



## “Estudio computacional de inhibidores de la hidroxifenilpiruvato dioxigenasa”

Trabajo de Tesis para optar al grado de Licenciado en  
Química

\*\*\*

AUTOR: Alfonso Pepe

DIRECTOR: Dr. D. Mariano Adolfo Vera

CO-DIRECTOR: Dra. Cristina L. Ramirez

FCEyN, DEPTO DE QUÍMICA

UNMdP

\*\*\*

AÑO: 2013

# Índice general

<b>1. Objetivos</b>	<b>6</b>
1.1. Objetivos generales . . . . .	6
1.2. Objetivos específicos . . . . .	7
<b>2. Antecedentes</b>	<b>8</b>
2.1. Introducción a la 4-hidroxifenilpiruvatodioxigenasa . . . . .	8
2.2. Estructura de la HPPD . . . . .	11
2.3. La reacción catalizada . . . . .	13
2.4. Especificidad por el sustrato . . . . .	14
2.5. Asociación a HPP y activación de oxígeno . . . . .	15
2.6. Intermediarios y mecanismos . . . . .	18
2.7. Inhibidores . . . . .	19
2.7.1. Sintéticos . . . . .	19
2.7.2. Derivados de plantas . . . . .	26
2.8. Los complejos de coordinación . . . . .	27
2.8.1. Carga y número de coordinación . . . . .	28
2.8.2. Ligandos . . . . .	28

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>3</b>
2.8.2.1. Ligandos polidentados o quelatos . . . . .	29
2.8.3. Complejos en sistemas biológicos . . . . .	29
2.8.4. Reactividad del metal . . . . .	31
2.8.5. Teorías de la estructura de complejos . . . . .	32
2.8.5.1. Teoría de enlace de valencia (TEV) . . . . .	32
2.8.5.2. Teoría del campo cristalino . . . . .	34
2.8.5.3. Teoría del Campo ligando (TCL) . . . . .	37
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>40</b>
3.1. Acidez . . . . .	40
3.2. Introducción a la mecánica cuántica . . . . .	44
3.3. Aproximación de Born-Oppenheimer . . . . .	46
3.4. Teoría Funcional de la Densidad (DFT) . . . . .	49
3.4.1. Teoremas de Hohenberg-Kohn . . . . .	50
3.4.1.1. Primer Teorema de Hohenberg-Kohn . . . . .	51
3.4.1.2. Segundo Teorema de Hohenberg-Kohn . . . . .	52
3.4.2. Ecuaciones de Kohn-Sham . . . . .	53
3.4.3. Funcionales de Correlación-Intercambio . . . . .	56
3.4.4. Solvente Implícito . . . . .	59
3.5. Estudios conformacionales . . . . .	62
3.6. Cálculos cuánticos . . . . .	62
3.7. Mecánica molecular . . . . .	66
3.7.1. Campos de fuerza . . . . .	70
3.8. <i>Docking</i> Molecular . . . . .	73
3.8.1. Reconocimiento Molecular . . . . .	73

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>4</b>
3.8.2. Funciones de evaluación . . . . .	75
3.8.3. Autodock . . . . .	76
3.8.4. Algoritmo Genético Lamarkiano . . . . .	78
3.8.5. Mapa de grilla . . . . .	81
3.8.6. <i>Docking</i> realizados en la presente Tesis . . . . .	82
3.9. Función de localización electrónica . . . . .	86
3.9.1. Introducción a la Teoría atómica de átomos en moléculas (QTAIM, de sus siglas en inglés) . . . . .	86
3.9.2. La topología de la densidad electrónica . . . . .	88
3.9.2.1. La topología de la densidad electrónica dicta la forma de los átomos en las moléculas . . . . .	93
3.9.2.2. Resumen de la aplicación del la Función de localización electrónica . . . . .	97
3.9.3. El uso de las propiedades atómicas provenientes de la teoría cuántica de átomos en moléculas . . . . .	98
3.9.4. Cálculo de la función de localización electrónica . . . . .	98
<b>4. Resultados</b>	<b>100</b>
4.1. Acidez . . . . .	100
4.2. Estudio conformacional . . . . .	104
4.3. <i>Docking</i> . . . . .	108
4.3.1. Validación del método . . . . .	108
4.3.2. <i>Docking</i> de los inhibidores estudiados en la presente Tesis	111
4.4. Cálculos cuánticos . . . . .	115
4.5. Función de localización electrónica (ELF) . . . . .	119

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	5
5. Conclusiones	128
6. Agradecimientos	132
Bibliografía	145

# Capítulo 1

## Objetivos

*“Mientras no alcances la verdad, no podrás corregirla. Pero si no la corriges, no la alcanzarás. Mientras tanto, no te resignes.”*

*Libro de los consejos*

### 1.1. Objetivos generales

El objetivo central que motivó esta Tesis fue, obtener información molecular útil para comprender los mecanismos de inhibición de la HPPD y las propiedades fisicoquímicas que confieren actividad inhibitoria a los compuestos en estudio y obtener pistas a nivel atómico para el diseño y optimización de compuestos bioactivos de interés medicinal o medioambiental. Para llevar a cabo dicho objetivo, se utilizaron modelos y métodos de la Química computacional correlacionados con resultados experimentales .

## 1.2. Objetivos específicos

En particular se estudiará una familia de inhibidores (Fig. 2.11 y 2.12), bajo desarrollo en el grupo como así también de diferentes inhibidores de actividad conocida que fueron cocrystalizados con la enzima HPPD (NTBC y Mesotriona de la figura 2.7). En estos compuestos se explorará el espacio conformacional, con especial atención a los grados internos de libertad que facilitan o dificultan el ligado en el sitio activo. Se determinarán los tautómeros más estables y el protómero más probable de ser encontrado en condiciones fisiológicas y coordinado en el sitio. Se estudiará la energética y topología de la coordinación en modelos reducidos del sitio activo involucrando los diferentes compuestos utilizando distintos conjuntos de bases para el cálculo computacional y se estudiará el modo de ligada de los distintos inhibidores al sitio activo de la proteína utilizando metodologías de *docking* molecular. Por último se relacionarán los distintos métodos utilizados a fin de poder sacar conclusiones que permiten explicar las diferencias en cuanto a la eficacia de los distintos inhibidores. Se espera que estas conclusiones sean útiles para el diseño racional de nuevos fármacos.

# Capítulo 2

## Antecedentes

*“Cuando me siento así, por el piso, me siento en el piso a pensar: Suelo hallar consuelo en el suelo.”*

*Marcos Mundstock*

### 2.1. Introducción a la **4-hidroxifenilpiruvatodioxigenasa**

En el metabolismo aeróbico la conversión de 4-hidroxifenilpiruvato (HPP) a 2,5-dihidroxifenilacetato (homogentisato) es catalizada por una enzima denominada 4-hidroxi fenilpiruvato dioxigenasa (HPPD). Si bien esta transformación es única en la naturaleza e involucra descarboxilación, hidrofilación aromática y migración de sustituyentes en un sólo ciclo catalítico, la reacción es similar a las que son catalizadas por la superfamilia de enzimas oxigenasas dependientes de  $\alpha$ -cetoácido [1]. Esta conversión es el segundo paso de la

vía catabólica que involucra acetoacetato y fumarato proveniente de la L-tyrosina [2]. Mientras que estos productos aportan energía directamente, en organismos superiores, esta vía metabólica posee funciones adicionales. En los animales esta vía es requerida para modular los niveles de tirosina [3]. En las plantas esta vía participa en la producción de cofactores esenciales como plastoquinonas y tocoferoles que son sintetizados a partir del homogentisato [4]. Este último rol del catabolismo de la tirosina ha generado importantes investigaciones movidas por intereses agroquímicos que desean diseñar inhibidores/herbicidas que puedan desacoplar la fotosíntesis suprimiendo la producción de cofactores redox lipofílicos activos que unen los dos fotosistemas. Estas investigaciones abarcan la mayoría de la literatura acerca de la HPPD y ha producido varios herbicidas disponibles comercialmente. Una de estas moléculas desarrolladas recientemente como herbicida, se usa ahora, terapéuticamente en humanos[5].

La inhibición específica de la HPPD es usada para aliviar los síntomas de dos desórdenes metabólicos. En mamíferos defectos de nacimiento en el catabolismo de la tirosina dan lugar a patologías que pueden llegar a resultar letales. Una deficiencia en la primera enzima del catabolismo de la tirosina, la tirosinaminotransferaza, produce tirosinemia de tipo II, una enfermedad caracterizada por niveles altos de tirosina en sangre que resultan en moderado retraso mental en neonatos, y opacamiento de la córnea más tarde a lo largo de la vida [6]. La tirosinemia de tipo III aparece como consecuencia de una deficiencia de la HPPD activa [7]. Es en gran medida indistinguible del desorden de tipo II respecto a la sintomatología debido a la reversibilidad de la reacción precedente catalizada por la tirosinaminotransferaza [8]. Una de-

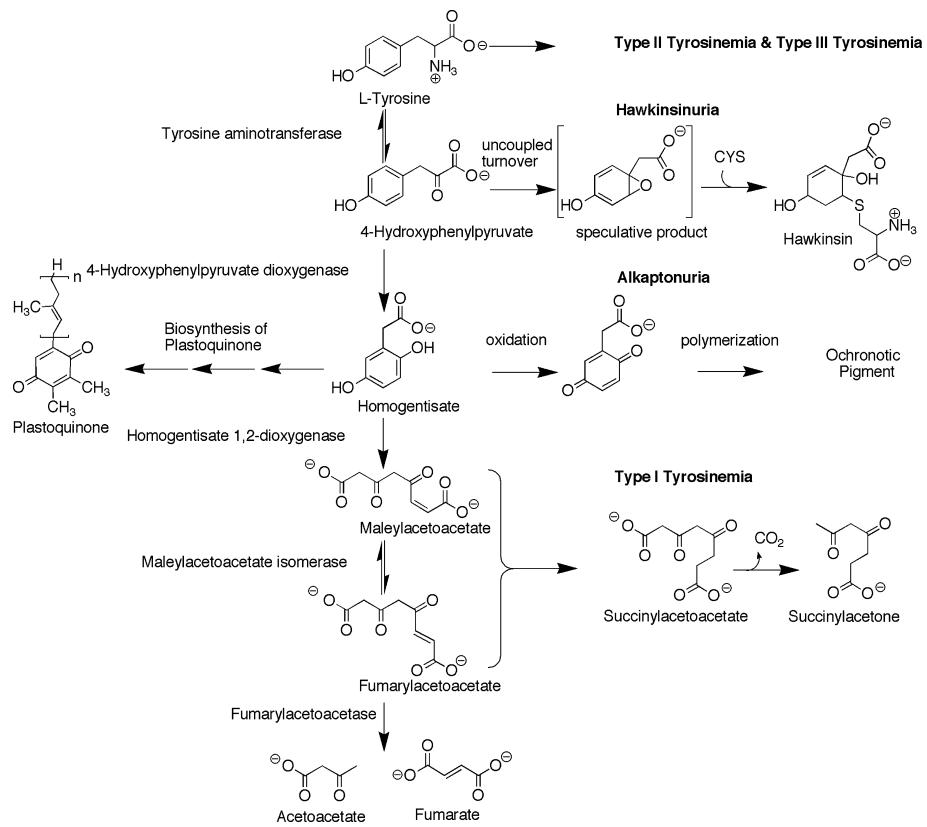


Figura 2.1: Metabolismo de la L-tirosina y desórdenes asociados.

ficiencia en la fumaril acetoacetasa causa el defecto más severo, la tirosinemia de tipo I. Los pacientes que la padecen sufren malfuncionamiento hepático y fallo en los túbulos contorneados proximales del riñón. Este desorden presenta alta tasa de mortalidad debido al hepatocarcinoma primario [9, 10]. La inhibición específica de la HPPD ha sido aceptada como blanco terapéutico para la tirosinemia de tipo I [11, 12] además induce efectos moderados cuya sintomatología imita en parte a las tirosinemias de tipo II y tipo III [3, 8, 13].

## 2.2. Estructura de la HPPD

La HPPD se encuentra en todos los organismos aerobios a excepción de algunas bacterias Gram positivas [14]. La proteína consta de subunidades de 40-50 kDa y en general se encuentra asociada formando tetrámeros y dímeros en bacterias y eucariotas respectivamente [15, 16, 17]. La estructura primaria de la enzima puede ser dividida en una porción N-terminal variante y otra C-terminal más conservada. Las secuencias obtenidas de plantas muestran la única variación significativa exhibiendo una inserción de 15 aminoácidos cerca del carboxilo terminal [18, 19]. La primer estructura cristalográfica obtenida por difracción de rayos X que fue publicada fue obtenida de *Pseudomonas fluorescens* (Protein Data Bank, PDB ID= 1CJX) [20]. Posteriormente se resolvieron las estructuras pertenecientes a *Arabidopsis thaliana* (PDB ID = 1SP9 y 1TFZ) [18, 19], *Streptomyces avermitilis* (PDB ID = 1T47) [21] y *Ratus norvegicus* (PDB ID = 1SQI) [19]. Estas estructuras indican que tanto el N como el C terminal se pliegan en dominios discretos. Así el sitio activo se compone exclusivamente de residuos ubicados en los extremos de la cadena. El plegamiento de la HPPD es distinto al de las otras  $\alpha$ -cetooxigenasas ácido dependientes las que poseen un barril formado por hojas  $\beta$ . La HPPD tiene dos patrones similares a este último, cada uno de los cuales contiene un módulo de  $\beta\alpha\beta\beta\alpha$  similar a algunas estradiol-dioxigenasas (Fig. 2.2) [20, 21, 22, 23, 24, 25].

Al igual que en todas las oxigenasas no-hemo dependientes de Fe (II), el ion metálico del sitio activo se encuentra directamente coordinado por tres residuos de la enzima [26]. Las oxigenasas  $\alpha$ -cetoácido dependientes pueden

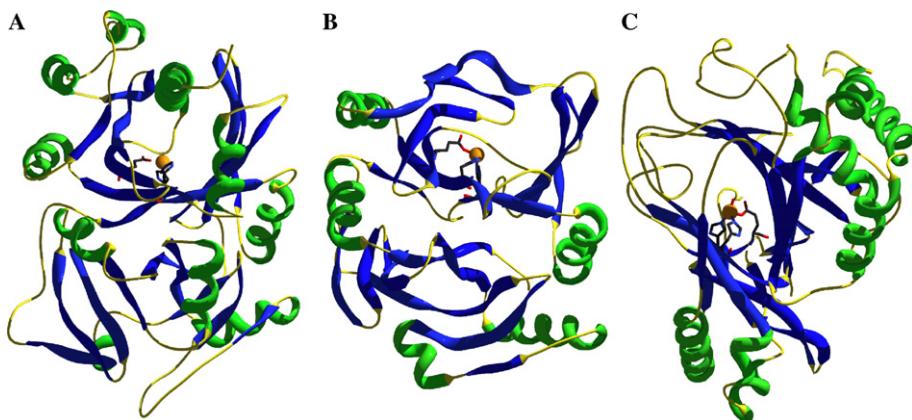


Figura 2.2: Comparación de las estructuras ternarias de HPPD de *Pseudomonas fluorescens* (A), dihidroxidifeniloxigenasa de *Pseudomonas cepacia* (B), y clavaminato sintasa de *Streptomyces clavigerus* (C). Para cada una de las estructuras la posición del sitio activo se determina por la posición del centro metálico y sus ligando proteicos.

ser clasificadas en tres grupos basados en el espaciamiento de estos tres ligan-  
do en la estructura primaria. El patrón de espaciamiento usual en estas enzi-  
mas es  $\text{HX(D/E)X}_{50-210}\text{H}$  [27]. La HPPD no puede ser clasificada en ninguna  
de estas categorías debido a que posee el siguiente motivo  $\text{HX}_{80}\text{HX}_{80}\text{E}$ , que de  
nuevo es más similar a las enzimas oxigenasas de tipo estradiol ( $\text{HX}_{65}\text{HX}_{50}\text{E}$ ).  
Esto sumado a la similitud del plegamiento sugiere una convergencia entre los  
mecanismos de las enzimas  $\alpha$ -cetoácido dependientes y estradiol-dioxigenasa.

El bolsillo de unión al sustrato no está descripto aún por completo. Serre et. al. [20] modelaron al sustrato en el sitio activo y propusieron un modelo de unión que fue consistente con el observado en otras oxigenasas  $\alpha$ -cetoácido dependientes. Este modo de ligado depende tanto de la coordinación biden-  
tada del metal por parte del  $\alpha$ -cetoácido como de las interacciones por puente  
de hidrógeno con los residuos amidados [20, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 33]. Re-  
cientemente se han propuesto nuevas posiciones de unión consistentes con la

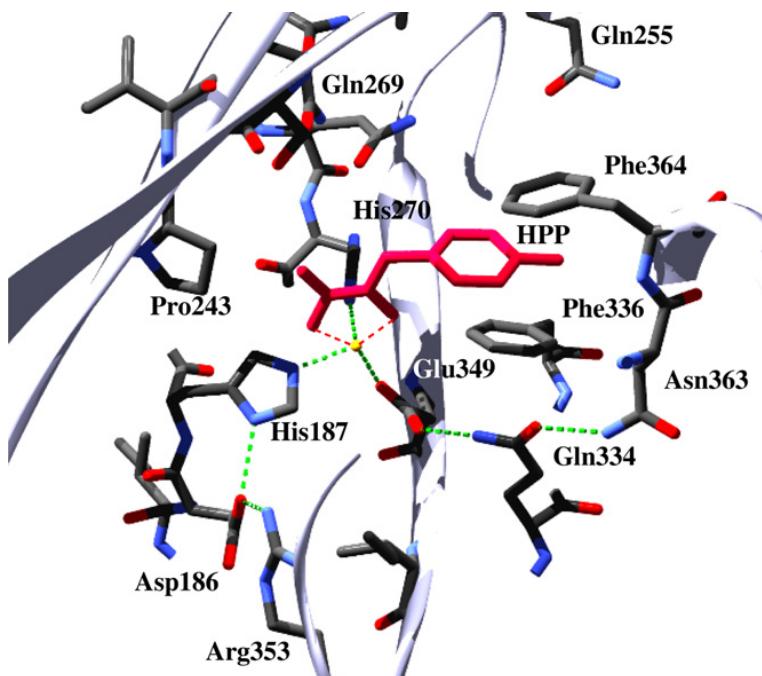


Figura 2.3: Sitio de unión propuesto para el sustrato HPP (en rojo) en el sitio activo de HPPD proveniente de *S. avermitilis*.

estructura cristalográfica obtenida de la HPPD ligada a un inhibidor (Vide Supra) [14, 21]. En este “bolsillo” propuesto el grupo  $\alpha$ -cetoácido del HPP sigue haciendo contacto de forma bidentada con el metal del sitio activo. El fenol, por otro lado, se encuentra dispuesto entre dos anillos de fenilalanina (Fig 2.3).

