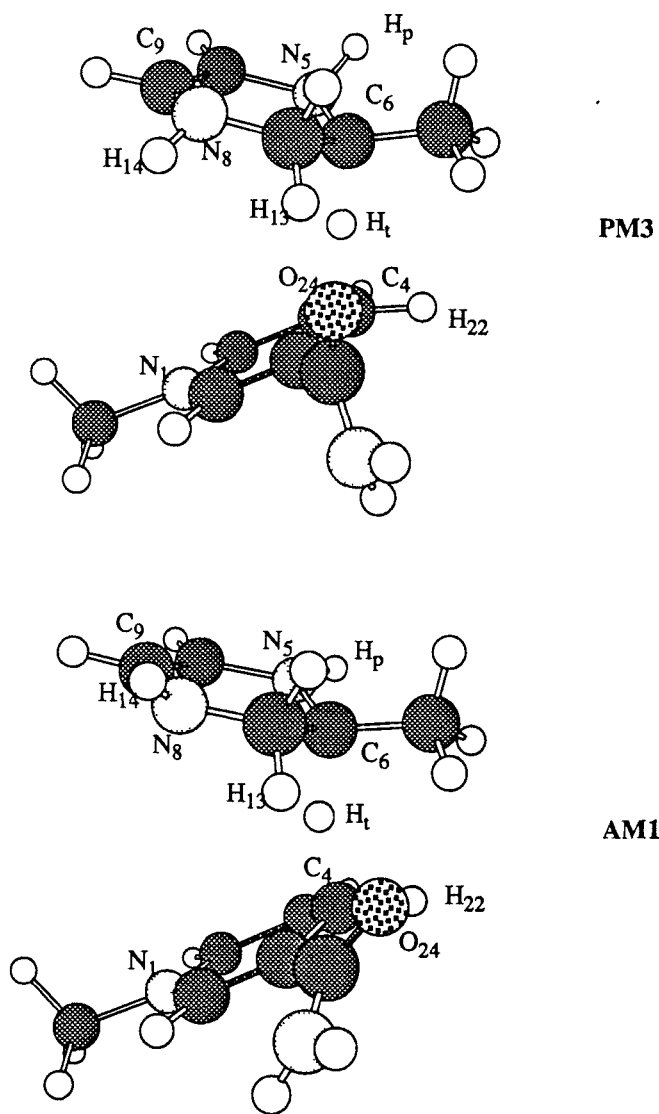


Figura 4.18. Estructuras optimizadas del ET obtenidas con los métodos AM1 y PM3.

IV. 3. 3. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con ambos procedimientos semiempíricos son muy similares. No obstante, el análisis de éstos revelan las siguientes características:

I) la estructura endo está doblada, con un ángulo C6-H_t-C4 entre 163.01 y 170.64 grados. Esta estructura "sin" parece ser un hecho generalizado para estas transferencias⁹⁻¹⁵. Los dos anillos, casi en paralelo, forman ángulos muy similares para ambos cálculos (C9-C6-C4, y N1-C4-C6).

II) la estructura del ET obtenida en PM3 sugiere la posibilidad de una interacción por puente de hidrógeno entre el H13 y el O24 (ver tabla 4. 20). El resultado presenta el grupo amida girado respecto al anillo de dihidronicotina-mida. En AM1 no se observa este efecto.

III) la reorganización geométrica del ET resulta nuevamente en una forma óptima para la interacción de los orbitales moleculares frontera¹¹⁻¹⁴. El solapamiento entre el HOMO y el LUMO se obtiene con esta conformación endo. Este hecho tan bien documentado se explica mejor a partir de los resultados en PM3. La orientación impuesta por el centro activo del DHFR forzando a los reactivos a adquirir dicha conformación (endo) resulta óptima al polarizar el enlace que se tiene que romper (H_t-C4), y sitúa al sistema en la zona cuadrática del punto de silla.

IV) continuando con el análisis de población, los resultados de la distribución de las cargas atómicas netas revelan diferencias entre ambos métodos que, sin ser definitivas, son importantes. Mientras los cálculos AM1 producen cargas negativas localizadas sobre el N5 y N8 del anillo que simula la DHF, el PM3 nos da valores casi nulos más en concordancia con el mecanismo de reacción propuesto. Considerando que el N5 es el nitrógeno que ha recibido la transferencia del protón, parece más lógico este último resultado.

V) en la estructura del ET, el enlace que se forma, H_t-C6, es más corto que el que se rompe H_t-C4. Los factores que influyen en la geometría de la

transferencia de hidruro han sido ampliamente discutidas por Williams y colaboradores¹⁶.

VI) comparando con los resultados del apartado IV.2. y con resultados previos, resulta evidente que la geometría del ET para etapas de transferencia de hidruro en modelos de diferentes enzimas es prácticamente invariante. Los resultados anteriores se pueden utilizar como guía para construir ETs de partida en este tipo de reacciones.

VII) se puede observar cómo el vector de transición contiene la información de esta reacción: los desplazamientos atómicos que corresponden a la transferencia de hidruro para la reacción catalizada por el DHFR dependen del movimiento relativo del H_t desde el C4 hasta el C6.

VIII) en la matriz de constantes de fuerza los valores propios negativos surgen de los términos cruzados; las constantes de fuerza diagonales son todas positivas.

IX) el análisis de los modos normales de estas estructuras proporcionan una frecuencia imaginaria relativamente pequeña (alrededor de $1100i \text{ cm}^{-1}$). Esto significa que el protón está fuertemente acoplado con el movimiento de los átomos pesados. Recientemente, Seeger y colaboradores¹⁷ han demostrado la utilidad de los métodos semiempíricos para derivar modos vibracionales iniciales de sistemas experimentales.

X) un examen más detallado de las componentes del vector de transición indica que efectos isotópico cinéticos de deuterio pueden estar presentes¹⁸. La rehibridación de la amplitud del C6 (ángulo C4-H_t-C6) tiene un peso más importante que la suma del grado de avance del hidruro (distancia C4-H_t y H_t-C6). Ello implica un fuerte efecto secundario y un efecto isotópico cinético primario de deuterio más pequeño. De esta forma, el ET calculado tiene las características requeridas para dar una adecuada descripción de estos efectos experimentales, de acuerdo con resultados de Huskey y Schowen¹⁹.

A la vista de la discusión de los resultados, ambos métodos reproducen estructuras similares del ET, si bien el método PM3 parece ser más adecuado para simular interacciones débiles por puentes de hidrógeno, y para describir la localización de orbitales moleculares, como ocurre en el caso de la LDH.

IV. 4. PIRROLOQUINOLINA QUINONA (PQQ)

IV. 4. 1. INTRODUCCIÓN

Hasta hace pocos años la opinión generalizada era que había dos tipos de enzimas deshidrogenasas: NADP- y flavin-dependientes. No obstante, aunque existían algunas excepciones¹, éstas apenas reportaban atención. En 1979, Salisbury y colaboradores² aislaron un nuevo coenzima de la bacteria metilotrófica y desvelaron su estructura. Su nombre sistemático sería el 2, 7, 9-tricarboxy-1H-pyrrolo [2,3-f]-quinolina-4,5-diona, más conocida por su nombre semisistemático pirroloquinolina quinona o PQQ, y suponía el establecer un tercer tipo de enzimas deshidrogenasas; las quinoproteínas u oxidoreductasas. Las bacterias que crecen en medios ricos en metanol, metano o metilamina dependen de la oxidación de estos sustratos a formaldehído, el cual es asimilado por la célula o se oxida todavía más a dióxido de carbono para obtener energía. Mientras en un principio se creía que las quinoproteínas se encontraban únicamente en microbios específicos, hoy en día se sabe que pueden encontrarse en tejidos de una gran variedad de organismos, desde bacterias hasta mamíferos^{3,4}. Dado que una gran parte de los enzimas que utilizan el PQQ como cofactor están implicados en degradaciones o biosíntesis de bioreguladores, parece claro el impacto que puede tener en el campo de la farmacología y la nutrición. De hecho, el estudio de algunos parámetros bioquímicos ha sugerido la utilidad del PQQ en el tratamiento y prevención de shocks en medicina clínica⁵.

Resulta de gran interés que, aunque los dos grupos quinona del PQQ parecen ser iguales (ver figura.4.19), únicamente el que se encuentra junto al anillo de la piridina es reactivo respecto a los agentes nucleófilos⁶ y todas las reacciones redox ocurren en dicho centro. Con el objeto de dilucidar el proceso bioquímico del enzima podemos elegir como ejemplo de su actividad catalítica el estudio en detalle de la oxidación del metanol en su centro activo.

IV. 4. 2. MÉTODO Y MODELO

Considerando los resultados previos de apartados anteriores, y la necesidad en primera instancia de trabajar con un modelo molecular suficientemente grande, el método de cálculo elegido ha sido el semiempírico PM3. La optimización y caracterización de las geometrías se ha llevado a cabo tal como hemos explicado en apartados anteriores. El procedimiento a seguir en el presente estudio consistirá en reproducir la SEP completa para cada una de las etapas que contiene el proceso completo. A partir de éstas, se tomarán las estructuras de los puntos estacionarios y se optimizarán por procedimientos analíticos. El motivo por el cual necesitamos dibujar la SEP completa se debe a que no se trata de una reacción como las que hemos estudiado, y por tanto no podemos utilizar las conclusiones de los capítulos anteriores para aproximarnos a las estructuras de los ETs.

