



Universitat de les Illes Balears



**ESTUDIO TEÓRICO DE LA REACCIONABILIDAD DE
COMPUESTOS MODELO DE LA VITAMINA B6 CON AMINAS**

Memoria para optar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

por

ANTONI SALVÀ SALVÀ

PALMA DE MALLORCA, NOVIEMBRE DE 2005

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

**ESTUDIO TEÓRICO DE LA REACCIONABILIDAD DE
COMPUESTOS MODELO DE LA VITAMINA B6 CON AMINAS**

por

ANTONI SALVÀ SALVÀ

Palma de Mallorca, Noviembre de 2005

Firmado

Dra. Josefa Donoso Pardo

Catedrático de la UIB

Firmado

Dr. Juan Frau Munar

Prof. Titular de la UIB

Directores de este trabajo

Firmado

Antoni Salvà Salvà

Licenciado en Ciencias Químicas

El autor quiere expresar su agradecimiento por su ayuda y estímulo a los directores de esta Tesis Doctoral, Dra. Josefa Donoso Pardo y Dr. Juan Frau Munar, así como al Dr. Francisco Muñoz Izquierdo y al resto de miembros del Área de Química-Física del Departamento de Química de la UIB.

a Coloma, Maria, Joan y Pau

ÍNDICE

1 Objeto.....	1
2 Antecedentes del tema.....	3
2.1 Generalidades.....	3
2.2 Formación de bases de Schiff de PLP	8
2.3 Transiminación de bases de Schiff con aminas.....	15
2.4 Significación biomédica de la Vitamina B6	17
2.5 Cálculos teóricos sobre modelos de PLP.....	19
3 Metodología.....	23
3.1 Fundamentos teóricos.....	23
3.1.1 Teoría de Hartree-Fock.....	23
3.1.2 Conjuntos de funciones de base.....	25
3.1.3 Métodos post-Hartree-Fock.....	28
3.1.3.1 Métodos variacionales.....	28
3.1.3.1.1 Interacción de configuraciones.	28
3.1.3.1.2 Coupled-cluster.....	30
3.1.3.2 Métodos perturbativos.....	30
3.1.4 Métodos semiempíricos.....	32
3.1.5 Teoría del funcional de la densidad	35
3.1.5.1 Métodos locales.....	38
3.1.5.2 Métodos no locales.....	38
3.1.5.3 Métodos híbridos.....	38
3.1.6 Cargas atómicas y teoría AIM Atoms in Molecules de Bader.....	39
3.2 Modelos de PLP.....	43
3.3 Metodología de cálculo.....	45
3.3.1 Cálculos semiempíricos.....	45

3.3.2 Cálculos DFT.....	46
3.3.3 Análisis de la topología de la densidad de carga	47
4 Artículo 1. Theoretical studies on Schiff base formation of vitamin b6 analogues J. Mol Struct (Theochem) 2002, 29, 577.....	49
5 Artículo 2. Theoretical studies on transimination of vitamin b6 analogs Int. J. Quantum Chem 2002, 89, 48.....	61
6 Artículo 3. DFT Studies on Schiff Base Formation of Vitamin B6 Analogues J. Phys. Chem. A. 2003, 107, 9409	73
7 Artículo 4. DFT studies on transimination of vitamin b6 analogues through geminal diamine formation J. Phys. Chem. B 2004, 108, 11709.....	81
8 Discusión general.....	89
9 Referencias.....	99

1 Objeto

La vitamina B6 interviene como cofactor en un amplio grupo de enzimas que llevan a cabo su acción catalítica sobre una gran variedad de reacciones fundamentales en los organismos vivos, especialmente aquellas relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos. La diversidad funcional de las enzimas dependientes de la vitamina B6 se ilustra por el hecho de que más de 140 actividades enzimáticas distintas que están catalogadas por la Enzyme Commission (EC) dependen de la presencia de esta coenzima, lo cual corresponde a un 4% de todas las actividades clasificadas.¹

En las enzimas dependientes de la vitamina B6, el 5'-fosfato de piridoxal (PLP) forma una base de Schiff con un residuo lisina en el centro activo. El primer paso para la gran mayoría de las reacciones que catalizan estas enzimas es el ataque nucleófilo del grupo amino de un aminoácido al grupo carbonilo de la base de Schiff, para formar una base de Schiff diferente que proporcionará diversos intermedios clave en el metabolismo de las proteínas.²

La reacción de esta base de Schiff con una segunda molécula de aminoácido permitirá de nuevo el anclaje del cofactor en el centro activo de la enzima en un proceso común a todo el metabolismo de las proteínas conocido como transaminación.

La amplia extensión de la vitamina B6 en la química de los procesos biológicos ha recibido una notable atención en estos últimos años. Numerosos estudios experimentales han descrito sus características químico-físicas tanto en disolución como en sistemas enzimáticos o en entornos que simulan dichos sistemas. El uso de compuestos modelo ha sido una metodología ampliamente usada para la descripción de los mecanismos de las reacciones en las que participa este cofactor, dada la complejidad de los intermedios de reacción y la rápida cinética de las reacciones enzimáticas. Los importantes progresos en estos trabajos se han visto ligados al desarrollo de las técnicas experimentales, fundamentalmente la espectroscopía molecular y, últimamente, la ingeniería genética.

Por otra parte, el acceso a capacidades de computación cada vez mayores y el desarrollo de paquetes de programas dedicados a la aplicación de la Mecánica Cuántica a problemas

químicos ha permitido que, en las últimas décadas, se puedan llevar a cabo estudios teóricos sobre moléculas de interés biológico. Los resultados de estos estudios teóricos proporcionan descripciones completas de las moléculas tales como su geometría, energía y otros parámetros termoquímicos y físico-químicos. La aplicación de esta metodología al estudio de la reactividad química permite llevar a cabo una descripción del perfil de la reacción mediante la caracterización de las estructuras como intermedio de reacción o como estado de transición. El número de referencias de estudios teóricos realizados sobre los compuestos derivados de la vitamina B6 es muy bajo comparado con los numerosos trabajos experimentales que se encuentran en la bibliografía. Los estudios teóricos realizados han permitido la obtención de las estructuras optimizadas de los mínimos locales en la reacción de transaminación de los derivados de la vitamina B6.³ Se ha descrito también la estabilidad relativa de los tautomeros de las formas fisiológicamente activas de la vitamina B6 en fase gas y en disolución.⁴ Otros trabajos han buscado una justificación, en términos de estructura electrónica, de la capacidad de los compuestos derivados de la vitamina B6 para la estabilización de carbaniones⁵ y de la importancia de las interacciones del tipo electrostático.⁶ Los estudios de reactividad química describen cálculos de coordenadas de reacción⁷ y las estructuras correspondientes a estados de transición para la etapa de descarboxilación en la transaminación.⁸

El objeto del presente trabajo es el estudio detallado desde un punto de vista teórico-computacional de la formación de la base de Schiff del PLP con una amina y de la reacción de transaminación con una segunda amina mediante la descripción de sus mecanismos de reacción y de las características físico-químicas de cada uno de los intermedios y estados de transición. Estas reacciones son generales para todas las enzimas dependientes de la vitamina B6 y el conocimiento de los detalles de su mecanismo ha de permitir una mejor modelización de las reacciones catalizadas por estas enzimas en el entorno biológico, de forma que se pueda llevar a cabo el diseño de moléculas con acciones de inhibición o promoción de dichos procesos y que sirvan de base para la formulación de fármacos específicos. Dadas las disfunciones de la salud humana que están relacionadas con los procesos en los que esta coenzima juega un papel clave, esta investigación pretende ser una aportación hacia el objetivo de diseñar drogas específicas para modular la acción de las enzimas PLP dependientes.

2 Antecedentes del tema

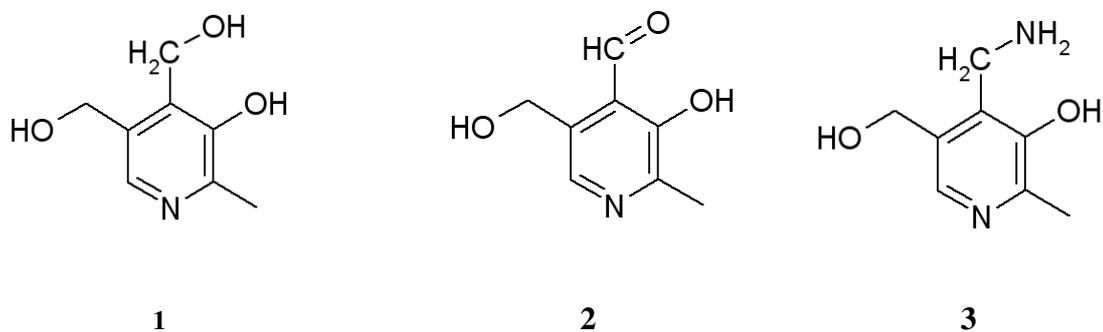
2.1 Generalidades

Las observaciones de Fletcher en 1905 sobre la existencia de nutrientes relacionados con la aparición de ciertas enfermedades llevaron a Hopkins y Funk al planteamiento en 1912 de la hipótesis de la existencia de vitaminas. Los estudios sobre dietas deficitarias permitieron a McCollum y Davis en 1915 la identificación de la vitamina A como una sustancia esencial que prevenía o anulaba los efectos de ciertas disfunciones. Varias décadas más tarde, el conocimiento de la base molecular de los procesos bioquímicos permitió reconocer el papel de las vitaminas como compuestos no macromoleculares cuya presencia es esencial para el correcto funcionamiento de los organismos vivos. Hoy es conocido que la mayoría de enzimas necesitan de la participación de sustancias orgánicas e inorgánicas para desarrollar su actividad catalítica. Estos grupos prostéticos no proteínicos de los sistemas enzimáticos, llamados coenzimas y cofactores, llevan a cabo diversos papeles relacionados con su funcionalidad química, tales como modificadores alostéricos, aceptores, dadores y agentes de almacenamiento para una gran variedad de especies, desde electrones en sistemas radicalarios hasta sustratos de alto peso molecular.

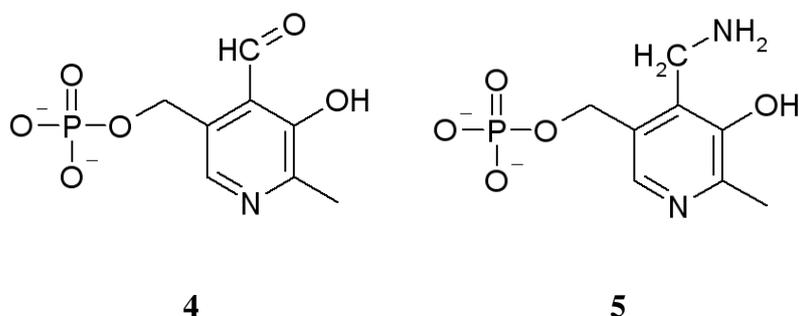
Un estudio nutricional sobre la aparición de la acrodinia, una dermatitis asociada a una dieta deficiente en riboflavina, permitió que György en 1934 diferenciara la riboflavina del llamado factor preventivo de la acrodinia. Por este motivo, recibió también el nombre de adermína (relacionada con la piel) además del de vitamina B6⁹. Cinco años más tarde, la vitamina B6 fue aislada en forma cristalina¹⁰, caracterizada como 4,5-bis(hidroximetil)-2-metil-3-piridinol o piridoxina¹¹ (**1**) y sintetizada artificialmente¹².

En 1944 se identificaron otros dos productos naturales con actividad similar a la de la vitamina B6 que se caracterizaron como el aldehído o análogo 4-formil de la piridoxina (piridoxal, **2**), y la amina correspondiente, o el análogo 4-aminometil (piridoxamina **3**).

Actualmente el término vitamina B6 se refiere de forma genérica a todos los derivados de la 3-hidroxi-2-metilpiridina con la misma actividad biológica que la piridoxina.¹³



En la bibliografía se ha descrito ampliamente que un derivado fosfórico del piridoxal, que se identificó como piridoxal 5'-fosfato (PLP, **4**), es la coenzima de un gran grupo de enzimas específicas que catalizan reacciones del metabolismo de los aminoácidos: transferencia de aminoácidos, descarboxilación, desaminación, desulfidritación y otras reacciones de eliminación y síntesis.¹⁴⁻¹⁸ En el proceso de la transaminación enzimática, el 5'-fosfato de piridoxal sufre una transformación reversible en 5'-fosfato de piridoxamina (PMP, **5**). Dicho producto actúa como grupo prostético de las aminotransferasas y de las enzimas que catalizan la fosforilación hidrolítica de glucógeno, pero no de otras enzimas B6 dependientes.^{19,20}



En las enzimas dependientes de la vitamina B6, el PLP se encuentra enlazado a una lisina del centro activo mediante la formación de una base de Schiff o aldmina interna. El grupo 5'-fosfato se encuentra anclado a la proteína mediante enlaces de hidrógeno (hasta nueve) y, usualmente, interacciones adicionales del tipo electrostático (Figura 1). Para las enzimas PMP dependientes, el grupo fosfato es el principal punto de enlace con la proteína.

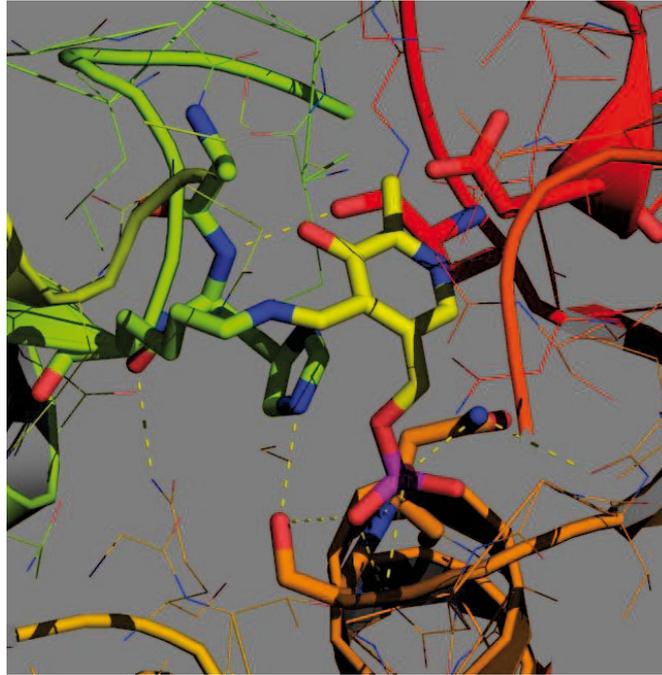


Figura 1

El 5' fosfato de piridoxal (código de colores: azul, N; amarillo, C; rojo, O; violeta, P) forma una base de Schiff con el residuo Lis87 (en verde) en la estructura cristalina de la triptófano sintasa, formada por una cadena α y una cadena β ²¹. La forma activa fisiológicamente es un complejo $\alpha_4\beta_2$.

Las enzimas dependientes de la vitamina B6 no pueden clasificarse de acuerdo con la similitud de la secuencia de aminoácidos, ya que enzimas con estructuras tridimensionales similares presentan secuencias muy diferentes. Por ello, el grupo de P. Christen²² hizo la propuesta de diferenciar estas enzimas según el átomo del aminoácido sustrato en el cual se observan cambios en la covalencia (los C α , β y γ). De acuerdo con este criterio, la aspartato aminotransferasa (AAT) es la representante principal del grupo α y la subunidad β de la triptófano sintasa (TRPS β) es una enzima prototipo del grupo β . Así, la cistationina β -liasa (CBL) se asignó al grupo γ . Sin embargo, la posterior determinación de su estructura tridimensional²³ mostró que esta proteína tiene el mismo tipo de patrón de plegamiento que las proteínas del grupo α , de forma que, evolutivamente, deben compartir un mismo ancestro. Según el convenio de clasificación estructural de las proteínas (SCOP²⁴), las proteínas comparten un mismo patrón de plegamiento si éstas tienen los mismos elementos principales de su estructura secundaria en la misma orientación mutua y con la

misma conectividad topológica. Este hallazgo reforzó una propuesta realizada por Goldsmith y colaboradores²⁵ sobre la clasificación de estas enzimas de acuerdo con un criterio estructural. Las enzimas PLP dependientes presentan dominios generales denominados α / β , β y en multidominios α / β , donde esta nomenclatura corresponde al convenio SCOP. Un análisis comparativo de estas proteínas permitió la identificación de unidades estructurales que se repiten de forma recurrente dentro de estos dominios y que corresponden a patrones de plegamiento principales. Así las enzimas del grupo α y γ , según la clasificación de Christen, se integraron en una misma categoría llamada plegamiento tipo I y el grupo β de Christen pasó a ser tipo II. La estructura de la alanina racemasa (AR)²⁶ corresponde al tipo III. La D-aminoácido aminotransferasa y las estructuras relacionadas con ésta pertenecen al tipo IV y la glucógeno fosforilasa (que usa el grupo fosfato en la catálisis) corresponde a un tipo V. Este esquema de clasificación hizo la previsión de dos grupos más (VI y VII) para integrar nuevas estructuras. En la figura 2 se muestran las imágenes de las estructuras de las enzimas prototipo de los patrones de plegamiento I a IV.

La disponibilidad de las estructuras tridimensionales de un importante número de enzimas dependientes de la vitamina B6 pone de manifiesto que las interacciones que son responsables del anclaje del cofactor y de los intermedios catalíticos covalentes a la proteína son muy diversas. Así el número de puentes de hidrógeno de los ligandos de la proteína al grupo fosfato del PLP varía de 4 a 8, incluso 9, y la carga negativa de este grupo se encuentra en algunas proteínas prácticamente compensada por la presencia de ligandos mientras que en otras no se encuentra casi en absoluto compensada. El entorno del N1 del PLP también presenta un amplio margen de situaciones, desde la existencia de un puente de hidrógeno del nitrógeno protonado a un residuo aspartato, glutamato o serina, hasta la constatación de la no protonación de este nitrógeno. Por otra parte, la disposición de la estructura de las enzimas dependientes del PLP para enlazarse al sustrato también es dispar. Mientras que la AAT se dispone de forma cerrada, de manera que el sustrato dicarboxilato establece un doble puente de hidrógeno con residuos arginina, otros enzimas (tal vez la mayoría, según la bibliografía) no forman una estructura cerrada en torno al sustrato, e incluso no requieren una interacción tan rígida con éste.²⁷

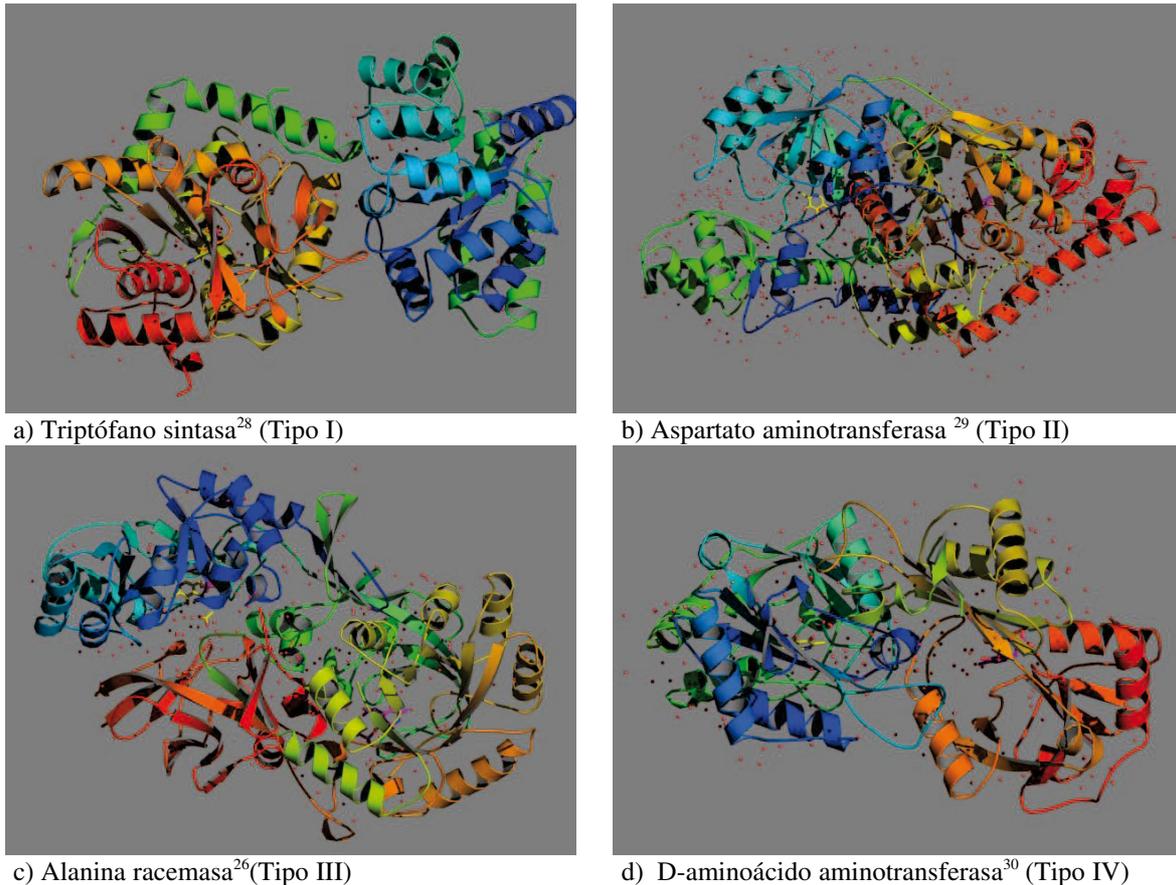


Figura 2

Figuras correspondientes a las estructuras de los representantes de los cuatro tipos de las enzimas dependientes de la vitamina B6 en función de su clasificación estructural. Las moléculas de agua que forman parte de la unidad cristalina aparecen como puntos rojos (correspondientes al átomo de oxígeno) e incluyen la coenzima en el centro activo. a) es un complejo $\alpha_2\beta_2$ en presencia de catión potasio, b) es un dímero α_2 en el que una molécula de 5'-fosfato de piridoxal se encuentra formando una base de Schiff con el residuo Lis258 de cada subunidad, c) este grupo de enzimas tiene en uno de sus dominios una estructura denominada barril- $(\alpha/\beta)_8$ y presenta la característica de que el nitrógeno piridínico del PLP (N1) no se encuentra protonado, sino que forma un puente de hidrógeno con un residuo arginina d) El PLP forma una base de Schiff en el centro activo de la enzima con el residuo Lis145,