### 2.3. La reacción catalizada

En la Figura 2.4, se muestra la reacción catalizada por la HPPD. En 1970 Lindblad et al. [34] demostraron usando  $^{17}\text{O}$  que dos átomos del  $\text{O}_2$  son incorporados en la formación del homogentizato. Uno al  $\text{C}\alpha$  del piruvato y el otro en el  $\text{C}1$  del anillo aromático respecto del homogentizato (HPP).

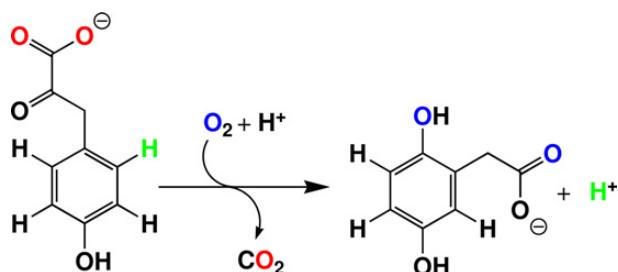


Figura 2.4: Reacción catalizada por la HPPD

Rundgren realizó ensayos basados en el desplazamiento de carboxilato marcado perteneciente al piruvato y su posterior cuantificación como  $^{14}CO_2$ . Con esto se estableció que durante la catálisis ocurría una descarboxilación oxidativa [35]. Rundgren mostró que el átomo de tritio en posición *ortho* respecto del piruvato pasa al solvente durante la reacción. Rundgren también determinó que el mecanismo de unión del sustrato involucra una adición ordenada de los sustratos y una liberación ordenada de los productos, en los que HPP es el primer sustrato en unirse y el  $CO_2$  es el primer producto en ser disociado [35].

## 2.4. Especificidad por el sustrato

Se ha demostrado que la HPPD tiene una amplia especificidad por sustrato reconociendo una amplia variedad de  $\alpha$ -cetoácidos polares y no polares como sustrato. HPPD extraída de hígado de rata puede descarboxilar y oxigenar al ácido (4-metil, $\alpha$ -ceto)pentanoico convirtiéndolo en ácido (3-hidroxi, 3-metil)butírico [36]. HPPD extraída de Pseudomonas, cerdo y humano utilizan al fenilpiruvato como principal sustrato convirtiéndolo en ácido 2-hidroxifenilacético [17, 37, 38]. Sin embargo la enzima extraída de

Streptomyces pierde su actividad tanto de descarboxilasa como de dioxigenasa en presencia de fenilpiruvato a pesar de que el átomo metálico del sitio activo está ligado de modo similar en todos los organismos estudiados. Mientras que la necesidad de que haya un sustituyente fenol en el sustrato para estimular la actividad de la HPPD parece ser especie dependiente, la enzima acepta un número variado de moléculas como sustratos que poseen sustituyentes adicionados al anillo aromático o alteraciones del lado del piruvato. Pascal et al. Mostraron que el (2-fluoro)HPP es convertido a (3-fluoro)homogentisato y que el ácido (4-hidroxifenil)-tiopirúvico produce (4-hidroxifenil)-sulfinilacetato como consecuencia de la segunda oxigenación que ocurre en átomo de azufre rico en electrones perteneciente al grupo funcional tiopirúvico [39]. HPPD no tiene tendencia a oxigenar el carbono bencílico del HPP. La hidroximandalato sintasa (HMS) posee los mismos sustratos y cataliza reacciones muy similares a las catalizadas por la HPPD con la segunda molécula de oxígeno siendo incorporada en el carbono benzílico, en consecuencia, el producto es el fenol sustituido con el para- $\alpha$ -hidroxiacetato (hidroximandalato). HPPD y HMS muestran una alta homología. Basado en las diferencias entre ambas, Gunsior et al. Crearon una HPPD mutante que muestra una hidroxilación preferencial por el carbono bencílico del HPP [14].

## 2.5. Asociación a HPP y activación de oxígeno

Se ha propuesto una adición ordenada de sustratos para enzimas dioxigenasas dependientes de Fe (II). En estos mecanismos el reactivo orgánico se asocia primero que oxígeno molecular. Para las enzimas  $\alpha$ -cetoácido depen-

dientes, se estableció que el  $\alpha$ -cetoácido es el primer reactivo en unirse y el CO<sub>2</sub> el primer producto en disociarse [40, 41, 42, 43, 44]. Se sugiere que la asociación por el sustrato orgánico aumenta la reactividad de la enzima por el O<sub>2</sub>. Se llevaron a cabo numerosas investigaciones espectroscópicas para elucidar este proceso de activación. Se ha observado por medio de cristalografía para un gran número de enzimas  $\alpha$ -cetoácido dependientes, que el  $\alpha$ -cetoglutarato coordina de forma bidentada con el metal presente en el sitio activo [28, 29, 32, 33, 45]. Utilizando el espectro IR de dicroismo circular magnético (MCD) se compararon la HPPD con una enzima oxigenasa  $\alpha$ -cetoglutarato dependiente y con una oxigenasa de tipo estradiol. Se llegó a la conclusión de que la HPPD es un puente entre estas dos enzimas, ya que posee características espectroscópicas de ambos tipos de oxigenasas. Se observó que en el sitio activo en reposo y el complejado con el  $\alpha$ -cetoglutarato, el ion metálico está hexacoordinado, y esto previene la reducción fútil del dioxígeno debido a que no puede acceder al átomo metálico. Se ha propuesto que en la presencia del  $\alpha$ -cetoglutarato y del otro sustrato orgánico que no actúa como ligando del metal, el Fe adopta una geometría pentacoordinada (Fig. 2.5A) [46, 47].

Se puede inferir de lo anterior que en presencia del reactivo orgánico HPP (S en la Fig. 2.5A), el Fe del sitio activo de la HPPD estará pentacoordinado y le será posible reaccionar con el oxígeno molecular. Sin embargo, investigaciones recientes, muestran que el sitio activo metálico se encuentra en una mezcla de especies hexa y pentacoordinadas (9:1) (Fig. 2.5B) [48]. Esto nos lleva a pensar que otros factores, no sólo la coordinación controlan la capacidad de la HPPD de reducir el oxígeno molecular (Fig. 2.5C).

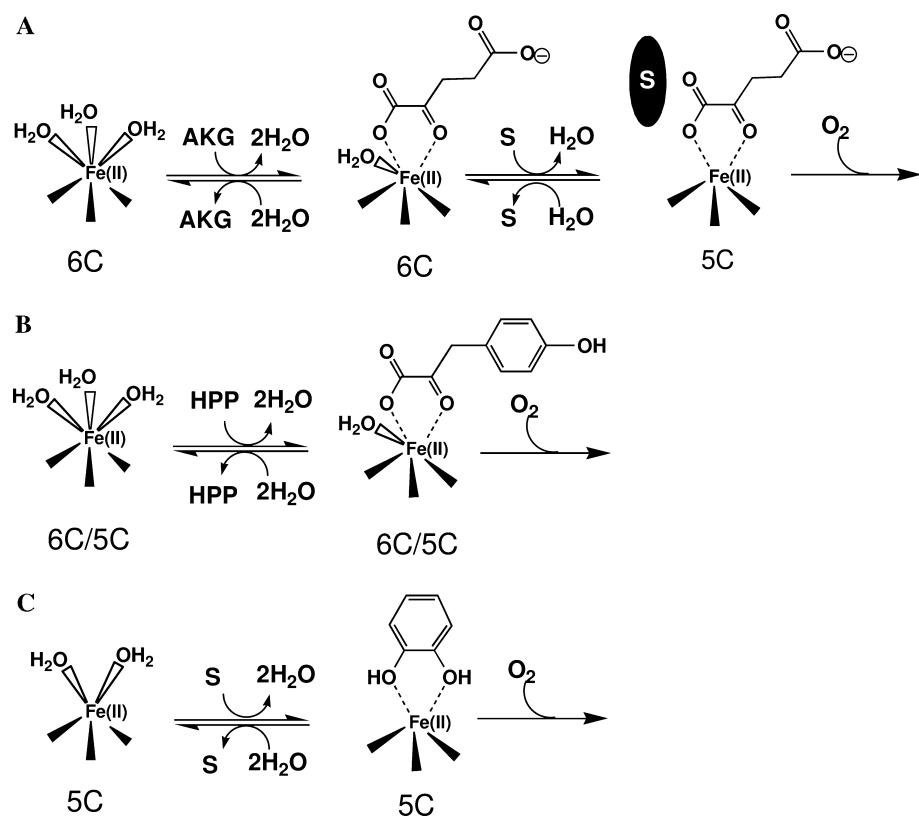


Figura 2.5: Coordinación del Fe (II) y Fe (III) en distintas geometrías del sitio activo de la HPPD.

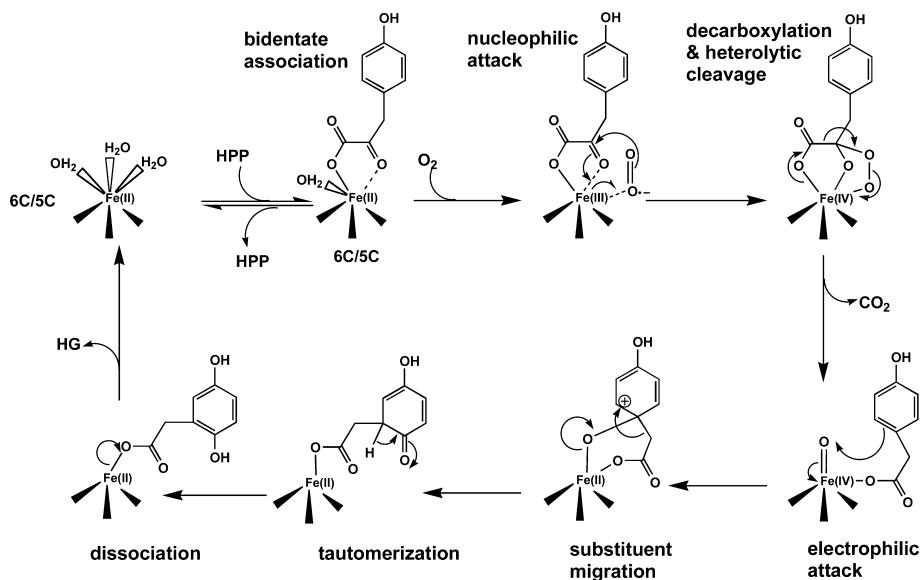


Figura 2.6: Mecanismo hipotético para el modo de acción de la enzima HPPD.

## 2.6. Intermediarios y mecanismos

Hasta el 2005, existían pocos estudios que evidenciaran la acumulación de intermediarios, habiéndose identificado uno que absorbe a 490 nm [49]. En el esquema de la Figura 2.6 se muestra un mecanismo hipotético para la HPPD [5].

En este esquema la catálisis comienza con la asociación bidentada del sustrato para formar una mezcla de estados penta y hexacoordinados [48]. Este complejo (o mezcla de complejos) tiene una reactividad por el oxígeno molecular aumentada [35, 49] y en presencia del mismo la densidad electrónica de los carbonilos del  $\alpha$ -cetoácido se desplaza al dioxígeno [46]. Esto sustraе densidad negativa del sustrato orgánico y permite un ataque nucleófilo sobre el carbono  $\alpha$  del piruvato. Este ataque conduce a una especie peróxido con un puente de Fe (IV). El clivaje heterocíclico de la unión peróxi-

ido ocurre durante la descarboxilación para dar un intermediario electrofílico altamente reactivo, el oxo-Fe(IV) [50, 51] que puede sustraer electrones del anillo aromático induciendo la formación o bien de un catión arenio (Fig. 2.6) o de un epóxido no mostrado en la misma figura. La localización en *ortho* del catión respecto al sustituyente aceto, dirigirá el cambio de lado de la cadena carbonada para formar una dienona que sólo necesita tautomerizarse para producir el homogentisato que es el producto de la reacción catalizada por la HPPD.

## 2.7. Inhibidores

### 2.7.1. Sintéticos

Tricetonas y dicetonas alcaloides son producidas por un número variado de plantas [52] y líquenes [53]. Estos agentes son usados como herbicidas [54]. El modo de acción de este grupo de moléculas es la inhibición específica de la HPPD [19, 55, 56, 57]. Esta inhibición previene la formación de homogentisato lo que deriva en la inhibición de la síntesis en la muerte de la planta afectada ya que esta no puede fijar el CO<sub>2</sub> atmosférico. Se han desarrollado numerosas moléculas sintéticas similares a las anteriormente descriptas que inhiben específicamente a la HPPD y podrían ser usadas potencialmente como herbicidas [58, 59, 60, 61, 62]. Muchos de estos inhibidores como el Mesotriona, Sulcotriona y el Isofluxatol se utilizan en la actualidad como herbicidas (Fig. 2.7), cabe señalar que la toxicidad de estos compuestos sintéticos es considerable [63, 64, 65].

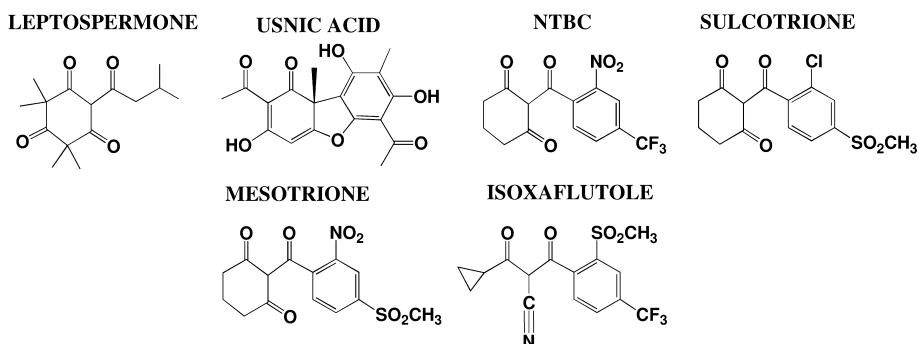


Figura 2.7: Inhibidores sintéticos

Dos defectos genéticos en el catabolismo de la tirosina en mamíferos, son tratados usando una molécula cuya estructura es muy similar a la de los inhibidores anteriormente descriptos. El 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1,3-colcohexanodiona (NTBC). El NTBC fue una de las primeras tricetonas en ser desarrolladas como herbicidas [65]. La pronunciada mejoría de los pacientes con tirosinemia de tipo I tratados con NTBC llevó a su rápida adopción como agente terapéutico [11]. Recientemente el NTBC ha sido usado para el tratamiento de pacientes con alcaptonuria<sup>1</sup> [66].

Pese a su importancia en medicina y agricultura, la forma en que estos inhibidores interactúan con la HPPD fue hasta hace poco tiempo incierto en gran medida. En la actualidad persisten conjeturas acerca de varios aspectos como el tautómero predominante del inhibidor, como se une con el centro metálico de la enzima, el estado de oxidación preferencial del Fe para unirse al inhibidor y la existencia de valores de IC50 variados. Recientemente muchas de estas características fueron establecidas fehacientemente para el NTBC actuando sobre la HPPD de *S. avermitilis* [67]. En soluciones acuosas las di

<sup>1</sup>Alcaptonuria: es una enfermedad hereditaria rara caracterizada por un trastorno del metabolismo de la tirosina y la fenilalanina.

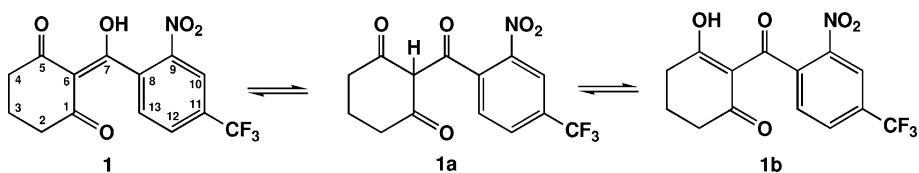


Figura 2.8: Tautómeros del NTBC

y tricetonas tienden a tautomerizar formando enoles (Fig. 2.8).

Conocer los tautómeros dominantes en soluciones acuosas es fundamental para conocer el mecanismo inhibitorio y posiblemente la selectividad de estos inhibidores. Se llevaron a cabo numerosos estudios acerca de estos equilibrios. Se han realizado cálculos en varias tricetonas que sugieren que los enoles exocíclicos (Fig. 2.8-1) y endocíclicos (Fig 2.8-1b) predominan en soluciones acuosas [62]. Esto es consistente con los estudios de cristalografía de rayos X llevados a cabo por Wu et al. que indican una estructura ambigua del sólido en donde las longitudes de enlace indican que están presentes tanto la forma exocíclica como la endocíclica [68]. En el caso del NTBC, debido a su  $pK_a$  la forma predominante es el enolato a  $pH$  fisiológico[67].