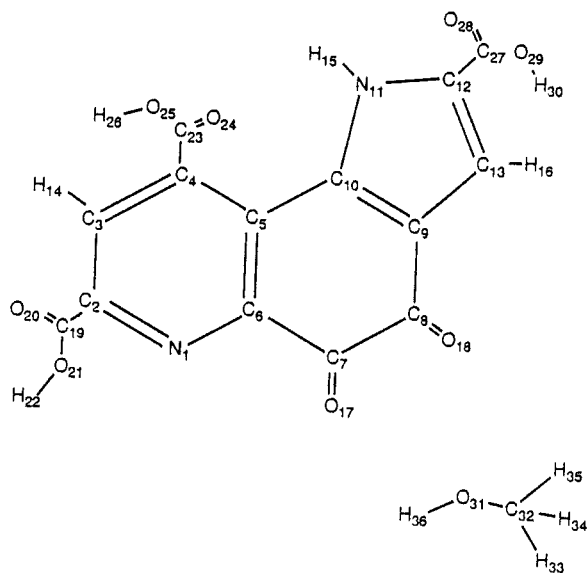


Figura 4.19. Modelo molecular para la reacción de oxidación del MeOH por el PQQ.

De acuerdo con estudios previos de J. Krechl y colaboradores⁷, basados en resultados de difracción de rayos X⁸, crearemos un modelo molecular con una geometría de partida formada por 36 átomos (ver figura 4.19). Para definir la matriz Z se ha utilizado 3 átomos dummies.

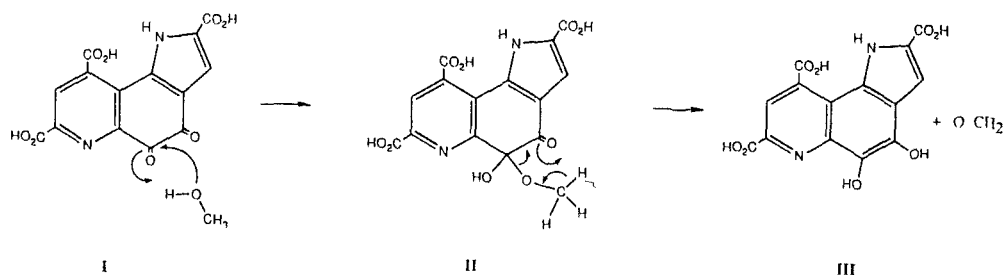


Figura 4.20

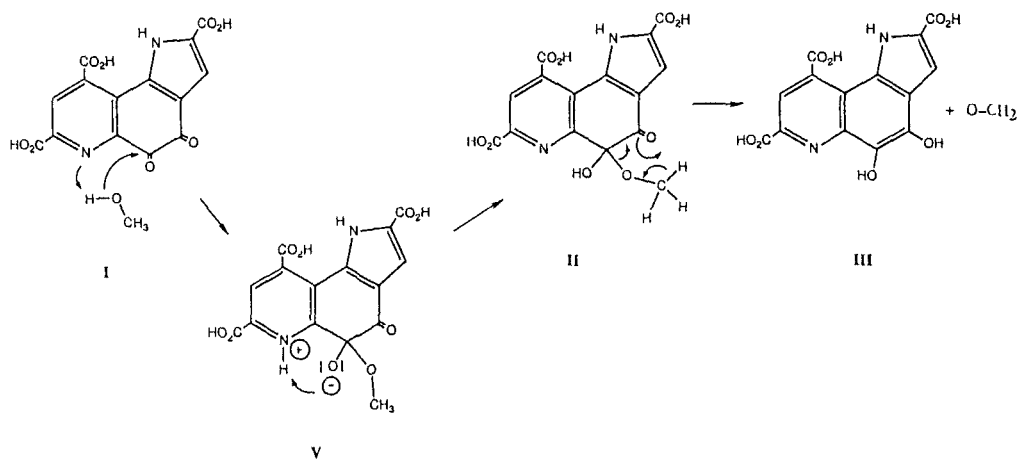


Figura 4.21

La estrategia para abordar el problema consiste en estudiar los dos posibles caminos de reacción a partir de la estructura de origen. El primero consiste en el ataque nucleofílico del oxígeno del metanol al C7 y la protonación del O17 por el H36. Este proceso se representa en la figura 4.20.

como $I \rightarrow II$. El hemiacetal II se descompone entonces según el proceso $II \rightarrow III$, formando el formaldehído y la forma reducida del PQQ: PQQH₂. La segunda ruta alternativa, que se ilustra en la figura 4.21, pasa por una protonación inicial del N1 del anillo de la piridina junto con un ataque nucleofílico del oxígeno del metanol al C7. La segunda etapa será idéntica a la que se presenta en el primer camino de reacción ($II \rightarrow III$).

IV. 4. 3. RESULTADOS

Proceso I \rightarrow II.

El camino de reacción del proceso $I \rightarrow II$ lo hemos definido por medio de dos variables: las distancias H36-O17 y O31-C7. Estas variables se han fijado en varios puntos dentro del rango 1.80-0.90 Å para la primera y 3.10-1.25 Å para la segunda, y el resto de grados de libertad (100 en total) se ha optimizado para cada uno de los puntos que forman la red. Cerca de 500 puntos en la SEP han sido evaluados y caracterizados como mínimos de energía para todas las variables. La hipersuperficie resultante se presenta en la figura 4.22, donde hemos proyectado en dos dimensiones la superficie tridimensional a fin acotar la región del ET.

El análisis de la superficie 4.22 muestra cómo el mecanismo correspondiente a la formación del hemiacetal II a partir del PQQ y metanol se puede interpretar como una reacción concertada. Los reactivos, I, alcanzan el ET, ET1, a través de la protonación del O17 y del ataque nucleofílico sobre el C7 de una forma sincrónica. Una vez alcanzado el ET, siguiendo los desplazamientos del vector de transición alcanzaríamos las estructuras del hemiacetal II.

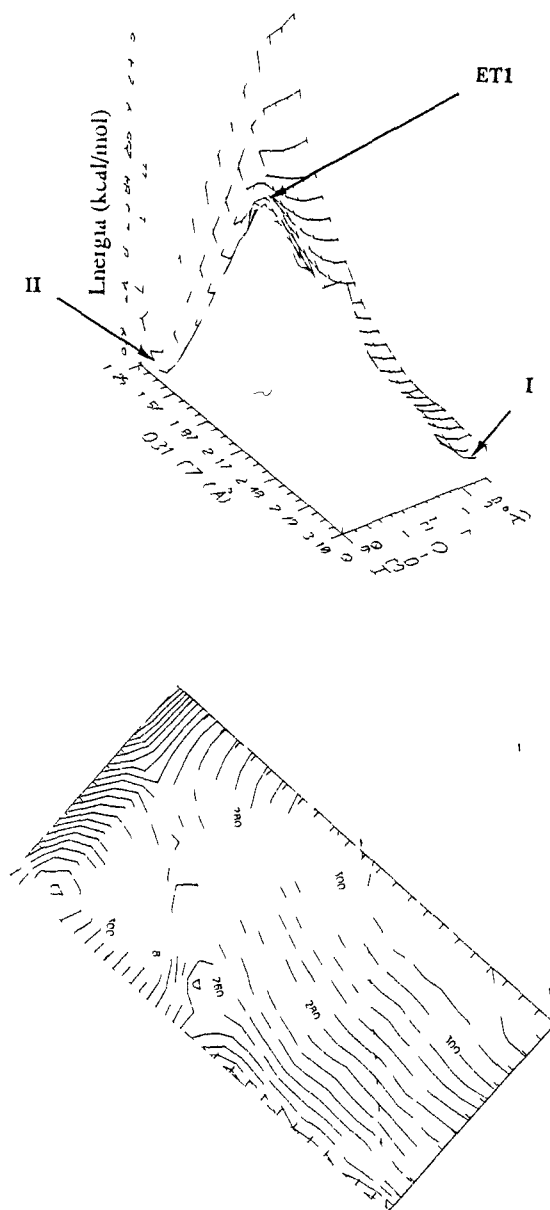


Figura 4.22 SEP para el proceso I \rightarrow II. El proceso está controlado por dos distancias H36-O17 y O31-C7, en Å. La energía se presenta en kcal.

En la tabla 4.22, las distancias interatómicas dan una idea de la transferencia del hidrógeno y del movimiento del oxígeno desde sus átomos de partida y de llegada, y las energías de reactivos (I), ET (ET1) y producto (II). Dado que el movimiento del H36 es concertado, los cambios de las distancias del enlace que se rompe y el que se forma (H36-O31 y H36-O17 respectivamente) son proporcionales en el ET1. El cambio en la posición del O31 hacia el C7 se puede interpretar como que el oxígeno no alcanza su posición final. Por otro lado, el enlace C7-O17 que es doble en la estructura I, se ha alargado pero todavía manteniendo un valor entre un enlace sencillo C-O y uno doble C=O. Similar información se puede extraer de los órdenes de enlace más significativos en cada uno de los puntos estacionarios (tabla 4.22). Los valores del enlace H36-O17 y H36-O31, en el ET1, refuerzan estas conclusiones. El enlace químico entre el oxígeno del metanol y el carbono de la quinona, O31-C7 está en una etapa avanzada, prácticamente formado. Por último, el enlace O17-C7 casi ha perdido su carácter doble.

Comparando los resultados de la energía se deduce que la formación del hemiacetal II a partir del PQQ y el metanol, según nuestro modelo en vacío, es un proceso exotérmico

Tabla 4.22.- Distancias interatómicas (Å), calor de formación (kcal/mol) y órdenes de enlace.

	H36-O17	O31-C7	H36-O31	O17-C7	Calor de Formación
Distancias:					
I	2.0061	3.1554	0.9539	1.2090	-96.94
ET1	1.3800	1.5400	1.2080	1.3292	-53.04
II	0.9582	1.4069	1.8774	1.3957	-105.36
Órdenes de enlace:					
I	0.013	0.007	0.931	1.984	
ET1	0.462	0.745	0.400	1.231	
II	0.895	0.978	0.026	1.013	

Proceso II → III.