El uso de argumentos puramente estructurales en la clasificación de las proteínas tiene su punto débil en un cierto grado de subjetividad asociado a la decisión sobre qué elementos de la estructura secundaria son significativos para la descripción de su disposición relativa y de su conectividad. Por este motivo, otros argumentos, como consideraciones de tipo funcional o evolutivo, se tienen en cuenta en la asignación de los patrones de plegamiento.³¹

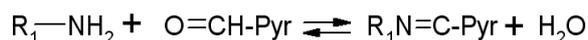
Recientemente se ha intentado llevar a cabo la clasificación de las enzimas dependientes del PLP a partir de secuencias genómicas que se obtienen por métodos de búsqueda que

identifican la conservación estructural de familias de proteínas.³² Las características mecanísticas comunes de su acción enzimática, que incluyen la formación de intermedios carbaniónicos que se estabilizan por el cofactor, sugieren que han aparecido enzimas con actividades idénticas o altamente similares varias veces durante el curso de la evolución. Sin embargo, las enzimas PLP dependientes están involucradas en un gran variedad de procesos celulares, de tal forma que incluso para una enzima para la cual la actividad catalítica se puede asignar en base a su secuencia, la función real biológica puede ser incierta. Se ha señalado que una tercera parte de las enzimas cuya actividad catalítica depende de este cofactor, según la clasificación de la EC (Enzyme Commission), no están aún caracterizadas en términos de secuencia genómica.³³ Se propone como motivo que este tipo de enzimas pueden no tener una especificidad estricta hacia el sustrato. Por ejemplo, se ha descrito una aminotransferasa que cataliza reacciones correspondientes a tres procesos distintos.³⁴ Este fenómeno, conocido como promiscuidad catalítica implica que una misma porción de un gen puede ser responsable de diversas funciones catalíticas, lo que complica una clasificación funcional y una asignación genómica unívoca.³⁵ En algunos casos, la misma actividad puede incluso ser llevada a cabo (posiblemente como una reacción lateral o mediante control alostérico) por diversas enzimas dependientes del PLP. Por ejemplo, se conocen al menos nueve enzimas distintas, incluyendo diversas aminotransferasas, que catalizan reacciones de cisteína S-conjugada β -liasa en mamíferos.³⁶ La promiscuidad catalítica y la pérdida de especificidad para un sustrato también implica que un organismo puede tener más actividades PLP dependientes que genes que codifican sus enzimas.

2.2 Formación de bases de Schiff de PLP

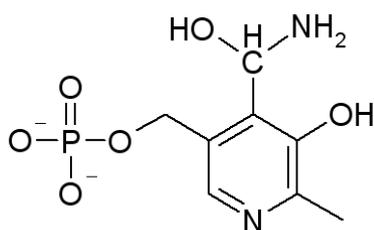
Desde un punto de vista químico, el PLP participa en numerosas reacciones en las que debe estabilizarse una carga negativa formal sobre el carbono alfa de un aminoácido. Como cualquier aldehído, el PLP puede formar iminas por reacción con aminas primarias, incluyendo el grupo terminal amino de un residuo de lisina.

La adición de un nucleófilo nitrogenado a un grupo carbonilo es una reacción común en numerosos procesos químicos y bioquímicos. Mediante estudios sobre modelos^{19,37} se demostró que un grupo amino de los aminoácidos reacciona con el grupo 4-formilo del PLP para formar la base de Schiff de acuerdo con la reacción global (Esquema 1):



Esquema 1

La formación de la base de Schiff se lleva a cabo mediante un mecanismo por pasos en el que el principal intermedio es una carbinolamina (**6**) y en el que la deshidratación es el paso limitante de la reacción.³⁸⁻⁴⁰



6

Se ha postulado que los intermedios que llevan a la formación de la base de Schiff son del tipo carbinolamina/quinonoide y que su estabilidad relativa se justifica mediante la formulación de estructuras resonantes que permite la consideración del sistema conjugado de forma que el anillo piridínico, especialmente si el nitrógeno se encuentra protonado, actúa como electrófilo. Tobias y Kallen⁴¹ hallaron que, en la formación de la base de Schiff entre el 5'-fosfato de piridoxal y serina, la protonación del nitrógeno piridínico tiene el efecto de aumentar en casi 100 veces la velocidad de reacción respecto al sistema desprotonado. El papel del anillo de piridina como sumidero de electrones (electron sink) es uno de los paradigmas más aceptados⁴² en la explicación de la reactividad del PLP y sus derivados.

Se conoce que tanto el piridoxal como el 5'-fosfato de piridoxal en disoluciones acuosas, a temperaturas ambiente y a valores fisiológicos del pH, catalizan reacciones de aminoácidos similares a aquellas catalizadas por enzimas PLP-dependientes *in vivo*.⁴³

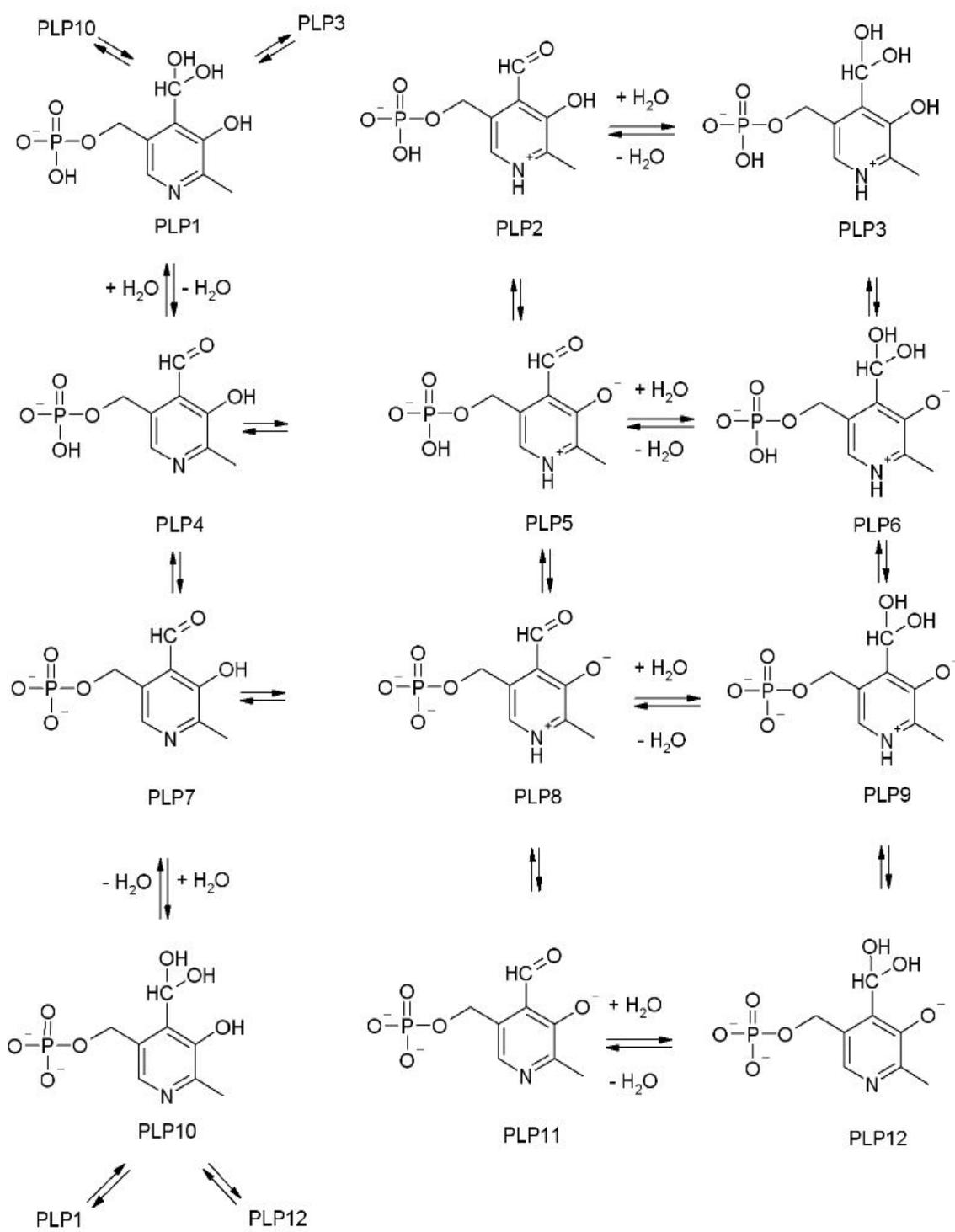
En esta línea se ha investigado la formación de bases de Schiff del PLP y de su análogo 5'-desopiridoxal (DPL), que carece del grupo fosfato, con hexilamina en medio acuoso.⁴⁴⁻⁴⁷ Se ha descrito también la influencia de la polaridad del disolvente en la cinética de la formación de bases de Schiff de PLP y DPL con hexilamina mediante la alteración de la catálisis intramolecular que afecta a la estabilidad de los intermedios de la reacción. Estos estudios, llevados a cabo en medios de distinta polaridad y en disolventes no acuosos

demuestran que la composición del disolvente tiene una gran importancia en la cinética de la formación de las bases de Schiff.⁴⁸⁻⁵¹

En enzimas PLP dependientes la coenzima se enlaza a la proteína mediante la formación de una imina con el grupo ϵ -amino de un residuo lisina, conocida como aldimina interna.¹⁷ Para descarboxilasas PLP dependientes en un medio con agua deuterada, se ha demostrado que, en los α -aminoácidos, un átomo de deuterio se incorpora en las aminas libres que se forman producto de la reacción, y que estos productos marcados son enantioméricamente puros.⁵² Cuando se ha estudiado la biosíntesis dependiente del PLP del L-Trp catalizada por el complejo $\alpha_2\beta_2$ triptófano sintasa, el marcaje con deuterio de la proteína muestra que el intercambio con hidrógeno del medio acuoso es lento, lo que ha sido interpretado como una restricción del acceso de agua de solvatación al lugar catalítico.⁵³ Éste y otros resultados, junto a los relacionados con la influencia que el grado de protonación del medio tiene en el desarrollo de la reacción, sugiere que las transferencias de hidrógeno deben tener un papel importante en el mecanismo de intervención de la vitamina B6.⁵⁴

En disolución acuosa se observa un incremento progresivo de la constante cinética de formación de la base de Schiff al aumentar la protonación de la molécula de PLP, lo que ha sido interpretado como un efecto de la catálisis intramolecular ácida general para la deshidratación de la carbinolamina intermedia. Se ha comprobado que la formación de la base de Schiff se ve favorecida por la presencia de grupos polares ionizados y no ionizados cerca del enlace imina que va a formarse, mientras que la presencia de grupos hidrofóbos y no polares en la proximidad del enlace imina ya formado en la base de Schiff, previene la hidrólisis al mantener alejadas las moléculas de agua.⁵⁵⁻⁵⁸ Se ha descrito experimentalmente la estabilidad relativa de los tautómeros del PLP para diferentes valores de pH y condiciones de solvatación.⁵⁹⁻⁶²

En el esquema 2 se ilustran los equilibrios de protonación, hidratación y tautomerización del PLP. Los valores para las constantes microscópicas de equilibrios de hidratación, tautomerización y protonación en medio acuoso de acuerdo con los valores proporcionados por Harris et al.⁶³ muestran que para el PLP con el fosfato monoprotonado (con carga global de la molécula -2) la forma zwitteriónica PLP8 en el esquema está favorecida sobre el tautómero PLP7, en la que el nitrógeno piridínico está desprotonado y se ha regenerado el grupo fenólico en C3.



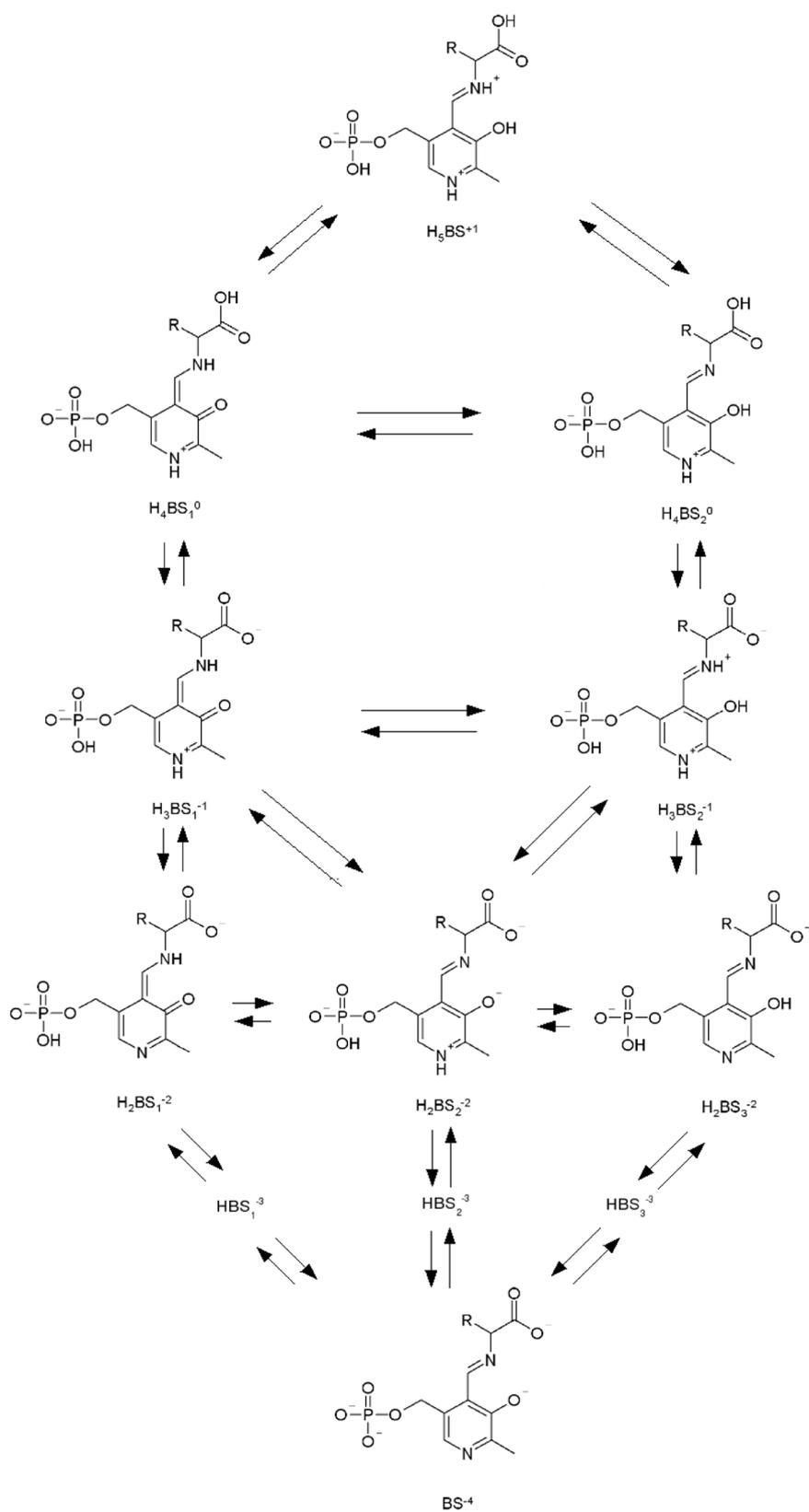
Esquema 2

Las diferentes formas tautoméricas para la base de Schiff formada entre un aminoácido y el 5'-fosfato de piridoxal se resumen en el esquema 3. En disolución acuosa se ha observado una dependencia de los valores de las constantes de equilibrio entre las distintas formas tautoméricas según la basicidad de la amina a partir de la cual se ha generado. Así, en la estructura correspondiente a la cetoenamina $H_3BS_1^{-1}$, que se encuentra en equilibrio con el correspondiente tautómero enolimina $H_3BS_2^{-1}$ esta última forma es más estable en disolución acuosa a medida que aumenta la basicidad de la amina.⁶⁴⁻⁶⁷

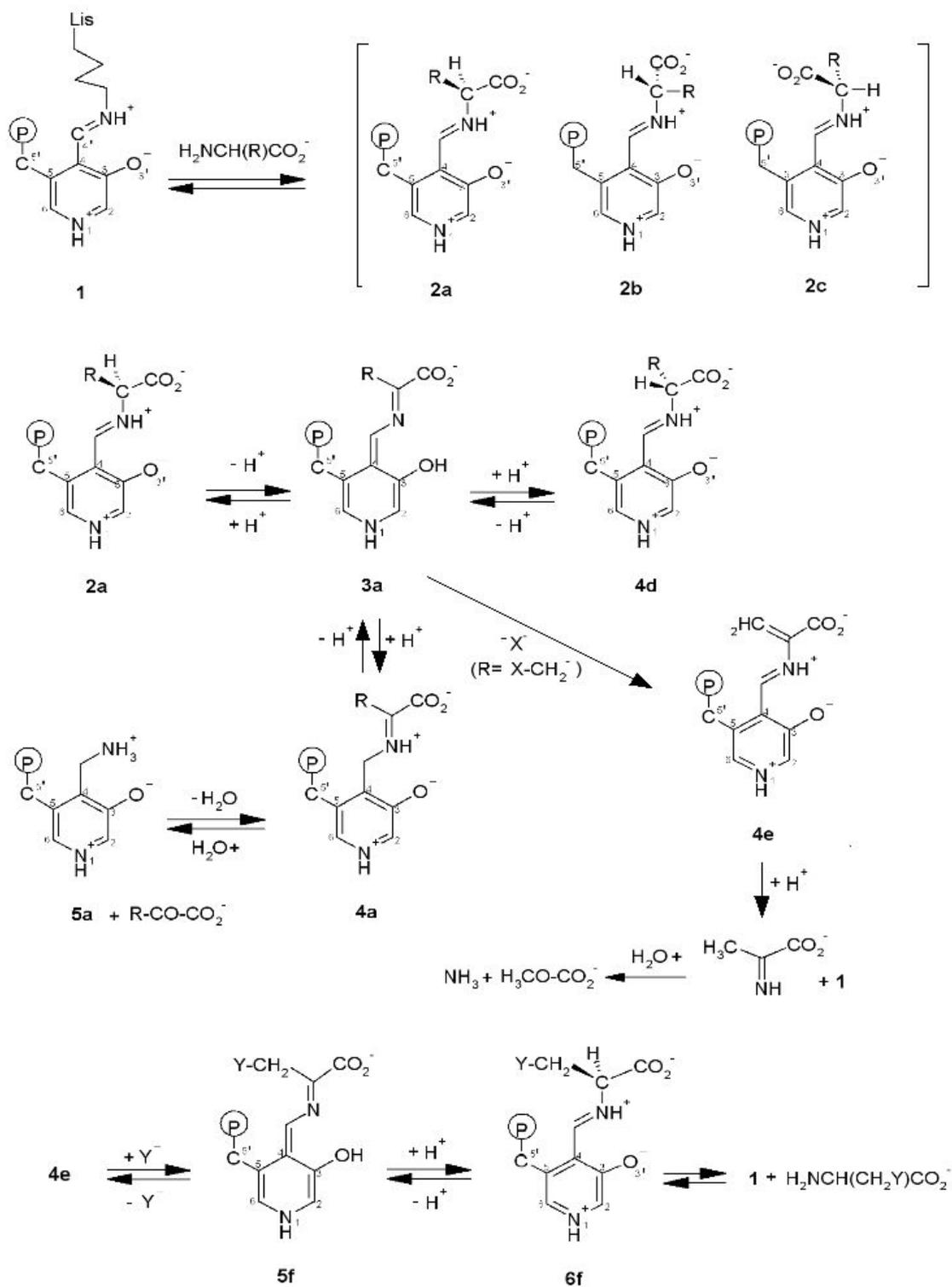
Se ha establecido que la estructura preferente de la base de Schiff protonada en medio acuoso a pH fisiológico es la del zwitterión imonio $H_3BS_2^{-1}$. En el esquema 3, los tautómeros HBS_1^{-3} , HBS_2^{-3} y HBS_3^{-3} son análogos a los divalentes, siendo la única diferencia la pérdida del hidrógeno del grupo fosfato.