Bajo condiciones aeróbicas, en presencia de reductores, HPPD alterna entre la forma oxidada (Fe III) y la forma reducida (Fe II) [49, 69]. La acción de los inhibidores de la HPPD será efectiva si pueden actuar sobre ambas formas de la enzima. Prisbylla et al. propusieron que como la estructura de estas tricetonas es similar al sustrato de la enzima entonces se unirán de forma bidentada a la forma ferrosa activa de la misma [57], esta noción está soportada por el hecho de que la existencia de un grupo 1,3-diceto parece ser el requerimiento mínimo para que exista inhibición [53, 60, 70]. Recientemente García et al. mostró usando inhibidores marcados con isótopos radioactivos,

que los inhibidores dicetónicos se unen sólo a la forma ferrosa de la enzima [58]. Kavana y Moran observaron que el NTBC interactúa sólo con la forma ferrosa de la HPPD. Cuando se agrega NTBC a la forma ferrosa de la HPPD, en condiciones anaeróbicas, aparece una banda de transferencia de carga metal-ligando a 450 nm. Si el NTBC se agrega a la forma férrica no se observan cambios espectroscópicos en el espectro UV-Vis ni en el EPR. Por lo tanto, si ocurre la unión de la enzima con el inhibidor no involucra al centro metálico [67]. Cotejar las afinidades de los inhibidores por la HPPD es complejo porque muchos de los valores publicados tal vez no representen una medida de la afinidad de enlace real o pueden no ser comparables entre sí directamente. Un problema común en la determinación de la fuerza de interacción enzima-ligando es la validez de supuestos que se consideran antes de realizar la medición. Para la HPPD la mayoría de estas determinaciones están basadas en dos suposiciones. Primero que el enlace con el inhibidor es fácilmente reversible y segundo que éste involucra sólo un paso de asociación y disociación. Además con la excepción de los estudios con HPPD extraída de zanahoria [58], todos los valores de KI e IC<sub>50</sub> extraídos de la literatura fueron determinados con la enzima parcialmente purificada o cruda, conduciendo a problemas graves en la interpretación de los resultados.

Para el NTBC el mecanismo de enlace no es una asociación reversible simple. Existen al menos 3 pasos antes de que el inhibidor se enlace con la enzima. Existe un pre-equilibrio relativamente débil seguido por 2 uniones al centro metálico, siendo el último francamente irreversible. La observación de una banda de transferencia de carga débil para el complejo HPPD-Fe(II)-NTBC provee una oportunidad para definir el mecanismo de enlace mezclando la

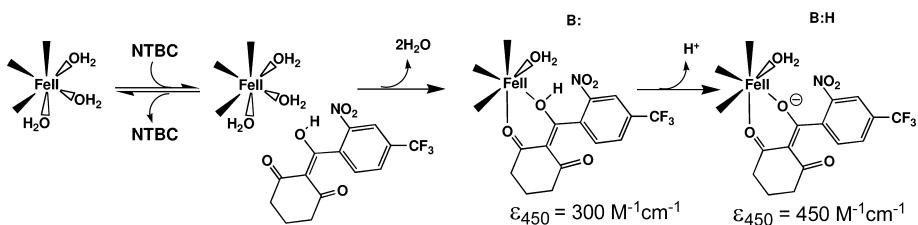


Figura 2.9: Mecanismo de unión entre NTBC y la forma ferrosa de la HPPD.

forma ferrosa de la enzima en condiciones anaeróbicas con el inhibidor en un espectrofotómetro de flujo detenido (*stopped flow*) bajo condiciones de pseudo primer orden. Se propuso la formación de un enlace bidentado entre el inhibidor y el Fe (II) del sitio activo (Fig 2.9).

La irreversibilidad del último paso de unión se propuso porque el complejo HPPD-Fe(II)-NTBC no reaccionó con el oxígeno molecular incluso en períodos de tiempo prolongados [67]. Dado que la reactividad de la HPPD con el oxígeno es conocida (39 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) [49], es posible que la oxidación de la forma ferrosa a la forma férrica incolora ocurra con la liberación del NTBC concomitante. Sin embargo hay una cantidad de factores que pueden influenciar la reversibilidad de esta reacción. La irreversibilidad observada para el NTBC en asociación con la HPPD de *S. avermitilis* puede ser tanto inhibidor como especie específica. Ellis et al. observaron que el 90 % de la actividad de la HPPD de un extracto citosólico de rata se recuperaba luego de 10 horas pasada la inhibición con el inhibidor relacionado. Esto implica una lenta disociación del complejo [71]. Por otro lado, el Mesotriona es usado como un herbicida debido a la observación de que es eliminado por los humanos de forma relativamente rápida sugiriendo una complejación totalmente reversible con la HPPD humana [72].

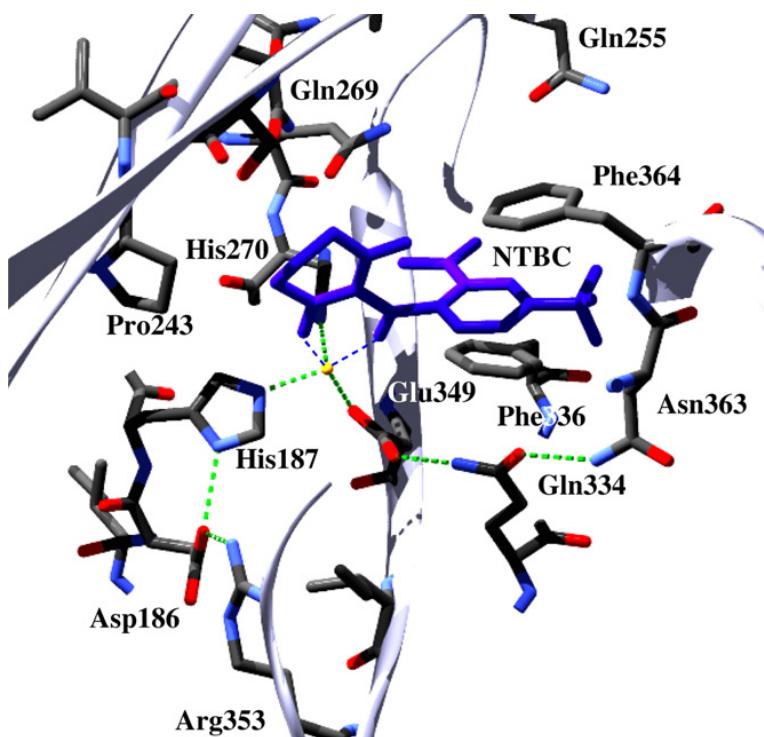


Figura 2.10: Estructura del NTBC (compuesto azul) enlazado en el sitio activo de la HPPD de *S. avermitilis*.

El complejo HPPD-Fe(II)-NTBC no es reactivo frente al oxígeno molecular [67]. En los últimos años se ha resuelto la estructura del NTBC en asociación con HPPD extraído de *S. avermitilis*. En esta estructura no hay consideraciones estéricas que impidan que el oxígeno reaccione con el ion metálico del sitio activo [21]. Se observó que el NTBC coordina de modo bidentado al ion metálico del sitio activo por medio de los oxígenos 5' y 7' (Fig 2.10).

El plegamiento de la enzima proveniente de *S. avermitilis* es muy similar al obtenido de la enzima extraída de *P. fluorescens*. Una hélice C-terminal se encuentra plegada a 40° hacia el solvente con respecto a esta última, como se observa en la enzima de planta en ausencia de ligando [18]. Recientemente

se observaron estos mismo plegamientos en la enzima extraída de rata y de *Arabidopsis spp.* complejada con ligandos inhibitorios [19]. Esta hélice provee una de las dos fenilalaninas que interaccionan con el anillo fenólico del inhibidor. Estas interacciones  $\pi$  junto con la complejación del átomo metálico son los únicos contactos energéticamente significativos con la superficie del sitio activo. Existen otras interacciones pero son del tipo de fuerzas de Van der Waals y ocurren en sitios completamente conservados. Estas observaciones conducen a pensar que la selectividad de los inhibidores está basada más en una biodisponibilidad que en una diferencia directa de afinidades por la HPPD de un organismo específico. Sin embargo, Yang et al. propusieron que pueden diseñarse inhibidores que muestren mayor afinidad por la HPPD de planta que por la proveniente de mamíferos [19].

Tanto la estrecha asociación de la HPPD con los inhibidores como la relativamente lenta aparición de la inhibición son consistentes con aquellos inhibidores que forman estados de transición análogos [67, 73]. Mientras esta aseveración es mayormente especulativa podemos ver, comparando la Figura 2.3 con la Figura 2.10, que el NTBC posee ciertas similitudes estructurales con el sustrato. La conformación de las fenilalaninas en torno al anillo fenólico del inhibidor tal vez contribuya a la oxigenación del anillo aromático en el caso del sustrato. Sin embargo es poco probable que estas interacciones contribuyan significativamente a mantener al sustrato unido en su sitio, ya que en general estas interacciones son bastante débiles [74]. Sin embargo las interacciones donor aceptor  $\pi$ -catión poseen considerables energías de enlace, consistentes con la estabilización del catión arenio propuesto (Fig. 2.6) [75, 76].

### 2.7.2. Derivados de plantas

El compuesto de partida para la síntesis de inhibidores efectivos análogos de la Sulcotriona como el Mesotriona o el NTBC es la sustancia de origen natural leptospermona<sup>2</sup>. Sin embargo existe muy poca bibliografía acerca de productos de origen vegetal que muestren actividad inhibitoria sobre la HPPD [79, 80]. Por eso la búsqueda de este tipo de compuestos como alternativa para el tratamiento de pacientes o como herbicida es objeto de muchas investigaciones.

Carpinella et al. [81] buscaron sustancias inhibidoras específicas de la HPPD en plantas [82, 83] nativas de la región central de Argentina. Para las especies más efectivas el compuesto responsable fue aislado e identificado. Se estudió en detalle el mecanismo cinético y la interacción de estos compuestos con la enzima [81]. Extractos obtenidos de *Dysphania ambrosioides*, *Otholobium higerilla* y *Solanum palinacanthum* mostraron un rango de inhibición de 71 a 80 % mientras que los extractos obtenidos de *Achyrocline satureoides*, *Baccharis coridifolia*, *Flourensia oolepis*, *Ophryosporus charua*, *Salvia cuspidate* y *Solanum sisymbriifolium* mostraron un porcentaje de inhibición mayor al 85 % cuando se testearon a 250 µg/ml. Entre los anteriores el extracto más efectivo fue el proveniente de *F. oolepis* con un IC<sub>50</sub> de 65,72 µg/ml [81]. Del extracto etanólico de esta planta, la flavona identificada como Pinocembrín (Fig. 2.11) fue aislada como el principio más activo. Esto compuesto mostró un IC<sub>50</sub> de 73,07 µM (18,71 µg/ml) mientras que la 2',4'-dihidroxichalcona<sup>3</sup>

<sup>2</sup>β-tricetona natural aislada de *Leptospermum scoparium* [77] y *Callistemon citrinus* [78].

<sup>3</sup>Sustancia también presente en el extracto de *F. oolepis* estructuralmente relaciona con el Pinocembrín.

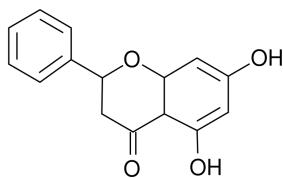


Figura 2.11: Pinocembrín

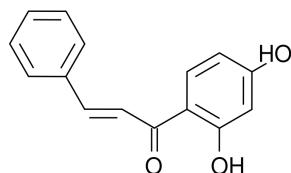


Figura 2.12: 2',4'-dihidroxichalcona

(Fig. 2.12) mostró un IC<sub>50</sub> de 456,753 µM (109,662 µg/ml) [81]. Carpinella et al. encontraron que el Pinocembrín actúa como un inhibidor reversible y no competitivo[81].

## 2.8. Los complejos de coordinación

Como dijimos en la sección 2.2 el sitio activo de la enzima presenta un ion Fe (II) complejado por los aminoácidos que ya indicamos. De ahí la necesidad de conocer la química de los complejos de metales de transición.

Los iones metálicos existen como complejos en solución. Los ligandos son aniones o moléculas polares, y tienen un par de electrones de valencia no compartidos como ocurre con H<sub>2</sub>O, X, NH<sub>3</sub>, PR<sub>3</sub>, RCN, etc. La unión entre el ligando y el ion metálico puede ser de tipo electrostática, entre el catión y los extremos negativos de los dipolos o iones, y la capacidad para formar los complejos dependerá del aumento de carga positiva del ion metálico y de la

disminución del tamaño del átomo [84].

Las diversas combinaciones entre los métales y sus ligandos resultan en compuestos de diferentes propiedades, tales como la solubilidad y la polaridad que pueden ser usadas en síntesis, separaciones, purificaciones y análisis.

Se debe considerar además que para entender la unión entre los iones de los metales de transición y los ligandos, no sólo se debe considerar el aspecto electrostático, sino que también se debe considerar un cierto grado de carácter covalente [84].

### 2.8.1. Carga y número de coordinación

La carga del complejo se determinará por el balance o suma de las cargas positivas y negativas con respecto al átomo central y los ligandos alrededor. Cuando los ligandos se coordinan al metal, lo que ocurre en la llamada esfera de coordinación, el átomo del ligando que se une directamente con el metal se denomina átomo donor; el número total de átomos que actúan como donores determina el número de coordinación (NC), que con frecuencia depende del tamaño del ion metálico y de los ligandos que lo rodean [84].

### 2.8.2. Ligandos

Los ligandos necesitan para su unión con el metal al menos un par libre de electrones que sean capaces de coordinarse al ion metálico. Los átomos que son capaces de esto los podemos encontrar en la esquina superior derecha de la tabla periódica; los más importantes son el Oxígeno y el Nitrógeno, seguidos por el Carbono, Fósforo, Azufre, Cloro, Flúor, etc. A los ligandos los

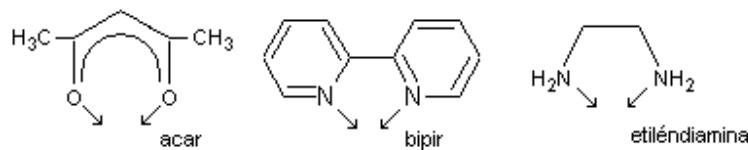


Figura 2.13: Ejemplo de ligandos bidentados

podemos clasificar de acuerdo al número de átomos donores, como ligandos monodentados o polidentados. En particular nos centraremos en estos últimos debido a que es el modo de ligado de los inhibidores en estudio [84].

#### 2.8.2.1. Ligandos polidentados o quelatos

Estos ligandos son capaces de tener dos o más uniones simultáneamente (bidentados, tridentados, tetradentados, etcétera); como ejemplo de estos ligandos tenemos a los iones fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), carbonato  $\text{CO}_3^{2-}$ , oxalato ( $\text{ox}^{2-}$ ), la bipiridina (bipy), etiléndiamina (en) como lo podemos ver en la figura 2.13. Como los complejos formados a partir de este tipo de ligandos fijan el metal entre dos o más átomos donores. Son usados como agentes precipitantes o agentes quelantes [84].

#### 2.8.3. Complejos en sistemas biológicos

Además de los elementos básicos de la vida (carbono, nitrógeno, oxígeno e hidrógeno) tenemos elementos metálicos que resultan esenciales aún en pequeñas cantidades, y entre ellos tenemos a los metales de transición como: vanadio, cromo, hierro, cobre, zinc, cobalto, níquel, molibdeno y manganeso. Dichos elementos también forman complejos con moléculas presentes en sistemas biológicos.

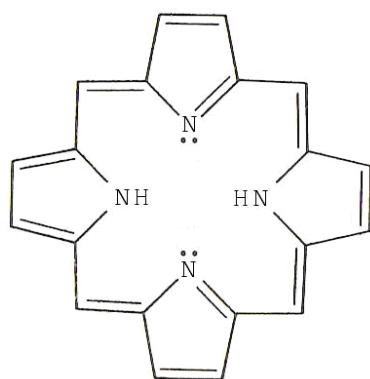


Figura 2.14: Estructura del agente quelante porfirina

Los derivados de la porfina, denominados porfirinas (Fig. 2.14), forman complejos metálicos planos a través de la coordinación de sus cuatro átomos de nitrógeno al centro metálico. Estos derivados varían de acuerdo a sus sustituyentes y al tipo de metales a los que se coordinan; entre los derivados más importantes se encuentran el grupo hemo, que contiene Fe(II) y la clorofila, que contiene Mg (II) [84].

El grupo hemo lo podemos encontrar en la mioglobina, hemoglobina y citocromos entre otras moléculas. En el complejo formado con hemo, el Fe(II) tiene seis uniones coordinantes, cuatro en el plano y dos perpendiculares (Fig. 2.15-a). En la hemoglobina y mioglobina, una de las uniones perpendiculares se coordina con un átomo de nitrógeno que pertenece al residuo de histidina, y el otro está disponible para coordinarse con alguna molécula de oxígeno (oxihemoglobina, de color rojo brillante) o de agua (desoxihemoglobina, color rojo púrpura) como observamos en la figura 2.15-b.