El camino de reacción para el proceso II → III lo hemos definido en base a dos variables: las distancias H35-O18 y O31-C7. Nuevamente, estas variables se han fijado en varios puntos dentro de un rango de 0.90-3.15 Å para la primera y 1.35-3.00 Å para la segunda, y el resto de grados de libertad (100 en total) se ha optimizado para cada uno de los puntos que forman la red. En esta ocasión, cerca de 300 puntos en la SEP han sido evaluados y caracterizados como mínimos de energía para el resto de las variables. La hipersuperficie resultante se presenta en la figura 4.23, donde hemos proyectado en dos dimensiones la superficie tridimensional.

El análisis de la figura 4.23 muestra que el mecanismo correspondiente a la descomposición del hemiacetal II en PQQH₂ y formaldehído se puede interpretar como por etapas. La molécula II protona su O18 con el H35 alcanzando de esta forma el ET, ET2. A partir de este punto, el sistema se descompone en las dos moléculas de productos; III.

A partir de la tabla 4.23 se observa cómo mientras al aproximar el H35 al O18, la distancia O31-C7 no cambia apreciablemente de su valor inicial de enlace sencillo (molécula II). Una vez alcanzado el ET2, la separación del átomo O31 provoca la separación del PQQH₂ y la estabilización de todas las distancias en la "supermolécula" III.

El proceso completo se puede ilustrar con la evolución de los órdenes de enlace a lo largo del camino de reacción (tabla 4.23). El enlace H35-O18 evoluciona rápidamente alcanzando en el ET2 un valor muy cercano al final: el H35 no conecta todavía con el C32. El formaldehído, por tanto, posee una sustancial conectividad con el C7 en el ET.

El proceso II → III es exotérmico y el salto energético del proceso global I → II → III resulta ser considerable.

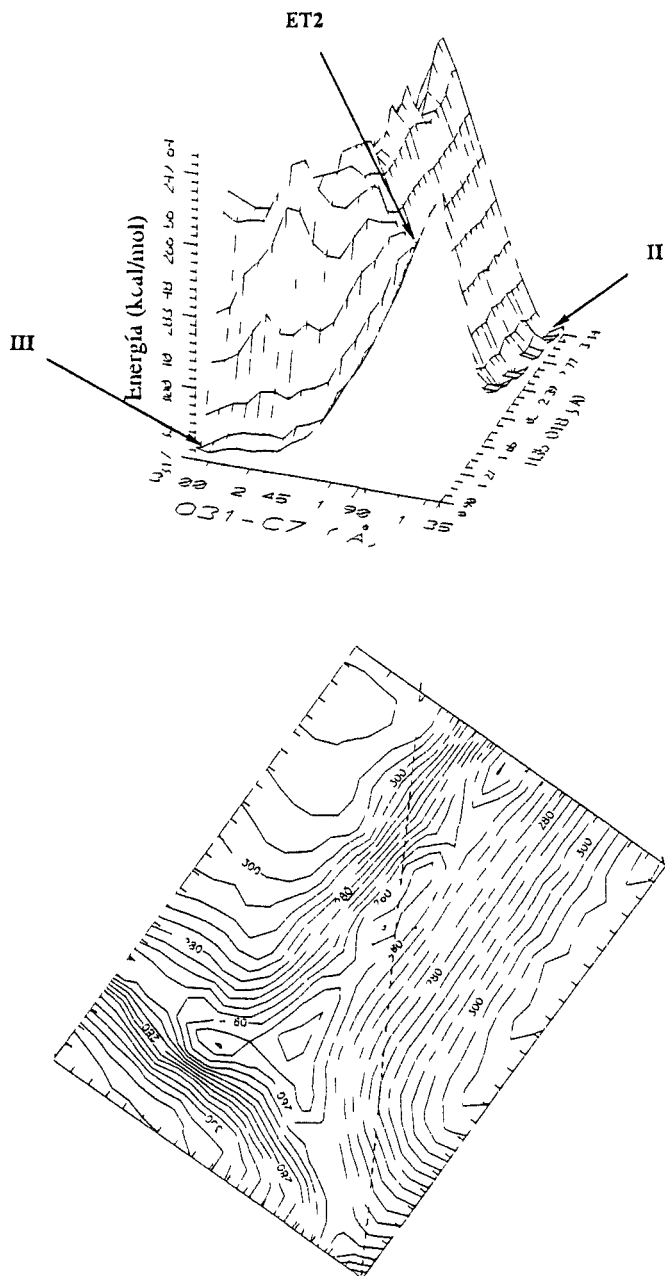


Figura 4.23. SEP para el proceso II \rightarrow III. El proceso está controlado por dos distancias H35-O18 y O31-C7, en Å. La energía se presenta en kcal.

Tabla 4.23.- Distancias interatómicas (Å), calor de formación (kcal/mol) y órdenes de enlace.

	H35-O18	H35-C32	H31-C7	O31-C32	Calor de Formación
<u>Distancias:</u>					
II	3.1411	1.0943	1.4000	1.4058	-105.36
TS2	1.2000	3.8987	1.8000	1.2221	-91.28
III	0.9701	2.7304	3.8727	1.2107	-142.12
<u>Órdenes de enlace:</u>					
II	0.000	0.979	0.978	0.965	
TS2	0.861	0.000	0.255	1.836	
III	0.833	0.000	0.000	1.907	

Proceso I → V

Una vez analizado el proceso descrito en la figura 4.20 trataremos de examinar la hipótesis de la protonación del N1 por el H36 tal como se presenta en la figura 4.21. De esta forma, comparando ambos procesos esperamos poder explicar la exclusividad del C7 en el ataque de agentes nucleófilos⁵. El camino de reacción para el hipotético proceso I → V lo hemos definido en base a dos variables: las distancias H36-N1 y O31-C7. Éstas se han fijado en varios puntos dentro del intervalo 3.00-0.90 Å y 3.10-1.25 Å respectivamente, y el resto de grados de libertad (100 en total) se ha optimizado para cada uno de los puntos que forman la red. Cerca de 250 puntos en la SEP han sido evaluados y caracterizados como mínimos de energía. La hypersuperficie resultante se presenta en la figura 4.22.

El análisis de la SEP que se presenta en la figura 4.24 muestra que el presunto proceso I → V era falso y, en lugar de obtener la supermolécula V, el sistema degenera en una ruptura del anillo heterocíclico y se forma un alfa-oxo metilester: supermolécula IV en la figura 4.25.

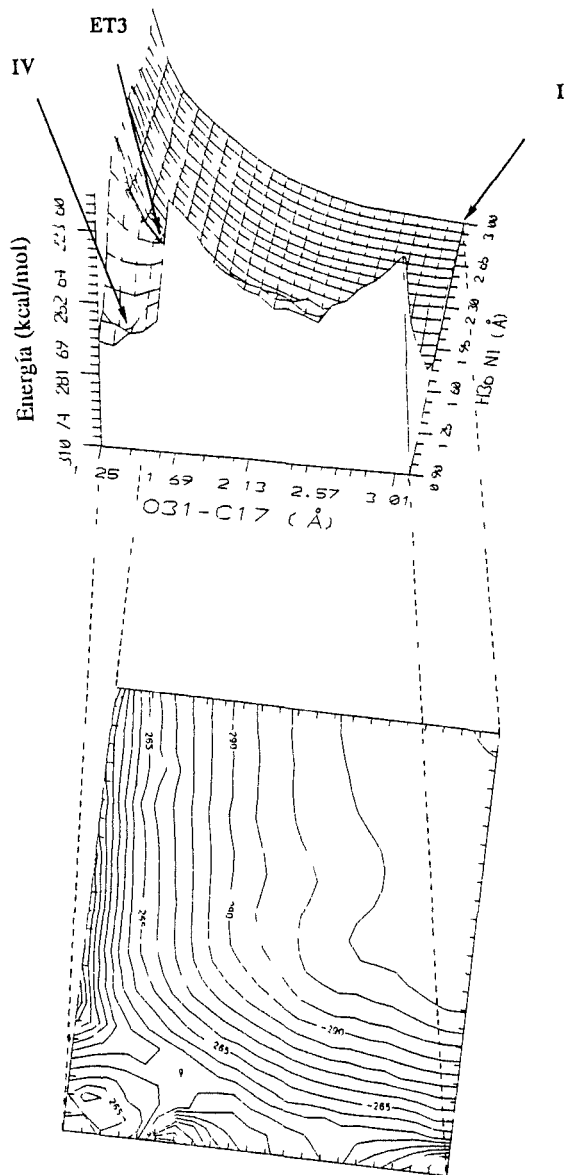


Figura 4.24. SEP para el hipotético proceso I \rightarrow V. El proceso está controlado por dos distancias H36-N1 y O31-C7, en Å. La energía se presenta en kcal.

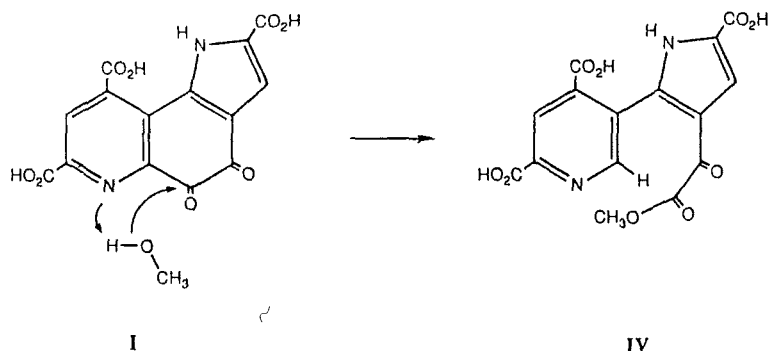


Figura 4.25

En la tabla 4.24 se demuestra como la aproximación del H36 al N1 crea un enlace nitrógeno-hidrógeno en el ET3. No obstante, el desplazamiento desde este punto hacia productos provoca la ruptura del enlace C6-C7 y el H36 se desplaza hacia su posición final en el C6. La barrera energética de esta etapa es ligeramente menor que para el proceso I \rightarrow II.