La capacidad de la base de Schiff del PLP con aminoácidos para proporcionar diversos productos de reacción explica el amplio margen de reacciones químicas catalizadas por enzimas dependientes de esta coenzima. El papel de electrófilo del sistema de resonancia formado por el doble enlace imina con el anillo de piridina cargado positivamente, facilita la salida de los grupos enlazados al carbono α del aminoácido. En los esquemas 4 y 5 se indican los intermedios de reacción principales de las reacciones catalizadas por enzimas dependientes de la vitamina B6.

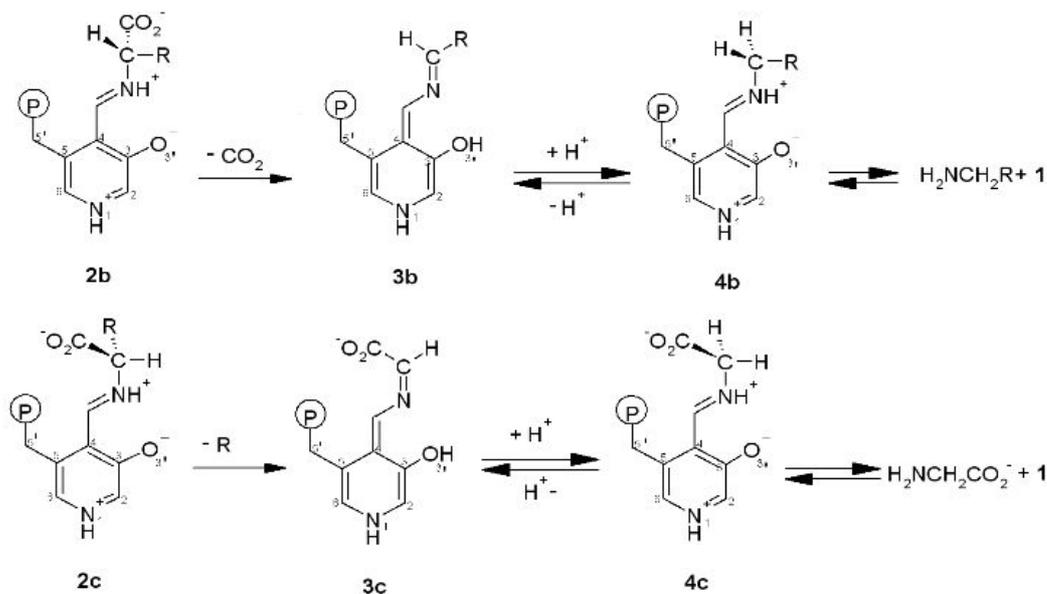
La protonación del intermedio **3a** en el esquema 4 lleva a la racemización de aminoácidos mediante la regeneración de la aldimina externa en los conformeros **4d** y **2a**, los cuales por hidrólisis producen, respectivamente, el aminoácido D y L. El intermedio quinonoide **3a** es también punto de partida de una eliminación de un grupo X^- en la cadena lateral R en las posiciones β o γ por la cual se produce el intermedio aminoacrilato **4e**. La protonación de este intermedio y la posterior transiminación con un residuo Lis del centro activo de una proteína proporciona la aldimina interna **1** y una imina que se hidroliza a piruvato y a amoníaco. El intermedio aminoacrilato **4e** incorpora un grupo nucleófilo Y^- al carbono β de la cadena lateral y produce una estructura quinonóidea **5f** que se reprotona en el carbono α para producir la aldimina externa **6f**. La transiminación de este intermedio proporciona el producto de la β -sustitución y la base de Schiff **1**.



Esquema 3



Esquema 4

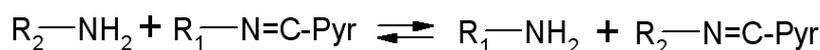


Esquema 5

En la primera fila del esquema 5 se representan los intermedios producto de la descarboxilación del confórmero **2b** de la aldimina externa. El intermedio quinonoide **3b** se protona en el carbono α y produce la aldimina externa **4b** que, después de un proceso de transiminación con la enzima, produce una amina y la aldimina interna **1** del esquema 4. Por otra parte, la eliminación de la cadena lateral R en la aldimina externa **2c** produce un intermedio quinonoide **3c**, el cual, tras protonación, produce la aldimina externa **4c**. La transiminación de ésta con la enzima forma la glicina y la aldimina interna **1** del esquema 4. Alternativamente, el intermedio **3c** puede protonarse en C4' para proporcionar PMP en un proceso análogo al **3a** \rightarrow **4a** \rightarrow **5a** del esquema 4.

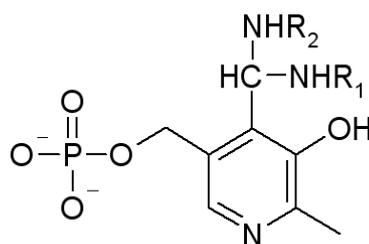
2.3 Transiminación de bases de Schiff con aminas

Una vez que se ha formado una base de Schiff del PLP con un grupo amino de un residuo lisina en el lugar activo de la enzima, un grupo amino de un substrato aminoácido reacciona con el carbono imínico de forma que se desprende el grupo amino de la lisina y se forma una nueva base de Schiff con el aminoácido substrato. En todas las reacciones en las que interviene la base de Schiff del PLP y una molécula de aminoácido en enzimas PLP dependientes, la transiminación o transaldiminización es un proceso muy común que responde a la reacción general representada en el esquema 6.⁶⁸



Esquema 6

Este proceso permite la conversión de aldiminas externas en aldiminas internas y *viceversa* si se considera la reacción en sentido contrario. Hubo una cierta controversia sobre la interpretación de los datos experimentales para proponer un mecanismo adecuado para la reacción de transiminación. Un primer mecanismo fue propuesto por Snell y Jenkins⁶⁹, que se basaba en la formación de una diamina geminal **7** como principal intermedio de la reacción. Esta hipótesis se recogía como la más plausible⁷⁰ aunque otros autores fundamentaron el mecanismo de la transiminación en un doble proceso de adición-eliminación.^{71,72} Sin embargo, las evidencias experimentales para la transiminación dieron su apoyo a la existencia de la diamina geminal como intermedio principal.^{2,73,74}



7

De acuerdo con este esquema, en enzimas dependientes del PLP la formación de diaminas geminales como intermedios transitorios permite la generación de bases de Schiff en la forma de aldiminas externas a partir de aldiminas internas.

El estudio de la transiminación enzimática desde un punto de vista químico presenta grandes dificultades debido a su rápida cinética y al elevado grado de complejidad de los intermedios de reacción.⁷⁵ Por ello, la transiminación no enzimática ha sido ampliamente estudiada mediante el uso de modelos químicos intramoleculares e intermoleculares. Estos estudios se fundamentan en la detección espectroscópica UV y RMN de la formación de diaminas geminales cíclicas como compuestos modelo de la reacción.⁷⁶⁻⁸⁴

Estos trabajos han permitido la determinación de la cinética y de las constantes de equilibrio de la transiminación para estos modelos. La etapa limitante de la reacción se sitúa

en la adición-eliminación de la amina más básica.⁸⁵ Se ha descrito también la catálisis ácido-base y la influencia de las transferencias de hidrógeno asociadas al transcurso de la transaminación para un modelo intermolecular formado por PLP, un aminoácido y dodecilamina en medio acuoso en el que las constantes cinéticas de la transaminación aumentan con la acidez de la disolución.⁷⁴

2.4 Significación biomédica de la Vitamina B6

La vitamina B6 se encuentra ampliamente distribuida en los organismos de los reinos animal y vegetal. Las plantas sintetizan este compuesto, mientras que los animales y algunas bacterias y hongos deben obtenerlo de fuentes externas.

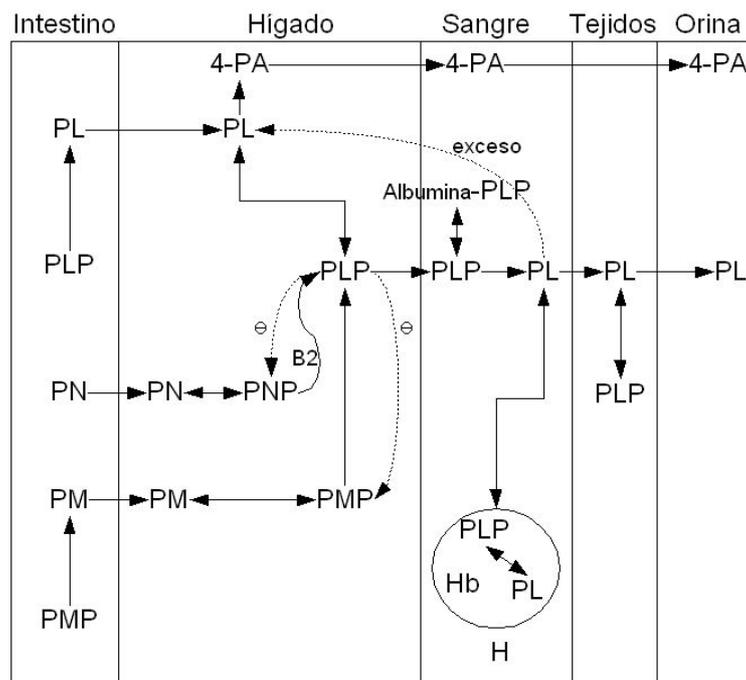
En mamíferos, el papel del PLP como cofactor de enzimas que intervienen en el metabolismo de las proteínas hace que éste sea esencial para los procesos asociados a la biosíntesis de la hemoglobina,⁸⁶ el funcionamiento correcto del sistema inmunológico y nervioso, y la conversión de triptófano en niacina.⁸⁷⁻⁹⁰

Por estos motivos, la vitamina B6 es de gran importancia en la dieta humana, especialmente en individuos en fases de desarrollo y crecimiento: niños, jóvenes, mujeres a lo largo del embarazo y del período de lactancia. Es especialmente crítica la deficiencia de la vitamina B6 durante el desarrollo del córtex cerebral, que puede resultar en funciones motóricas no coordinadas y en disfunciones del aprendizaje y de la memoria. Para adultos de la especie humana, la cantidad diaria recomendada de vitamina B6 se encuentra, según el margen de edad y el género, en el intervalo de 1.3 y 2.0 mg.⁹¹ y se suele encontrar formando parte de una dieta variada en los países occidentales. La vitamina B6 se encuentra distribuida de forma bastante general en los alimentos, excepto en la fruta. La jalea real es uno de los productos naturales con mayor concentración de vitamina B6 (5000 ppm). La forma sintética que se usa como suplemento en la dieta es el clorhidrato de piridoxina.

En la ingesta de alimentos, el piridoxal se disocia de la proteína y se absorbe como forma libre. En el hígado se transforma en su mayor parte en fosfato de piridoxal, mientras que el resto se encuentra en forma de fosfato de piridoxamina. La vitamina B6 se almacena como PLP en pequeñas cantidades en todos los tejidos. En el tejido muscular, el 90% se encuentra como PLP en la glucógenofosforilasa. La vitamina B6 se oxida a ácido piridóxico, el cual se excreta a través de la orina. Farmacológicamente, tiene como antagonista la

deopiridoxina y la isoniazida. El esquema 7 ilustra de forma simplificada el transporte y las principales vías metabólicas de la vitamina B6 en el organismo.

Se han descrito cuadros clínicos de diversa índole, como disfunciones cardiovasculares, enfermedades mentales y alteraciones inmunológicas, que se relacionan, de forma directa o indirecta, con la disponibilidad de esta coenzima.⁹² Situaciones como dietas poco equilibradas con un alto contenido en proteínas, enfermedades del hígado, disfunciones metabólicas como la fenilcetonuria y estados de drogodependencias requieren ingestas adicionales de vitamina B6. En este último caso, se conoce que el alcohol y las sustancias estupefacientes interfieren con las funciones de la vitamina B6. El alcohol provoca la liberación de vitamina B6 que se encuentra asociada a la proteína en formas libres de PLP. También se ha descrito la aparición de cálculos urinarios asociados a situaciones de deficiencia de la vitamina B6 y a la presencia de ácido oxálico y xanturénico en la orina.⁸⁶



Esquema 7 Transporte y principales vías metabólicas de la vitamina B6 en el organismo. PL: piridoxal, PN: piridoxina, PM: piridoxamina, 4-PA: ácido piridóxico, PLP: piridoxal 5-fosfato, PNP: piridoxina 5-fosfato, PMP: piridoxamina 5-fosfato, H: eritrocito, ⊖: inhibición, B2: riboflavina, Hb: hemoglobina.

Desde un punto de vista biomédico, existe mucho interés y un intenso debate sobre los

efectos de la vitamina B6 sobre el sistema nervioso, en particular en el tratamiento de neuropatías asociadas al alcoholismo crónico, el autismo, el mal de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.⁹³ Su función como grupo prostético de las descarboxilasas tiene como consecuencia que una deficiencia de la vitamina B6 provoca disfunciones en la conversión de aminoácidos a histamina, serotonina y taurina. Son también objeto de estudio las interacciones con ciertas quimioterapias, como el tratamiento de enfermos aquejados de asma crónica con isoniazida y medicamentos antihipertensivos,^{94,95} y el control de la homocisteína⁹⁶ para el tratamiento de cardiopatías.⁹⁷⁻¹⁰⁵

El interés sobre el conocimiento fundamental y aplicado de la reactividad química de la vitamina B6 plantea numerosas cuestiones que pueden abordarse desde la investigación de los mecanismos de reacción que presenta el cofactor en sus distintas formas tautoméricas y funcionalidades, tanto con los centros activos de las enzimas como con los substratos aminoácidos.

2.5 Cálculos teóricos sobre modelos de PLP

Los cálculos mecano-cuánticos sobre un sistema reactivo pueden describir de forma detallada la geometría y la energía de los intermedios de reacción y de los estados de transición involucrados en el proceso.

Las referencias de estudios teóricos en relación con la vitamina B6 son escasas. Nero et al.³ calcularon las energías y establecieron la geometría de los principales mínimos locales de PLP en fase gaseosa involucrados en el mecanismo de la transaminación del ácido γ -aminobutírico usando el método semiempírico AM1. En este estudio, la asignación de las cargas atómicas en los intermedios de la reacción no proporcionaba un modelo adecuado para la hidrólisis que lleva a la generación de piridoxamina y semialdehído succínico en la reacción objeto del estudio. Los cálculos llevados a cabo sobre análogos del PLP en los que se sustituye el nitrógeno piridínico por un átomo de carbono revelan la importancia de éste para que las energías de los intermedios sean las adecuadas para el transcurso de la reacción.

Por otra parte, Alagona et al.⁵ estudiaron la capacidad de formación de carbaniones en fase gaseosa sobre distintos substratos, incluyendo PLP, usando métodos semiempíricos y *ab initio*. En este trabajo se estudiaron las condiciones bajo las cuales se puede producir la transferencia de protones desde una base de Schiff formada entre la bencilamina y el

5'-fosfato de piridoxal y de bencilamina con topaquinona para la rotura del aducto y la formación del carbanión con una barrera de potencial aceptable. La estimación de dicha barrera de potencial se llevó a cabo con el estudio de la estabilidad relativa de varias estructuras posibles para las bases de Schiff formadas a partir de metilamina con 5'-fosfato de piridoxal. Sin localizar los estados de transición para la transferencia de hidrógeno, el estudio sugiere que dicha transferencia debe poder realizarse con una barrera energética baja desde el grupo amonio hasta el oxígeno en un intermedio de tipo quinonoide.

Ondrechen et al.⁶ establecieron un modelo teórico con metodología HF/6-31G para el complejo de la enzima alanina racemasa con el sustrato L-alanina y PLP. El particionamiento de cargas según Lödwin a partir del mínimo local calculado para el sistema proporcionó valores que los autores justifican en la capacidad que presumiblemente debe tener la enzima para estabilizar las cargas negativas que se generan en la formación del complejo objeto del estudio. Basándose en estos resultados postulan un comportamiento anfótero del entorno enzimático, de forma que los residuos pueden actuar como bases en la abstracción de un hidrógeno en el carbono α y también pueden funcionar como ácidos mediante la donación de un protón al intermedio de reacción para formar otro enantiómero.

Mientras que estos trabajos teóricos se orientan hacia la descripción de estructuras que corresponden a posibles mínimos locales, la reactividad de la vitamina B6 ha sido poco explorada desde un punto de vista mecánico-cuántico. Toney⁷ realizó cálculos de coordenada de reacción mediante una metodología semiempírica en un modelo de entorno enzimático para estimar la barrera energética de la descarboxilación de 2-aminoisobutirato y concluye que las transferencias de protón deben actuar de forma concertada con el proceso de descarboxilación.

El efecto de la estabilización de interacciones del tipo electrostático en la etapa de descarboxilación de la transaminación dependiente del PLP ha sido estudiado por Bach et al.⁸ mediante la realización de cálculos *ab initio* y de la aplicación de la teoría del funcional de la densidad. Los resultados de los estudios teóricos de estos autores cuestionan la validez del paradigma del papel del anillo piridínico como sumidero de electrones en base a la asignación de cargas atómicas de acuerdo con el particionamiento de Mulliken. El estudio no proporciona ningún cambio en la densidad electrónica del anillo de piridina de la base de Schiff a lo largo del transcurso de la reacción. Respecto a la reactividad, dichos autores

sugieren que el papel fundamental del PLP para el proceso estudiado (descarboxilación) es proporcionar un tautómero zwitteriónico del sustrato como consecuencia de una catálisis ácida general (transferencia de protón) que disminuya la diferencia de energía entre la estructura del intermedio o estado fundamental y la estructura de transición. Los factores que, según este estudio, afectan al transcurso de la reacción son la influencia coulombica de la transferencia de hidrógeno, la estabilización que proporciona el puente de hidrógeno del catión imonio hacia el anión fenolato y la formación de intermedios zwitteriónicos a lo largo de la coordenada de reacción con una estabilización coulombica del PLP en el sitio activo.

Los equilibrios tautoméricos del PLP y de un conjunto de derivados de la 3-hidroxipiridina han sido objeto de estudios teóricos con metodología DFT en fase gas y teniendo en cuenta los efectos de solvatación mediante una aproximación de solvatación explícita, en continuo y con una metodología híbrida que incluye los efectos macroscópicos y microscópicos del solvente. Kiruba y Wong⁴ han calculado que la forma no zwitteriónica del PLP es significadamente más estable en 43-56 kJ•mol⁻¹ en fase gas y en solventes no polares, mientras que el resultado inverso se obtiene para el medio acuoso. Concluyen que, de acuerdo con la evidencia experimental, el tautómero zwitteriónico es la forma predominante del PLP en condiciones fisiológicas. El estudio destaca el papel de las moléculas de agua explícitas y de la constante dieléctrica del disolvente en la influencia de los equilibrios tautoméricos del PLP y de los compuestos relacionados con esta estructura.