Moléculas como el CO actúan como venenos porque el enlace que se forma con el Fe(II) es más fuerte que el que existe con el O<sub>2</sub>. También cuando consumimos cantidades insuficientes del metal se sufre de anemia, que es

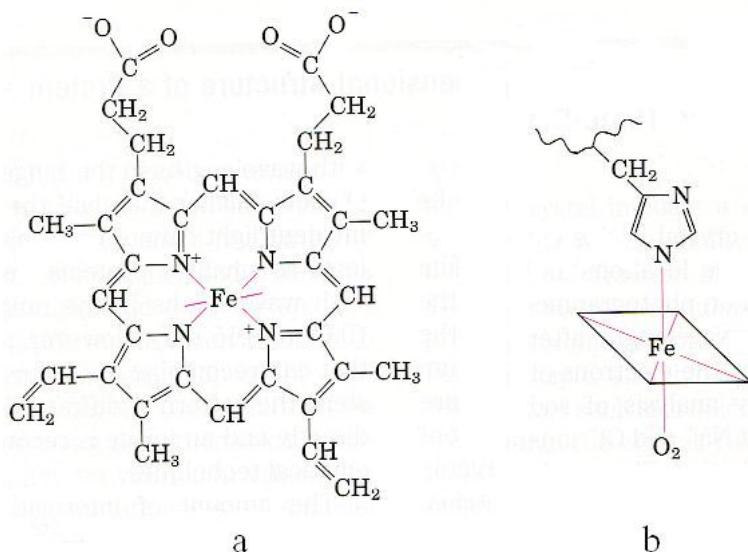


Figura 2.15: En (a), estructura del complejo hemocoordinado con  $\text{Fe}^{2+}$  y en (b) estructura de coordinación de la hemoglobina.

una reducción en la cantidad de hemoglobina, ya que sin ella no existe el transporte del oxígeno hacia las células del cuerpo para la producción de energía [84].

#### 2.8.4. Reactividad del metal

La naturaleza del metal tiene gran importancia por la influencia en la reactividad del ligando y la formación favorable o desfavorable de los complejos. El enlace covalente coordinado entre el átomo donor y el centro metálico puede ser sencillo, doble o incluso triple. Se conocen ejemplos de enlaces metal-ligando triples (con oxígeno, nitrógeno y carbono) en complejos con metales desde el titanio hasta el osmio, y algunos más recientes entre iridio y alquilidinos, los cuales están predominantemente en estado de oxidación de +4 e incluso mayores.

Existen tantas excepciones y variaciones para la formación de complejos que resulta difícil predecir de manera general el comportamiento e interacciones del metal con los ligandos a los que se puede unir. Los complejos del grupo IV solo se conocen en estados de oxidación +4. En el grupo V hay complejos con estados de oxidación mas grande (+5) como es el caso para compuestos con el ion vanadilo ( $\text{VO}^{+2}$ ). En el grupo VI,  $\text{MoOCl}_3$  y  $\text{MoOCl}_4$  son sólidos con cloruros puente y se favorecen los enlaces múltiples, lo que se observa también para el caso de la química con Osmio en el grupo VIII. Se observan ligandos terminales de alquilideno sin sustituyentes heteroatómicos para los grupos del V-VII, mientras que para otros metales éstos ligandos comúnmente forman puentes [84].

### 2.8.5. Teorías de la estructura de complejos

Los metales de transición, que son los átomos centrales en los compuestos de coordinación, contienen orbitales de valencia parcialmente llenos que son capaces de coordinarse con ligandos para formar complejos. Varias teorías han sido usadas para la descripción de los compuestos de coordinación y estas son, la Teoría de Enlace Valencia, la Teoría de Campo Cristalino, Teoría de Campo ligando y la Teoría de Orbitales Moleculares [84].

#### 2.8.5.1. Teoría de enlace de valencia (TEV)

Esta teoría hace referencia al principio de hibridización para explicar las fuerzas de unión en términos de un enlace de coordinación covalente; explica además, la existencia de electrones en estados de energía altos, o complejos

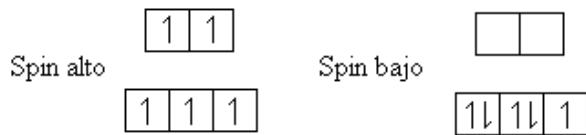


Figura 2.16: Arreglo de electrones en un complejo de alto espín (a) y en otro de bajo espín (b)

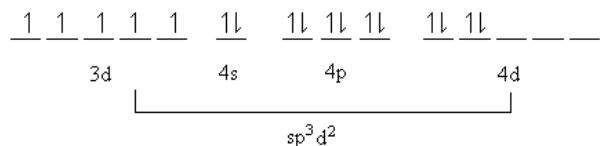


Figura 2.17: Orbital híbrido  $sp^3d^2$

de espín alto, y otros denominados complejos de espín bajo. Un complejo de espín alto ocurre cuando los electrones del metal están distribuidos en los orbitales disponibles de modo que permanecen sin aparearse tanto como sea posible (por ejemplo  $[CoF_6]^-$ ); cuando ésto no es posible y se encuentran apareados el complejo resultante es de espín bajo (por ejemplo,  $[Co(CN)_6]^-$ ).

Los metales de la primera serie utilizan los orbitales 3d o 4d para formar complejos octaédricos; si tomamos el caso para  $Fe^{3+}$  el cual tiene 5 electrones desapareados y los acomodamos cada uno en un orbital d, en un complejo de espín alto, todos estarán desapareados. En un complejo de espín bajo, los electrones están confinados al conjunto de orbitales de menor energía, lo que da como resultado un electrón no apareado (Fig. 2.16).

En complejos con 5 electrones no apareados, el ligando no se enlaza fuertemente para forzar apareamiento de los electrones 3d y Pauling propuso que se usan los orbitales 4d para enlazarse (Fig. 2.17).

En los complejos en donde existe un electrón no apareado, este es obligado por la fuerza del ligando a aparearse lo que nos da orbitales 3d para

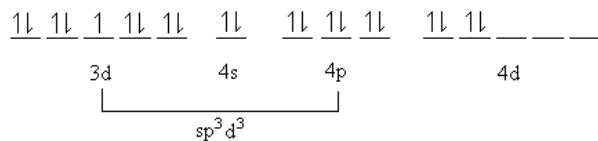
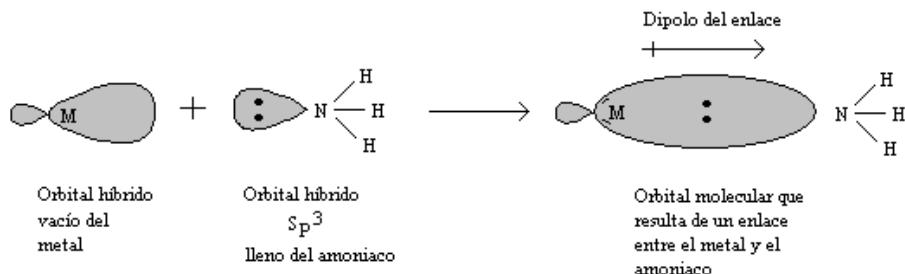
Figura 2.18: Orbital híbrido  $sp^3d^3$ 

Figura 2.19: Representación de enlace metal-ligando como interacción ácido-base de Lewis.

hibridación y enlace, lo que podemos ver en la figura 2.18 [84].

### 2.8.5.2. Teoría del campo cristalino

La interacción entre el metal y el ligando puede ser considerada una reacción ácido-base de Lewis, la base con pares de electrones sería el ligando y el aceptor serían los orbitales vacíos en el metal en su papel de ácido, dicha interacción se encuentra esquematizada en la figura 2.19.

Sin embargo, muchas interacciones se deben a fuerzas electrostáticas, como es el caso de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{SCN}^-$ , o para moléculas polares que se unen con sus extremos negativos por la existencia de pares de electrones no compartidos.

Cuando el ligando se aproxima al metal, sus orbitales d son perturbados por la carga negativa del ligando. La energía del ion más los ligandos es menor (el complejo es más estable) cuando los ligandos son atraídos hacia el centro del metal, pero existe también una repulsión entre los electrones externos del

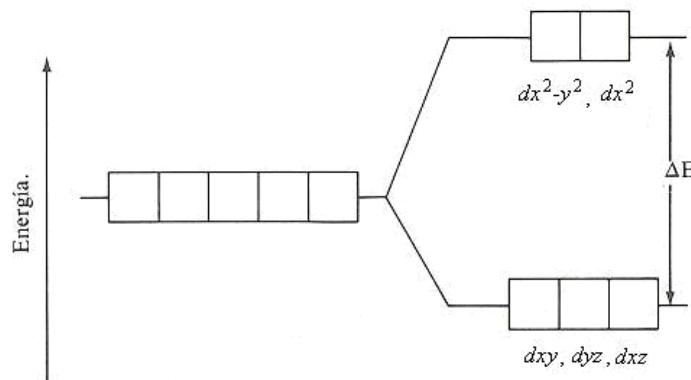


Figura 2.20: Desdoblamiento de energía de los orbitales d en un campo cristalino octaédrico.

metal y las cargas negativas de los ligandos. Esta fuerza de interacción se conoce como campo cristalino, e incrementa la energía de los electrones d. Pero los orbitales d no se comportan de la misma manera bajo la influencia del campo cristalino. Si observamos la forma de los orbitales d (Fig. 2.24), los cinco poseen la misma energía cuando el ion esta aislado (se dice en este caso que los 5 orbitales están degenerados).

Cuando los ligandos se aproximan, los orbitales  $d_{x^2-y^2}$  y  $d_{z^2}$ , que su orientación es hacia los ejes x, y y z, son repelidos con más fuerza que los orbitales  $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$  y  $d_{yz}$  que están orientados entre los ejes a los que se aproximan los ligandos, y es cuando se da un desdoblamiento de energía. Los  $d_{x^2-y^2}$  y  $d_{z^2}$  aumentan su energía y los otros la disminuyen (Fig. 2.20).

Las diferencias de energía entre los orbitales d, ( $\Delta E$  de la Fig. 2.20), tiene el mismo orden de magnitud que la energía de un fotón de luz visible (energía de desdoblamiento del campo cristalino). Entonces, cuando un complejo absorbe luz visible, excita a los electrones d. Esto lo podemos ver con el ion  $[Ti(H_2O)_6]^{3+}$ , que sólo se tiene un electrón d para Ti (III) [84].

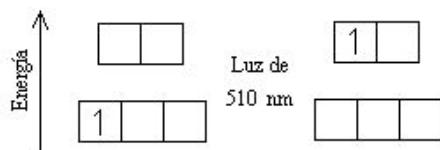


Figura 2.21: Excitación del electrón del complejo del orbital d de menor energía a otro de mayor energía por irradiación de luz a 510 nm.

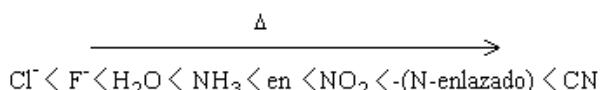


Figura 2.22: Serie espectroquímica.

Esta absorción de energía causa que las sustancias con estos iones presenten un color púrpura. Las diferencias en la absorción de cada complejo para dar colores, dependerá del metal y de los ligandos en cuestión. Al acomodar los ligandos en el orden de sus capacidades para aumentar la diferencia de energía,  $\Delta E$ , se obtiene la llamada serie espectroquímica; en la figura se dan a conocer algunos de ellos.

Aquellos que quedan a la izquierda de la serie se conocen como ligandos de campo débil, y los de la derecha son ligandos de campo fuerte. Cuando se cambian los ligandos hay cambios en el desdoblamiento de orbitales d. Esto lo observamos con algunos complejos de cromo (III) en la figura 2.23.

Se puede observar que a medida que el campo ejercido por los seis ligandos aumenta, el desdoblamiento de los orbitales d también aumenta y como el espectro de absorción esta relacionado con esta separación de energía, los complejos varían de color.

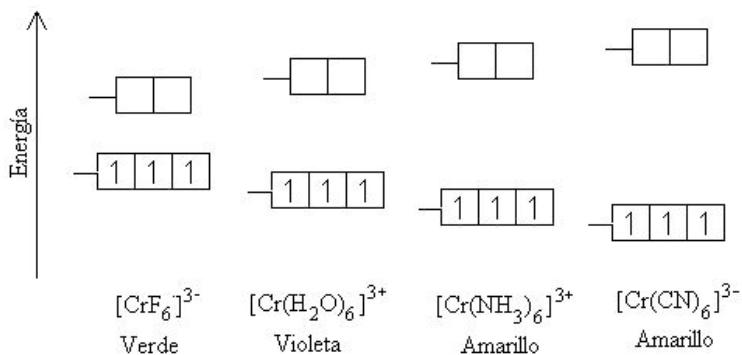


Figura 2.23: Desdoblamiento del campo cristalino en una serie de complejos octaédricos del cromo (III).

#### 2.8.5.3. Teoría del Campo ligando (TCL)

Dentro de un complejo octaédrico  $ML_6$ , el metal está en una posición simétrica, y si ahora lo tomamos como el origen de los ejes de un plano cartesiano, los seis ligandos se distribuyen en los ejes, y los orbitales están divididos de acuerdo al tipo de orbitales moleculares que el metal y el ligando pueden formar (s o p) (Fig. 2.24).

$$s : S, P_x, P_y, P_z, d_{x^2-y^2}, d_{x^2}$$

$$p : d_{xy}, d_{yz}, d_{xz}$$

Los orbitales de los ligandos forman un nuevo grupo de orbitales ligando con la simetría correcta para formar enlaces s y p con los orbitales del metal, incluso con el orbital de tipo S. En los ejes x,y y z positivos serán para los orbitales  $s_1, s_2$  y  $s_3$ , y para los ejes x,y y z negativos los orbitales  $s_4, s_5$  y  $s_6$ . Como los lóbulos de máxima amplitud de los orbitales  $d_{xy}, d_{yz}$ , y  $d_{xz}$  están desviados de los orbitales sigma de los ligandos, no son afectados y son por lo tanto orbitales de no enlace.

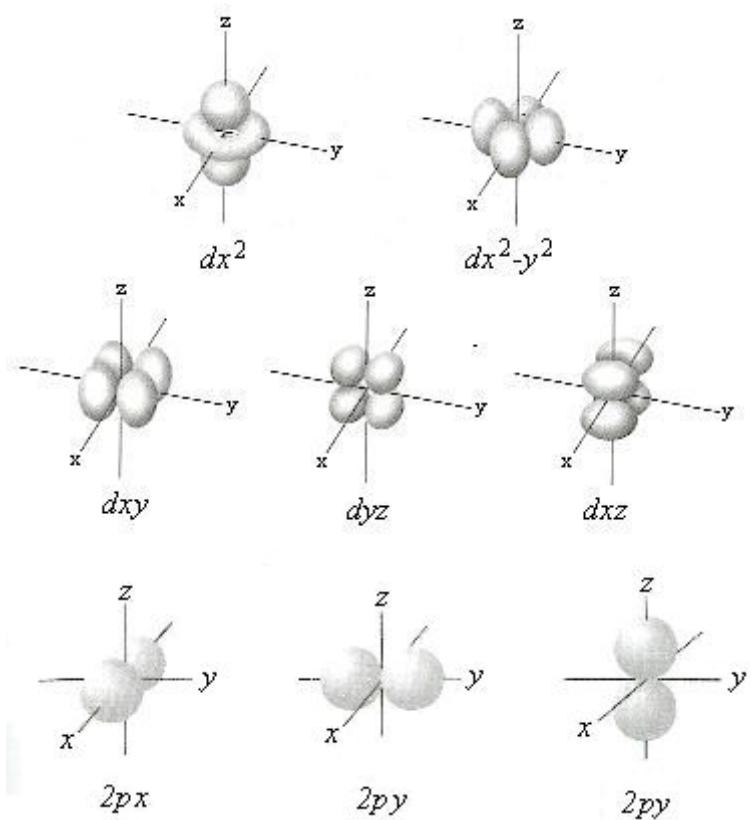


Figura 2.24: Representación de los orbitales d y p.

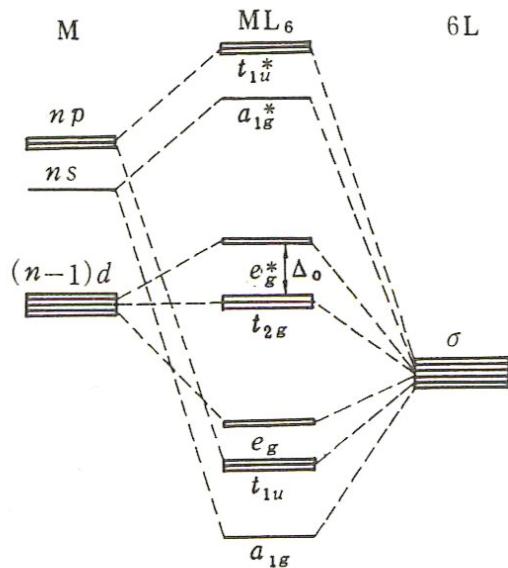


Figura 2.25: Diagrama de niveles de energía de los orbitales de un complejo  $ML_6$ .

La combinación de los seis orbitales del metal y los seis del ligando genera doce orbitales, la mitad son de enlace y la otra de anti-enlace (Fig. 2.25). Como el ligando es mas electronegativo, sus niveles de energía son mas bajos, y sus electrones llenan los orbitales de enlace, mientras que los electrones del metal llenan los orbitales de anti-enlace que son de mayor energía y están divididos en dos grupos, tres con menos energía ( $t^2_g$ ) y  $e_g^*$  de mayor energía, de acuerdo a la fuerza del campo ligando.

La separación entre ellos es conocida como energía de separación ( $\Delta E_o$ ) que es análoga a la energía del desdoblamiento del campo cristalino de la teoría anterior [84].