Tabla 4.24.- Distancias interatómicas (Å), calor de formación (kcal/mol) y órdenes de enlace.

	H36-N1	H36-O31	H36-C6	O31-C7	C6-C7	O7-O17	Calor de For.
Distancias:							
I	3.4221	0.9583		3.9139	1.5125	1.2093	-96.97
TS3	1.2200	1.7497	2.1285	1.7800	1.5158	1.2441	-58.84
IV	2.0672	2.6564	1.1011	1.3585	3.0838	1.2116	-96.17
Órdenes de enlace:							
I	0.000	0.926	0.000	0.011	0.903	1.975	
TS3	0.809	0.097	0.004	0.582	0.856	1.617	
IV	0.006	0.000	0.941	1.049	0.000	1.846	

Estructuras de los ETs

En las figuras 4.22, 4.23 y 4.24, y en las tablas 4.22, 4.23 y 4.24 se presentan las estructuras optimizadas de los ETs para cada uno de los procesos. Para estas estructuras, el único modo vibracional asociado a la frecuencia imaginaria nos indica la dirección de la reacción desde el ET. Desplazamientos desde estos puntos hacia reactivos y productos nos han llevado a cada una de las estructuras de mínima energía, I a V, identificando los reactivos y productos conectados por el ET⁹⁻¹².

Varias características del ET1 revelan que la primera reacción está controlada por el movimiento del H36 y O31, y que la estructura está sólo ligeramente influenciada por el resto de las variables. La estructura del ET2 y las tablas 4.24 y 4.25 muestran la etapa II \rightarrow III como un proceso asincrónico, en el que el enlace H38-O18 está prácticamente formado en el ET2. Este valor, junto con el resto de distancias de enlace (O31-C7, H35-C2 y O31-C32), muestra el ET2 en un estado avanzado de la etapa. El proceso I \rightarrow IV parece ser una reacción sincrónica controlada por el movimiento de los átomos H36 y O31.

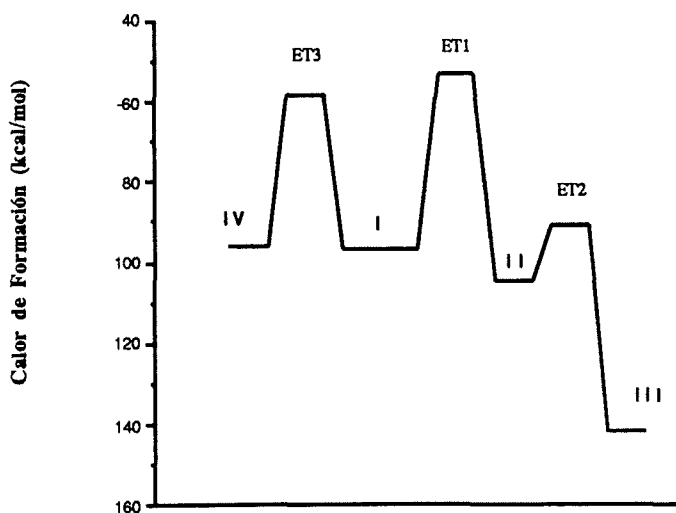


Figura 4.26. Representación esquemática del perfil energético para los procesos : I \rightarrow II \rightarrow III y I \rightarrow IV definidos en los esquemas IV.4.1 y IV.4.2.

En la figura 4.26 presentamos esquemáticamente el perfil energético para ambas rutas alternativas: $I \rightarrow II \rightarrow III$ y $I \rightarrow IV$. Aunque el segundo camino de reacción es energéticamente más favorable que el descrito en la figura 4.20, (las energías de activación correspondientes al ET3 y ET1 son 38.13 y 43.9 kcal/mol respectivamente) su segunda etapa es un proceso con una barrera energética muy inferior, 14.08 kcal/mol, y de una considerable energía de reacción exotérmica; 45.18 kcal/mol. Por otro lado, no debemos olvidar por un lado que no es posible alcanzar el mecanismo catalítico completo del PQQ a través de la estructura IV, y por otro lado que las estructuras de los mínimos se han obtenido en vacío y dejando optimizar las estructuras libremente sin restricciones estéricas. Estas libertades sabemos que son irreales en el centro activo del enzima y en consecuencia sus resultados son únicamente orientativos.

IV. 4. 4. CONCLUSIONES

En el presente apartado hemos realizado el estudio del mecanismo catalítico del PQQ por medio de un examen detallado de la oxidación del metanol a formaldehído. La caracterización de la SEP completa y la localización de los puntos estacionarios se ha llevado a cabo por medio del método semiempírico PM3. El proceso global se puede considerar como un mecanismo por etapas. La primera está controlada por la protonación del oxígeno de la quinona y el ataque nucleofílico de su átomo de carbono simultáneamente para formar el hemicetal. La segunda etapa consiste en la descomposición del hemicetal en una reacción asincrónica a través de una barrera energética relativamente baja.

El estudio de un segundo mecanismo en el que el nitrógeno del anillo piridínico se protone podría ofrecer un camino alternativo. Sin embargo, éste no resulta viable debido a que, una vez alcanzado el ET, el anillo de la quinona se rompe de forma espontánea. Este resultado nos impide explicar la exclusividad del C7 frente a ataques nucleofílicos, tal como demuestran los

resultados experimentales. En este sentido podríamos tratar de proponer un mecanismo en el que el metanol atacara el C8 y comparar los resultados con los obtenidos en el primer mecanismo. Dadas las características estructurales de nuestro modelo es fácil suponer que el resultado sería idéntico al obtenido en el ataque al C7, ya que intervendrían los mismos grupos funcionales: los dos grupos carbonilo del anillo y el metanol.

IV. 5. EFECTOS ISOTÓPICO CINÉTICOS EN LA ETAPA DE TRANSFERENCIA DE HIDRURO DEL LDH.

IV. 5. 1. INTRODUCCIÓN

Como venimos indicando en cada uno de los capítulos de la presente memoria, el conocimiento a nivel molecular del proceso catalítico de los enzimas requiere un detallado conocimiento de la estructura del ET. Este conocimiento es suministrado por unos pocos resultados experimentales de técnicas muy sofisticadas (ver capítulo I) y, sin duda, por estudios teóricos. Con el objeto de obtener el máximo beneficio de los cálculos teóricos, resulta deseable utilizar métodos computacionales que nos permitan determinar propiedades químicas o físicas observables tales como las frecuencias vibracionales.

Los efectos isotópico cinéticos, EIC, son magnitudes que dependen de estas propiedades y a la vez son susceptibles de ser medidas experimentalmente. En la actualidad, se ha establecido firmemente como una potente herramienta en la discusión de los mecanismos moleculares de los enzimas¹⁻³. El creciente interés en estos valores resulta de la posibilidad de comparar la teoría y la experiencia, y en este sentido utilizar los resultados para el conocimiento de la naturaleza de los sistemas enzimáticos⁴⁻⁶.

En este campo de la química física⁷⁻¹³ se han utilizado cálculos químico cuánticos y, en particular, EIC de deuterio para el estudio de transferencias intramoleculares¹⁴⁻¹⁷ e intermoleculares^{18,19} de hidruro. A partir de resultados de métodos semiempíricos^{20,21} se ha conseguido el estudio de grandes sistemas moleculares de interés químico en los que los métodos *ab initio* no son aplicables o, en el caso más favorable, serían muy costosos. En concreto, Jones y Urbauer¹³ han llevado a cabo caracterizaciones teóricas de EIC para la

transferencia de hidruro del formato al dióxido de carbono, con buenos resultados.

En este capítulo pretendemos investigar el efecto de diferentes métodos semiempíricos en el cálculo de las frecuencias vibracionales del ET así como los EIC en la etapa de transferencia de hidruro del piruvato al lactato que tiene lugar en el centro activo del LDH.

Tal como vimos en el capítulo IV.2., y en trabajos recientemente publicados por Wilkie y Williams²² o Almarsson y Bruice²³, el proceso de la reacción global en el LDH viene controlado por la etapa de transferencia de hidruro desde el NADH hacia el carbono carbonílico del piruvato protonado. Como parte de un programa de investigación en caracterización teórica de ETs para etapas de transferencia de hidruro en diferentes enzimas^{24,25}, este estudio va a suponer el aislar y comparar las estructuras del ET de la etapa que controla la reacción catalítica de LDH obtenidas con diferentes métodos semiempíricos. A partir de estos resultados realizaremos los cálculos teóricos que permitan predecir los EIC en esta reacción.

El papel de un gran número de residuos en los centros activos de los enzimas se ha derivado de coordenadas experimentales obtenidas por medio de difracción de rayos X, que ofrecen una representación realista de la orientación del cofactor, sustrato y residuos aminoácidos en esta peculiar cavidad. Existen prometedores estudios experimentales de EIC en el enlace del NAD⁺ al LDH realizados por Anderson y colaboradores²⁶, así como resultados de espectroscopía Raman presentados por Callender y colaboradores²⁷. No obstante, si bien disponemos de completos resultados isotópico cinéticos experimentales de reacciones en enzimas de la familia de las hidrogenasas, la reacción estudiada en este capítulo no ha sido todavía objeto de trabajos similares.