Los equilibrios de transferencia de hidrógeno en las bases de Schiff que forman enlaces de hidrógeno intramoleculares estabilizados por un sistema aromático, como el 2-(α -(N-metilimino)etil) fenol, han sido estudiados mediante la metodología DFT.¹⁰⁶ El esquema propuesto para la transferencia de hidrógeno destaca el papel de la estabilización por resonancia en la descripción de los tautómeros individuales. El cálculo de las constantes de fuerza de las estructuras optimizadas permiten la interpretación de los espectros IR de estos sistemas, incluyendo el efecto del desplazamiento de la frecuencia correspondiente al enlace C=N con la protonación.

3 Metodología

3.1 Fundamentos teóricos

3.1.1 Teoría de Hartree-Fock

La mecánica cuántica proporciona una explicación correcta de la estructura y de las propiedades físicas de las moléculas mediante una descripción de la distribución y niveles de energía disponibles de los electrones, por ello, es el marco teórico principal de la química.

En la química computacional, la aproximación numérica de la solución de la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo de un sistema multielectrónico en un potencial electrostático de N núcleos fijos se lleva a cabo mediante el método de cálculo de Hartree-Fock con las ecuaciones matriciales de Roothan-Hall¹⁰⁷.

De forma genérica, los orbitales moleculares de Hartree-Fock se representan como un conjunto de funciones de base $\{b_\mu\}_{\mu=1}^K$, no necesariamente ortogonal, con coeficientes $c_{\mu i}$ en la forma:

$$\phi_i = \sum_{\mu=1}^K c_{\mu i} b_\mu \quad [1]$$

Estas funciones se pueden calcular individualmente como funciones propias de un conjunto de operadores monoeléctricos que incluyen la repulsión electrostática de cada electrón con el campo electrostático formado por el resto de los electrones considerados en conjunto.

El operador monoeléctrico de Fock se define para cada uno de los electrones i del sistema como:

$$f_i = -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_k^N \frac{Z_k}{r_{ik}} + V_i^{HF}\{j\} \quad [2]$$

donde el término final, el potencial de Hartree-Fock es

$$V_i^{HF}\{j\}=2J_i-K_i \quad [3]$$

siendo J_i el operador de Coulomb y K_i el operador de intercambio, respectivamente. La aproximación de Roothan para la determinación de los orbitales moleculares requiere, para un conjunto de K funciones de base la solución de la ecuación secular

$$\begin{vmatrix} F_{11}-ES_{11} & F_{12}-ES_{12} & \dots & F_{1K}-ES_{1K} \\ F_{21}-ES_{21} & F_{22}-ES_{22} & \dots & F_{2K}-ES_{2K} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ F_{K1}-ES_{K1} & F_{K2}-ES_{K2} & \dots & F_{KK}-ES_{KK} \end{vmatrix} = 0 \quad [4]$$

que proporciona las distintas raíces E_j .

Para construir este determinante, las integrales de solapamiento $S_{\mu\nu}$ se computan de forma explícita mientras que los elementos $F_{\mu\nu}$ se calculan mediante

$$F_{\mu\nu} = \int \phi_\mu \left(-\frac{1}{2} \nabla^2 \phi_\nu \right) d\vec{r} - \sum_k^N Z_k \int \phi_\mu \left(\frac{1}{r_k} \phi_\nu \right) d\vec{r} + \sum_{\lambda\sigma} P_{\lambda\sigma} [(\mu\nu|\lambda\sigma) - \frac{1}{2}(\mu\lambda|\nu\sigma)] \quad [5]$$

En esta expresión $\frac{1}{r_k}$ es el operador distancia a un núcleo k . La matriz de densidad

$P_{\lambda\sigma}$ se computa mediante

$$P_{\lambda\sigma} = 2 \sum_i c_{\lambda i} c_{\sigma i} \quad [6]$$

donde los coeficientes corresponden a la contribución de la función de base b al orbital molecular i . La notación $(\mu\nu|\lambda\sigma)$ corresponde a las integrales de intercambio entre dos electrones de la forma:

$$(\mu\nu|\lambda\sigma) = \int \int \phi_\mu(1) \phi_\nu(1) \frac{1}{2} \phi_\lambda(2) \phi_\sigma(2) d\vec{r}(1) d\vec{r}(2) \quad [7]$$

donde ϕ_μ y ϕ_ν es la densidad de probabilidad de uno de los electrones y ϕ_λ y ϕ_σ la del otro. El resultado del cálculo de estas integrales de intercambio bielectrónicas por la matriz de densidad describe el grado en el cual las diferentes funciones de base contribuyen a la función de onda multielectrónica.

Es necesario disponer de una estimación inicial de los coeficientes de las funciones de base escogidas, de forma que se pueda construir una matriz inicial de densidad para generar los elementos $F_{\mu\nu}$ de la matriz. La resolución de las ecuación seculares [4] permite calcular

el valor de los coeficientes de orbital que minimizan el valor de la energía del sistema. Con estos coeficientes se computan de nuevo las integrales de solapamiento, monoeléctricas y bielectrónicas, se construye una nueva matriz de densidad y se resuelven de nuevo las ecuaciones seculares, cuyo resultado proporciona un nuevo conjunto de coeficientes. De este modo se sigue un procedimiento iterativo que se repite hasta que se cumplen los criterios de convergencia establecidos (campo autoconsistente) para la distribución inicial de núcleos. En el caso de una optimización de la geometría, se procedería a modificar esta geometría para realizar un nuevo ciclo de cálculos.

Esta metodología de cálculo presenta dos limitaciones importantes. La primera se encuentra en la naturaleza monoeléctrica del operador de Fock [2] que excluye la consideración de la correlación electrónica y que puede proporcionar una descripción incompleta desde el punto de vista químico de la molécula o sistema molecular objeto del estudio. Así, se ha descrito que la aplicación del método de Hartree-Fock predice de forma errónea las geometrías de estructuras que incorporan enlaces de hidrógeno mientras que la aplicación de una metodología *ab initio* que incorpora la correlación electrónica proporciona resultados con una buena coincidencia con los resultados experimentales.¹⁰⁸ La segunda limitación se encuentra en los requisitos computacionales relacionados con la evaluación numérica de las integrales de intercambio bielectrónicas y su número, que depende del número de átomos y del conjunto de bases escogido.

3.1.2 Conjuntos de funciones de base

Los conjuntos de funciones de base son las funciones matemáticas a partir de las cuales se construye la función de onda. Cada orbital molecular en la teoría de Hartree-Fock se expresa como una combinación lineal de funciones de base. Son los coeficientes de dicha combinación lineal los que se determinan en la solución iterativa del campo autoconsistente. Cuando se cumplen los criterios de convergencia geométrica y energética la función de onda completa se expresa como un determinante formado por los orbitales moleculares individualmente ocupados (determinante de Slater). Idealmente, un conjunto de bases infinito permitiría la construcción de una función de onda que describiría de forma óptima el sistema molecular.

La implementación computacional del método de Hartree-Fock requiere el uso de conjuntos de funciones en la forma adecuada, especialmente para la resolución de las

integrales bielectrónicas [7]. Los orbitales del tipo Slater (STO)¹⁰⁹ presentan dificultades para la evaluación numérica de dichas integrales, por ello se sustituyen por combinaciones lineales de funciones del tipo gaussiano (GTO). En coordenadas cartesianas, una función gaussiana centrada en un núcleo tiene la forma:

$$\phi(\vec{r}) = N \cdot x^l \cdot y^m \cdot z^n \cdot e^{-\alpha r^2} \quad [8]$$

donde N es el factor de normalización, $r = |\vec{r}|$, α es un exponente que controla la amplitud del orbital, y i, j y k son números enteros que determinan el tipo de orbital. Estas funciones, denominadas gaussianas primitivas, se obtienen de cálculos sobre átomos con metodología Hartree-Fock o post-Hartree-Fock con un método que incluya la correlación electrónica, como Interacción de Configuraciones (CI) o la aplicación de la Teoría de Perturbaciones de Møller-Plesset (MP). Estas funciones son adecuadas para cálculos sobre átomos aislados, pero no pueden describir de forma correcta el efecto de la modificación de los orbitales atómicos por la presencia de otros átomos en una molécula. Para ello, estas funciones se mejoran con una combinación de funciones que suelen recibir el nombre de orbitales del tipo gaussiana contraídos (CGTO) y las gaussianas a partir de las cuales se forma se denominan gaussianas primitivas, que toman la forma general

$$\varphi(x, y, z, \alpha, i, j, k) = \sum_{a=1}^M c_a \phi(x, y, z, \alpha_a, i, j, k) \quad [9]$$

En un conjunto de bases de GTO contraídas, cada función de base se define por los coeficientes de contracción c_a y los exponentes α_a para cada una de las primitivas. M es el número de gaussianas usadas en la combinación lineal. Los coeficientes c_a se escogen para optimizar la forma de la suma de funciones de base de modo que se aproximen a un orbital del tipo Slater y para asegurar la normalización.

Existen dos formas básicas de construir las funciones de base: de forma segmentada o general. En una contracción segmentada una primitiva gaussiana aparece solamente en una contracción, mientras que en una función de base general, cualquier primitiva puede aparecer en cada función de base (contracción).

En general, los paquetes de programas de cálculo de química computacional están orientados a los conjuntos de funciones de base segmentada. Los conjuntos de base segmentados se estructuran de forma que las primitivas con el menor exponente (primitivas difusas) aparecen sin contraer (una primitiva gaussiana por función de base), mientras que las

primitivas con mayor exponente se toman con los coeficientes que proporcionan los cálculos Hartree-Fock para el sistema atómico y se forman una o más contracciones. Para cálculos sobre sistemas moleculares ciertas combinaciones lineales se usan como funciones de base, con sus exponentes y sus coeficientes fijos. Las gaussianas cartesianas se agrupan en capas que se nombran con la misma letra con la que se designa el número cuántico del momento angular L , sin embargo L en este caso es la suma de los exponentes de las coordenadas cartesianas $L=n+l+m$ en la definición de primitiva de la ecuación [8].

En la metodología de Hartree-Fock, el esfuerzo computacional para el cálculo de las integrales aumenta con la cuarta potencia del número de gaussianas primitivas. Una vez las integrales se han calculado, los pasos siguientes en el procedimiento dependen solamente del número de funciones de base (o contracciones).

La convención más utilizada para la descripción de los conjuntos de bases es la de Pople y colaboradores. El conjunto de funciones de base se señala para todo el sistema molecular objeto del cálculo, y no para centros particulares, de forma que describe la estructura del conjunto de funciones de base. Esta notación es del tipo $n-ijG$ o $n-ijkG$ y diferencia el número de primitivas para los electrones de las capas internas (n) y el número de primitivas para las contracciones de la capa de valencia (ij o ijk). La notación ij describe conjuntos del tipo doble zeta (dos contracciones usadas para representar un orbital atómico de Slater sencillo) y los conjuntos ijk del tipo triple zeta.

Desde un punto de vista químico, el uso de estos conjuntos de funciones de base proporciona más flexibilidad en la descripción de los electrones de la capa de valencia mientras que los electrones internos vienen descritos por una única contracción, desde la hipótesis que éstos no participan de forma significativa en la formación del enlace.

Por orden de complejidad, los conjuntos de funciones de base más utilizados en la notación de Pople son la base mínima (zeta única) STO-3G, del tipo doble zeta (3-21G, 6-21G, 4-31G, 6-31G) y triple zeta 6-311G.

En los cálculos que se han llevado a cabo en esta investigación se ha utilizado el conjunto de bases del tipo doble zeta 6-31G.^{110,111}

A las contracciones originales derivadas de los cálculos Hartree-Fock para átomos se añaden otras funciones: polarizadas¹¹² y difusas.¹¹³

Las funciones polarizadas son necesarias para la descripción correcta del enlace químico. Estas funciones se suelen incorporar como gaussianas no contraídas y tienen valores más altos de L que los que se encuentran presentes en orbitales atómicos ocupados para el átomo correspondiente. Los exponentes de las funciones polarizadas no se pueden derivar de cálculos Hartree-Fock atómicos, ya que corresponden a orbitales atómicos no ocupados, y por ello se estiman por optimización explícita a partir de un conjunto de moléculas. La elección de las funciones polarizadas que se incorporan al conjunto de bases debe contemplar un compromiso entre el esfuerzo computacional y la necesidad de una descripción correcta del enlace para los sistemas moleculares objeto del estudio. Así, en esta investigación se han usado 6 funciones tipo d como funciones polarizadas (6-31G(d) o 6-31G*) a cada uno de los átomos pesados (diferentes de H).

Las funciones difusas permiten la descripción correcta de aniones y enlaces débiles, especialmente los puentes de hidrógeno. Se trata de gaussianas que tienen exponentes pequeños del tipo s y p. Para el conjunto de bases 6-31G puede añadirse una función del tipo s y una del tipo p que se incorporan al conjunto de bases estándar de los átomos pesados (6-31+G*) o bien una función difusa del tipo s y del tipo p a cada uno de los átomos pesados y una gaussiana difusa del tipo s a los hidrógenos (6-31++G*).

3.1.3 Métodos post-Hartree-Fock

Existen diferentes métodos para la determinación de la energía de correlación a partir del método de Hartree-Fock. De forma general, la incorporación del efecto de la correlación electrónica puede llevarse a cabo mediante procedimientos variacionales, como el método de Interacción de Configuraciones (CI, QCIS) o los métodos Coupled Cluster ; y perturbativos, como la aplicación de la Teoría de Perturbaciones de Møller-Plesset (MP).

3.1.3.1 Métodos variacionales

3.1.3.1.1 Interacción de configuraciones.

Para cualquier sistema, además de los orbitales ocupados que se han obtenido mediante el método de Hartree-Fock existe una serie de orbitales virtuales que corresponden a valores de energía superiores y que pueden usarse para construir otras configuraciones con coeficientes que pueden determinarse variacionalmente. La función de onda de interacción de

configuraciones (CI) tiene la forma:

$$\Psi_e = \sum_i C_i \Phi_i \quad [10]$$

donde Φ_i son un conjunto ortonormal de N configuraciones electrónicas. Por configuración se entiende una combinación lineal de determinantes de Slater D_i de forma que ésta posee todos los elementos de simetría del estado molecular que se describe. La aplicación del principio variacional

$$\int \Psi_e^* H_e \Phi_e d\tau \quad [11]$$

conduce a las ecuaciones de interacción de configuraciones

$$(H - EI)C = 0 \quad [12]$$

donde I es la matriz identidad. Los elementos de la matriz del hamiltoniano vienen dados por

$$H_{ij} = \int \Psi_j^* H_e \Phi_j d\tau \quad [13]$$

donde

$$\Phi_j = \sum_i C_{ij} D_i \quad [14]$$

Si i y j son de simetría diferente, $H_{ij} = 0$. Si se usan M configuraciones en la expansión CI, se obtienen M valores propios (energías) de forma que el valor más bajo de la energía es un nivel por encima de la energía real. Esto implica que no es necesario resolver la energía de todo el sistema, solamente se requiere determinar la más baja (o los dos o tres niveles más bajos).

El método más habitual de interacción de configuraciones es el cálculo MCSCF (Multi-configuration self consistent field o campo autoconsistente de configuración múltiple). En este método los parámetros de configuración C_{ij} de [14] y los parámetros de la expansión C_i de [10] varían de forma simultánea a lo largo de un proceso iterativo. Una iteración k implica la formación del vector

$$\sigma_\mu^{(K)} = \sum_\nu H_{\mu\nu} C_\nu^{(k-1)} \quad [15]$$

Se requieren valores iniciales para C_i y C_{ij} , con los que se halla Φ_i . Con este valor se determinan los nuevos parámetros C_i y C_{ij} y se repite el cálculo hasta que los parámetros convergen dentro del margen establecido. El cálculo de los elementos de la matriz

es la limitación computacional principal para este cálculo. Para la determinación de una configuración molecular, sólo se tienen en cuenta los electrones fuera de las capas cerradas. Dentro de un conjunto de orbitales, los elementos de la matriz entre determinantes que difieran de tres o más orbitales de espín son idénticamente cero, por los que deben considerarse las excitaciones simples y dobles de la configuración de referencia HF .

3.1.3.1.2 Coupled-cluster

El método coupled-cluster (CC)^{114,115} plantea una función de onda CC que viene dada por un operador de excitación que actúa sobre una función de referencia, normalmente el determinante de Hartree Fock $\Psi_{HF} = D_0$ en la forma

$$\Psi_{CC} = \hat{T} \Psi_{HF} \quad [16]$$

El operador \hat{T} se construye desde un número k de excitaciones desde un estado de referencia $\hat{T} = \sum_k \hat{T}_k$ de forma que en

$$\hat{T}_k \Psi_{HF} = \sum t_{ij}^{ab} D_{ij}^{ab} \quad [17]$$

el operador \hat{T}_k genera excitaciones de pares de estados ocupados ij a pares de estados no ocupados o virtuales ab desde un determinante de referencia Hartree Fock. Los coeficientes de expansión t_{ij}^{ab} se determinan de forma autoconsistente. Una función de onda CC que usa sustituciones dobles del determinante de Hartree-Fock (CCD) se escribe como:

$$\Psi_{CCD} = D_0 + \sum t_{ij}^{ab} D_{ij}^{ab} + \frac{1}{2} \sum \sum t_{ij}^{ab} t_{kl}^{cd} D_{ijkl}^{abcd} \quad [18]$$

La expansión CC se suele cortar después de que se hayan incluido todas la excitaciones dobles o todas las excitaciones cuádruples. Los requisitos computacionales de los métodos CC aumentan con los términos de excitación en la expansión. Para términos sencillos y dobles el coste computacional con respecto al mismo cálculo HF se incrementa a la sexta potencia del número de funciones de base y los cálculos que incluyen términos de cuádruple excitación llega hasta la décima potencia.

3.1.3.2 Métodos perturbativos

Una aproximación diferente para el cálculo de la correlación electrónica es el método

perturbativo de Møller-Plesset (MP)¹¹⁶. Las excitaciones se toman en cuenta mediante un operador de perturbación P dentro de la teoría de perturbación de múltiples cuerpos de Rayleigh y Schrödinger.

El problema de Hartree-Fock se trata como una función de onda no perturbada y la parte residual del Hamiltoniano se trata como una perturbación:

$$H = H^0 + P \quad [19]$$

La aplicabilidad de la teoría de perturbación está limitada al caso en el que la contribución de la energía de correlación electrónica sea pequeña. Para este método, debe conocerse, de la aplicación del método de Hartree-Fock, la solución del sistema no perturbado con el hamiltoniano H^0 , es decir, del determinante de Slater $\Psi^{(0)}$ y la energía $E^{(0)}$:

$$H^0 \Psi^{(0)} = E^{(0)} \Psi^{(0)} \quad [20]$$

Se define entonces un hamiltoniano electrónico generalizado como:

$$H_\lambda = H^0 + \lambda P \quad [21]$$

La función de onda Ψ_λ y la energía E_λ se expanden como una serie de potencias:

$$\Psi_\lambda = \Psi^{(0)} + \lambda^1 \Psi^{(1)} + \lambda^2 \Psi^{(2)} + \dots = \sum_{n=0}^{\infty} \lambda^n \Psi^{(n)} \quad [22]$$

$$E_\lambda = E^{(0)} + \lambda^1 E^{(1)} + \lambda^2 E^{(2)} + \dots = \sum_{n=0}^{\infty} \lambda^n E^{(n)} \quad [23]$$

Ψ_λ y E_λ representan, respectivamente, para un conjunto de funciones de base dado, la función de onda exacta y la energía del estado fundamental de un sistema descrito por el hamiltoniano H_λ . En este punto debe resolverse la ecuación

$$H_\lambda \Psi_\lambda = E_\lambda \Psi_\lambda \quad [24]$$

$E^{(0)}$ es la suma de las energías monoeléctricas y la suma

$$E^{(0)} + E^{(1)} = \langle \Psi^{(0)} | H_\lambda | \Psi^{(0)} \rangle \quad [25]$$

representa la energía de Hartree-Fock ya que $\Psi^{(0)}$ corresponde a la función de onda de Hartree-Fock. Para calcular $E^{(2)}$ se debe conocer la función de onda de primer orden

$$\Psi^{(1)} = \sum_{s>0} (E_0 - E_s)^{-1} P_{s0} \Psi_s \quad [26]$$

La energía E_s , correspondiente al determinante Ψ_s , es la suma de las energías

monoelectrónicas de aquellos orbitales-espín ocupados donde P_{s0} son los elementos de la matriz del operador perturbación. Solamente las sustituciones dobles contribuyen a la función de onda de primer orden, ya que si s corresponde a un determinante con doble sustitución, puede demostrarse que los elementos P_{s0} no son cero. El coste computacional de este método es importante, por lo que la expansión de potencias normalmente se corta después del segundo orden (nivel MP2) para el cual la energía es:

$$E^{MP2} = E^{(0)} + E^{(1)} + E^{(2)} = E^{HF} + E^{(2)} \quad [27]$$

La energía de tercer orden, como MP3, solamente incorpora contribuciones de sustituciones dobles.¹¹⁷⁻¹¹⁹ En el nivel MP4, se incluyen sustituciones adicionales sencillas, dobles, triples y cuádruples.^{120,121}

El problema principal de este método es que las series MP convergen lentamente, especialmente en sistemas donde los efectos de la correlación son mayores (correspondientes a una perturbación grande). El método MP es práctico hasta el cuarto orden y así se encuentra disponible en los programas de química computacional, sin embargo, para este nivel, está limitado a sistemas relativamente pequeños. Para el segundo orden, se consiguen resultados correctos para conjuntos de funciones de base de calidad igual o mejor al 6-31G* y con la metodología de frozen core, es decir, considerando solamente los efectos de correlación electrónica de los electrones de valencia.