# Capítulo 3

## Materiales y Métodos

*“Todos aspiramos a este gozo de conocer, cuya presunción contribuye al honor del espíritu humano.”*

*Jean Rostand, Introducción a la historia de la Biología.*

### 3.1. Acidez

La química moderna se apoya mucha veces en el modelado de parámetros químicos y biológicos basados en la predicción de propiedades moleculares. El primer análisis que se llevó a cabo fue la obtención de los valores de  $pK_a$  para los inhibidores en estudio, con el fin de poder predecir el grado de ionización al pH de trabajo de la enzima HPPD (6,4)[81]. Esto es de radical importancia debido a que para poder modelar los complejos formados entre los distintos inhibidores y el sitio activo de la enzima lo más verosímilmente posible es necesario conocer si los compuestos con los que trabajaremos se encuentran ionizados al pH en el cual se realizan los estudios de inhibición in vitro. Para

ello, se utilizó el programa ACD/pK<sub>a</sub> DB [85].

El programa ACD/pK<sub>a</sub> DB del paquete ACD Labs 6.0 permitió el cálculo de pK<sub>a</sub> a partir de una predicción basada en aproximación por fragmentos. Esto significa que el software consiste en una extensa base de datos de fragmentos estructurales y utiliza un algoritmo holístico para calcular los valores de pK<sub>a</sub> de la molécula en cuestión basado en los fragmentos que esta contiene.

ACD/pK<sub>a</sub> DB utiliza ecuaciones Hammett derivadas de una librería de más de 14.000 compuestos. Un estudio realizado por M. Meloun y S. Borodovska [86] compara valores predichos con valores experimentales de pK<sub>a</sub> para tres series de compuestos. Usando la técnica de regresión lineal (descripta en el artículo), concluyeron que ACD/pK<sub>a</sub> provee la predicción de valores más precisa en comparación con el resto de los programas mostrando mejores resultados en 6 aspectos estadísticos [86, 85].

Con este programa se realizó una curva de calibración con algunos compuestos conocidos a fin de corroborar el correcto funcionamiento del programa y para poder validar los resultados obtenidos. Los compuestos ensayados fueron los presentados en la tabla 3.1.

Luego de realizar la curva de calibración se calcularon los pK<sub>a</sub> de los compuestos en estudio en la presente Tesis (Tabla 3.2).

También se calculó el pK<sub>a</sub> de los compuestos de la tabla 3.5 que se utilizaron para realizar la validación del método de *docking* (sección 3.8.6).

Tabla 3.1: Compuestos utilizados para validar los  $pK_a$  obtenidos para los inhibidores en estudio.

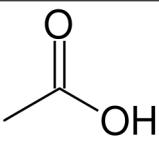
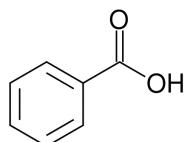
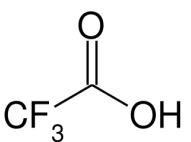
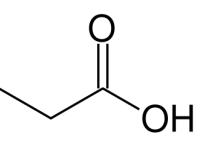
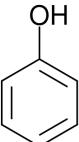
Compuesto	Estructura
1	
2	
3	
4	
5	

Tabla 3.2: Inhibidores en estudio en el presente trabajo.

Compuesto	Estructura
Pinocembrín	
2',4'-dihidroxichalcona	
NTBC	
Mesotriona	

### 3.2. Introducción a la mecánica cuántica

En este capítulo, se realizará un breve repaso de los modelos y métodos computacionales, los cuales son herramientas de la Química Computacional. Éstos han sido de invaluable utilidad no sólo por responder algunas preguntas planteadas, sino también, por abrir otras. Se desarrollarán en este Capítulo, los modelos de Mecánica Molecular y Mecánica Cuántica, ambos basados en principio, en la aproximación de Born-Oppenheimer. El postulado fundamental de la Mecánica Cuántica es que las propiedades (observables físicas) de cualquier sistema están descriptas por una función de onda ( $\Psi$ ). La energía del sistema puede obtenerse mediante la acción de un operador Hamiltoniano ( $H$ ) actuando sobre la función de onda mediante la ecuación de autovalores:

$$H\Psi = E\Psi \quad (3.1)$$

En la ecuación 3.1 el escalar  $E$  es el autovalor de energía del sistema para un estado estacionario, es decir un sistema donde el potencial externo no cambia con el tiempo. La autofunción, expandida sobre un conjunto de  $M$  bases convenientes, puede ser representada por un vector columna de  $N$  componentes y el operador  $H$ , como una matriz  $M \times M$ . La función de onda,  $\Psi$ , no es por sí misma una observable, pero el producto de  $\Psi$  por su compleja conjugada, es decir  $|\Psi^*\Psi|$ , es una densidad de probabilidad. La probabilidad de que un sistema químico sea encontrado dentro de alguna región del espacio multidimensional es igual a la integral de  $|\Psi^*\Psi|$  sobre esa región del espacio. Para que  $\Psi$  se considere como una función aceptable, debe ser integrable cuadráticamente. Además, la integración cuadrática sobre to-

do el espacio cartesiano debe resultar en el número de N de electrones. Una función de onda con estas características, se denomina función de onda aceptable de N-electrones. Esto último tiene como consecuencia (o determina) que la función tenga sentido físico. Sin embargo, a pesar de esta restricción y la representación formal, la naturaleza de  $\Psi$  es difícil de hallar. A lo largo del capítulo, se mostrará en qué forma  $\Psi$  puede ser expresada. En general, la ecuación 3.1 tiene muchas autofunciones  $\Psi$  aceptables para una dada molécula, resultando en diferentes autovalores  $E$  asociados a cada autofunción. De esta forma, existe un conjunto completo de autofunciones  $\Psi_i$  con autovalores  $E_i$  asociados, si aquellas son ortonormales, es decir:

$$\int \Psi_i \Psi_j d\tau = \delta_{ij} \quad (3.2)$$

donde  $\delta_{ij}$  es el delta de Krönecker, cuyo valor es 1 si  $i=j$ , o bien es cero en cualquier otro caso. Esta integral implica la integración de las autofunciones en un elemento de volumen  $d\tau$  del espacio 3N-dimensional de coordenadas cartesianas (donde N es la cantidad de partículas del sistema) y N coordenadas de espín. En adelante, omitiremos esta dependencia, aún cuando en todo momento se intentará encontrar autofunciones del operador de espín cuadrado y del hamiltoniano molecular simultáneamente, toda vez que resulte posible. Esta es la denominada ecuación de Schrödinger independiente del tiempo y no relativista. Se puede escribir de una forma más rigurosa, como sigue:

$$H_{tot}(Q, q)\Psi(Q, q) = E_{tot}\Psi(Q, q) \quad (3.3)$$

$$H_{tot}(Q, q) = T_n(Q) + T_e(q) + V_{nn}(Q) + V_{ne}(Q, q) + V_{ee}(q) \quad (3.4)$$

Extendiendo cada operador de la parte derecha de la ecuación y empleando unidades atómicas se obtiene:

$$H_{tot} = -\frac{1}{2} \sum_{A=1}^M \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 + \sum_A \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{R_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (3.5)$$

donde Q representa el conjunto de las coordenadas espaciales de los núcleos y q a las coordenadas espaciales y de espín de los electrones. La parte derecha de la ecuación 3.5 contiene, respectivamente, los operadores de energía cinética nuclear y electrónica y los correspondientes a los potenciales núcleo-núcleo, núcleo-electrón, repulsión interelectrónicos.

El hamiltoniano de la ecuación 3.5 contiene términos de atracción y repulsión de a pares, implicando que ninguna partícula se mueve independientemente de las demás. Esta interdependencia entre las partículas de un sistema se denomina “correlación”. El empleo de este hamiltoniano que involucra el movimiento correlacionado de las partículas hace que sea muy difícil encontrar funciones de onda exactas, ya que la ecuación 3.5 de N-partículas no resulta separable.

### 3.3. Aproximación de Born-Oppenheimer

La aproximación de Born-Oppenheimer (BO) se basa en la consideración práctica de que incluso el más pequeño de todos los núcleos, el protón (<sup>1</sup>H),

pesa más de 1.800 veces que un electrón, y para un núcleo típico como el del carbono, la relación es de 20.000. En otras palabras, el relajamiento electrónico respecto al movimiento nuclear es instantáneo. De esta forma, es posible desacoplar los movimientos electrónicos y nucleares, y computar la energía electrónica para posiciones nucleares fijas. Por ello, la aproximación de BO corresponde a despreciar el acoplamiento entre las velocidades de los núcleos y electrones, es decir que los núcleos están estacionarios desde el punto de vista electrónico. Desde este punto de vista, la aproximación de BO, simplifica el  $H_{tot}$ , debido a que, como no hay movimiento nuclear, la energía cinética nuclear ( $T_n$ ) es cero y la energía potencial de la repulsión entre núcleos ( $V_{nn}$ ) es una constante (ecuación 3.4). Entonces el Hamiltoniano de la ecuación se reduce al llamado Hamiltoniano electrónico:

$$H_{tot} = T_{nuc} + H_{elec} \Rightarrow H_{tot} = H_{elec} \quad (3.6)$$

$$H_{elec} = T_e(q) + V_{ne}(Q, q) + V_{ee}(q) + V_{nuc}(Q) \quad (3.7)$$

Se define el término  $v(r)$  como “potencial externo”, el cual no es más que el que actúa sobre los electrones, debido a la carga de los núcleos.

$$\nu(r_i) = \sum_A^M \frac{Z_A}{|R_{iA}|} \quad (3.8)$$

La ecuación de Schrödinger para el movimiento electrónico está dada por:

$$H_{elec} \Psi_{elec}(Q, q) = E_{elec} \Psi_{elec}(Q, q) \quad (3.9)$$

La función de onda electrónica  $\Psi_{\text{elec}}$  como la  $E_{\text{elec}}$  dependen paramétricamente de las coordenadas nucleares, ya que según la aproximación depende de las posiciones de los núcleos y no de sus momentos. De este modo se puede expresar  $E_{\text{elec}}$  en función de la coordenadas nucleares, es decir,  $E_{\text{elec}}(Q)$ . De este forma se puede calcular el estado químico de un sistema para una determinada configuración nuclear resolviendo la ecuación de Schrödinger electrónica. Debido a que por cada configuración de las coordenadas nucleares hay una  $\Psi_{\text{elec}}$  y una  $E_{\text{elec}}$  correspondiente al estado fundamental (por lo tanto una  $E_{\text{tot}}$ ) se puede construir un superficie de energía potencial del sistema. La explicación anterior se realizó desde el punto de vista de los electrones, los cuales ven un potencial externo debido a que los núcleos que están fijos. Desde el punto de vista de los núcleos, un potencial externo debido a los electrones que se ajusta instantáneamente a su movimiento. Por lo tanto, si los núcleos cambian sus coordenadas en  $\Delta Q$ , entonces la función de onda electrónica cambia instantáneamente de  $\Psi_{\text{elec}}(Q, q)$  a  $\Psi_{\text{elec}}(Q + \Delta Q, q)$  y la energía electrónica cambia de  $E_{\text{elec}}(Q)$  a  $E_{\text{elec}}(Q + \Delta Q)$ . De este modo, a medida que los núcleos se mueven, la energía electrónica varía suavemente como una función de las coordenadas nucleares y, por ende, la  $E_{\text{elec}}(Q)$  se convierte efectivamente en la energía potencial para el movimiento nuclear. Los electrones actúan como una nube de carga negativa que aporta un potencial que mantiene cerca los núcleos cargados positivamente. Por consiguiente, la ecuación de Schrödinger para el movimiento nuclear es:

$$H_n \Psi_n = E_n \psi_n \quad (3.10)$$

Las variables en la ecuación de Schrödinger nuclear son las coordenadas nucleares. La energía E (ecuación 3.10) es la energía total de la molécula, ya que el hamiltoniano nuclear incluye el operador para la energía cinética nuclear y el término correspondiente a la energía electrónica.

### 3.4. Teoría Funcional de la Densidad (DFT)

La teoría funcional de la densidad (DFT) es una aproximación a la estructura electrónica de átomos y moléculas, que en las últimas décadas se ha tornado muy importante. DFT a diferencia del método de Hartree-Fock (HF), tiene en cuenta, dentro de su formalismo, una buena estimación de la correlación electrónica. Muchos problemas que antes eran tratados con Hartree-Fock, o con métodos post-Hartree-Fock son actualmente tratados empleando DFT, el cual, en algunos casos, presenta mejor concordancia con los datos experimentales. Además, posee un fuerte atractivo, debido a que puede ser aplicado al estudio de sistemas de tamaño moderado a grande ( $N_{\text{átomos}} \geq 20$ ) obteniendo resultados con una exactitud aceptable. El costo computacional es semejante al de HF (debido a que conceptualmente es similar) y, algunas veces, es una fracción del requerido utilizando métodos de correlación electrónica como teoría de perturbaciones de muchos cuerpos (métodos basados en Moeller-Plesconjunto) y coupled cluster. Asimismo, DFT proporciona resultados de calidad comparable con coupled cluster. El desarrollo de funcionales de correlación-intercambio (ver más adelante), de algoritmos más eficientes y la implementación de éstos en varios paquetes de programas de cálculo (GAMESS, Gaussian, NWChem, Siesta, ADF, etc.)

contribuyó en forma significativa a la popularidad de los métodos de DFT.

### 3.4.1. Teoremas de Hohenberg-Kohn

DFT se basa en el uso de la densidad electrónica  $\rho(r)$  en vez de una función de onda. El uso de la densidad electrónica como una variable fundamental en la descripción de un sistema electrónico se remonta a inicios del siglo XX, cuando Drude aplicó a la teoría de los gases a un metal, considerando a los electrones como un gas homogéneo, a fin de poder desarrollar una teoría sobre la conducción térmica y eléctrica. Desde entonces, varios modelos (Drude, Sommerfield, Thomas-Fermi, Dirac) fueron propuestos y perfeccionados. El modelo de Thomas-Fermi se valió de argumentos estadísticos para aproximar la distribución electrónica a un gas uniforme de electrones (gue), dando como resultado una expresión para la energía cinética de este sistema ( $T_{gue}$ , ecuación 3.11).

$$T_{gue} [\rho(r)] = \frac{3}{10} (3\pi^2)^{\frac{2}{3}} \int \rho^{\frac{5}{3}}(r) dr \quad (3.11)$$

Cabe destacar que la energía cinética  $T$  está en función de la densidad, mientras que la densidad en sí es una función de las coordenadas espaciales ( $r$ ). Una función cuyo argumento es otra función se denomina funcional.

El uso de la densidad electrónica como variable básica fue rigurosamente fundamentado con la publicación de dos teoremas de Hohenberg y Kohn en 1964, los cuales proporcionan las bases de la teoría funcional de la densidad moderna.

### 3.4.1.1. Primer Teorema de Hohenberg-Kohn

El primer teorema de Hohenberg-Kohn (HK) establece que la densidad electrónica de un estado basal no degenerado determina en forma única el operador Hamiltoniano (dentro de la aproximación de BO) y, con ello, todas las propiedades del sistema. En otras palabras, el teorema demuestra que la densidad determina al potencial externo,  $v(r)$  y al número de electrones,  $N$ , y con ello el Hamiltoniano. La demostración de este teorema puede ser encontrada en las ref. [87, 88].

Como consecuencia de que la energía del estado basal es un funcional de densidad electrónica de ese estado, también lo deben ser cada uno de los componentes de la energía.

$$E_0 = E_V [\rho_0] = T [\rho_0] + E_{ee} [\rho_0] + E_{Ne} [\rho_0] \quad (3.12)$$

$$E_0 = E_V [\rho_0] = F [\rho_0] + E_{Ne} [\rho_0] \quad (3.13)$$

Conteniendo  $F$  a la energía cinética y la interacción interelectrónica. En la ecuación 3.12, el subíndice  $V$  es colocado para explicitar la dependencia con el potencial externo. En dicha ecuación, el término  $T$  es la energía cinética de los electrones,  $E_{ee}$  el potencial de repulsión interelectrónica y  $E_{Ne}$  el potencial de atracción núcleo-electrón, este término contiene al potencial externo. En el caso de una molécula aislada el potencial externo es precisamente el generado por los núcleos  $v_{ext}(r)$ . La ecuación 3.13 posee los mismos términos que la ecuación 3.7, a excepción del potencial de repulsión núcleo-núcleo, la cual

es una constante dentro de la aproximación de BO y varía con la posición espacial de los mismos. El funcional de la energía de la ecuación 3.12, define el funcional  $F[\rho]$  que es un funcional universal, porque es independiente de  $v(r)$  y, por ende, del sistema también. La aproximación más simple, si se evalúa a priori la energía molecular usando sólo la densidad electrónica como una variable, es considerar el sistema en forma clásica, en cuyo caso la atracción entre los núcleos y los electrones es:

$$E_{Ne} [\rho_0] = \rho(r)v(r)dr \quad (3.14)$$

### 3.4.1.2. Segundo Teorema de Hohenberg-Kohn

El segundo teorema explica el porqué DFT es definida como una teoría aplicada solamente el estado basal.

El segundo teorema establece que, habiendo cualquier densidad electrónica aproximada,  $\tilde{\rho}(r)$ , de modo que  $\tilde{\rho}(r) \geq 0$  y  $\int \tilde{\rho}(r)dr = N$ , la energía total será siempre mayor o igual a la energía exacta del sistema, es decir,  $E[\tilde{\rho}] \geq E[\rho_0]$ .