IV. 5. 2. MODELO MOLECULAR Y MÉTODO DE CÁLCULO.

El modelo molecular empleado para reproducir el centro activo del LDH ha sido el mismo que el utilizado en el capítulo IV.2.: figura 4.10. Los cálculos

MNDO, AM1 y PM3 se han llevado a cabo con los métodos y criterios de convergencia explicados en la sección III.7. La SEP ha sido explorada únicamente en la región cuadrática del ET y a partir de las estructuras ya optimizadas del capítulo IV.2.

El camino de reacción desde el ET hacia reactivos en la SEP se ha identificado por medio del procedimiento IRC propuesto por Fukui, con el objeto de buscar la estructura de reactivos necesaria para calcular los EIC. Para cada especie isotópica, el IRC se ha iniciado en el ET siguiendo el único modo normal con frecuencia imaginaria. Asumiendo la aproximación armónica, el tamaño del primer paso Δs produce el descenso energético necesario $f(\Delta s)^2/2$, donde f es la constante de fuerza asociada a la frecuencia negativa. Entonces, el IRC se traza tomando sucesivos pasos muy pequeños en la dirección del gradiente negativo. Tres de estos pasos se han generado en la dirección de los reactivos (ver tabla 4.27). Recordemos que los reactivos obtenidos en vacío no son necesariamente aquellos que participan en el centro activo del enzima dado que en éste no están permitidos los desplazamientos libres.

El desarrollo de la teoría de los EIC está construido sobre la base de la teoría del estado de transición²⁸. Para el cálculo de estos efectos se requiere únicamente el conocimiento de la SEP en la región entre el ET y los reactivos. Así, los EIC se obtienen de las funciones de partición de reactivos y ETs de especies isotópicas concretas. Para encontrarlos, los parámetros geométricos y las frecuencias de las geometrías de equilibrio de reactivos y ET han sido calculadas utilizando funciones de partición moleculares evaluadas como un gas ideal, rotor rígido y aproximaciones armónicas. Los EIC teóricos los hemos calculado con la ecuación de Bigeleisen^{29,30} modificada por Klinman³¹ (ecuación 3.28).

IV. 5. 3. RESULTADOS

La figura 4.27 representa esquemáticamente la SEP de nuestro de nuestro sistema, incluyendo los puntos estacionarios: ET, reactivos (R) y productos (P).

Las coordenadas que controlan la región cuadrática del ET en la SEP son las que definen el movimiento del hidruro: C2-C37, H_t-C2 y H_t-C37.

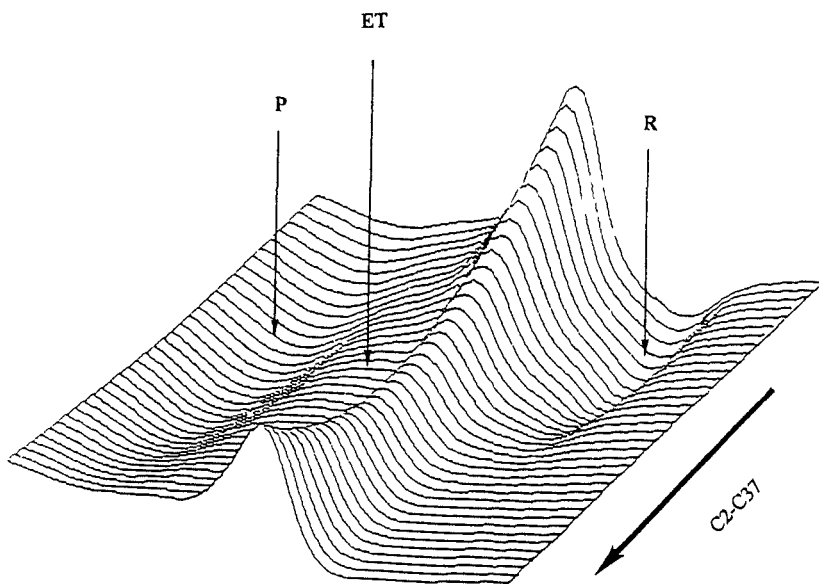


Figura 4.27. Representación esquemática de la SEP correspondiente a la transferencia de hidruro en el LDH.

Desde el ET hacia R o P, uno debe descender por la combinación antisimétrica de las distancias interatómicas: C2-C37 y C37-H36. Si nos desplazamos por la coordenada simétrica, la distancia C2-C37, describiremos la trayectoria a lo largo de la cresta que separa los valles de reactivos y productos. El camino que une ambos mínimos vía el ET se puede observar sobre la figura 4.27.

Estructuras de los Estados de Transición

En la tabla 4.25 presentamos el valor de las energías absolutas, el gradiente de longitudes promedio, los parámetros geométricos más relevantes y

las cargas atómicas netas correspondientes a las estructuras del ET obtenidas con los diferentes modelos.

Tabla 4.25. Energía (Hartrees), gradiente de longitudes promedio (mdyn), parámetros geométricos más relevantes y cargas atómicas netas (u.a.) para las estructuras del ET obtenidas con los diferentes métodos: MNDO, AM1 y PM3.

	MNDO	AM1	PM3
Energía total:	0.163238	0.108187	0.064320
Grad. de longitudes prom.:	1.1×10^{-4}	1.5×10^{-4}	1.7×10^{-4}
Distancias (Å):			
C2-C37	2.7028	2.7034	2.7207
C2-H36	1.3919	1.3903	1.4173
H36-C37	1.3232	1.3479	1.3082
H23-O9	0.9820	0.9820	0.9927
C2-N24	4.4798	4.3578	5.4784
H16-O5	3.3916	2.1231	1.7188
H18-O4	3.2624	2.0159	1.7104
Ángulos de enlace (grados):			
C2-H36-C37	169.11	161.71	173.15
O9-H23-N24	142.45	153.16	157.03
Ángulos dihedros (grados):			
H36-C2-O9-H23	84.09	85.91	88.80
Cargas atómicas netas:			
C2	0.26	0.10	0.21
O9	-0.33	-0.30	-0.27
H23	0.31	0.33	0.15
N24	-0.33	-0.25	-0.18
H36	-0.10	0.02	0.02
C37	0.21	0.01	0.05

La separación de los átomos entre los que se transfiere el hidruro está alrededor de 2.7 Å para todos los cálculos, siendo un poco mayor para el PM3. Las distancias que podían indicar la posibilidad de interacciones por puente de hidrógeno, que como vimos en la sección IV.2. el método PM3 daba valores dentro del rango característico y los resultados AM1 resultaban ser mucho mayores, no aparecen tampoco bien resueltas por el método MNDO. Estamos hablando lógicamente de la fijación del sustrato a la guanidina.

El papel asignado al residuo polar de la histidina es la relajación de la estructura, característico en catálisis ácida, como una pre-protonación que ocurre antes de la etapa de transferencia de hidruro. Este hecho indica que, en ausencia de catálisis, la reacción no tendría lugar. Estas conclusiones están de acuerdo con las obtenidas por Wilkie y Williams²². Esta protonación se requiere para colocar el sustrato en la orientación adecuada. Recientes simulaciones de dinámica molecular realizadas por Almarsson y Bruice²³ ofrecen resultados similares.

La transferencia del protón y la del hidruro ocurren en planos casi perpendiculares. La estructura del ET obtenida en MNDO es muy similar a las ya discutidas estructuras PM3 y AM1, donde la configuración endo vuelve a aparecer como una característica de este tipo de transferencias.

Vector de transición y efectos isotópico cinéticos.

En la tabla 4.26 se presentan las frecuencias imaginarias, las constantes de fuerza y los correspondientes vectores propios asociados a las estructuras del ET obtenidas con los tres métodos. Los desplazamientos atómicos en el vector de transición corresponden a la transferencia del H_t para la reacción de catálisis del LDH. Las amplitudes del vector de transición indican que los EIC de deuterio primarios y secundarios deben estar presentes. Como ejemplo, la rehibridación de la amplitud de los orbitales del C2 tiene un peso mayor que la suma para el avance del hidruro. Esto implica un importante EIC secundario y un más pequeño EIC primario de deuterio, ambos fuertemente acoplados. Estas

cantidades resultan de acuerdo con los resultados que presentamos en la tabla 4.27 para los tres métodos de cálculo.

La transferencia del hidruro depende de la posición correcta de los centros dador y receptor. Callender y colaboradores³² han sugerido que los cambios conformacionales de la proteína, producidos por la fijación del sustrato, conducen a los reactivos hacia la estructura del ET, estando el sustrato fuertemente enlazado al enzima por al menos dos interacciones con residuos específicos³³. Este hecho es una demostración potencial de cómo las energías de enlace pueden influir en la reacción de transferencia de hidruro. Las simulaciones de dinámica molecular de Almarsson y Bruice muestran que cuando la distancia entre el anillo de la NADH y el carbono carbonílico del sustrato están a 2.7 Å (aproximadamente la suma de los radios de van der Waals para los dos núcleos, C37 y C2), las fuerzas atractivas entre el complejo cofactor-sustrato están optimizadas. El sustrato está de esta manera preparado para adquirir la estructura del ET para esta transferencia.

Por otro lado, Fersht y colaboradores³⁴ han propuesto que ocurren cambios estructurales que resultan importantes en los casos en los que al enzima se le permite colocar grupos funcionales cargados en una geometría óptima para que el sustrato se aproxime a la configuración del ET. De forma similar, Srinivasan y Fisher³⁵ han propuesto, basándose en experimentos de EIC, que el aumento en la reactividad para la transferencia de hidruro en el glutamato deshidrogenasa respecto a la reacción no enzimática es debido a la energía de enlace de la primera.