3.1.4 Métodos semiempíricos

El método de cálculo de Hartree-Fock en base al uso de las ecuaciones de Roothan-Hall (especialmente los procedimientos que incluyen la correlación electrónica) tiene su aplicación limitada a moléculas de pequeño o medio tamaño debido al elevado coste computacional. Por ello los métodos semiempíricos son especialmente interesantes para la realización de cálculos preliminares o sobre sistemas con un número de centros tal que no permite el uso de una metodología HF o post-Hartree-Fock. Sin embargo, la aplicación de los métodos semiempíricos se encuentra restringida a las limitaciones de las aproximaciones numéricas y parametrizaciones que los definen.

Estos métodos proporcionan un esquema de cálculo dentro del método de Hartree-Fock introduciendo simplificaciones y aproximaciones que reducen sustancialmente el tiempo de cálculo. Presentan características comunes: consideran solamente los electrones de valencia,

se basan en el algoritmo del campo autoconsistente (SCF) y tienen en cuenta la repulsión electrostática y la energía de intercambio.

El conjunto de bases que describen los electrones de valencia son orbitales tipo Slater (STO). Los electrones interiores se incorporan a un potencial electrostático efectivo junto con los núcleos.

Los distintos formalismos que fundamentan los métodos semiempíricos disponibles (CNDO, INDO, NDDO) se diferencian, de forma general, en el tratamiento de las interacciones electrón-electrón sobre un mismo átomo.

En el formalismo NDDO (Neglect of diatomic differential overlap) se evalúan todas las integrales bielectrónicas del tipo $(\mu\nu|\lambda\sigma)$ si las funciones de base μ y ν , y λ y σ se encuentran en el mismo átomo, respectivamente. En estas condiciones hay 10 combinaciones posibles de s, p_x , p_y y p_z para cada átomo y 100 posibles combinaciones de combinaciones para las integrales bielectrónicas. Si se incluyen las funciones d, el número posible de integrales únicas alcanza 2025. Aún así, se consigue una reducción importante en el tiempo de cálculo respecto al método *ab initio*, ya que éste último evalúa todas las posibles combinaciones de las combinaciones de funciones. Con este esquema, se computan individualmente los términos de la matriz de Fock: elementos diagonales $F_{\mu\mu}$, elementos no diagonales para dos funciones de base μ y ν sobre el mismo átomo A $F_{\mu,\nu}$ y elementos no diagonales cuando μ está sobre el átomo A y ν sobre el átomo B . En NDDO los parámetros β_{AB} entre dos átomos A y B , análogos a los definidos en la teoría de Hückel, no son específicos para una pareja de átomos sino que se determinan.

Dentro del esquema del formalismo NDDO los métodos semiempíricos más usados son MNDO,¹²² AM1,¹²³ y PM3.^{124,125}

En el método MNDO la energía de repulsión nuclear se computa para un sistema con K núcleos de acuerdo con:

$$V_N = \sum_{k < l}^K Z_k Z_l (s_k s_k | s_l s_l) \left(1 + \frac{1}{\tau} e^{-\alpha Z_k r_{kl}} + e^{-\alpha Z_l r_{kl}} \right) \quad [28]$$

El método MNDO contiene parámetros para los átomos C, H, N y O obtenidos por un procedimiento de optimización sobre una muestra de moléculas: las integrales monoeléctricas para los elementos de la matriz diagonal U_{ss} y U_{pp} , los parámetros

β_s y β_p , los exponentes sobre los orbitales atómicos s y p que forman el orbital STO (ζ_s y ζ_p) y el término de repulsión α . Los restantes parámetros, que corresponden a las integrales bielectrónicas G_{ss} , G_{sp} , G_{pp} , $G_{pp'}$ y L_{sp} se obtienen de resultados experimentales.

El método MNDO obtiene unos resultados erróneos de las geometrías y energías de moléculas que presentan enlace de hidrógeno. Por ello, el método AM1 pretende mejorar los resultados de MNDO mediante la modificación de la evaluación de la repulsión nuclear de este último método. Para ello introduce para cada átomo unos nuevos parámetros a , b y c que describen funciones gaussianas centradas a varias distancias c que modifican el potencial entre dos átomos A y B según:

$$V_{AB} = Z_A Z_B (s_A s_A | s_B s_B) + \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}} \sum_{i=1}^4 [a_{A,i} e^{-b_{A,i}(r_{AB}-c_{A,i})^2} + a_{B,i} e^{-b_{B,i}(r_{AB}-c_{A,i})^2}] \quad [29]$$

Estos parámetros a , b y c se optimizan de forma conjunta con los mismos parámetros que usa el método MNDO y mantiene los derivados de valores experimentales para la evaluación de las integrales bielectrónicas.

En el método PM3 la parametrización se consigue por optimización simultánea de todos los parámetros que usa el formalismo NNDO y no sólo para los átomos C, H, O y N, ya que incluye, en su primera versión, los elementos Al, Si, P, S, Cl, Br y I. El tratamiento estadístico para la optimización de estos parámetros se llevó a cabo sobre un número más elevado de compuestos que la parametrización del método AM1 y proporcionó un conjunto mucho más completo de parámetros que reproduce de forma correcta las entalpías de formación de moléculas de interés biológico, compuestas por los elementos C, H, O, N y F. Actualmente incluye también parámetros para otros átomos de los períodos segundo y tercero.

La metodología semiempírica permite la optimización de la geometría de una molécula y el cálculo de su energía dentro de un medio continuo (en forma de calor de formación en condiciones estándar). De forma general, la ecuación de Schrödinger que se pretende resolver adopta la forma:

$$(H - \frac{1}{2}V)\Psi = E\Psi \quad [30]$$

En la que V es un campo de reacción general dentro de una cavidad que depende de Ψ del

sistema. Los orbitales ψ_i se pueden determinar de

$$(F_i - V)\psi_i = \epsilon_i \psi_i \quad [31]$$

donde F_i es el operador de Fock. La implementación del método del Campo de Reacción Autoconsistente¹²⁶ (Self-Continent Reaction Field SCRF) ofrece una evaluación accesible de las primeras derivadas de la energía del sistema respecto a las coordenadas atómicas. Los métodos AMSOL¹²⁷ (del paquete de cálculo semiempírico AMPAC) y COSMO¹²⁸ (integrado en el paquete de cálculo MOPAC) suponen un procedimiento mejorado con respecto al SCRF. El método COSMO (Conductor like Screening Model), genera una superficie poligonal conductora en torno al sistema molecular objeto de estudio a la distancia de van der Waals de forma que introduce un factor de corrección dependiente de la constante dieléctrica ϵ en las expresiones para la energía de apantallamiento y para su gradiente:

$$f(\epsilon) = \frac{(\epsilon - 1)}{(\epsilon + \frac{1}{2})} \quad [32]$$

3.1.5 Teoría del funcional de la densidad

Para resolver la ecuación de Schrödinger, una estrategia alternativa a los métodos que describen la estructura electrónica mediante funciones de onda polieletrónicas, como la teoría de Hartree-Fock, es usar la función de densidad electrónica $\rho(\mathbf{r})$. Esta función depende de las tres variables espaciales, x, y, z , mientras que las funciones de onda polieletrónicas requieren tres variables para cada uno de los N electrones del sistema molecular. Esta reducción en el número de variables de la función que se maneja en el procedimiento de cálculo tiene su consecuencia en una disminución del tiempo de computación para un procedimiento basado en la teoría del Funcional de la Densidad en comparación con respecto a la teoría de Hartree-Fock.

El fundamento de la teoría del funcional de la densidad se encuentra en los dos teoremas de Hohenberg y Kohn.¹²⁹ El primer teorema establece que la densidad electrónica del estado fundamental de un sistema polieletrónico en la presencia de un potencial externo viene determinada de forma única por dicho potencial. La demostración de este teorema se fundamenta en la existencia de una relación biunívoca entre la función de densidad

electrónica de una molécula en su estado fundamental y la función de onda multielectrónica en el mismo estado. Según este planteamiento, la densidad electrónica del estado fundamental es suficiente para construir el operador hamiltoniano y así calcular cualquier propiedad del estado fundamental sin necesidad de conocer la función de onda multielectrónica. El segundo teorema de Hohenberg y Kohn establece que la densidad electrónica del estado fundamental corresponde a un mínimo de la energía electrónica del sistema. Así, para una función de onda y un hamiltoniano de prueba, se puede evaluar un valor de energía que será mayor o igual al de la energía del estado fundamental real E_0 :

$$\langle \Psi_{prueba} | H_{prueba} | \Psi_{prueba} \rangle = E \geq E_0 \quad [33]$$

De este modo se justifica la posibilidad de la aplicación del principio variacional para obtener la función de densidad electrónica del estado fundamental por un procedimiento iterativo. La función de densidad electrónica se usa como argumento en un planteamiento variacional para determinar la energía directamente sin usar la función de onda. Para ello, se usa la metodología del campo autoconsistente de Kohn-Sham.¹³⁰

El funcional de la energía es la suma de cinco términos:

$$E[\rho(\mathbf{r})] = E[\rho(\mathbf{r})]_T + E[\rho(\mathbf{r})]_{Ne} + E[\rho(\mathbf{r})]_{ee} + \Delta E_T[\rho(\mathbf{r})] + \Delta E_{ee}[\rho(\mathbf{r})] \quad [34]$$

Donde los términos se refieren, respectivamente, a la energía cinética de los electrones que no interaccionan, la interacción núcleo-electrón, la repulsión culombiana electrón-electrón, la corrección de la energía cinética debido a la interacción entre los electrones y todas las correcciones de la energía de repulsión electrón-electrón. Para el tratamiento computacional de un sistema con N electrones y K núcleos, se expresa la densidad en la forma:

$$\rho = \sum_{i=1}^N \langle \chi_i | \chi_i \rangle \quad [35]$$

y el funcional de la energía toma la forma general:

$$E[\rho(\mathbf{r})] = \sum_i^N \left(\langle \chi_i | -\frac{1}{2} \nabla_i^2 | \chi_i \rangle - \langle \chi_i | \sum_k^K \frac{Z_k}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}'|} | \chi_i \rangle \right) + \sum_{i=1}^N \langle \chi_i | \frac{1}{2} \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' | \chi_i \rangle + E_{XC}[\rho(\mathbf{r})] \quad [36]$$

Los dos términos de corrección de [34] se han agrupado en un término de energía de intercambio-correlación E_{XC} . El objetivo es buscar los orbitales χ_i que minimizan la energía en [36]. Para ello se define el operador monoeléctrico de Kohn-Sham como:

$$h_i^{KS} = -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_k^K \frac{Z_k}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_k|} + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + V_{XC} \quad [37]$$

donde

$$V_{XC} = \frac{\delta E_{XC}}{\delta \rho} \quad [38]$$

Los orbitales χ_i cumplen las ecuaciones

$$h_i^{KS} \chi_i = \varepsilon_i \chi_i \quad [39]$$

y permiten la construcción de la función propia en forma de determinante de Slater. Estos orbitales de Kohn-Sham se expresan dentro de un conjunto de funciones de base ϕ y en el procedimiento de cálculo se determinan los coeficientes de orbital individual por solución de una ecuación secular análoga a la que se plantea para la teoría de Hartree-Fock, excepto que en la teoría DFT los elementos de la matriz de Fock $F_{\mu\nu}$ se sustituyen por elementos $K_{\mu\nu}$, los cuales, se definen por:

$$K_{\mu\nu} = \langle \phi_\mu | -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_k^K \frac{Z_k}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_k|} + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + V_{XC} | \phi_\nu \rangle \quad [40]$$

De la misma forma que en el método del campo autoconsistente en la teoría de Hartree-Fock, el método de cálculo requiere proporcionar una geometría inicial para el sistema objeto de estudio y una estimación inicial de la densidad mediante el conjunto de funciones de base que describen los orbitales KS para la computación de los distintos elementos de la matriz secular. La iteración, basada en el principio variacional, se llevará a cabo hasta el cumplimiento de los criterios de convergencia establecidos.

En DFT se minimiza el funcional de la energía con respecto a la densidad con la restricción de que la integral de la densidad sea el número total de electrones. En este caso, sólo la densidad electrónica tiene significado físico. A diferencia de la teoría de Hartree-Fock, no tienen significado físico ni los orbitales KS ni los valores propios asociados a estos orbitales. Ψ_{KS} es una función de onda que pertenece al conjunto de funciones cuya integral es la densidad de carga y constituye una aproximación a la función de onda exacta, por lo que se deben usar factores de escala para el cálculo de valores observables. Sin embargo, se ha demostrado que la forma, simetría y el orden energético de estos orbitales coinciden con la de los orbitales HF, por lo que los orbitales KS son significativos en estudios de reactividad química.¹³¹

Los distintos métodos DFT se diferencian en la forma con la que se define el funcional de la energía de intercambio/correlación E_{XC} . Dichos métodos se clasifican en métodos de aproximación a la densidad local (Local density approximation, LDA), métodos de corrección por gradiente (CGA) y funcionales híbridos.

3.1.5.1 Métodos locales

Los métodos LDA, solamente proporcionan valores exactos para una distribución electrónica uniforme (gas electrónico) y no son apropiados para cálculos sobre sistemas moleculares. Originalmente se basaron en la definición del funcional de la energía de intercambio E_X de Slater.¹³² Con posterioridad, se han planteado funcionales para la energía de correlación en base a soluciones distintas de la de Slater para el gas electrónico uniforme que incluyen parámetros optimizados respecto a datos experimentales, como las dos versiones del funcional de correlación de Vosko, Wilk y Nusair¹³³ (VWN y VWN V) y la versión local del funcional de Perdew¹³⁴ (Perdew Local).

3.1.5.2 Métodos no locales

Los métodos no locales o de gradiente corregido, también conocidos como aproximación de gradiente generalizado (generalized gradient approximation (CGA) mejoran la formulación del funcional de intercambio incorporando un término de corrección al funcional de intercambio local. Así, el funcional de intercambio de Becke¹³⁵ (B) incluye el funcional de intercambio de Slater y un término con un parámetro optimizado respecto a las energías de intercambio experimentales de seis gases nobles. Estos métodos plantean diversos funcionales de correlación electrónica, algunos de los cuales incluyen términos locales corregidos por el gradiente de la densidad. El funcional de Lee, Yang y Parr¹³⁶ (LYP) incluye términos locales y no locales. El funcional de correlación local de Perdew tiene dos versiones corregidas con el gradiente de la densidad: Perdew 86¹³⁷ y Perdew/Wang 91.¹³⁸

3.1.5.3 Métodos híbridos

Los funcionales híbridos de intercambio/correlación permiten el cálculo de la energía de intercambio/correlación mediante una combinación de funcionales de la energía y de la correlación electrónica locales y/o no locales E_{XC}^{DFT} , y de la energía de intercambio exacta

de la teoría de Hartree-Fock E_X^{HF} . Entre los numerosos modelos disponibles, el funcional B3LYP¹³⁹ usa funcionales locales que incluyen la polarización del espín (LSDA) y no locales (el funcional de Becke para el intercambio y el LYP para la correlación electrónica):

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1-a) E_x^{LSDA} + a E_X^{HF} + b \Delta E_x^B + (1-c) E_c^{LSDA} + c E_c^{LYP} \quad [41]$$

donde los parámetros a , b y c son 0.20, 0.72 y 0.81, respectivamente, en la versión original que se encuentra disponible en la mayoría de paquetes de química computacional. Este funcional se ha reoptimizado para mejorar la predicción de las densidades electrónicas locales que se obtienen en los cálculos QCISD en un conjunto de 16 moléculas de pequeño tamaño.¹⁴⁰

3.1.6 Cargas atómicas y teoría AIM “Atoms in Molecules” de Bader

Los cálculos sobre un sistema molecular con el método adecuado proporcionan la energía del sistema, la geometría si ésta ha sido optimizada a partir de unas coordenadas iniciales de los núcleos y la función de onda multielectrónica Ψ como determinante de Slater para el sistema molecular objeto de estudio. Una de las informaciones de mayor interés que proporciona la función de onda es la posibilidad de asignar cargas parciales a los átomos de una molécula. Aunque dicha asignación ignora el carácter ondulatorio del electrón, desde el punto de vista químico este modelo es del mayor interés para la predicción de la reactividad y de la estabilidad relativa de una molécula mediante la evaluación de las posibilidades de interacciones de tipo electrostático con otras moléculas reaccionantes y con el disolvente. Esta asignación de cargas parciales sobre los átomos puede realizarse mediante el particionamiento de la función de onda molecular con métodos como el propuesto por Mulliken, por el cual se reparten los electrones entre los átomos de acuerdo con el grado en el que diferentes funciones de base de orbitales atómicos contribuyen a la función de onda. La carga atómica parcial de un átomo k según el análisis de población electrónica de Mulliken¹⁴¹ se define como

$$q_k = Z_k - N_k \quad [42]$$

donde Z_k es la carga del núcleo y N_k se calcula según

$$N_k = \sum_j^N \left(\sum_{r \in k} c_{jr}^2 + \sum_{r \in k, s \notin k} c_{jr} c_{js} S_{rs} \right) \quad [43]$$

para un sistema de N electrones y K núcleos, r y s son los índices de la función de base del orbital atómico φ , c_{jr} es el coeficiente de la función de base r en el orbital molecular j y S es el elemento de la matriz de solapamiento. Esta aproximación al particionamiento de la

carga total entre los núcleos que forman la molécula fue mejorada por Lödwin¹⁴² transformando las funciones de base que representan los orbitales atómicos φ en un conjunto de funciones de base ortonormal χ mediante

$$\chi_r = \sum_s S_{rs}^{-1/2} \varphi_s \quad [44]$$

y expresando los orbitales moleculares ϕ mediante este nuevo conjunto de bases ortonormal. Estos esquemas de particionamiento son muy dependientes del conjunto de funciones de base usado para la descripción de la función de onda y comparten el inconveniente de que en la elección del suconjunto de orbitales ocupados existe la posibilidad de que no se tengan en cuenta otros subconjuntos que tengan una contribución significativa.