La densidad electrónica,  $\tilde{\rho}(r)$ , define su propio  $v(\tilde{r})$  y, por consiguiente, el Hamiltoniano  $\tilde{H}$  y la función de prueba  $\tilde{\Phi}(q)$ . Esta función de onda, a su vez, puede ser usada como una función de onda de prueba para el Hamiltoniano exacto, es decir, el que posee el  $v(r)$  real del sistema. Aplicando el teorema variacional se obtiene:

$$\frac{\int \Phi * H\Phi dr}{\int |\Phi|^2} = E[\Phi] = T[\tilde{\rho}] + E_{ee}[\tilde{\rho}] + \int \tilde{\rho}(r)v(r)dr = E[\tilde{\rho}] \geq E_0 \quad (3.15)$$

Resumiendo, los teoremas de HK demuestran que las propiedades de un sistema químico pueden ser determinadas a partir de la densidad electrónica de su estado fundamental y ésta puede ser hallada mediante el principio variacional. Sin embargo, hay ciertas restricciones, la primera es la V-representabilidad, restringe las posibles  $\tilde{\rho}(r)$  a aquellas que generen el potencial externo real del sistema electrónico. En la mayoría de los problemas de estructura electrónica, el potencial externo puede ser fácilmente obtenido (o una aproximación de él) a través del conocimiento del sistema químico, es decir, generalmente se conocen las coordenadas de los núcleos y sus cargas. En la segunda restricción las  $\tilde{\rho}(r)$  deben ser N-representable, es decir debe ser generada a partir de una función de onda antisimétrica con el número de electrones del sistema real [88, 87, 89, 90].

### 3.4.2. Ecuaciones de Kohn-Sham

Una idea muy sorprendente fue la de Kohn y Sham (KS), quienes en 1965, propusieron como sistema de partida, usar un sistema de electrones no interactuantes (ficticio) que tenga la misma densidad electrónica del estado basal que el sistema real, interactuante. Luego podemos reescribir la ecuación 3.12 de la siguiente forma:

$$E[\rho] = T_{ni}[\rho] + E_{ne}[\rho] + J[\rho] + \Delta T[\rho] + \Delta E_{ee}[\rho] \quad (3.16)$$

En la ecuación 3.16 los términos de la derecha, se refieren a la energía cinética de los electrones no-interactuantes, a la atracción núcleo-electrón, a la repulsión electrón-electrón clásica, a la corrección a la energía cinética

debida a la naturaleza interactuante de los electrones y, por último, a todas las correcciones no-clásicas a la repulsión electrón-electrón.

Los términos  $\Delta T[\rho]$  y  $\Delta E_{ee}[\rho]$  son difíciles de conocer y pueden ser agrupados en un sólo término, que comúnmente se conoce como energía de correlación e intercambio,  $E_{xc}$ .

De acuerdo con Kohn y Sham, es posible utilizar un sistema de referencia de electrones no-interacturantes con un Hamiltoniano que tenga un potencial local efectivo,  $v_{ef}(r)$ .

$$H_{KS} = -\frac{1}{2} \sum_i^N \nabla_i^2 + \sum_i^N v_{ef}(r_i) \quad (3.17)$$

El operador Hamiltonio de KS,  $H_{KS}$ , realmente describe un sistema de electrones no-interactuantes, para el cual la densidad electrónica exacta del estado basal es  $\rho$ . Debido a la naturaleza de este operador, la función de onda que representa a su estado basal es el determinante de Slater que se expresa mediante la ecuación 3.18.

$$\Psi_0 \approx \Phi SD = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{bmatrix} x_1(q_1) & x_2(q_1) & \cdots & x_N(q_1) \\ x_1(q_2) & x_2(q_2) & \cdots & x_N(q_2) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ x_1(q_N) & x_2(q_N) & \cdots & x_N(q_N) \end{bmatrix} \quad (3.18)$$

Podemos expresar el operador monoelectrónico de Kohn-Sham (KS),

$$h_i^{KS} \chi_i^{KS}(q_1) = \left( -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_{ef}(r_i) \right) \chi_i^{KS}(q_1) = \epsilon_i(q_1) \chi_i^{KS}(q_1) \quad (3.19)$$

A partir de la anterior ecuación se pueden obtener los llamados orbitales de espín de Kohn-Sham. La propuesta de Kohn-Sham se basa en elegir un potencial efectivo apropiado, tal que la densidad electrónica del sistema de electrones no-interactuante sea igual a la densidad real.

$$\rho_{KS}[r] = \sum_i^N |\chi_i^{KS}(q_1)|^2 = \rho_0[r] \quad (3.20)$$

Este planteo propone que toda la descripción de las interacciones no clásicas estén dentro del potencial efectivo, permitiendo utilizar un sistema de referencia simple como lo es el sistema de partículas no- interreactantes. De este modo, se evita tener que utilizar la función de onda real y/o su densidad electrónica, que son desconocidas.

El potencial efectivo es obtenido minimizando el Lagrangiano de la expresión en la ecuación 3.16 empleando como restricción que las funciones de espín sean ortogonales (de manera similar al desarrollo de HF). Una derivación detallada se puede encontrar en la ref. [89]. Entonces, el potencial efectivo se expresa como:

$$v_{ef}(r) = v(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r - r'|} dr' + v_{xc}(r) \quad (3.21)$$

$$v_{xc}(r) = \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(r)} \quad (3.22)$$

En la ecuación 3.21, se aprecia que  $v_{ef}(r)$  depende de  $\rho(r)$ ; por lo tanto, las ecuaciones 3.19, 3.20 y 3.21 deben ser resueltas auto-consistentemente. El desarrollo expuesto presenta mucha similitud entre DFT y HF. La importante

diferencia es que DFT no contiene aproximaciones, es exacto. El problema surge en que se desconoce la expresión exacta de  $v_{xc}$ , por lo tanto se deben introducir aproximaciones sobre este funcional [88, 91, 89, 90].

### 3.4.3. Funcionales de Correlación-Intercambio

La piedra angular de DFT es la descripción exacta del funcional de correlación-intercambio,  $E_{xc}$  que involucra los términos no clásicos, como la correlación, el intercambio y la diferencia en la energía cinética entre el sistema real y el de referencia. En la actualidad, existe un esfuerzo muy importante en el desarrollo de nuevos y mejores funcionales. Sin embargo, se está muy lejos de un funcional universal, sino que, por el momento, se construyen funcionales pensados para calcular determinadas propiedades. Así, un funcional se debe usar en función de las propiedades que se desean calcular. Los funcionales  $E_{xc}$  se dividen en familias de acuerdo a como se implementó su aproximación. Las familias más importantes son Aproximación de la Densidad Local (LDA), Aproximación de Gradiente Generalizado (GGA) y Conexión Adiabática (híbridos y meta-GGA) [88, 87, 89, 91, 90].

La dependencia de  $E_{xc}$  con  $\rho(r)$  se expresa como interacción entre la densidad electrónica y una “densidad de energía”  $\epsilon_{xc}$ , la cual a su vez depende de  $\rho(r)$ :

$$E_{xc}[\rho(r)] = \int \rho(r)\epsilon_{xc}[\rho(r)] dr \quad (3.23)$$

La densidad de energía,  $\epsilon_{xc}$ , se trata siempre como una suma individual de contribuciones de intercambio y de correlación, es decir,  $\epsilon_{xc} = \epsilon_x + \epsilon_c$ . El

primer método, LDA, se basa en la teoría de gas de electrones homogéneos para derivar las funciones de correlación-intercambio aproximadas. El empleo del gas de electrones homogéneos para este propósito no es equivalente a asumir que la densidad es constante en todo el espacio, sino que un sistema no homogéneo con densidad electrónica,  $\rho(r)$ , como lo es una molécula o un átomo, se aproxima el funcional  $E_{xc}[\rho]$  por un valor correspondiente al gas de electrones homogéneo como una densidad electrónica igual a  $\rho(r)$ . La aproximación de LDA tuvo gran éxito en la predicción de estructuras, en especial de metales de transición y de sistemas en el estado sólido[88, 87, 91, 90].

A pesar de su éxito en la descripción de algunos sistemas, en otros la densidad electrónica está lejos de ser espacialmente uniforme, y por ello tiene sus limitaciones. En la aproximación de GGA, se incluye, entonces, el cambio local de la densidad electrónica, es decir su gradiente,  $\rho(r)$ . De este modo, obtiene una mejor descripción de la densidad electrónica. El funcional de intercambio GGA más popular al día de hoy es el desarrollado por Becke en 1988 [92]. Este funcional se abrevia como “B” (en algunas ocasiones B88) y tiene un correcto comportamiento asintótico a larga distancia para la densidad de energía,  $\epsilon_{xc}$ , e incorpora un parámetro experimental[88, 87, 91, 90]. En relación a los funcionales de correlación GGA, los más importantes son los propuestos por Lee, Yang y Parr (LYP) y por Perdew [92].

Por otro lado, otros funcionales de correlación e intercambio no tienen parámetros empíricos. Entre los más conocidos se encuentra el de Perdew, Burke y Ernzerhof (PBE).

En la literatura se encuentra comúnmente que los funcionales de inter-

cambio y correlación se especifican por dos acrónimos en ese orden respectivamente. Por ejemplo, el cálculo con BLYP combina el funcional de intercambio de Becke (“B”) con el de correlación de GGA de Lee, Yang y Parr (LYP) [88, 91, 90, 87].

El funcional híbrido B3LYP ha resultado sumamente útil en la química computacional, sin embargo, ha sido infructuoso en algunas aplicaciones como el estudio de la polarizabilidad de cadenas largas, las excitaciones usando DFT dependiente del tiempo (TD-DFT) y las excitaciones de transferencia de carga. La razón de estas fallas se debe principalmente a que a distancias largas, el potencial de intercambio se comporta como  $\frac{-0,2}{r}$  en vez del valor exacto  $\frac{-1}{r}$ , lo cual representa incorrectamente los potenciales de correlación e intercambio. Este problema es responsable de distorsiones en las geometrías de equilibrio, errores (por defecto) en el cálculo del gap HOMO-LUMO y sobreestimación de la polarizabilidad en compuestos poliénicos y moléculas simétricas. Por esto, el método pierde aplicabilidad en ciertos campos de la nanotecnología. Esta deficiencia se ha corregido desdoblando la dependencia de las distancias internucleares mediante la ecuación 3.24.

$$\frac{1}{r_{12}} = \frac{1 - [\alpha + \beta \cdot \text{erf}(\mu r_{12})]}{r_{12}} + \frac{\alpha + \beta \cdot \text{erf}(\mu r_{12})}{r_{12}} \quad (3.24)$$

Donde debe satisfacerse la siguiente condición:  $0 \leq \alpha + \beta \leq 1$ ,  $0 \leq \alpha \leq 1$ ,  $0 \leq \beta \leq 1$ ,  $r_{12}$  es la distancia entre los centros y  $\text{erf}$  es la función error aplicada para modular el cambio hacia HF. Ésta aproximación se denomina Método de Atenuación Coulombica (CAM), donde el parámetro  $\alpha$  incorpora la contribución del intercambio de HF responsable de la interacción entre

núcleos a largo alcance y b tiene en cuenta la contribución de la interacción de intercambio de DFT a corto alcance [93].

### 3.4.4. Solvente Implícito

La mayoría de los procesos químicos ocurren en solución, es decir donde el medio es un solvente. Éste, en algunos casos, puede participar directamente del proceso químico, como por ejemplo, una reacción de hidrólisis de éster o una solvólisis en  $\text{SN}_1$ . En otros casos, el solvente no interviene directamente, pero ofrece un ambiente que afecta la estabilidad de las distintas especies presentes en la reacción (reactantes, estados de transición, intermediarios o productos). Por ejemplo, afecta la velocidad al determinar la energía relativa del estado de transición en una reacción  $\text{SN}_2$ . En este último caso, una variedad de modelos de solvente implícito han sido propuestos, tanto para mecánica cuántica como mecánica molecular.

La energía libre de solvatación ( $\Delta G_{solv}$ ) se puede descomponer en tres contribuciones:

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{elec} + \Delta G_{cav} + \Delta G_{vdw} \quad (3.25)$$

El primer término de la ecuación 3.25 es el electrostático el segundo es el costo de cavitación <sup>1</sup>, y el último es el que refiere a las interacciones de Van der Waals entre el solvente y el soluto, el cual puede ser dividido en un término repulsivo ( $\Delta G_{rep}$ ) y otro de dispersión atractivo ( $\Delta G_{disp}$ ). El término

---

<sup>1</sup>Costo de cavitación se refiere al trabajo necesario para generar una cavidad para el soluto en contra de la presión del solvente y de la penalidad entrópica asociada con la reorganización de las moléculas de solvente.

más crítico es el primero, relacionado con la contribución electrostática a la solvatación. En esta sección, se tratarán sólo los modelos de solvente implícito dentro de los cálculos de mecánica cuántica.

La contribución electrostática se aplica el modelo que se conoce como Campo de Reacción (RF), en el cual el soluto, que se encuentra en una cavidad dentro el solvente, polariza al solvente, y éste a su vez induce un campo eléctrico sobre el soluto. El RF dentro de la Mecánica Cuántica, se conoce como campo de reacción auto-consistentemente (SCRF) considerando el hamiltoniano del sistema ( $H_{tot}$ ) como hamiltoniano en fase gaseosa ( $H_0$ ) más una perturbación ( $H_p$ ) impuesta por la presencia del solvente.

$$H_{tot} = H_0 + H_p \quad (3.26)$$

Hay distintos modelos de SCRF que varían fundamentalmente en cómo se define la cavidad y la distribución de cargas del soluto.

El modelo de SCRF utilizado en esta Tesis es el PCM (método de continuo polarizado)[94]. En PCM, la cavidad está definida por la conjunción de esferas con radios atómicos de van der Waals aumentados un 20 % aproximadamente [90]. La distribución de carga del soluto,  $q(r)$ , es la suma de la distribución de carga nuclear discreta,  $q_{nuc}(r)$ , y la función de densidad electrónica,  $\rho(r)$ .

En este modelo, la cavidad es dividida en pequeños elementos de superficie, y la polarización del solvente es  $q_{nuc}(r)$  representada a través de cargas puntuales sobre dichos elementos. La magnitud de cada carga superficial es proporcional al flujo del campo eléctrico en ese punto. Entonces la distribución de cargas del soluto genera cargas superficiales devenidas de la

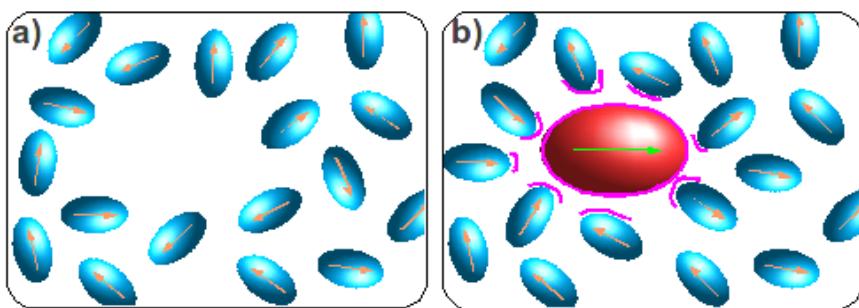


Figura 3.1: Representación esquemática de las contribuciones a la solvatación en el planteo del campo de reacción. a) Se genera la cavidad donde va el soluto (pérdida de entropía asociada a la “energía de cavitación.” b) El soluto es polarizado por el solvente y este a su vez se polariza por el soluto, lo que se asocia a la contribución electrostática; además habrá un potencia de interacción de van der Waals a nivel superficial (corta distancia, resaltado en fucsia)

polarización del solvente, y éstas, a su vez, polarizan al soluto modificando su distribución de cargas, y con ellas a la densidad electrónica [95].

El segundo y el tercer término correspondientes a la pérdida de entropía para generar una cavidad en el solvente donde se aloja el soluto y la estabilización debida a interacciones de Van der Waals (balance entre repulsión y dispersión), respectivamente, son los términos más sencillos de calcular. La mayoría de los modelos continuos utilizan parámetros similares a los empleados en Mecánica Molecular clásica y parten de modelos sencillos parametrizados para adecuarse el comportamiento de gases nobles en estado líquido. Existen parámetros adecuados para la mayoría de los átomos de la tabla periódica y dependen largamente de su polarizabilidad y tamaño atómico [95, 96].

### 3.5. Estudios conformacionales

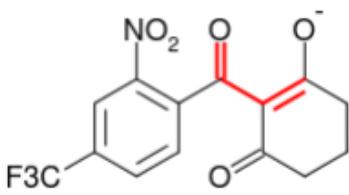
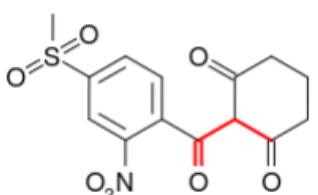
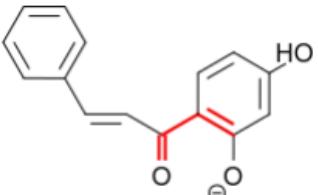
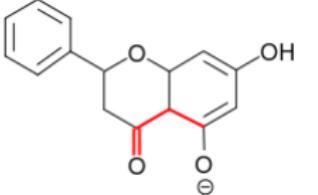
En el estudio de la inhibición de la inhibición de la HPPD, es de interés conocer el confórmero más estable correspondiente a cada inhibidor, con este fin se realizó un estudio conformacional de los inhibidores de la tabla 3.2. El análisis se llevó a cabo con el programa Gaussian [97]. Este tipo de cálculo se basa en una exploración de la superficie de energía potencial (SEP). En este caso se realiza un examen rígido, el cual consiste en evaluaciones puntuales de energía que involucran las coordenadas internas previamente seleccionadas. El capítulo 8 de “*Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*” [98] provee una discusión detallada acerca de la evaluación de la SEP. Se varió el diedro indicado en rojo en las estructuras de la tabla 3.3 en incrementos de  $10^{\circ}$  y se optimizó cada confórmero con CAM-B3LYP. Luego se graficó la energía relativa de cada confórmero respecto del ángulo del diedro.

El diedro se varió para el NTBC y el Mesotriona entre 0 y  $180^{\circ}$  debido a la simetría de la molécula. Para la 2',4'-dihidroxichalcona, como no es simétrica se realizó un estudio completo, entre 0 y  $360^{\circ}$ . Por último para el Pinocembrín, el análisis se realizó entre -30 y  $30^{\circ}$  debido a la tensión anular que impidió la rotación completa entorno al enlace indicado.