Estos resultados teóricos se pueden explicar debido a la posición forzada del lactato hacia el NAD⁺, causando que la barrera energética de esta transferencia sea más baja de lo que sería en ausencia del enzima. Estas condiciones permiten un sustancial grado de efecto túnel para el hidrógeno. El movimiento del segundo átomo de hidrógeno del C37, el H55, tiene una componente importante en el vector de transición (ver tabla 4.26), y esta componente llega a ser menos significativa con el sustrato deuterado. Efectos cualitativamente similares de la masa del átomo transferido en EIC secundarios de deuterio han sido observados para un modelo de transferencia de hidruro por

Powell y Bruice³⁶ y para otras transferencias de este tipo en otros enzimas^{35,37-40}.

Tabla 4.26. Frecuencias imaginarias (cm^{-1}), constantes de fuerza (K, en u.a.) y el correspondiente vector propio asociado con el único valor propio negativo del ET obtenido con los diferentes métodos: MNDO, AM1 y PM3.

	MNDO		AM1		PM3	
Frecuencia imaginaria:	1086.80i		1057.35i		1134.43i	
Variable:	<u>e</u>	<u>K</u>	<u>e</u>	<u>K</u>	<u>e</u>	<u>K</u>
r C2-C1	0.047	0.392	0.076	0.371	0.085	0.409
r H23-O9	0.066	0.323	0.038	0.533	0.098	0.522
r H36-C2	-0.118	0.318	-0.077	0.303	-0.263	0.318
r H55-C37	0.057	0.322	0.055	0.322	0.080	0.325
∠ C2-C1-D1	0.160	3.247	0.083	2.167	0.109	5.274
∠ H36-C2-C1	-0.824	1.765	-0.527	1.261	-0.701	3.085
∠ C37-D5-D1	0.109	0.107	0.067	0.090	0.079	0.147
∠ H55-C37-C38	-0.379	0.286	-0.295	0.296	-0.321	0.287
∠ C2-C1-D1-D2	-0.052	3.548	-0.125	2.413	-0.086	3.343
∠ H23-O9-C2-C1	0.017	0.118	0.129	0.155	0.088	0.173
∠ H36-C2-C1-O4	0.267	1.986	0.645	1.444	0.470	3.309
∠ C37-D5-D1-D2	-0.047	0.426	-0.115	0.242	-0.074	0.558
∠ H55-C37-C38-C39	0.071	0.215	0.324	0.213	0.178	0.220

Tabla 4.27. EIC primarios (k_H/k_{D1}), secundarios (k_H/k_{D2}) y primarios y secundarios (k_H/k_{D1D2}) calculados con los diferentes métodos: MNDO, AM1 y PM3.

	C2-C37 (Å)	k_H/k_{D1}	k_H/k_{D2}	k_H/k_{D1D2}
<u>MNDO</u>				
pas01	2.7062	1.00	1.00	1.02
pas02	2.7095	1.08	0.99	1.06
pas03	2.7138	1.24	0.98	1.22
R	4.1147	3.42	0.96	3.23
<u>AM1</u>				
pas01	2.7076	1.09	0.99	1.08
pas02	2.7152	1.30	0.96	1.28
pas03	2.7258	1.64	1.01	1.58
R	5.0336	3.01	0.95	2.90
<u>PM3</u>				
pas01	2.7211	1.01	1.00	1.01
pas02	2.7245	1.33	1.08	1.32
pas03	2.7288	2.06	0.98	2.05
R	3.7894	3.82	0.92	3.57

IV. 5. 4. CONCLUSIONES

Cálculos semiempíricos MNDO, AM1 y PM3 se han llevado a cabo con el objeto de determinar la estructura del ET y los EIC primarios y secundarios de deuterio en el LDH. Los resultados se podrían concretar en los siguientes cuatro puntos:

I) Los métodos semiempíricos MNDO, AM1 y PM3 ofrecen resultados muy similares de geometrías y vector de transición para el ET, así como para los cálculos de EIC. No obstante, el método PM3 sigue reproduciendo mejor las geometrías de estructuras con interacciones intermoleculares de puentes de hidrógeno.

II) El punto de silla calculado posee las características necesarias para dar una adecuada descripción de los EIC.

III) La orientación relativa impuesta a los reactivos por el centro activo del LDH (configuración endo muy próxima al ET) resulta idónea para la polarización del enlace C-H y para situar el sistema en la zona cuadrática del punto de silla.

IV) Por comparación entre diferentes ETs de transferencias de hidruro, la estructura y componentes del vector de transición de este punto de silla de primer orden parece ser una característica general de las deshidrogenasas.

IV. 6. REFERENCIAS

IV. 1.

- IV. 1. [1] a) F. Kögl *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* , 68, **A16**, 1935. b) F. Kögl; v.B. Tönnis; Hoppe-Seylers *Z. Physiol. Chem.* 242, **43**, 1936.
- IV. 1. [2] F. Lynen; J. Knappe; E. Lorch; G. Jutting y E. Ringelmann *Angew. Chem.* , 481, **71**, 1959.
- IV. 1. [3] H. Dugas *Bioorganic Chemistry. A Chemical Approach to Enzyme Action. 2nd Ed.*; Springer-Verlag: New York, 1989.
- IV. 1. [4] J. Metey y F. Lynen *Biochem. Z.*, 2569, **342**, 1965.
- IV. 1. [5] J. Moss y M. D. Lane *Adv. Enzymol.* 321, **35**, 1971.
- IV. 1. [6] A. S. Mildvan *Acc. Chem. Res.* , 246, **10**, 1977.
- IV. 1. [7] Y. Kaziro; L. F. Hass; P. D. Boyer y S. Ochoa *J. Biol. Chem.* 1460, **237**, 1962.
- IV. 1. [8] R. Kluger y P. D. Adawadkar *J. Am. Chem. Soc.* , 3741, **98**, 1976.
- IV. 1. [9] W. C. Stallings *Arch. Biochem. Biophys.* , 179, **183**, 1977.
- IV. 1. [10] O. Tapia y J. Andrés *Chem. Phys. Letters* , 471-477, **109**, 1984.
- IV. 1. [11] M. J. D. Powell *Program VA05AD, Harwell Subroutine Library, Atomic Energy Research Establishment, Harwell, U.K.* ,
- IV. 1. [12] J. W. McIver *Acc. Chem. Res.* , 72-77, **7**, 1974.
- IV. 1. [13] H. B. Schlegel Thesis, Queen's University, Kingston, Canada, 1975.
- IV. 1. [14] I. H. Williams *Chem. Phys. Lett.* , 462, **88**, 1982.
- IV. 1. [15] G. Fogarasi y P. Pulay *Annu. Rev. Phys. Chem.* , 19, **35**, 1984.
- IV. 1. [16] J. E. Simandiras; J. E. Rice; T. J. Lee; R. D. Amos y N. C. Handy *J. Chem. Phys.* , 3187, **88**, 1988.
- IV. 1. [17] A. R. Miller *J. Chem. Soc.* , 1984, **100**, 1978.
- IV. 1. [18] G. S. Hammond *J. Am. Chem. Soc.* , 334, **77**, 1955.
- IV. 1. [19] S. J. F. Formosinho *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* , 61, 1987.

- IV. 1. [20] A. J. C. Varandas y S. J. F. Formosinho *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* , 282, 1986.
- IV. 1. [21] G. Lendvay *J. Phys. Chem.* , 4422, **93**, 1989.
- IV. 1. [22] I. Mayer *Chem. Phys. Lett.* , 270, **97**, 1983.
- IV. 1. [23] J. Andrés; R. Cárdenas; E. Silla y O. Tapia *J. Am. Chem. Soc.* , 666, **110**, 1988.
- IV. 1. [24] J. Andrés; J. Krechl y E. Silla *Chem. Phys. Lett.* , 54, **169**, 1990.
- IV. 1. [25] P. Otto y J. Ladik *Int. J. Quantum. Chem.* , 1143, **18**, 1980.
- IV. 1. [26] C. Moller y M. S. Plesset *Physical Review* , 618, **46**, 1934.
- IV. 1. [27] a) O. Tapia; J. Andrés y R. Cardenas *Chem. Phys. Lett.* , 471, **109**, 1984. b) O. Tapia; J. Andrés y R. Cardenas *Chem. Phys. Lett.* , 395, **189**, 1992.
- IV. 1. [28] R. Seeger y J. A. Pople *J. Chem. Phys.* , 66, **7**, 1977.
- IV. 1. [29] C. A. Reynolds y C. Thomson *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* , 961, **83**, 1987.
- IV. 1. [30] K. N. Houk; Y. Li y J. D. Evanseck *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* , 682, **31**, 1992.
- IV. 1. [31] H. B. Schlegel *J. Chem. Phys.* , 3676, **77**, 1982.
- IV. 1. [32] H. B. Schlegel *J. Comp. Chem.* , 214, **3**, 1982.
- IV. 1. [33] K. Fukui *J. Phys. Chem.* , 4161, **74**, 1970.
- IV. 1. [34] K. Ishida; A. Morokuma y J. Komornicki *J. Chem. Phys.* , 2153, **66**, 1977.
- IV. 1. [35] D. G. Truhlar; A. D. Isaacson y B. C. Garrett *Theory of Chemical Reaction Dynamics*; CRC Press: Boca Raton FL, 1985; Vol. IV.
- IV. 1. [36] C. Gonzalez y H. B. Schlegel *J. Phys. Chem.* , 2154, **90**, 1989.
- IV. 1. [37] M. Levy y J. P. Perdew *J. Chem. Phys.* , 4519, **84**, 1986.
- IV. 1. [38] H. Yamataka; S. Nagase; T. Ando y T. Hanafusa *J. Am. Chem. Soc.* , 601, **108**, 1986.
- IV. 1. [39] K. M. Merz Jr.; R. Hoffman y M. J. S. Dewar *J. Am. Chem. Soc.* , 5636, **111**, 1989.
- IV. 1. [40] K. M. Merz Jr. *J. Am. Chem. Soc.* , 7973, **112**, 1990.