Una aproximación distinta consiste en usar la función densidad de carga $\rho(\mathbf{r})$ determinada por todos los orbitales ocupados de la molécula. La teoría de átomos en moléculas (Atoms in molecules, AIM) de Bader¹⁴³ establece que la descripción de la topología del campo escalar $\rho(\mathbf{r})$ se corresponde con una descripción del enlace químico y de las propiedades moleculares. Para la asignación de las cargas parciales sobre los átomos, el particionamiento del espacio de la molécula correspondiente a los núcleos se define de acuerdo con el concepto de sumidero atómico (atomic basin) o superficie de flujo cero, que es cruzada por los vectores gradiente de la función densidad de carga que tienen su origen en el propio núcleo. Así la molécula se divide en volúmenes Ω_j delimitados por superficies S en las que se cumple la condición

$$\nabla \rho(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{n}(\mathbf{r}) = 0 \quad [45]$$

para todos los puntos \mathbf{r} de S donde \mathbf{n} es la normal a S en \mathbf{r} . Puede demostrarse que este particionamiento es único cuando cada uno de los volúmenes contiene un núcleo atómico. De forma general, el valor de un observable \hat{A} sobre Ω se define como

$$A(\Omega) \equiv \langle \hat{A} \rangle = \int_{\Omega} \rho_A(\mathbf{r}) d\tau \quad [46]$$

donde

$$\rho_A(\mathbf{r}) = \frac{N}{2} \int [\phi^* \hat{A} \phi + (\hat{A} \phi)^* \phi] d\tau', \quad [47]$$

para un sistema con N electrones y τ' son sus coordenadas de posición y espín. Para estos volúmenes definidos por las superficies de flujo cero, el valor molecular de un observable se

define por la suma de sus contribuciones de cada Ω_j :

$$\langle \hat{A} \rangle = \sum_j A(\Omega_j) \quad [48]$$

Así, según este planteamiento, la integración de la función de densidad electrónica según este particionamiento de la molécula proporciona el valor de la carga electrónica a partir de la cual se obtiene la carga parcial atómica por diferencia con la carga nuclear. Debido a la necesidad de llevar a cabo un estudio de la topología de la función densidad de carga, este procedimiento es más costoso desde el punto de vista computacional que el análisis de población electrónica de Mulliken y Lödwin.

La topología de un campo escalar se describe en términos de sus puntos críticos, que son las posiciones que en los que el gradiente de este campo es cero.

$$\nabla \rho(\mathbf{r}) = 0 \quad [49]$$

Para un espacio tridimensional hay cuatro clases de puntos críticos: un mínimo local, un máximo local y dos tipos de punto de ensilladura. La notación de estos puntos críticos se lleva a cabo con un índice, que es el número de curvaturas positivas menos el número de curvaturas negativas. Un mínimo local tiene la curvatura positiva en las tres direcciones ortogonales y es del tipo (3,3) -el primer número es el número de dimensiones del espacio y el segundo número el número neto de curvaturas positivas-. Un máximo local es del tipo (3,-3), ya que las tres curvaturas son negativas. Un punto de ensilladura con dos de las tres curvaturas negativas es del tipo (3,-1) mientras que si solamente hay una curvatura negativa es del tipo (3,1). Bader demostró que es posible correlacionar las propiedades topológicas de la densidad de carga con las propiedades del enlace de las moléculas.

Los máximos (3,-3) coinciden con los núcleos atómicos, de forma que la distribución de carga electrónica en la molécula hace que todas las trayectorias del campo escalar de la densidad de carga terminan en el núcleo vecino.

Los puntos (3,-1) se encuentran entre los núcleos de los átomos enlazados, por lo que su presencia se establece como condición para la existencia de un enlace y, por ello, el nombre de punto crítico de enlace (bond critical point BCP). La existencia del enlace se define al calcular a partir de éste una línea de puntos con valores máximos de la densidad electrónica dirigida hacia cada uno de los núcleos, llamada camino o trayectoria de enlace (bond path). Si las fuerzas que resultan de la acumulación de la carga en la zona de enlace son

suficientes para superar las fuerzas de antienlace sobre un rango de separaciones para proporcionar una configuración de equilibrio, luego el estado es enlazado y la línea de interacción atómica así construida es el camino de enlace. El conjunto de trayectorias de enlace en una molécula define el gráfico molecular y justifica la estructura de la molécula.

Si los núcleos en una molécula forman un anillo, se puede localizar un punto crítico de anillo en su interior en el cual la densidad de carga es un mínimo. Estos puntos son del tipo (3,+1) o puntos críticos de anillo (RCP). A partir de los RCP se establece también una línea de puntos con valores máximos de la densidad de carga hacia los BCP o camino anillo-enlace (ring-bond path). Dichos caminos o trayectorias permiten visualizar la contribución de cada uno de los enlaces a la formación de sistemas cíclicos.

Las moléculas formadas por un cierto número de estructuras cíclicas cerradas contienen puntos críticos de la densidad de carga denominados puntos críticos de caja (cage critical point o CCP) correspondientes a mínimos locales (3,3).

El carácter π del enlace puede establecerse mediante la comparación de las dos primeras curvaturas o valores propios de la matriz hessiana en un BCP (elipticidad). Para un BCP (3,-1) los dos primeros valores propios del hessiano λ_1 y λ_2 son negativos mientras que el tercero λ_3 es positivo. La ausencia de carácter π corresponde a una situación en la que $\lambda_1 \approx \lambda_2$, de forma que el enlace presenta una simetría cilíndrica. Sin embargo, si la carga se acumula de forma preferente en un plano dado a lo largo del camino de enlace $\lambda_1 > \lambda_2$ corresponde a un carácter π .

El valor de la densidad de carga ρ_b para un punto crítico de un enlace C-C puede ajustarse a una expresión que la relaciona con el orden de enlace n para el conjunto de funciones de base 6-31G*.¹⁴⁴

$$n = e^{6.458(\rho_b - 0.2520)} \quad [50]$$

La evaluación del gradiente de la función de onda $\nabla^2 \rho(x, y, z)$ en los puntos críticos de enlace proporciona un criterio adicional a los anteriores para la caracterización del enlace entre dos átomos. Así, los enlaces de carácter covalente presentan valores negativos del gradiente de la función de densidad con valor absoluto pequeños, mientras que el carácter iónico del enlace está asociado a valores positivos y de valor absoluto mayores que los anteriores para $\nabla^2 \rho(x, y, z)$ evaluado en el BCP.

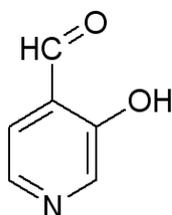
La topología de la función gradiente de la densidad de carga proporciona información sobre la reactividad química, mediante la identificación de un centro como nucleófilo o bien como electrófilo. Un centro nucleófilo se identifica como un punto con una concentración local de densidad electrónica alta y con un máximo de $\nabla^2\rho(x,y,z)$ evaluado en dicho punto. En cambio, un punto con carácter electrófilo tiene una baja concentración local de densidad electrónica y presenta un mínimo de la función laplaciana de la densidad de carga evaluada en este punto. La densidad de energía potencial tiene signo negativo en todos los puntos del espacio mientras que el signo de la densidad de energía cinética es positiva. Por ello, el signo de la laplaciana de la densidad de carga determina cual de estas dos contribuciones a la energía total se encuentra en exceso sobre la proporción del virial 2:1

$$V(\vec{r})+2G(\vec{r})=0 \quad [51]$$

3.2 Modelos de PLP

Los elevados tiempos de computación que se necesitan para moléculas complejas como aquellas cuya reactividad pretende estudiarse, hace necesario que se usen compuestos análogos del PLP y de los aminoácidos para formar los complejos moleculares sobre los que se realizarán los cálculos.

Así se ha escogido el 3-hidroxi-4-pirinaldehído (**8**) como molécula análoga al PLP en los complejos moleculares sobre los que se han realizado los cálculos mecano-cuánticos para establecer el mecanismo de las reacciones de la formación de la base de Schiff del PLP con aminas y de la transiminación de dicha base de Schiff con una molécula de aminoácido.



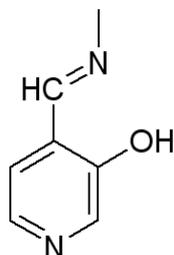
8

Por su parte, la amina ha sido el reactivo usado para simular el papel del grupo amino libre del aminoácido en dichos complejos moleculares. Los compuestos análogos que han sido usados responden no sólo a la intención de disponer de sistemas reaccionantes que

requieran un tiempo de cálculo razonable, sino también a hechos conocidos por estudios experimentales sobre este tipo de sistemas.

Así, por una parte, se conoce que los grupos 2-metil y 5-fosfato que forman parte del PLP y que no aparecen en el compuesto modelo **8**, sirven para anclar el cofactor al lugar activo de la enzima¹⁴⁵, por lo que no intervienen de forma directa en la reactividad considerada. Se ha demostrado, además, que estos sustituyentes pueden ser cambiados por una gran variedad de grupos sin que se modifique sustancialmente la funcionalidad del cofactor. Por otra parte, es un hecho conocido que la formación de la base de Schiff entre el PLP y un aminoácido requiere que el grupo amino se encuentre en forma de base libre.¹⁴⁶

Para el estudio de la transiminación, se ha adoptado como modelo el 4-metiliminometilpiridin-3-ol (**9**). Este compuesto es la base de Schiff que resulta de la condensación del modelo **8** y la metilamina. La transiminación se lleva a cabo con una segunda molécula de metilamina.



9

En ambos mecanismos estudiados se produce un ataque nucleófilo del grupo amino sobre un carbono (carbonílico en el caso de la formación de la base de Schiff e imínico para la reacción de transiminación). Por este motivo en el estudio semiempírico en fase gas del mecanismo de ambas reacciones se han incluido en el complejo molecular moléculas de agua explícitas. En estudios teóricos de reactividad sobre ataques nucleófilos en ausencia de disolvente, se ha descrito que la aproximación del nucleófilo se lleva a cabo sin ninguna barrera potencial y la energía siempre disminuye hasta que se llega a un intermedio tetraédrico.¹⁴⁷⁻¹⁵⁰

3.3 Metodología de cálculo

3.3.1 Cálculos semiempíricos

En una primera aproximación, el mecanismo de las reacciones consideradas ha sido establecido desde el punto de vista teórico mediante cálculos mecano-cuánticos usando el hamiltoniano semiempírico PM3^{124,125}, incluido en los conjuntos de programas AMPAC¹⁵¹ y MOPAC,¹⁵² que se han llevado a cabo en un ordenador Silicon Graphics Origin 200. El algoritmo utilizado para la optimización de la geometría fue el seguimiento de vector propio (EF) mientras que para los estados de transición se llevaron a cabo cálculos de coordenadas de reacción para la localización de los posibles puntos de ensilladura que luego se optimizaron con la rutina EF.¹⁵³ El criterio para la finalización de las optimizaciones se estableció mediante un incremento de 10 veces de los requisitos de convergencia electrónicos y geométricos establecidos por defecto.

Una vez optimizadas, todas las estructuras fueron caracterizadas como mínimos locales (intermedios de reacción) o puntos de ensilladura de orden 1 (estados de transición) mediante el cálculo de la matriz hessiana y su posterior diagonalización, lo cual proporciona las constantes de fuerza y las frecuencias de vibración correspondientes para el sistema molecular. El signo positivo de todas las constantes de fuerza permitió caracterizar los mínimos locales mientras que la presencia de una única constante de fuerza negativa correspondiente a una frecuencia imaginaria definió de forma unívoca los estados de transición. Sobre cada uno de ellos se realizaron cálculos de coordenada interna de reacción (IRC)¹⁵⁴ siguiendo el vector de transición correspondiente a la frecuencia de vibración negativa para verificar si cada uno de los estados de transición se encontraban entre los intermedios anteriores y posteriores, respectivamente a lo largo del camino de la reacción.

El uso de métodos semiempíricos, especialmente para los puntos de ensilladura o estados de transición, exige que los resultados sean considerados con cierta cautela debido a que dichos métodos únicamente están parametrizados para moléculas conocidas que forman mínimos locales en la hipersuperficie de energía potencial. Sin embargo, su rapidez de cálculo en ordenadores de capacidad media permite, por una parte, disponer de resultados preliminares para el estudio ulterior mediante métodos *ab initio* o DFT y, por otra parte, su aplicación a sistemas con un elevado número de centros, en particular, para complejos moleculares que cuentan con una descripción de la solvatación mediante la inclusión de un

número elevado de moléculas de disolvente explícitas en torno al soluto.

El efecto de la solvatación acuosa para las reacciones consideradas sobre el sistema reaccionante, ha podido ser tenido en cuenta mediante dos métodos de solvatación: la solvatación en continuo y la aproximación supermolecular. El modelo de solvatación en continuo consiste en el recálculo del complejo molecular en fase gas, previamente optimizado, mediante el hamiltoniano PM3 con el método COSMO.^{128,155-157} Dicho método computa el valor de la energía del sistema molecular en un medio continuo que simula la presencia del disolvente. Por su parte, la aproximación supermolecular consiste en llevar a cabo una reoptimización completa y su posterior caracterización mediante análisis vibracional de un complejo molecular que consiste en las estructuras en fase gas, previamente optimizadas, rodeadas de una esfera de solvatación de unos 8 Å de radio, lo que para el sistema considerado corresponde a 30 moléculas de agua explícitas.

3.3.2 Cálculos DFT

El uso de métodos de cálculo basados en la Teoría del Funcional de la Densidad con funcionales híbridos que incorporan un término de funcional de energía exacto, en particular B3LYP, permite la obtención de resultados que incluyen la correlación electrónica comparables a la calidad de los cálculos post-Hartree-Fock (MP2) con un coste computacional significativamente menor que éstos últimos. Es especialmente interesante la posibilidad de desarrollar metodologías de cálculo que permitan la descripción de enlaces de hidrógeno, la determinación de la geometría de compuestos de interés biológico y el tratamiento de barreras energéticas mediante la identificación de estados de transición de reacciones enzimáticas.^{158,159}

Los cálculos DFT se han realizado usando el conjunto de programas Gaussian 94¹⁶⁰ en un ordenador Silicon Graphics Octane. El conjunto de bases que se ha usado para estos cálculos ha sido el 6-31+G*. Se han incluido funciones polarizadas y difusas para los átomos pesados. Las funciones de polarización son importantes para la reproducción de los enlaces químicos. Por otra parte, aumentar los conjuntos de bases con funciones difusas permite la descripción correcta de aniones y enlaces débiles, por lo que es una metodología de interés para los enlaces de hidrógeno.¹⁶¹ Aunque son disponibles conjuntos de bases más completas, el coste computacional que supone su uso no se traduce en una mejoría significativa de los resultados, como ha sido constatado en estudios comparativos con conjuntos de bases hasta 6-311++G

(d,p).¹⁶²⁻¹⁶⁴

Se usaron cálculos de coordenada de reacción con optimización completa de todos los parámetros geométricos hasta el cumplimiento de los criterios de convergencia en el punto estacionario deseado (mínimo local o punto de ensilladura). Sobre estas estructuras se llevaron a cabo cálculos de análisis vibracional para su caracterización como mínimos locales, con todas las frecuencias vibracionales positivas, o como puntos de ensilladura, con una única frecuencia imaginaria. La caracterización de cada uno de estos puntos estacionarios es el primer paso para su asignación como intermedios o estados de transición a lo largo del camino de reacción, respectivamente. En una segunda fase, se ha llevado a cabo, para cada una de las estructuras supuestamente correspondientes a un estado de transición, un cálculo de coordenada de reacción interna (IRC) a lo largo del vector de transición definido por el modo de vibración de la frecuencia imaginaria para confirmar que dicha estructura de transición conecta en cada uno de los sentidos con sendos mínimos, lo cual permite su asignación como intermedios de la reacción.

3.3.3 Análisis de la topología de la densidad de carga

Las funciones de onda obtenidas con el cálculo DFT (B3LYP/6-31+G*) para cada una de las estructuras permiten la realización de un estudio de la topología de la función densidad de carga $\rho(x, y, z)$ y de su laplaciana mediante la aplicación de la Teoría de Bader. Dicho estudio se ha llevado a cabo en un ordenador tipo PC mediante el programa AIM2000.¹⁶⁵

Para cada estructura se han localizado los puntos críticos de enlace, de anillo y de caja; y se han calculado las trayectorias de enlace entre átomos y desde éstos a los puntos críticos de anillo. Ello ha permitido la asignación de los enlaces y la identificación de las interacciones por puentes de hidrógeno en el sistema molecular. Los distintos enlaces se han caracterizado mediante la determinación de la elipticidad y el cálculo del orden de enlace según los criterios que se describen más arriba. Para las cargas atómicas, el particionamiento del sistema molecular se ha realizado para la superficie de flujo cero que encierra el núcleo para el cual es de interés la asignación de una carga atómica. La localización de los puntos críticos de la laplaciana de la densidad de carga ha proporcionado el criterio para la localización de los puntos susceptibles de ataque nucleófilo.

4 Artículo 1. “Theoretical studies on Schiff base formation of vitamin b6 analogues” J. Mol Struct (Theochem) 2002, 29, 577

5 Artículo 2. “Theoretical studies on transimination of vitamin b6 analogs” Int. J. Quantum Chem 2002, 89, 48

6 Artículo 3. “DFT Studies on Schiff Base Formation of Vitamin B6 Analogues” J. Phys. Chem. A. 2003, 107, 9409

7 Artículo 4. “DFT studies on transamination of vitamin b6 analogues through geminal diamine formation” J. Phys. Chem. B 2004, 108, 11709

8 Discusión general.

El estudio teórico que se ha llevado a cabo ofrece una descripción del mecanismo de reacción de dos reacciones de gran importancia de la vitamina B6, cofactor de un amplio conjunto de enzimas que, de forma general, dirigen el metabolismo de los aminoácidos. La primera reacción es la formación de una base de Schiff entre un compuesto modelo del fosfato de piridoxal y una amina. La segunda reacción consiste en la transimación de una base de Schiff con una segunda molécula de amina para formar una nueva base de Schiff y liberar la molécula de amina que formaba parte de la base de Schiff original. Esta última reacción permite la incorporación del substrato aminoácido en el centro activo de las enzimas que dependen de la vitamina B6 como cofactor, y su liberación al medio si se considera el proceso inverso.

De ambas reacciones, se dispone en la literatura de algunas evidencias experimentales sobre los principales intermedios de reacción y de los procesos que corresponden al paso limitante de cada reacción. Los cálculos que, en este estudio, se han realizado sobre los compuestos modelo en un entorno no enzimático han permitido la identificación, desde un punto de vista teórico, de los intermedios de reacción y de los estados de transición que conectan dichos intermedios.

Para cada una de las reacciones estudiadas se ha usado, en primer lugar una aproximación semiempírica mediante el uso del hamiltoniano PM3.^{124,125} Los cálculos llevados a cabo con esta metodología han permitido hallar los intermedios de reacción y los estados de transición para el complejo molecular modelo en fase gas y en disolución acuosa, mediante dos modelizaciones distintas: en continuo y como solvatación explícita. En el método del continuo el sistema objeto de estudio se envuelve de una superficie que genera un entorno con el valor de la constante dieléctrica del agua. En la aproximación de la solvatación explícita, se optimiza el conjunto formado por el complejo molecular rodeado de una caja de 30 moléculas

de agua.

En segundo lugar, se ha usado un procedimiento de cálculo fundamentado en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) para obtener, en fase gas, las estructuras y las energías de los complejos moleculares modelo correspondientes a los intermedios de reacción y a los estados de transición de ambas reacciones. Las funciones de onda obtenidas mediante dicho método han sido usadas para llevar a cabo un estudio de la topología de la función de densidad de carga en estructuras seleccionadas, con el objeto de obtener una descripción adecuada de las características de ciertos enlaces clave para el desarrollo de la reacción.

Formación de la base de Schiff

En la reacción de la formación de la base de Schiff se identifican tres etapas: formación de la carbinolamina, deshidratación y formación de la imina.

El complejo molecular modelo escogido está formado por una molécula de metilamina, el 3-hidroxi-4-pirinaldehído como molécula modelo de 5'-fosfato de piridoxal y una molécula de agua.

En estas condiciones, el estudio mediante la metodología PM3 revela que el ataque nucleófilo de la amina sobre el carbono carbonílico se lleva a cabo una vez se ha formado una especie zwitteriónica tras la ionización del grupo fenol mediante la transferencia del hidrógeno de este grupo al oxígeno carbonílico. Esta transferencia interna de hidrógeno (correspondiente a las estructuras 1→2→3 en la figura 3) se lleva a cabo mientras la molécula de agua establece un puente de hidrógeno con el mismo oxígeno del grupo carbonilo, y corresponde a la segunda barrera energética en todo el perfil de la reacción.

La consideración del efecto de la solvatación en dicho proceso no altera la geometría de las estructuras. Sin embargo, sí se observa en el perfil energético de la reacción una disminución de las energías relativas con respecto a las estructuras en fase gas. Estas diferencias son más acusadas en el modelo de solvatación explícita, en el que la barrera energética de las transferencias de hidrógeno son significativamente más bajas que las correspondientes en la modelización de solvatación en continuo. Esta estabilización de las especies zwitteriónicas es de esperar en un medio acuoso y, en este caso, se reproduce mejor en el modelo de solvatación explícita que en el modelo de solvatación en continuo. El intermedio de reacción más estable es la carbinolamina (estructura 7 en la figura 3), un

resultado que coincide con las conclusiones de los estudios experimentales.³⁸⁻⁴⁰ En disolución acuosa, según el modelo de solvatación explícita, la especie zwitteriónica de la carbinolamina (estructura 5 en la figura 3), con el grupo fenol en forma de fenolato y la amina en forma de catión amonio, es más estable que la forma no zwitteriónica.