### 3.6. Cálculos cuánticos

Como explicamos anteriormente no es práctico realizar cálculos cuánticos con la proteína entera debido a que el número de coordenadas es tan grandes que los requerimientos computacionales son demasiado altos y el tiempo in-

Tabla 3.3: Análisis conformacional. Se indica en rojo el diedro que se varió durante el análisis.

Compuesto	Estructura	Intervalo de variación del diedro ( $^{\circ}$ )
NTBC		0-180
Mesotriona		0-180
2',4'-dihidroxichalcona		0-360
Pinocembrín		-30-30

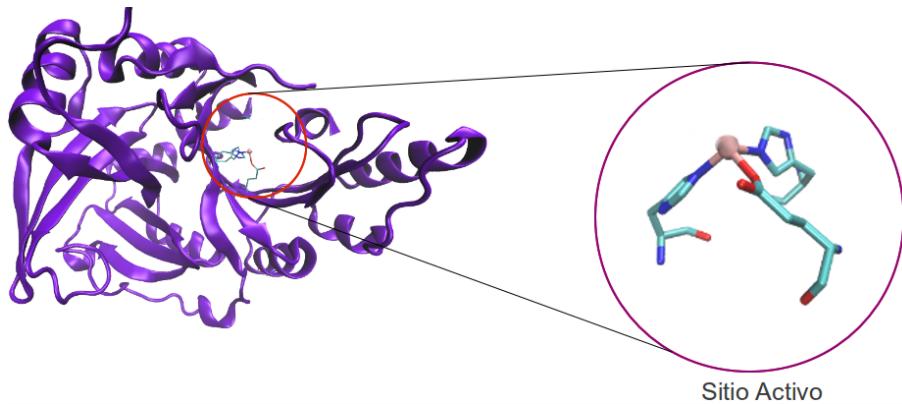


Figura 3.2: Sitio activo reducido. Las 2 aguas de coordinación no aparecen en el presente esquema.

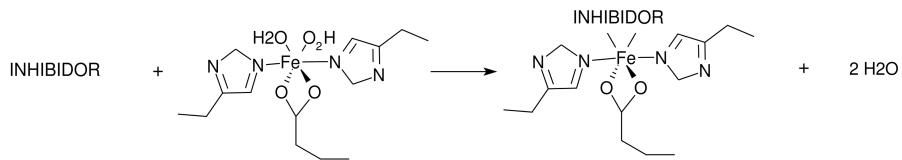


Figura 3.3: Esquema de reacción utilizado para los cálculos cuánticos realizados.

vertido sería desmesurado. Por eso procedimos de la siguiente manera. Se descargó de la base de datos RCSB [99] la estructuras obtenidas por cristalografía de rayos X de la HPPD correspondiente a *Streptomyces avermitilis* (PDB ID: 1T47), esta estructura es homodimérica y se encuentra coocristaliza con NTBC. Se recortó el sitio activo reducido de la cadena A y nos quedamos solamente con el Fe del sitio activo y con los tres aminoácidos (AA) más cercanos a este (2 histidinas y un glutamato) (Fig. 3.2).

Luego se truncó la cadena de estos 3 AA entre el carbono  $\beta$  y el  $\alpha$  y se completaron las estructuras con metilos.

Se procedió al cálculo de energías basándonos en el esquema básico de reacción representado en la Fig 3.3.

Tabla 3.4: Detalle de bases y solventes utilizados para los cálculos cuánticos de la presente Tesis. El lector debe recordar que para todos los cálculos realizados se utilizó el funcional híbrido CAM-B3LYP.

Serie de cálculos	conjunto de bases	Solvente
1	6-31+G*	Vacio
2	6-31+G*	DCE
3	LACVP	Vacio
4	LACVP	DCE

Se optimizó cada reactivo y cada producto con el programa Gaussian [97], y luego se obtuvieron los  $\Delta E$  para la reacción representada en la figura 3.3. Se realizaron una serie de cálculos en vacío y otra en solvente 1,2-dicloroetano. Se trabajo con el solvente como se explicó en la sección 3.4.4. Para todos los cálculos utilizamos el funcional híbrido CAM-B3LYP explicado en la sección 3.4.3. Se trabajó con dos conjuntos de bases diferentes. Una serie de cálculos se realizó con el conjunto de bases 6-31+G\* desarrollado por George Pettersson et al. definido como parte del conjunto Completo de Bases [100, 101]; otra serie de cálculos se llevó a cabo con el conjunto de bases LACVP [102] que combina el conjunto de bases 6-31+G\* para los átomos no metálicos con el conjunto de bases LANL2DZ (Los Alamos National Laboratory) [103, 104] para los átomo metálicos de la primera serie de transición. El protocolo de cálculos realizados se resumen en la tabla 3.4.

Los inhibidores se trabajaron en forma iónica exceptuando al Pinocembrín que se trabajo en también en forma neutra debido a su  $pK_a$ . Los cálculos con la forma neutra de la 2',4'-dihidroxichalcona no se realizaron por falta de tiempo y serán considerados en trabajos posteriores.

Las estructuras de partida para la optimización de los distintos complejos enzima-inhibidor fueron obtenidos de los confórmeros más probables arroja-

dos por los resultados de los *docking*.

Como hemos descripto anteriormente en la introducción, el sitio activo de la enzima posee un átomo de hierro. Tres inconvenientes surgen en este punto. Establecer la carga y la multiplicidad del mismo y decidir con cuantas moléculas de agua se encuentra coordinado en el sitio activo libre de la enzima. Estas problemáticas aún se encuentran en estudio [5, 67, 68] y no hay consenso acerca de ellas. En la presente Tesis trabajamos con el sitio activo pentacoordinado, es decir, con 2 moléculas de aguas. El hierro se trabajó como Fe (II) [5]. Para determinar la multiplicidad, el grupo realizó con anterioridad cálculos cuánticos con Gaussian y determinaron que la multiplicidad 5 era la que mejor se ajustaba a los datos experimentales, por eso se utilizó ese valor para realizar los cálculos correspondientes.

### 3.7. Mecánica molecular

Muchos de los problemas que son de interés en modelado molecular, involucran sistemas cuyos tamaños son demasiado grandes para ser tratados con métodos de Mecánica Cuántica (QM). Debido a que los métodos QM tratan a los electrones explícitamente, la resolución de la ecuación de Schrödinger ( $H\Psi=E\Psi$ ;  $\Psi$  función de onda del sistema), es muy costosa computacionalmente. La mecánica molecular (MM) es entonces indudablemente usada para calcular propiedades de sistemas con un gran número de átomos. En algunos casos, a partir de los métodos MM se obtienen resultados con una exactitud igual a los cálculos QM de más alto nivel, pero en una fracción de tiempo mucho menor. Sin embargo, los métodos MM no pueden obtener

propiedades que dependan de la densidad electrónica ni describir formación y/o ruptura de enlaces.

Los métodos MM funcionan adecuadamente debido a la validez de varias aproximaciones. La primera de éstas aproximaciones es la de Born-Oppenheimer (sección 3.3), sin la cual sería imposible describir la energía del sistema en función de las coordenadas nucleares [88, 91, 90].

$$H_{nuc} = - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + \epsilon_{tot} \quad (3.27)$$

No obstante, en la ecuación de Schrödinger para los núcleos (Ec. 3.27) el primer término es la energía cinética nuclear y el segundo es la energía total asociada a la conformación de los núcleos. El término  $\epsilon_{tot}$  es la energía potencial asociada a una conformación particular de los núcleos, es decir a un punto específico de la superficie de energía potencial. Este término puede ser aproximado mediante potenciales analíticos clásicos muy convenientes computacionalmente que describan todas las interacciones intra o intermoleculares que pueden ser representadas por estas aproximaciones. Por ejemplo, el potencial asociado a la distancia entre los núcleos en una molécula de hidrógeno, puede ser aproximado por un potencial de Morse  $V(r) = D_e [1 - e^{-a(r-r_e)}]^2$  donde  $r$  es la distancia entre los núcleos,  $r_e$  es la distancia de equilibrio,  $D_e$  es el potencial mínimo,  $a$  es un parámetro asociado a una constante de fuerza del potencial próximo al mínimo. Este potencial puede ser utilizado para propagar el movimiento nuclear (de ahora en más trayectoria) en intervalos de tiempo cortos, donde las posiciones de los núcleos varíen poco. Las funciones matemáticas que describen a la energía potencial del sistema se

denominan Campos de Fuerza. De esta forma, la presencia de los electrones no es considerada en forma explícita en la propagación de la trayectoria [90].

La descripción del potencial de interacción de un sistema de muchas partículas se obtiene a partir del potencial de interacción de pares, triples, cuádruples, etc. La segunda aproximación, es que, dado un potencial de interacción entre dos partículas  $v_{ij}$ , el potencial para las  $N$  partículas del sistema se obtiene como la suma sobre todos los pares posibles, es decir:

$$V(r_1, r_2, \dots, r_n) = \sum_{i < j}^N v_{ij} \quad (3.28)$$

Esta aproximación se ha obtenido dejando de lado los potenciales de interacción de orden mayor a dos y tomando sólo las interacciones de a pares.

Resumiendo, la definición de los potenciales clásicos no es independiente de las propiedades cuánticas de las interacciones. En primer lugar, la dinámica de los núcleos y de los electrones se desacopla siguiendo la aproximación de Born-Oppenheimer. De este modo, pasa a tener sentido la propagación de las trayectorias de los núcleos en una superficie de energía potencial generada por los electrones. Esta superficie podría ser obtenida por cálculos de estructura electrónica en todos los pasos de la trayectoria. En la práctica, estos cálculos pueden ser hechos para grupos pequeños de partículas. Funciones analíticas, como el potencial de Morse, son, entonces, ajustadas a las curvas de energía potencial obtenidas. Estas curvas son usadas para construir la superficie de energía potencial generada por los electrones en sistemas más complejos, pero sin la necesidad de la realización de cálculos de estructura electrónica [90].

Diversos tipos de potenciales analíticos pueden ser usados para las interacciones entre partículas. Éstos deben ser escogidos para cada tipo de interacción, buscando la mejor representación de la curva de energía de potencial verdadera, de acuerdo con los recursos computacionales disponibles y con el tipo de fenómeno observado. Estos potenciales analíticos podrían ser usados para propagar la trayectoria, tanto cuánticamente, de acuerdo con la ecuación de Schrödinger, como clásicamente por las ecuaciones de Newton. El cálculo de las trayectorias usando Mecánica Clásica es, evidentemente mucho más rápido. Para el estudio de propiedades dinámicas de biomoléculas, a la temperatura ambiente, esto no acarrea una pérdida importante de exactitud [90].

La energía térmica típica ( $\sim kBT$ ) de un sistema a la temperatura ambiente es del orden de 0,593 Kcal/mol. Por lo tanto, la energía de la mayoría de los enlaces covalentes es 2 o 3 órdenes de magnitud mayores que la energía  $kBT$ . La ruptura de un enlace covalente no es estadísticamente relevante en una simulación de cientos de nanosegundos. De esta forma, no es necesario representar toda la curva de energía potencial de la molécula mediante un potencial disociativo, como el de Morse. El enlace covalente tendrá siempre una distancia próxima a la correspondiente al mínimo de energía. En esta región, el potencial puede ser aproximado de forma conveniente por un potencial armónico (por ejemplo, ley de Hook). Este es el caso de todos los enlaces covalentes en moléculas comunes, en particular en biomoléculas, en las temperaturas y escalas de tiempo que son generalmente estudiadas por dinámica molecular [90].

### 3.7.1. Campos de fuerza

La mayoría de los campos de fuerza usados en la actualidad para sistemas biológicos de tamaño considerable contienen las expresiones de energía más sencillas, entre los posibles diseños de fórmulas. Estos pueden ser expresados por un potencial de interacción de cinco términos, que describe potenciales intra e intermoleculares dentro de un sistema.

$$\begin{aligned}
 E_{total} = & \sum_{enlaces} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{ángulos} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \\
 & + \sum_{diedros} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\varphi - \gamma)] \\
 & + \sum_{VDW} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \sum_{coulombica} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}
 \end{aligned} \tag{3.29}$$

Los tres primeros términos se refieren a las interacciones intramoleculares (enlazantes), estos son: energía de estiramiento de enlace, energía de deformación de ángulos y energía de rotación de enlace o variación de ángulo diedro, respectivamente. La desviación de los enlaces y ángulos, respecto a sus valores de equilibrio ( $r_{eq}$  y  $\theta_{eq}$ ), tiene asociada penalidades energéticas. Los dos últimos términos corresponden a las interacciones intermoleculares (no enlazantes). De este modo, el penúltimo término de la ecuación 3.29 expresa la energía de Van der Waals y el último la energía culómbica.

Los campos de fuerzas más complejos pueden tener términos adicionales, como aquel que describe el acople entre los términos no enlazantes u otro que tiene en cuenta las interacciones de puente de hidrógeno. Para definir el campo de fuerza, se debe especificar, no sólo la forma funcional, sino también

los parámetros (es decir, constantes como  $K_r$ ,  $V_n$  y  $A_{ij}$  en la ecuación 3.29) dos campos de fuerza pueden usar formas funcionales idénticas, pero tener parámetros muy diferentes. A pesar de ello, campos de fuerza con la misma forma funcional, pero con diferentes parámetros, y campos de fuerza con diferentes formas funcionales, pueden dar resultados de exactitud comparable [96].

Debido a que utiliza un potencial de a pares (ecuación 3.28), la parametrización incluye el efecto de muchos cuerpos. Este potencial, así parametrizado, se denomina potencial efectivo. Otro punto importante a tener en cuenta, es el concepto de “tipo de átomo”, el cual es común en la gran mayoría de campos de fuerza. Así, se asigna a cada átomo un tipo de átomo, el cual confiere la información del número atómico, hibridización y entorno (otros átomos a los que está unido). Cada parámetro tiene en cuenta los tipos de átomos que involucra, debido a que, en general, debe haber una distinción entre, por ejemplo, el nitrógeno con hibridización sp<sup>3</sup> de uno sp<sup>2</sup>. Además, siguiendo con el ejemplo, dentro de este último grupo distinguir el entorno atómico, es decir, no es lo mismo un nitrógeno amida, que uno imina o uno en un anillo aromático. Los tipos de átomos y diferencias varían con el campo de fuerza. El caso del *docking* molecular (ver próxima sección) hay menos tipos de átomos, por lo tanto la diferencia entre átomos con distinto entorno no es estan estricta. Uno de los mayores desafíos para la realización de dinámica molecular es la parametrización de los campos de fuerza. No siempre el ajuste de curvas de energía potencial obtenidas por cálculos de estructura electrónica de pequeños grupos de moléculas es satisfactorio.

Un campo de fuerza está generalmente parametrizado para reproducir

ciertas propiedades, generalmente, estructurales o termodinámicas, por ejemplo, entalpía de vaporización y densidad en el caso de los líquidos, energía libre de solvatación en el caso de los iones solvatados; factores de estructura obtenidos por rayos X para sólidos (metales, óxidos, sales, etc.), el coeficiente de transporte, entre otras. Una característica importante de los campos de fuerza es la transferibilidad de la forma funcional y de los parámetros. Esto significa que el conjunto de parámetros con el cual se diseñó el campo de fuerzas puede ser transferido a moléculas relacionadas, sin la necesidad de tener que ajustarlos a cada nueva molécula.

El término transferibilidad no significa que los parámetros no sean transferibles entre distintos campos de fuerza. Esto es debido a que cada uno de ellos utiliza diferentes formas funcionales y diferentes correlaciones entre los parámetros y su respectivo potencial clásico [90] . En el caso de moléculas como las proteínas, la parametrización es todavía más compleja. La cantidad de datos termodinámicos experimentales que están disponibles para las proteínas es bastante limitado. Por esta razón, la parametrización de un campo de fuerza para proteínas, generalmente involucra un trabajo sistemático que intenta reproducir datos energéticos obtenidos a partir de cálculos QM. Los datos experimentales son usados cuando se encuentran disponibles, como por ejemplo, las frecuencias de estiramiento de diversos enlaces covalentes de aminoácidos.

Los campos de fuerza son muy ampliamente utilizados en *docking Molecular* y *Dinámica Molecular*.

## 3.8. *Docking* Molecular

### 3.8.1. Reconocimiento Molecular

Un fármaco (ligando) es una molécula que actúa en el organismo con el fin de producir o bloquear una respuesta biológica. El fármaco interacciona en el organismo con una determinada macromolécula receptora (en general una proteína), la cual es la responsable de algún efecto biológico que desea activar o bloquear. Los fármacos se unen a una región específica (sitio) de la proteína receptora, esta región puede ser un sitio activo de la proteína o un sitio alóstérico. El reconocimiento molecular receptor-ligando depende de la complementariedad de características estructurales y físico-químicas de las moléculas interactuantes. Las características físico-químicas definen el grado de afinidad y de especificidad entre el ligando y el bioreceptor, los cuales están dados por interacciones intermoleculares, que comprenden fuerzas electrostáticas, de dispersión, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno.