- IV. 1. [41] O. Jacob; R. Cardenas y O. Tapia *J. Am. Chem. Soc.* , 8692-8705, **112**, 1990.
- IV. 1. [42] O. Tapia; O. Jacob y F. Colonna *Theor.Chim.Acta* , 217, **82**, 1992.
- IV. 1. [43] a) O. Tapia; J. Andrés y V. S. Safont *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, pendiente de publicación, 1993. b) J. Andrés; V. S. Safont y O. Tapia, *J. Am. Chem. Soc.*, pendiente de publicación, 1993.

IV. 2.

- IV. 2. [1] R. D. LaReau y V. E. Anderson *J. Biol. Chem.* , 15338-15343, **264**, 1989.
- IV. 2. [2] V. E. Anderson y R. D. LaReau *J. Am. Chem. Soc.* , 3695-3697, **110**, 1988.
- IV. 2. [3] M. J. Adams; A. Liljas y M. G. Rossmann *J. Mol. Biol.* , 519, **76**, 1973.
- IV. 2. [4] W. Eventoff; M. L. Hackert y M. G. Rossmann *J. Mol. Biol.* , 249, **98**, 1975.
- IV. 2. [5] J. L. White; M. L. Hackert; M. Buehner; M. J. Adams; G. C. Ford; P. J. J. Lentz; I. E. Smiley; S. J. Steindel y M. G. Rossmann *J. Mol. Biol.* , 759, **102**, 1976.
- IV. 2. [6] R. D. Cahn; N. O. Kaplan; L. Levine y E. Zwilling *Science* , 962, **136**, 1962.
- IV. 2. [7] W. S. Allison; J. Admiraal y N. O. Kaplan *J. Biol. Chem.* , 4743, **244**, 1969.
- IV. 2. [8] H. A. Heck *J. Biol. Chem.* , 4375, **244**, 1969.
- IV. 2. [9] a) J. J. Holbrook *Biochem.* , 847, **133**, 1973. b) J. J. Holbrook y V. A. Ingraham *Biochem.* , 729, **131**, 1973.
- IV. 2. [10] M. J. Adams; M. Buehner; K. Chandrasekhar; G.C. Ford; M.L. Hackert; A. Liljas; M.G. Rossmann; I. E. Smiley; W. S. Allison; J.

Everse; N. O. Kaplan y S. S. Taylor *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1968, **70**, 1973.

- IV. 2. [11] J. Krechl; S. Bohm; S. Smrckova y J. Kuthan *Collect. Czech. Chem. Commun.* , 673, **54**, 1989.
- IV. 2. [12] J. Krechl y J. Kuthan *Int. J. Quantum. Chem.* , 1029, **21**, 1982.
- IV. 2. [13] J. Krechl y J. Kuthan *Int. J. Quantum. Chem.* , 479, **24**, 1983.
- IV. 2. [14] B. Kratochvil; J. Ondracek; J. Krechl y J. Hasek *Acta Crystallogr.* , 2182, **C43**, 1987.
- IV. 2. [15] B. Kratochvil; J. Novotny; S. Smrckova y J. Krechl *Collect. Czech. Chem. Commun.* , 479, **55**, 1990.
- IV. 2. [16] J. Andrés; J. Krechl; M. Carda y E. Silla *Int. J. Quantum. Chem.* , 127, **40**, 1991.
- IV. 2. [17] J. Andrés; J. Krechl y E. Silla *Chem. Phys. Lett.* , 54, **169**, 1990.
- IV. 2. [18] R. Fletcher y M. J. D. Powell *Comput. J.* , 163, **6**, 1963.
- IV. 2. [19] R. Fletcher *Comput. J.* , 317, **13**, 1970.
- IV. 2. [20] S. Schroder; V. Daggett y P. A. Kollman *J. Am. Chem. Soc.* , 8922, **113**, 1992.
- IV. 2. [21] S. Schroder; N. Buckley; N. J. Oppenheimer y P. A. Kollmann *J. Am. Chem. Soc.* , 8232, **114**, 1992.
- IV. 2. [22] J. Wilkie y I. H. Williams *J. Am. Chem. Soc.* , 5423, **114**, 1992.
- IV. 2. [23] J. A. McCammon y S. Harvey *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*; Cambridge University Press: Cambridge, 1989.
- IV. 2. [24] W. C. Herndon y T. P. Radhakrishnan *Chem. Phys. Lett.* , 492, **148**, 1988.
- IV. 2. [25] H. S. Rzepa y M. Yi *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* , 531, 1991.
- IV. 2. [26] J. J. P. Stewart en *Reviews in Computational Chemistry*; K. B. Lipkowitz and D. B. Boyd, Ed.; VCH publishers: New York, 1990; Vol. 1; pp 45-82.
- IV. 2. [27] K. E. Norris y J. E. Gready *J. Mol. Struct. THEOCHEM* , 99, **279**, 1993.
- IV. 2. [28] J. W. Verhoeven; W. van Gerresheim; F. M. Martens y S. M. van der Kerk, *Tetrahedron*, 975, **42**, 1986.

- IV. 2. [29] H. B. Burgi; J. D. Dunitz; J. M. Lehn y G. Wipff *Tetrahedron*, 1563, **30**, 1974.
- IV. 2. [30] I. H. Williams; A. B. Miller y G. M. Maggiora *J. Am. Chem. Soc.*, 530, **112**, 1990.
- IV. 2. [31] Y. D. Wu y K. N. Houk *J. Am. Chem. Soc.* , 2226, **109**, 1991
- IV. 2. [32] I. H. Williams *J. Am. Chem. Soc.* , 6299, **109**, 1987.
- IV. 2. [33] L. Pauling *Nature* , 707, **161**, 1948.
- IV. 2. [34] O. Tapia; R. Cardenas; J. Andres y F. Colonna-Cesari *J. Am. Chem. Soc.* , 4046, **110**, 1988.
- IV. 2. [35] O. Tapia; J. Andrés y R. Cardenas *Chem.Phys.Lett.* , 395, **189**, 1992.
- IV. 2. [36] Y. D. Wu y K. N. Houk *J. Am. Chem. Soc.* , 2353, **113**, 1991.
- IV. 2. [37] Y. D. Wu y K. N. Houk *J. Am. Chem. Soc.* , 530, **112**, 1991.
- IV. 2. [38] R. Sustmann; W. Sicking y G. E. Schulz *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* , 1023, **28**, 1989.
- IV. 2. [39] O. N. Ventura; E. L. Coitiño; A. Lledós y J. Bertrán *J. Comput. Chem.* , 1037, **13**, 1992.
- IV. 2. [40] D. E. Hansen y R. T. Raines *J. Chem. Ed.* , 483, **67**, 1990.

IV. 3.

- IV. 3. [1] R. L. Blakley *Folates and Pterins*; Wiley: New York, 1985; Vol. 2, pp 191.
- IV. 3. [2] C. A. Fierke; K. A. Johnson y S. J. Benkovic *Biochemistry* , 4085-4092, **26**, 1987.
- IV. 3. [3] J. Kraut y D. A. Matthews *Biological Macromolecules and Assemblies*; John Wiley: New York, 1987; Vol. 3, pp 1-72.
- IV. 3. [4] A. M. Naylor y W. A. Goddard III en *Biocatalysis and Biomimetics* 1989.
- IV. 3. [5] P. L. Cummins; K. Ramnarayan; U. C. Singh y J. E. Gready *J. Am. Chem. Soc.* , 8247, **113**, 1991.

- IV. 3. [6] J. E. Gready *Biochem.* , 4761, **24**, 1985.
- IV. 3. [7] O. Tapia; R. Cardenas; J. Andres y F. Colonna-Cesari *J. Am. Chem. Soc.* , 4046, **110**, 1988.
- IV. 3. [8] O. Tapia; J. Andrés; J. Krechl; M. Campillo y F. Colonna-Cesari *Int. J. Quantum Chem.* , 767, **39**, 1991.
- IV. 3. [9] O. Tapia; J. Andrés y R. Cardenas *Chem.Phys.Lett.* , 395, **189**, 1992.
- IV. 3. [10] S. Benkovic; C. A. Fierke y A. M. Naylor *Science* , 393, **26**, 1993.
- IV. 3. [11] Y. D. Wu y K. N. Houk *J.Am.Chem.Soc.* , 2226, **109**, 1987.
- IV. 3. [12] Y. D. Wu y K. N. Houk *J. Am. Chem. Soc.* , 2353, **113**, 1991.
- IV. 3. [13] O. Almarsson y T. B. Bruice *J. Am. Chem. Soc.* , 2125, **115**, 1993.
- IV. 3. [14] R. Sustmann; W. Sicking y G. E. Schulz *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* , 1023, **28**, 1989.
- IV. 3. [15] J. Wilkie e I. H. Williams *J. Am. Chem. Soc.* , 5423, **114**, 1992.
- IV. 3. [16] I. H. Williams; A. B. Miller y G. M. Maggiora *J.Am.Chem.Soc.* , 530, **112**, 1990.
- IV. 3. [17] D. M. Seeger; C. Korzeniewski y W. Kowalchuk *J. Am. Chem. Soc.* , 6871, **95**, 1991.
- IV. 3. [18] J. Andrés y V. Moliner, pendiente de publicación, 1993.
- IV. 3. [19] W. P. Huskey y R. L. Schowen *J.Am.Chem.Soc.* , 5704, **105**, 1983.