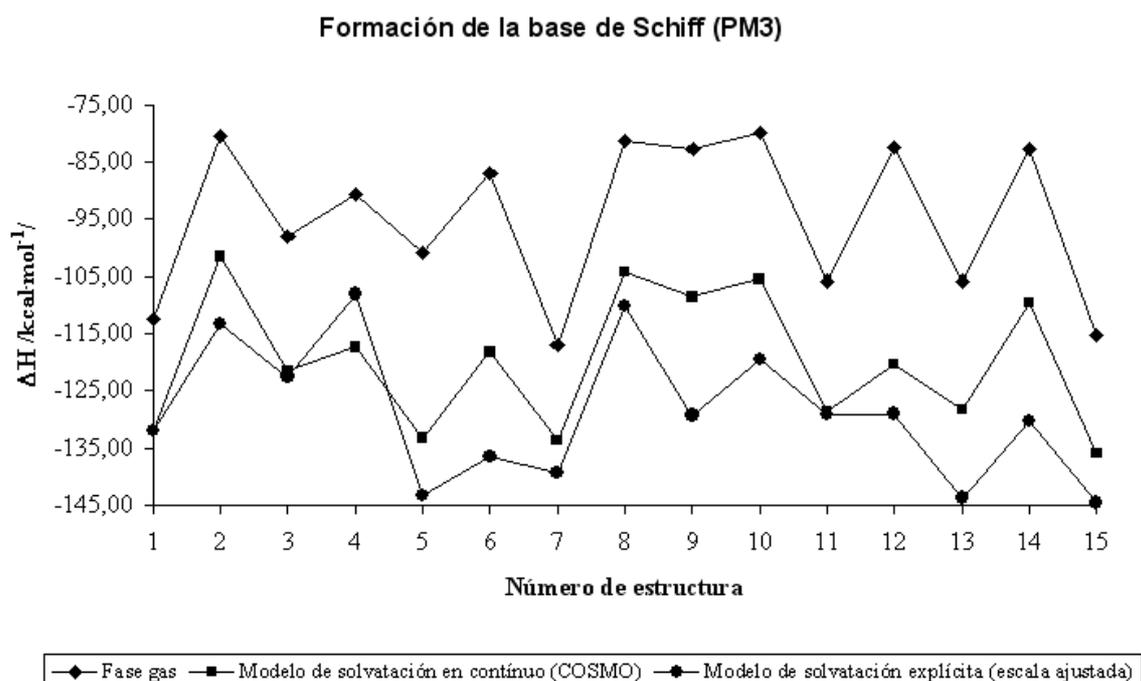


Figura 3

Perfil energético semiempírico de la reacción de la formación de la base de Schiff. La escala de las energías del modelo de solvatación explícita se ha desplazado para su comparación con el modelo de solvatación en continuo. La descripción de las estructuras se encuentra en el artículo número 1.

Con esta metodología semiempírica la deshidratación de la carbinolamina es un proceso con dos pasos: una transferencia interna de hidrógeno del grupo fenol al grupo alcohol enlazado al nitrógeno para formar un grupo hidronio (7→8→9 en la figura 3), y la posterior salida de una molécula de agua (9→10→11 en la figura 3). De acuerdo con la evidencia experimental, la deshidratación es el paso limitante de la reacción. Se observa que la magnitud de la barrera energética es menor en disolución acuosa, especialmente si ésta se

modeliza mediante la solvatación explícita. Tras la superación de una barrera rotacional (11→12→13 en la figura 3) (solamente significativa en fase gas y de pequeña magnitud en disolución acuosa) y una nueva transferencia de hidrógeno intramolecular se forma la base de Schiff (15 en la figura 3). En disolución acuosa, ambos modelos (la solvatación en continuo y la solvatación explícita) predicen similares energías relativas de las formas zwitteriónicas y no zwitteriónicas de ambas especies. La molécula del complejo molecular mantiene puentes de hidrógeno en torno a dichas transferencias de hidrógeno. Estos resultados están de acuerdo con la constatación experimental de que la composición del disolvente juega un papel muy importante en el proceso, dado que las formas zwitteriónicas reaccionan más rápidamente que las neutras al aumentar la polaridad del disolvente.⁴⁸⁻⁵¹ En el estudio semiempírico, este hecho se ha evidenciado con el hallazgo de barreras energéticas más bajas para el perfil de la reacción en medio acuoso.

La aplicación de la metodología DFT a la reacción de formación de la base de Schiff permite una evaluación más rigurosa de las energías relativas de los estados de transición que los obtenidos por la metodología semiempírica. En este estudio, las tres etapas del proceso (formación de la carbinolamina, deshidratación y formación de la imina) fueron identificadas del mismo modo que en el estudio basado en la metodología semiempírica. La disponibilidad de las funciones de onda DFT de las estructuras de los complejos moleculares optimizados permite llevar a cabo un estudio de la topología de densidad de carga para la identificación de interacciones interatómicas con distancias superiores a los estándares de enlace y la caracterización de enlaces seleccionados.

La formación de la base de Schiff se inicia con una transferencia de hidrógeno para formar un intermedio zwitteriónico a la vez que se lleva a cabo el ataque nucleófilo de la amina sobre el carbono carbonílico. Una vez el producto de dicho ataque nucleófilo se ha formado (estructura 3 en la figura 4), la evolución hacia la carbinolamina (estructura 5 en la figura 4) sigue un curso diferente al previsto por la metodología semiempírica. Ahora se forma un estado de transición concertado (estructura 4 en la figura 4) en el que la molécula de agua intercambia uno de sus hidrógenos para facilitar la desprotonación del grupo imonio y regenerar el grupo fenol. Esta intervención de la molécula de agua como reactivo, facilitando la transferencia remota de átomos de hidrógeno de forma intramolecular proporciona un papel especial a la presencia de moléculas de agua de los complejos moleculares considerados.

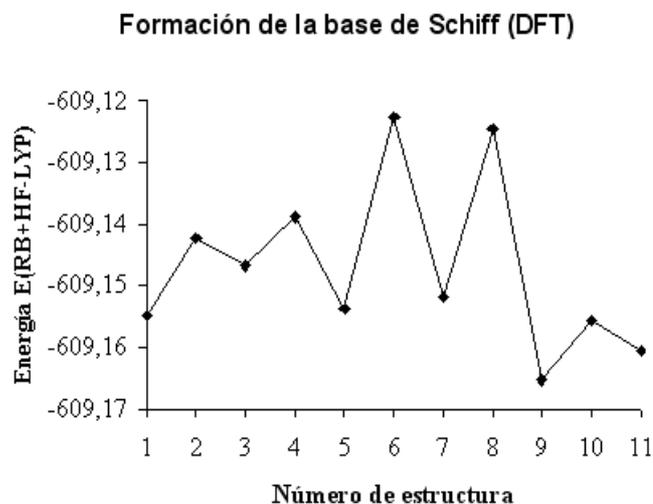


Figura 4

Perfil energético DFT de la reacción de formación de la base de Schiff. Las energías se expresan en unidades atómicas. La descripción de las estructuras se encuentra en el artículo número 3.

La etapa de la deshidratación de la carbinolamina para la formación de la base de Schiff (estructuras 5→6→7 en la figura 4) es, del mismo modo que fue descrito en el estudio semiempírico, el paso limitante de la reacción, aunque con una barrera energética ($19,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) claramente inferior a la diferencia de entalpías de formación del estudio semiempírico ($35,6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) y más cercano a los valores experimentales que se han detectado en el rango de pH 7,9 - 8,0 ($12,9 - 6,7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$).¹⁶⁶

El estudio de la topología de la densidad de carga permite evaluar la polaridad y el carácter π de los enlaces y confirma la naturaleza quinoide de intermedios de reacción, de acuerdo con la observación de intermedios de estas características en estudios de espectroscopía de absorción en la formación de bases de Schiff.

En la metodología DFT, la energía del tautómero zwitteriónico enolimina (estructura 9 en la figura 4), producido a partir de la transferencia de hidrógeno que se lleva a cabo sobre el producto de la deshidratación, tiene una energía inferior a la especie no zwitteriónica (estructura 11 en la figura 4). Aunque el complejo molecular se estudia en fase gas, dicho resultado es una consecuencia de la presencia de dos moléculas de agua: una obtenida después

del paso de la deshidratación y otra presente inicialmente como molécula de agua accesoria. El uso de la metodología DFT, en definitiva, confirma los estados de transición y los intermedios principales de la reacción para el proceso global descritos en el estudio PM3, está de acuerdo con la evidencia experimental y proporciona a la molécula de agua el papel de reactivo explícito, mediante la formación de un estado de transición concertado en la etapa de formación de la carbinolamina.

Transiminación

La transiminación de una base de Schiff con una segunda molécula de amina cuenta también con una molécula de agua en el complejo molecular modelo. El estudio con metodología semiempírica se ha llevado a cabo con el complejo molecular en fase gas y en fase acuosa con el modelo de solvatación en continuo y con solvatación explícita. La transiminación es un proceso simétrico si la amina reaccionante es la misma que la que ha formado la base de Schiff con el compuesto modelo del fosfato de piridoxal. Del perfil de reacción obtenido en dicho estudio se concluye que el principal intermedio de esta reacción es una diamina geminal, lo que está de acuerdo con la evidencia experimental descrita en la literatura.^{2,73,74}

El mecanismo de la transiminación presenta similitudes con el de la formación de la base de Schiff. La primera etapa de la reacción consiste en la transferencia intramolecular del hidrógeno del grupo fenol hacia el nitrógeno imínico (estructuras 1→2→3 en la figura 5). Sobre este tautómero se lleva a cabo el ataque nucleófilo de la amina sobre el carbono imínico, tras lo cual una sucesión de nuevas transferencias de hidrógeno llevarán a la formación de la amina geminal (estructura 9 en la figura 5).

El estudio semiempírico proporciona un perfil de reacción complejo con dos alternativas posibles para la formación de la carbinolamina, cada una de ellas con cuatro intermedios de reacción con sus correspondientes estados de transición. La primera posibilidad, una vez se ha llevado a cabo la formación del aducto resultado del ataque nucleófilo, es la intervención de la molécula de agua que forma del complejo molecular como medio para la transferencia del hidrógeno de la amina hacia el grupo fenol en dos etapas. La alternativa es la transferencia directa de dicho hidrógeno, lo que implica una deformación de la estructura planar del anillo de piridina. En ambas alternativas, la formación de la especie zwitteriónica de la base de Schiff, correspondiente al tautómero enolimina, tienen una misma barrera rotacional. A partir

de este intermedio, el proceso para la formación de la nueva base de Schiff con la nueva molécula de amina es un proceso inverso al inicial y corresponde a la etapa determinante de la reacción.

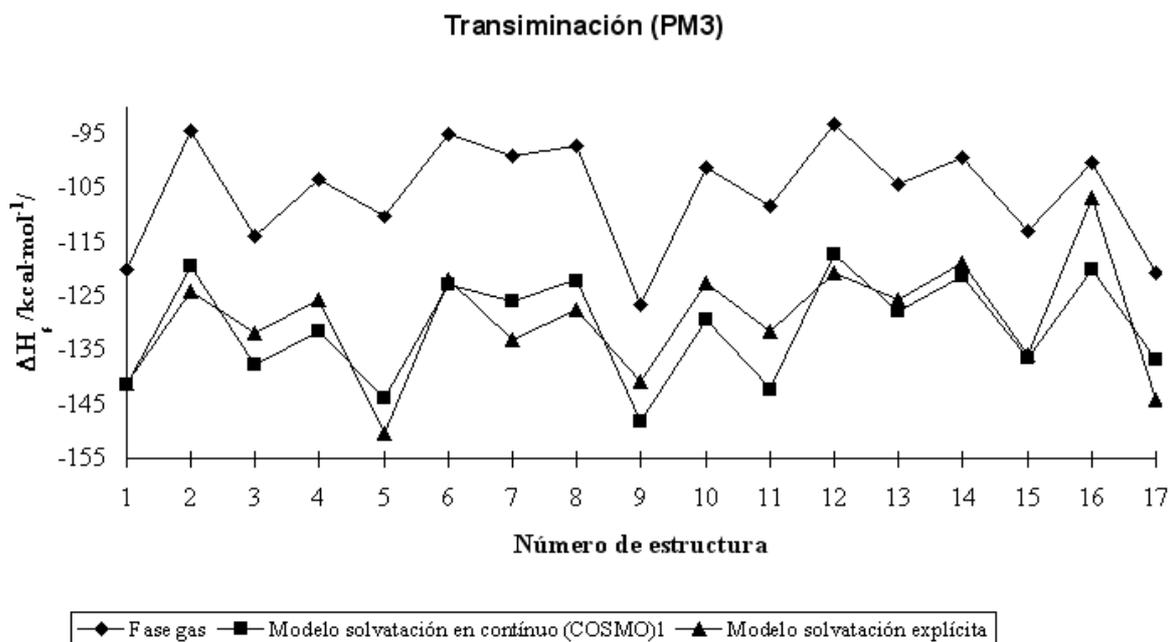


Figura 5

Perfil energético PM3 de la reacción de transiminación. La descripción de las estructuras se encuentra en el artículo número 2.

Cuando se considera el estado solvatado se observa una disminución de la energía relativa de las especies zwitteriónicas, que es más acusada para el modelo de solvatación explícita, lo cual produce un incremento, en relación con la fase gas, de las barreras energéticas principales. Esta diferencia de energías relativas observada para este estudio semiempírico tiene su constatación experimental en la dependencia de la velocidad de reacción con la polaridad del disolvente.⁷⁴

El estudio DFT de la transiminación confirma la intervención de la molécula de agua como un verdadero reactivo al identificar un estado de transición concertado para la transferencia del hidrógeno del grupo amonio en el aducto hacia el grupo fenolato.

La adición de la amina (o su eliminación para el proceso inverso) es la etapa determinante de la reacción. Ésta se lleva a cabo mediante la formación de este estado de transición concertado (estructura 6 en la figura 6) en el que la molécula de agua transfiere al grupo fenolato uno de sus hidrógenos, mientras recibe uno de los hidrógenos del grupo amino que ataca nucleofílicamente el carbono del grupo imino. Esta transferencia simultánea de hidrógeno permite la formación de la diamina geminal (estructura 7 en la figura 6), el principal intermedio de la reacción. La posibilidad de este intercambio de átomos de hidrógeno, en el que media una molécula de agua, había sido sugerida por Toney como resultado de estudios sobre coordenadas de reacción usando metodología semiempírica.⁷ En entorno enzimático, se ha constatado el intercambio de átomos de deuterio en substratos con átomos de hidrógeno del disolvente.⁵³ En el presente estudio no enzimático se describe la disponibilidad de una molécula de agua en el complejo molecular formado por la diamina geminal lo que permite el acceso a la eliminación de la amina original y a la generación de una nueva base de Schiff.

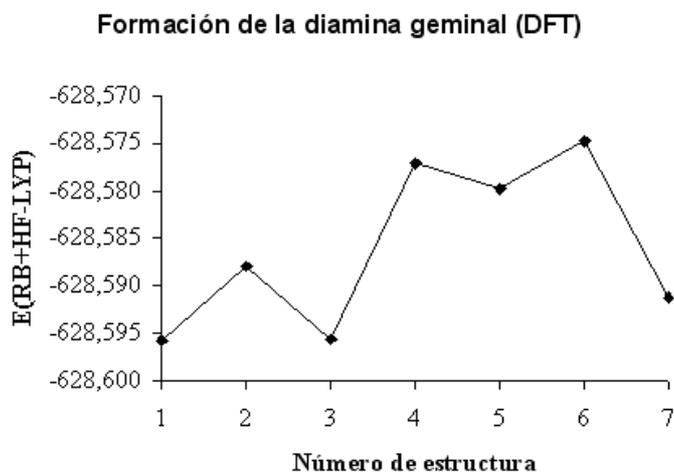


Figura 6

Perfil energético de la formación de la diamina geminal en la reacción de transiminación. La energía se expresa en unidades atómicas. La descripción de las estructuras se encuentra en el artículo número 4.

El perfil de la reacción de transiminación obtenido por metodología DFT reduce la barrera energética para la formación de la especie zwitteriónica, que es significativamente menor que

la que se obtiene en el cálculo PM3. El proceso global de formación de la diamina geminal tiene una barrera energética de $13,14 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, mientras que la metodología semiempírica ofrece una diferencia de entalpías de formación de $22,87 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. El estudio de la topología de la densidad de carga de las funciones de onda DFT permite la caracterización de especies intermedias de tipo quinonoide y la identificación en el complejo molecular de interacciones previas entre la amina y la base de Schiff a distancias interatómicas superiores a las distancias estándar.

Para la formación de la base de Schiff y la formación de la diamina geminal en la reacción de transiminación, el anillo de piridoxal mantiene sus parámetros geométricos constantes a lo largo del camino de reacción. De forma general, el progreso de la reacción para ambos procesos se fundamenta en la capacidad del complejo molecular para formar interacciones no covalentes asistidas por puentes de hidrógeno. La formación de múltiples puentes de hidrógeno entre los reactivos que forman dicho complejo molecular, incluyendo una molécula de agua, se pone en evidencia con la localización de los puntos críticos de enlace correspondientes al estudio de la topología de la densidad de carga para cada una de las estructuras. Las estructuras más estables, correspondientes a los intermedios principales de la reacción, presentan interacciones del tipo puente de hidrógeno en la que la molécula de agua queda integrada en el complejo molecular. En las estructuras de transición, la disposición de la molécula de agua permite la orientación adecuada de los reactivos. Para cada uno de los procesos estudiados, en una de las estructuras de transición la molécula de agua actúa como un verdadero reactivo, de forma que uno de sus hidrógenos se intercambia de forma concertada con el del substrato del piridoxal.

La disponibilidad de agua en el medio biológico en el que lleva a cabo su función la vitamina B6 y la localización de moléculas de agua de cristalización en las estructuras de las proteínas dependientes de este cofactor, además de los estudios ya citados de la dependencia de la actividad de modelos de vitamina B6 del grado de la polaridad y del pH de la disolución, sugieren un papel importante del agua más allá de su papel como disolvente, el cual ha sido descrito con detalle para dos procesos genéricos en todas las reacciones catalizadas por enzimas dependientes de la vitamina B6: la formación de la base de Schiff y la transiminación.