IV. 4.

- IV. 4. [1] J. G. Hauge *J. Biol. Chem.* , 3630, **239**, 1964.
- IV. 4. [2] S. A. Salisbury; H. S. Forrest; W. B. T. Cruse y O. Kennard *Nature* , 843, **280**, 1979.
- IV. 4. [3] J. A. Duine; J. Frank y P. E. J. Verwiel *Eur. J. Biochem.* , 187, **108**, 1980.
- IV. 4. [4] J. A. Duine; J. Frank y J. A. Jongejan *FEMS Microbiol. Rev.* , 165, **32**, 1986.

- IV. 4. [5] a) J. Matsumoto y J. Shima *PQQ y Quinoproteins*, editores J. A. Jongejan y J. A. Duine, Kluwer Academic Publishers, Holanda, 1989, pp 162-164.
- IV. 4. [6] R. H. Dekker; J. A. Duine; J. Frank; P. E. J. Verwiél y J. Westerling *Eur. J. Biochem.* , 69, **125**, 1982.
- IV. 4. [7] J. Krechl; S. Bohm y J. Kutham *Collect. Czech. Chem. Commun.* , 1203, **54**, 1989.
- IV. 4. [8] V. Koningsveld; H. Jansen; J. C. Jongejan; J. Frank y J. A. Duine *Acta Cryst.* , 89, **41**, 1985.
- IV. 4. [9] K. Fukui *J. Phys. Chem.* , 4161, **74**, 1970.
- IV. 4. [10] K. Ishida; A. Morokuma y J. Komornicki *J. Chem. Phys.* , 2153, **66**, 1977.
- IV. 4. [11] D. G. Truhlar; A. D. Isaacson y B. C. Garrett *Theory of Chemical Reaction Dynamics*; CRC Press: Boca Raton FL, 1985; Vol. IV.
- IV. 4. [12] C. Gonzalez y H. B. Schlegel *J. Phys. Chem.* , 2154, **90**, 1989.

IV. 5.

- IV. 5. [1] L. Melander y W. H. Saunders *Reaction Rates of Isotopic Molecules*; Krieger Publishing Company, FL: 1987.
- IV. 5. [2] W. W. Cleland *Bioorg. Chem.* , 283, **15**, 1987.
- IV. 5. [3] R. G. Duggleby y D. B. Northrop *Bioorg. Chem.* , 177, **17**, 1989.
- IV. 5. [4] K. A. H. Adams; S. H. Chung y A. M. Klivanov *J. Am. Chem. Soc.* , 9418, **112**, 1990.
- IV. 5. [5] S. Balasubramanian; C. Abell y J. R. Coggins *J. Am. Chem. Soc.* , 8581, **112**, 1990.
- IV. 5. [6] G. P. Akulov *Russ. Chem. Rev.* , 999, **61**, 1992.
- IV. 5. [7] M. J. S. Dewar y G. P. Ford *J. Am. Chem. Soc.* , 8343, **99**, 1977.
- IV. 5. [8] S. Gabbay y H. S. Rzepa *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* , 671, **78**, 1982.

- IV. 5. [9] J. P. Shea; S. D. Nelson y G. P. Ford *J. Am. Chem. Soc.* , 5451, **105**, 1983.
- IV. 5. [10] H. Yamataka; S. Nagase; T. Ando y T. Hanafusa *J. Am. Chem. Soc.* , 601, **108**, 1986.
- IV. 5. [11] M. Saunders; K. E. Laidig y M. Wolfsberg *J. Am. Chem. Soc.* , 8989, **111**, 1989.
- IV. 5. [12] M. J. S. Dewar y Y. Yate-Ching *J. Am. Chem. Soc.* , 2095, **112**, 1990.
- IV. 5. [13] J. P. Jones y J. L. Urbauer *J. Comput. Chem.* , 1134, **12**, 1991.
- IV. 5. [14] B. G. Hutley; A. E. Mountain; I. H. Williams; G. M. Maggiora y R. L. Schowen *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* , 267, 1986.
- IV. 5. [15] M. J. Field; I. H. Hillier; S. Smith; M. A. Vicent; S. C. mason; S. C. Whittleton; C. I. F. Watt y M. F. Guest , 84, 1987.
- IV. 5. [16] A. E. Pian e I. H. Williams *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* , 1367, 1988.
- IV. 5. [17] I. H. Hillier; S. Smith; S. C. Mason; S. N. Whittleton; C. I. F. Watt y J. Willis *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* , 1345, 1988.
- IV. 5. [18] H. S. Rzepa y J. Miller *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* , 717, 1985.
- IV. 5. [19] I. H. Rajyaguru y H. S. Rzepa *J. Chem. Soc. Chem. Commun* , 998, 1987.
- IV. 5. [20] J. J. P. Stewart, *Reviews in Computational Chemistry*; K. B. Lipkowitz and D. B. Boyd, Ed.; VCH publishers: New York, 1990; Vol. 1; pp 45-82.
- IV. 5. [21] M. C. Zerner, *Reviews in Computational Chemistry*; K. B. Lipkowitz and D. B. Boyd, Ed.; VCH Publishers: New York, 1991; Vol. 2; pp 313-366.
- IV. 5. [22] J. Wilkie e I. H. Williams *J. Am. Chem. Soc.* , 5423, **114**, 1992.
- IV. 5. [23] O. Almarsson y T. B. Bruice *J. Am. Chem. Soc.* , 2125, **115**, 1993.
- IV. 5. [24] O. Tapia; R. Cardenas; J. Andres y F. Colonna-Cesari *J. Am. Chem. Soc.* , 4046, **110**, 1988.
- IV. 5. [25] O. Tapia; J. Andrés y R. Cardenas *Chem. Phys. Lett.* , 395, **189**, 1992.

3G, 3-21G, 4-21G, 4-31G, 6-31G, 6-311G, 6-31G* y 6-31G**, incluyendo la energía de correlación a nivel de la teoría de perturbaciones de segundo orden, MP2, e interacción de configuraciones, CISD, indican que las geometrías de estas estructuras no dependen cualitativamente del método de cálculo y son independientes de la base emplada. De esta forma, los métodos semiempíricos y en particular los procedimientos AM1 y PM3 son válidos para el estudio de mecanismos moleculares. La estructura del ET, que es invariante respecto al modelo molecular utilizado, viene descrita por un anillo de cuatro átomos. Sin embargo, los valores energéticos dependen del método de cálculo.

TERCERA: se ha investigado el mecanismo molecular para la reducción del piruvato al lactato en el centro activo del LDH por medio de los dos métodos semiempíricos, AM1 y PM3. Hemos utilizado un modelo molecular suficientemente grande que nos ha permitido reproducir cada una de las especies que intervienen en el proceso. El camino de reacción obtenido con ambos métodos es comparable y los resultados lo presentan como una reacción por etapas. La primera está dominada por la transferencia de un protón desde la histidina al piruvato, mientras la segunda es una transferencia de un hidruro desde el NADH. El proceso está controlado por el movimiento de este hidrógeno reductor. Ambos movimientos están acoplados cinéticamente pero dinámicamente desacoplados. La estructura del ET que hemos obtenido para la transferencia del hidruro es la única estructura, caracterizada como punto estacionario de la SEP, que se acopla perfectamente a la estructura del centro activo del LDH obtenida por difracción de rayos X. Estos resultados respaldan la hipótesis de Pauling y refuerzan la importancia del ET. Por último, del análisis de los orbitales moleculares, se deduce que el método PM3 es más apropiado que el AM1 para explicar el principio de máximo solapamiento entre HOMO-LUMO, así como para reproducir interacciones por puente de hidrógeno.

CUARTA: la estructura del ET para la transferencia de hidruro en el enzima dihidrofolato reductasa, DHFR, ha sido calculada analíticamente a nivel

semiempírico AM1 y PM3. La geometría, estructura electrónica y componentes del vector de transición, han resultado nuevamente ser independientes del método de cálculo. Para alcanzar la zona cuadrática del ET los dos anillos del DHF y NADPH deben orientarse paralelamente y con una conformación endo. Una vez los reactivos adquieren esta disposición, el solapamiento de los orbitales frontera es óptimo y puede tener lugar la transferencia. Por comparación con los ETs de transferencia de hidruro en otros enzimas, las geometrías de estos puntos estacionarios son transportables, invariantes y tienen las características requeridas para dar una adecuada descripción de los resultados experimentales. Estos resultados, junto con el principio de máximo solapamiento de los orbitales frontera, se pueden utilizar como guía para localizar estructuras de ETs en reacciones de este tipo.

QUINTA: por medio de cálculos semiempíricos PM3, se ha caracterizado la SEP completa para la oxidación del metanol por el enzima pirroloquinolina quinona, PQQ. Se han localizado los puntos estacionarios y se han trazado los diferentes caminos de reacción. El proceso global es una reacción por etapas. La primera controlada por la protonación del oxígeno de la quinona y el ataque nucleofílico de su átomo de carbono simultáneamente, formando el hemicetal. La segunda etapa consiste en la descomposición de éste a través de una reacción asincrónica. A partir de nuestros resultados, la hipótesis de que la etapa inicial es la protonación del nitrógeno del anillo piridínico se puede descartar.

SEXTA: la información extraída de las estructuras del ET para la transferencia de hidruro en el LDH, calculadas con los métodos semiempíricos MNDO, AM1 y PM3, se ha utilizado para calcular teóricamente efectos isotópico cinéticos, EIC, de deuterio. Éstos son independientes del método y revelan que si los reactivos están próximos a la zona cuadrática del ET los EIC calculados coinciden con los resultados experimentales. El centro activo de un enzima están diseñado para moldear los reactivos de forma que adquieran la estructura y fluctuaciones del ET. Con esta disposición la barrera energética a

superar es muy inferior a la que obtenemos por la diferencia entre las energías del ET y reactivos libres.