9 Referencias

- ¹ EC, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- ² P. Christen and D.E. Metzler. *Transaminases*; John Wiley: New York (1985)
- ³ T.L. Nero, M. N. Iskander, M. G. Wong, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 431 (1993).
- ⁴ G.S.M. Kiruba, Ming Wah Wong, *J. Org. Chem.* **68**, 2874 (2003)
- ⁵ G. Alagona, C. Ghio, A. Agresti, *Computers and Chemistry* **24**, 311 (2000).
- ⁶ M.J. Ondrechen, J.M. Briggs, A. McCammon, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2830 (2001)
- ⁷ M.D. Toney *Biochemistry* **40**, 1378 (2001)
- ⁸ R.D. Bach, C. Canepa, M. N. Glukhovtsev, *J. Chem. Soc.* **121**, 6542 (1999).
- ⁹ P. György, *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 983 (1938)
- ¹⁰ J.C. Keresztesy, J.R. Stevens, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **38**, 64 (1938).
- ¹¹ E.T. Stiller, J.C. Keresztesy, J.R. Stevens *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 1237 (1939).
- ¹² S.A. Harris, E.T. Stiller, K. Folkers, *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 1242; 1245; 3307 (1939)
- ¹³ G.P. Moss Nomenclature for Vitamins B6 and Related Compounds IUPAC-IUB (Recommendations 1973). <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/B6.html>
- ¹⁴ E. Adams, *Adv. Enzymol.* **44**, 69 (1976).
- ¹⁵ M. Akhtar, V. C. Emery, J.A. Robinson. *New Comprehensive Biochemistry* (A. Neuberger, ed.), Vol. 6 (1984)
- ¹⁶ A. E. Evangelopoulos, *Chemical and Biological Aspects of VitaminB6 Catalysis*; A. R. Liss: New York (1984)
- ¹⁷ D. Dolphin, R. Poulson, O.Avrarnovic, *Vitamin B6 Pyridoxal Phosphate, Chemical, Biochemical and MedicalAspects*, Parts A and B; Wiley-Interscience: New York (1986)
- ¹⁸ A.H. Merrill, F.S. Burnham, en *Present Knowledge in Nutrition*, 6th Ed. (M. L Brown ed.) Int. Life Sciences Institute (1990)
- ¹⁹ E.E. Snell, *Vitam. Horm.* **16**, 77 (1958)
- ²⁰ A.E. Braunstein, en *The Enzymes*, 2nd Ed. (P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck eds.) Academic Press: New York (1960)
- ²¹ C.C. Hyde, E.W.Miles, *Biotechnology* **8**, 27 (1990)
- ²² F.W. Alexander, E. Sandmeier, P.K. Metha, P. Christen, *Eur. J. Biochem.* **219**, 953 (1994)
- ²³ T. Clausen, R. Huber, B. Laber, H-D. Polenz, A. Messerschmidt *J. Mol. Biol.* **262**, 202 (1996)
- ²⁴ L. Lo Conte, B. Ailey, T.J. Hubbard, S. E. Brenner, A.G. Murzin, C. Chotia, *Nucleic Acids Res.* **28**, 257 (2000)
- ²⁵ N.V. Grishin, M.A. Philips, E.J. Goldsmith, *Protein Sci.* **4**, 1291 (1995)
- ²⁶ J.P. Shaw, G.A. Petsko, D. Ringe *Biochemistry* **36**, 1329 (1997)
- ²⁷ J.N. Jansonius, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 759 (1998)
- ²⁸ S. Rhee, K.D. Parris, S.A. Ahmed, E. Wilson Miles, D.R. Davies *Biochemistry* **35**, 4211 (1996)
- ²⁹ C.A. Mc Phalen, M.G.Vincent, J.N. Jansonius, *J. Mol. Biol.* **225**, 495 (1992)
- ³⁰ S. Sugio, G.A. Petsko, J.M. Manning, K. Soda, D. Ringe, *Biochemistry* **34**, 9661 (1995)
- ³¹ N.V. Grishin, *J. Struct. Biol.* **134**, 167 (2001)
- ³² P.K. Mehta, P. Christen, *Adv. Enzymol.* **74**, 129 (2000)
- ³³ P. Christen, P.K. Mehta, *Chem. Reac.* **1**, 436 (2001)
- ³⁴ Q. Han, J. Fang, J. Li, *Biochem. J.* **360**, 617 (2001)
- ³⁵ R. Percudani, A. Peracchi, *EMBO reports* **4**, 850 (2003)
- ³⁶ A.J. Cooper, A.S. Bruschi, M.W. Anders, *Biochem. Pharmacol.* **64**, 553 (2002)
- ³⁷ T.C. French, D.S. Auld, T.C. Bruice, *Biochemistry* **4**, 77 (1965).
- ³⁸ J.M. Sayer, B. Pinsky, A. Schonbrunn, W. Washtien, *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 7998 (1974).

- ³⁹ J.M. Sayer, W.P. Jenks, *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 464 (1977).
- ⁴⁰ J.M. Sayer, P. Conlon, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 3592 (1980).
- ⁴¹ P.S. Tobias, R. G. Kallen, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 6530 (1975).
- ⁴² A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox. *Principles of Biochemistry*; Worth Publishers: New York (1993).
- ⁴³ E.E. Snell, *Vitam. Horm.* **28**, 265 (1970).
- ⁴⁴ J.M. Sanchez-Ruiz, J.M. Rodriguez-Pulido, J. Llor, M. Cortijo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1425 (1982)
- ⁴⁵ M.A. Vázquez, J. Donoso, F. Muñoz, F. García blanco, M.A. García del Vado, G. Echevarría, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 361 (1988)
- ⁴⁶ M.A. Vázquez, J. Donoso, F. Muñoz, F. García Blanco, M.A. García del Vado, G. Echevarría, *Helv. Chim. Acta*, **73**, 1991 (1990)
- ⁴⁷ M.A. García del Vado, J. Donoso, F. Muñoz, G. Echevarría, F. García-Blanco, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 445 (1987)
- ⁴⁸ J. Donoso, F. Muñoz, M.A. García del Vado, G. Echevarría, F. García-Blanco, *Biochem. J.*, **238**, 137 (1987)
- ⁴⁹ M.A. García del Vado, G. Echevarría, A. Garcia-Espantaleon, J. Donoso, F. Muñoz, F. García-Blanco, *J. Mol. Catal.* **44**, 313 (1988)
- ⁵⁰ M.A. Vázquez, J. Donoso, F. Muñoz, F. García-Blanco, M.A. García del Vado, G. Echevarría, *J. Mol. Catal.* **59**, 137 (1990)
- ⁵¹ M.A. Vázquez, J. Donoso, F. Muñoz, F. García-Blanco, M. A. García del Vado, G. Echevarria, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1143 (1991).
- ⁵² S. Mendele, R. Koppelman, M.E. Hanke *J. Biol. Chem.* **209**, 327 (1954)
- ⁵³ O. Hur, C. Leja, M.F. Dunn, *Biochemistry* **35**, 7378 (1996).
- ⁵⁴ M. Cortijo, J. Llor and J.M. Sanchez Ruiz, *J. Biol. Chem.* **263**, 17960 (1988).
- ⁵⁵ J. Donoso, F. Muñoz, G. Echevarría, F. García-Blanco, *An. Quím.* **82**, 222 (1986)
- ⁵⁶ M.A. Vázquez, G. Echevarria, F. Muñoz, J. Donoso, F. García-Blanco, *J.Chem.Soc.Perkin Trans 2*, 1617 (1989)
- ⁵⁷ M.A. Vázquez, F. Muñoz, J. Donoso, F. García-Blanco, *Int.J.Chem.Kinet.* **22**, 905 (1990)
- ⁵⁸ M.A. Vázquez, F. Muñoz, J. Donoso, F. García-Blanco, *Int.J.Chem.Kinet.* **24**, 76 (1992)
- ⁵⁹ A.E. Martell, *Acc. Chem. Res.* **22**, 115 (1989).
- ⁶⁰ A.E. Martell, en *Chemical and Biological Aspects of vitamin B-6 Catalysis*, Part. A. Ed. A. Evangelopoulos, A.R.L.: New York (1984)
- ⁶¹ A.E. Martell, *Adv. Enzymol.* **53**, 163 (1982)
- ⁶² C.M. Metzler, A. Cahill, D.E. Metzler, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 6075 (1980)
- ⁶³ C.M. Harris, R.J. Johnson, D.E. Metzler, *Biochem. Biophys. Acta* **421**, 181 (1976)
- ⁶⁴ M.A. Vázquez, F. Muñoz, J. Donoso, F. García-Blanco, *Biochem J.* **279**, 759 (1991).
- ⁶⁵ M.A. Vázquez, F. Muñoz, J. Donoso, F. García-Blanco, *Helvetica Chimica Acta* **75**, 1029 (1992)
- ⁶⁶ M.A. Vázquez, F. Muñoz, J. Donoso, F. García-Blanco, *Biochem. (Life Sci. Adv.)* **11**, 241 (1992)
- ⁶⁷ M.A. Vázquez, F. Muñoz, J. Donoso, F. García-Blanco, *Amino Acids* **3**, 81 (1992)
- ⁶⁸ M. Mäkelä, T. Korplela, *Chem. Soc. Rev.* **12**, 309 (1983)
- ⁶⁹ E.E. Snell, W. T. Jenkins, *J. Cell Comp. Physiol. Part I* **54**, 161 (1959)
- ⁷⁰ E. Adams, *Adv. Enzymol.* **44**, 69 (1976)
- ⁷¹ B. H. Jo, V. Nair, L. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 4467 (1977)
- ⁷² S. Hershey, D. L. Leussing, *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 1992 (1977)

- ⁷³ M. Akhtar, V. C. Emery, J. A. Robinson, en *New Comprehensive Biochemistry* Vol. 6; A. Neuberger, ed. (1984)
- ⁷⁴ M. A. Vázquez, F. Muñoz, J. Donoso, F. García-Blanco, *J. Phys. Org. Chem.* **5**,142 (1992)
- ⁷⁵ B.I. Yang, D.E. Metzler, *Methods Enzymol.* **62** 528 (1979)
- ⁷⁶ T. Korplela, M. Mäkelä, H. Löhnberg, *Arch. Biochem. Biophys.* **212**, 581 (1981)
- ⁷⁷ E.M. Abbott, A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 1754 (1970)
- ⁷⁸ E.M. Abbott, A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 5852 (1971)
- ⁷⁹ M. H. O’Learly, J.R. Payne, *J. Biol. Chem.* **251**, 2248 (1976)
- ⁸⁰ R. D. Lapper, H.H. Mansch, I.C.P. Smith, *Can. J. Chem.* **53**, 2406 (1975)
- ⁸¹ J.L. Hogg, D. A. Jencks, W.P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 4772 (1977)
- ⁸² C.M. Metzler, A. Cahill, D.E. Metzler, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 6075 (1980)
- ⁸³ P.M. Robitaille, R.D. Scott, J. Wang, D.E. Metzler, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 3034 (1989)
- ⁸⁴ A.J. Kresge, *Pure Appl. Chem.* **53**,189 (1981)
- ⁸⁵ M.J. Mäkelä, T.K. Korpela, *Chem. Soc. Rev.* **1**, 1309 (1983)
- ⁸⁶ J.E. Leklem. *Vitamin B6 en Modern Nutrition in Health and Disease. 9th ed.* M.E. Shils, J.A. Olson, M. Shike, A.C. Ross, ed.; Williams and Wilkins: Baltimore (1999)
- ⁸⁷ H. Gester, *Z. Ernährungswiss* **35**, 309 (1996).
- ⁸⁸ D.A. Bender, *Proc. Nutr. Soc.* **53**, 625 (1994).
- ⁸⁹ R. Chandra, L. Shudhakaran, *N.Y. Acad. Sci.* **585**, 404 (1990).
- ⁹⁰ A. Trakatellis, A. Dimitriadou, M. Trakatelli. *Postgrad. Med. J.* **73**, 617 (1997).
- ⁹¹ Institute of Medicin. Food and Nutrition Board. *Dietary Reference Intakes*. National Academy Press: Washington, D.C. (1988).
- ⁹² P. Holman, *Journal of the Australasian College of Nutritional and Environmental Medicine* **14**, 5 (1995)
- ⁹³ A.L. Bernstein, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **585**, 250 (1990).
- ⁹⁴ A. Brown, M. Mallet, D. Fiser, W.C. Arnold, *Pediatr. Pharmacol.* **4**, 199 (1984).
- ⁹⁵ J. Brent, N. Vo, K. Kulig, B.H. Rumack, *Arch. Intern. Med.* **150**, 1751 (1990).
- ⁹⁶ J. Selhub J, P.F. Jacques, A.G. Bostom, R.B. D’Agostino, P.W. Wilson, A.J. Belanger, D.H. O’Leary, P.A. Wolf, E.J. Scafer, I.H. Rosenberg, *N. Engl. J. Med.* **332**, 286 (1995).
- ⁹⁷ E.B. Rimm, W.C. Willett, F.B. Hu, L. Sampson, G.A. Colditz, J.E. Manson, C. Hennekens, M.J. Stampfer, *J. Am. Med. Assoc.* **279**, 359 (1988).
- ⁹⁸ H. Refsum, P.M. Ueland, O. Nygard, S.E. Vollset, *Annu. Rev. Med.* **49**, 31 (1998)
- ⁹⁹ G.H. Boers, *Neth. J. Med.* **45**, 34 (1994).
- ¹⁰⁰ J. Selhub, P.F. Jacques, P.F. Wilson, D. Rush, I.H. Rosenberg, *J. Am. Med. Assoc.* **270**, 2693 (1993)
- ¹⁰¹ M.R. Malinow, *Clin. Chem.* **41**, 173 (1995).
- ¹⁰² M.A. Flynn, V. Herbert, G.B. Nolph, G. Krause, *J. Am. Coll. Nutr.* **16**, 258 (1997).
- ¹⁰³ L.J. Fortin, J. Genest Jr, *Clin. Biochem.* **28**, 155 (1995).
- ¹⁰⁴ P.W. Siri, P.Verhoef , F.J. Kok, *J. Am. Coll. Nutr.* **17**, 435 (1998).
- ¹⁰⁵ J. B. Ubbink, A. van der Merwe, R. Delpport, R.H. Allen, S.P. Stabler, R. Riezler, W.J. Vermaak, *J. Clin. Invest.* **98**, 177 (1996).
- ¹⁰⁶ I. Król-Starzomska, A. Filarowski, M. Rospenk, A. Koll, S. Melikova, *J. Phys. Chem. A.* **108**, 2131 (2004)
- ¹⁰⁷ C.C.J. Roothan, *Rev. Mod. Phys.* **23**, 69 (1951)
- ¹⁰⁸ E.R. Lovejoy, D.R. Hanson, L.G. Huey, *J. Phys. Chem.* **100**, 19911 (1996)

- ¹⁰⁹J.C. Slater, *Phys. Rev.* **35**, 57 (1930)
- ¹¹⁰R. Ditchfield, W.J. Hehre, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **54**, 724 (1971)
- ¹¹¹P.C. Hariharan, J.A. Pople, *Theo. Chim. Acta* **28**, 213 (1973)
- ¹¹²M.J. Frisch, J. A. Pople, J. S. Binkley, *J. Chem. Phys.* **80**, 3265 (1984)
- ¹¹³T. Clark, J. Chandrasekhar, G.W. Spitznagel, P. v. R. Schleyer, *J. Comp. Chem.* **4**, 294 (1983)
- ¹¹⁴J.A. Pople, R. Krishnan, H.B. Schlegel, J.S. Binkley, *Int. J. Quant. Chem.* **14**, 545 (1978)
- ¹¹⁵R.J. Bartlett, G.D. Purvis, *Int. J. Quant. Chem.* **14**, 516 (1978)
- ¹¹⁶C. Müller, M.S. Plesset, *Phys. Rev.* **46**, 618 (1934)
- ¹¹⁷R. J. Bartlett, D. M. Silver, *J. Chem. Phys.* **62**, 3258 (1975)
- ¹¹⁸J. A. Pople, J. S. Binkley, R. Seeger, *Int. J. Quant. Chem., Quant. Chem. Symp.* **10**, 1 (1976)
- ¹¹⁹J. A. Pople, R. Seeger, R. Krishnan, *Int. J. Quant. Chem., Quant. Chem. Symp.* **11**, 149 (1977)
- ¹²⁰R. J. Bartlett, I. Shavitt, *Chem. Phys. Lett.* **50**, 190 (1977)
- ¹²¹R. Krishnan, J. A. Pople, *Int. J. Quant. Chem.* **14**, 91 (1978)
- ¹²²M. Dewar, W. Thiel, *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 4499 (1977)
- ¹²³M. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J.J.P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 3902 (1985)
- ¹²⁴J.J.P. Stewart, *J. Comp. Chem.* **10**, 209 (1989)
- ¹²⁵J.J.P. Stewart, *J. Comp. Chem.* **10**, 221 (1989)
- ¹²⁶H.S. Rzepa, M.M. Yi, M.M. Karelson, M.C. Zerner *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 635 (1991)
- ¹²⁷C.J. Cramer, D.G. Truhlar, *J. Comput. Chem.* **13**, 1089 (1992)
- ¹²⁸A. Klampt, G. Schuurmann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* 799 (1993)
- ¹²⁹P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.* **132**, B864 (1964)
- ¹³⁰W. Kohn, L.J. Sham, *Phys. Rev.* **140**, A1133 (1965)
- ¹³¹R. Stowasser, R. Hoffmann, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 3414 (1999)
- ¹³²J.C. Slater, *Quantum Theory of Molecules and Solids*. Vol. 4: *The Self-Consistent Field for Molecules and Solids*; McGraw-Hill: New York (1974).
- ¹³³S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair *Canadian J. Phys.* **58**, 1200 (1980)
- ¹³⁴J.P. Perdew, A. Zunger *Phys. Rev. B.* **23**, 5048 (1981)
- ¹³⁵A.D. Becke, *Phys. Rev.* **38**, 3098 (1988)
- ¹³⁶C. Lee, W. Yang, R.G. Parr *Phys. Rev. B* **37**, 785 (1988)
- ¹³⁷J.P. Perdew, *Phys. Rev. B* **33**, 8822 (1986)
- ¹³⁸J.P. Perdew, Y. Wang *Phys. Rev. B* **45**, 13244 (1992)
- ¹³⁹A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98**, 5648 (1993)
- ¹⁴⁰J. Poater, M. Duran, M. Solà, *J. Comput. Chem.* **22**, 1666 (2001)
- ¹⁴¹R.S. Mulliken, *J. Chem. Phys.* **23**, 1833 (1955)
- ¹⁴²P.O. Lödwin, *Adv. Quantum Chem.* **5**, 185 (1970)
- ¹⁴³R.F.W. Bader, *Atoms in Molecules, a Quantum Chemistry Theory*; Clarendon: Oxford (1990)
- ¹⁴⁴R.F.W. Bader, T.S. Slee, D. Cremer, E. Kraka, *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 5061 (1983)
- ¹⁴⁵H.C. Dunathan, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **55**, 712 (1966).
- ¹⁴⁶L. Feng, Y. Li, J.F. Kirsch, *Journal of Physical Organic Chemistry* **11**, 536 (1998).
- ¹⁴⁷S.J. Weiner, U.C. Singh, P.A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 2219 (1985).
- ¹⁴⁸J. Frau, J. Donoso, F. Muñoz, F. García Blanco, *J. Comput. Chem.* **13**, 681 (1992).
- ¹⁴⁹J. Frau, J. Donoso, B. Vilanova, F. Muñoz, F. García Blanco, *Theor. Chim. Acta* **86**, 229 (1993).
- ¹⁵⁰T. Katagi, *J. Comput. Chem.* **11**, 524 (1990).

- ¹⁵¹AMPAC 6.0, ©1997 Semichem, 7128 Summit, Shawnee, KS 66216
- ¹⁵²J.J.P. Stewart, QCPE#455, MOPAC 93, ©Fujitsu Limited.
- ¹⁵³J. Baker, *J. Comp. Chem.* **7**, 385 (1986)
- ¹⁵⁴K. Fukui, *Acc. Chem. Res.* **14**, 363 (1981).
- ¹⁵⁵A. Klampt, *J. Chem. Soc. Perkin 2*, 799 (1993)
- ¹⁵⁶A. Klampt, *J. Phys. Chem.* **99**, 2224 (1995)
- ¹⁵⁷A. Klampt, *J. Phys. Chem.* **100**, 3349 (1996)
- ¹⁵⁸M. Lozynski, D. Rusinska-Roszak, H.G. Mack, *J. Phys. Chem. A* **101**, 1542 (1997)
- ¹⁵⁹K. Kim, K.D. Jordan *J. Chem. Phys.* **98** 10089 (1994)
- ¹⁶⁰Gaussian 94, Revision D.4, M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, P.M.W. Gill, B.G. Johnson, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, T. Keith, G.A. Petersson, J.A. Montgomery, K. Raghavachari, M.A. Al-Laham, V.G. Zakrzewski, J.V. Ortiz, J.B. Foresman, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, A- Nanayakkara, M. Challacombe, C.Y. Peng, P.Y. Ayala, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, E.S. Replogle, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, J.S. Binkley, D.J. Defrees, J. Baker, J.P. Stewart, M. Head-Gordon, C. Gonzalez, J.A. Pople, Gaussian, Inc.: Pittsburgh PA, 1995.
- ¹⁶¹J.E. Del Bene, W.B Person, K. Szczepartiak, *J. Phys. Chem.* **99**, 10705 (1995)
- ¹⁶²J.R. Keisler, N.L. Allinger, *J. Comput. Chem.* **17**, 757 (1997)
- ¹⁶³J.J. Novoa, C.J. Sosa, *J. Phys. Chem.* **99**, 15837 (1995)
- ¹⁶⁴S. Reling, J. Bickmann, M. Schlenkirch, P.A. Bopp, *J. Comput. Chem.* **17**, 133 (1996)
- ¹⁶⁵F. Biegler-König, J. Schönbohm, D. Bayles, *J. Comput. Chem.* **22**, 545 (2001).
- ¹⁶⁶H. Wiesinger, H.J. Hinz, *Biochem. Biophys.* **1**, 34 (1984)