La interacción ligando-proteína no siempre es fácil de caracterizar experimentalmente, ya sea por microscopía de rayos X, estudio mutagénico de cisteínas usando ligando tio-reactivos o marcado de fotoafinidad mediante MALDI-TOF. Estos experimentos involucran que la proteína mutante no vea alterada su función o estructura, lo que no siempre se logra. Aún más difícil es caracterizar cuáles son los tipos de interacciones específicas, es decir describir la interacción a nivel atomístico. En este sentido, *docking* molecular es un método que predice el lugar y modo en que un ligando se une a la proteína, y con qué afinidad (estimación energética). La mayoría de los algoritmos de *docking* molecular predicen el lugar, modo y afinidad de ligado a través de

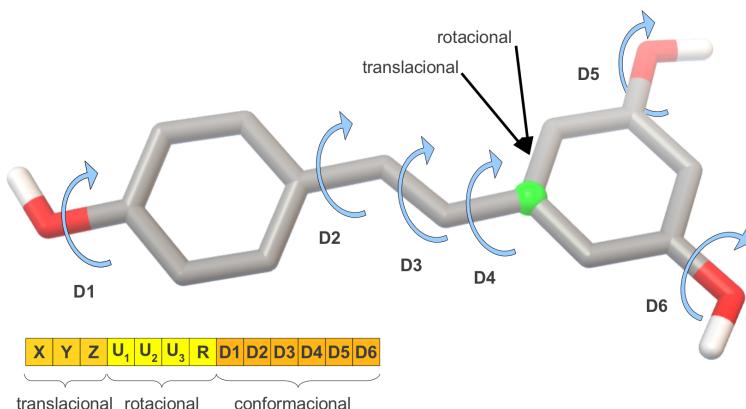


Figura 3.4: El cromosoma que contiene cada una de los torsiones de la molécula, la rotación (definida como cuaternión) y la translación. Cada torsión, translación y rotación es un gen. La translación y la rotación se definen a partir de centro de rotación (punto en verde) que puede o no coincidir con el centro masas.

pasos: 1) generar un número grande de modos conformacionales del ligando (confórmeros), recorriendo el espacio configuracional, es decir, variando su posición, orientación y la rotación de diedros, 2) evaluar la interacción entre el ligando y la proteína, y así determinar la energía de unión del confórmero a la proteína 3) establecer un orden de los confórmeros generados de acuerdo a su variación estructural y afinidad por la proteína (energía de unión), permitiendo identificar aquel de mayor interés. La evaluación de la energía de unión, y con ello la predicción de la actividad biológica, se realiza a través de una función de evaluación (en inglés scoring). El método de *docking* es una pieza clave dentro del área de Diseño Racional de Fármacos, permitiendo una descripción adecuada del proceso de reconocimiento molecular. Esta descripción permite conocer cuales son las características físico-químicas por el cual la unión de ligando a un proteína promueve la modulación de una respuesta biológica (activación o inhibición). El conocimiento de estas carac-

terísticas permite plantear el diseño de nuevos y mejores fármacos, asistiendo así a un diseño racional dirigido sin la necesidad de realizar una búsqueda farmacológica ciega [88, 90, 96].

### 3.8.2. Funciones de evaluación

La evaluación precisa, con un costo computacional razonable, de la afinidad de interacción entre los ligandos y sus receptores sería de enorme beneficio para el diseño racional de fármacos. Este hecho posibilitaría la predicción de la afinidad de un gran número de compuestos antes de ser sintetizados, agilizando el proceso del desarrollo farmacológico como un todo. Sin embargo, el proceso de obtener una estimación adecuada de la energía libre de unión de un complejo ligando-proteína es una tarea bastante costosa computacionalmente (por ejemplo, a través de métodos perturbativos como FEPi u otros más eficientes como LIEi).

La necesidad de funciones de evaluación más rápidas, que puedan ser utilizadas por los programas de *docking*, ha llevado al desarrollo de un gran número de funciones que hacen uso de aproximaciones para la validación del complejo ligando-proteína. Dentro de ese gran número, se pueden encontrar principalmente tres clases:

1. Funciones basadas en campos de fuerza,
2. Funciones empíricas y
3. Funciones basadas en conocimiento.

Las habituales funciones de evaluación basadas en campos de fuerzas tienen

limitaciones muy importantes porque fueron originalmente formuladas a fin de modelar contribuciones entálpicas en fase gaseosa sin incluir términos de solvatación y entrópicos.

En esta Tesis se utilizó el programa de *docking* llamado Autodock [105], el cual pertenece a la clase de algoritmos basados en campos de fuerza. En este caso, el campo de fuerza fue calibrado usando un conjunto de estructuras conocidas de complejos ligando-proteína [105].

### 3.8.3. Autodock

El paquete de programas Autodock [105], aplica *docking* para buscar complejos proteína-proteína, ligando-proteína y sitios activos dentro de proteínas. Este programa, que fue el utilizado a lo largo de la Tesis, utiliza funciones basadas en el campo de fuerza AMBER [106]. Para remediar algunas de las deficiencias de los campos de fuerza tradicionales desarrolló funciones de energía libre empíricas que intentan reproducir las constantes de unión observadas. Como aproximación, Autodock agrega dos términos: uno que tiene en cuenta la solvatación y otro que tiene en cuenta la entropía debida a la restricción en los grados de libertad conformacionales del ligando luego de la unión [105]. El  $\Delta G$  de unión en solvente es calculado por Autodock a través de un ciclo termodinámico de Wesson y Eisenberg [107].

El orden del solvente alrededor de la proteína y del ligando, cuando están unidos como cuando no lo están, está fuertemente influenciado por la formación de puentes hidrógeno entre las moléculas de solvente y la proteína o el ligando. La función de evaluación de Autodock puede estimar la contribución

entálpica debida a la formación de puentes hidrógeno [108].

Para predecir la conformación y orientación de un ligando en un sitio de unión de la proteína, y así predecir su actividad biológica, el Autodock realiza una búsqueda conformacional y evalúa las funciones de evaluación de cada complejo proteína-ligando que encuentra. La búsqueda conformacional se realiza manteniendo la proteína fija y variando posición, orientación y torsiones (o diedros) del ligando. Entonces los grados de libertad conformacionales, solumente debidos a la rotación de torsiones son  $3N-6$ , e igual a:

$$\text{Número - de - conformaciones} = \prod_{i=1}^N \frac{360}{\theta_i} \quad (3.30)$$

En la ecuación 3.30  $\theta_i$  es el incremento (en grados) del ángulo de la torsión para el enlace i. El número de conformaciones crece en un modo excepcional con el número de enlaces que pueden rotar (enlaces simples). Por ejemplo, si hay cinco enlaces simples con un incremento de  $30^\circ$ , para cada enlace, entonces se generarían 248.832 estructuras. Si el número de enlaces simples se incrementa a siete, entonces las estructuras generadas incrementarían a casi 36 millones. Si se quisiera realizar una búsqueda conformacional sistemática para explorar el espacio conformacional y encontrar la conformación que mejor se ajuste con la proteína, el primer ejemplo llevaría 69 horas, y el segundo ejemplo 415 días de cálculo. Entonces, ya que una búsqueda sistemática resulta inviable para la mayoría de los casos, hay que pensar en otras alternativas. Debido a este inconveniente, existen distintos algoritmos de búsqueda conformacional implementados en el programa Autodock, ellos son: simulated annealing (SA), algoritmo genético (AG), búsqueda local (BL) y algoritmo

genético lamarkiano (AG lamarkiano). Sólo se comenta este último debido a que en el transcurso de esta Tesis se utilizó el algoritmo genético.

### 3.8.4. Algoritmo Genético Lamarkiano

El algoritmo genético lamarkiano es un método que combina otros dos: el algoritmo genético con el de búsqueda local adaptativa. El AG lamarkiano mejora el rendimiento en comparación con SA y AG [105]. Los algoritmos genéticos (AG) son una clase de métodos basados en evolución biológica y se plantearon con el fin de encontrar las soluciones óptimas a los problemas. El primer paso es crear una “población” de posibles soluciones. Esta población inicial, correspondería a un conjunto de conformaciones de la molécula creadas al azar. Cada miembro de la población está codificado por un “cromosoma”, que está guardado en una secuencia lineal de bits (es decir, ceros y unos). El cromosoma codifica los valores de torsión, posición y orientación. El código binario que codifica a cada torsión, traslación o rotación, se denomina “gen” (Fig. 3.4). La población inicial se obtiene fácilmente a través de una configuración aleatoria de los ceros y unos del cromosoma. La creación de la población inicial es seguida de ciclos sobre generaciones, que se repiten hasta que se alcance el máximo número de generaciones o de evaluaciones de energía, lo que ocurra primero.

Cada generación consiste de cinco etapas:

1. Transducción y evaluación de la función aptitud,
2. Selección,
3. Entrecruzamiento,

4. Mutación,
5. Selección elitista.

En el AG lamarkiano, cada generación es seguida de una búsqueda local, que se realiza sobre una fracción predeterminada de la población. Cada uno de estos cinco pasos consisten en:

1. La transducción decodifica el cromosoma de cada miembro de la población y le asigna los valores de diedros, rotación y traslación. Luego, la función aptitud de cada miembro es evaluada. Esta función es la suma de las energías de interacción intermolecular proteína-ligando e intramolecular del ligando.
2. La selección establece (a través de una ecuación, [105]) cuáles son los individuos que pueden reproducirse, teniendo mayor probabilidad aquellos cuya aptitud es mayor que la promedio.
3. El entrecruzamiento primero selecciona al azar un porcentaje preestablecido de individuos y luego selecciona aleatoriamente una posición  $i$  ( $1 \leq i \leq l-1$ , donde  $l$  es la longitud cromosoma) en el cromosoma para realizar el entrecruzamiento. Dos nuevo cromosomas son creados mediante el intercambio de bits entre la posición  $i+1$  y  $l$ .
4. En la mutación se selecciona aleatoriamente un bit del cromosoma y lo cambia de cero a uno o viceversa. La mutación usualmente tiene baja probabilidad de ser aplicada. En este caso, también el hijo reemplazada al parente.

5. Luego, de los pasos de selección, entrecruzamiento y mutación, se establece un orden de los individuos de la población de acuerdo a su función aptitud. A partir de este orden, la selección elitista determina cuales sobreviven en la siguiente generación. La cantidad de sobrevivientes está predeterminada.

Los algoritmos genéticos fueron originalmente propuestos como una técnica para llevar a cabo optimizaciones globales. Si esto fuera así, la única conformación obtenida en cada corrida sería la del mínimo global. Aunque, en el análisis conformacional de moléculas complejas no se garantice que se alcance la conformación de mínima energía global, entonces el algoritmo genético es usado como un método muy efectivo para generar un número muy grande de buenas soluciones [105, 107, 108].

En la búsqueda AG lamarkiana, la aptitud asociada con un individuo en el algoritmo de selección AG se actualiza siempre utilizando la búsqueda local, la cual se efectúa sólo sobre los diedros. Además, en cada generación se puede realizar búsqueda local sobre una fracción de la población, la cual está previamente determinada. En el caso del programa Autodock el método de búsqueda local está basado en el de Solis y Wets, el cual tiene la gran ventaja de no requerir la información de gradientes del entorno local de energía, facilitando así la búsqueda en el espacio de los diedros. Asimismo, este método es adaptativo, ajustando el tamaño del paso de búsqueda dependiendo de la energías previas que encuentra: así el tamaño del paso de búsqueda se duplica si encuentra previamente un número  $n$  de incrementos consecutivos en la energía, siendo  $n$  un número predeterminado; y en el caso de encontrar un número  $n$  de disminución de la energía, el tamaño del paso de búsqueda

se reduce en la mitad [105].

### 3.8.5. Mapa de grilla

Una forma simple y rápida de resolver las interacciones entre cada conómero y la enzima es utilizar una grilla que rodea al sitio de unión (de interés) de la enzima o incluso toda la enzima. Por cada tipo de átomo del ligando se construye una grilla, calculando en cada punto de ella la energía de interacción culómbica y de Van der Waals entre este tipo de átomo del ligando y los tipos de átomos de la proteína. Estos datos son almacenados y, luego, computada la energía de interacción entre la proteína y ligando en una conformación particular, asignando cada átomo al punto de la grilla más cercano (o interpolando, lo cual es computacionalmente costoso), y el valor de energía correspondiente para este tipo de átomo en ese punto.

La disminución del espaciamiento entre los puntos de la grilla aumenta la precisión en el cálculo de la energía, como también su costo [88, 90, 108]. La grilla tiene en cuenta sólo los términos que involucran la interacción del ligando con la proteína (puente de hidrógeno, culómbica y de van der Waals). Aunque, en Autodock, los términos de solvatación también son pre-calculados para el ligando partir de la grilla [105]. En el caso de los términos de torsión y de las interacciones internas de ligando (energía interna), dependen de la conformación que adopte el ligando, por lo tanto no pueden ser pre-calculados.

### 3.8.6. *Docking* realizados en la presente Tesis

Lo primero que se hizo fue un búsqueda en bibliografía de distintos inhibidores que fueron medidos experimentalmente frente a HPPD de *Streptomyces avermitilis* y de *Rattus norvegicus* [79, 77, 80, 109, 110].

Se seleccionaron los inhibidores que figuran en la tabla 3.5.

Tabla 3.5: Esquemas de compuestos utilizados para realizar la validación del método de *docking*

Compuesto	Estructura
1	
2	
NTBC	
Mesotriona	
6	
7	
8	

Los valores de  $\text{pIC}_{50}$  experimentales de los compuestos 1, 2, NTBC, y Mesotriona (Tabla 3.6) se obtuvieron de J. W. Zou et al. [110]. Los valores correspondientes a los compuestos 6,7 y 8 se obtuvieron de Dayan et al.

Tabla 3.6:  $\text{pIC}_{50}$  experimentales obtenidos de bibliografía.

Compuesto	$\text{pIC}_{50}$ experimental
1	7,30
2	7,30
NTBC	7,40
Mesotriona	7,57
6	5,27
7	6,30
8	4,95

[109]. Todos los compuestos de la tabla 3.5 fueron utilizados para realizar el *docking* en su forma aniónica debido a que su  $\text{pK}_a$  fue mucho menor que pH de trabajo de la enzima.

Con los datos obtenidos se realizaron las curvas correspondientes y se analizaron por medio de regresión lineal.

Luego de realizadas las curvas de validación se realizaron los *docking* con el Pinocembrín y la 2',4'-dihidroxichalcona ambos en forma neutra, además realizamos el *docking* con el Pinocembrín en forma iónica.

Para realizar todos los *docking* se procedió de la misma manera. Se descartaron de la base de datos RCSB [99] las estructuras obtenidas por cristalográfica de rayos X de la HPPD correspondiente a *Streptomyces avermitilis* (PDB ID: 1T47) y *Rattus norvegicus* (PDB ID: 1SQ1) que fueron cristalizadas experimentalmente. Se editaron las estructuras correspondientes para eliminar todas las moléculas de agua remanentes durante el proceso de cristalización y se reemplazó el átomo de Fe del sitio activo por un átomo de Zn, el cual permite recrear de la mejor manera posible el potencial generado por el Fe.

Debido a que los átomos de hidrógeno no se observan por cristalográfia de rayos X, se agregaron los H de todos los residuos polares de la proteína.

Luego se definió el modelo de cargas para realizar el *docking*. Se escogieron cargas Gasteiger para todos los átomos exceptuando aquellos correspondiente al sitio activo de la enzima. Para estos átomos calculamos las cargas con el programa Antechamber [111, 112]. Partimos del sitio activo reducido (Fig. 3.2), lo optimizamos con Gaussian al nivel de teoría de CAM-B3LYP 3.4.3 y luego calculamos las cargas del modelo cuántico. Estas cargas las agregamos al archivo pdb de la macromolécula. Así modelamos la macromolécula con cargas compuestas, el sitio activo con las cargas obtenidas a partir del modelo cuántico y el resto de los átomos con cargas Gasteiger que están incluidas en el paquete de Autodock [105].

Las grillas utilizadas se construyeron abarcando el sitio activo y las zonas aledañas con un  $dx = 0,2\text{\AA}$ .

Con todos los inhibidores se trabajó de la misma manera. Se dibujaron sus estructuras con el programa Avogadro y se optimizaron con Gaussian al nivel de teoría PM6. Recordemos que todos los inhibidores fueron trabajados de forma iónica a excepción del Pinocembrín y la 2',4'-dihidroxichalcona.

Los parámetros que se utilizaron en el algoritmo genético para realizar todos los *dockings* fueron los siguientes:

- Número de corridas: 250
- Tamaño de la población: 150
- Máximo número de evaluaciones:  $8 \times 10^6$
- Máximo número de generaciones:  $1 \times 10^5$

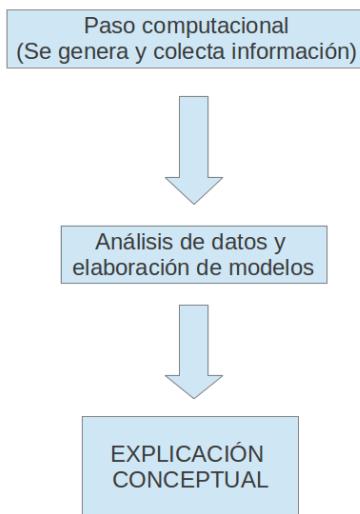


Figura 3.5: Protocolo de la química computacional.

Se analizaron entre 1000 y 1250 confórmeros para cada inhibidor. Las energías que se muestran en la sección 4.3 y que fueron utilizadas para realizar los gráficos corresponden a los confórmeros más probables. Es decir aquellos cuya frecuencia en los histogramas poblacionales fue mayor.

## 3.9. Función de localización electrónica

### 3.9.1. Introducción a la Teoría atómica de átomos en moléculas (QTAIM, de sus siglas en inglés)

Con el reduccionismo de los sistemas biofísicos, la atención se pasó a centrarse en decenas de átomos entre miles, siguiendo en general el esquema de la figura 3.5.

Pasar de los datos obtenidos por los programas a una explicación en términos químicos tradicionales no es fácil por lo cual debemos recurrir a

herramientas no clásicas, a la mecánica cuántica [88].

La observación de que algunas propiedades atribuidas a átomos y a grupos funcionales es transferible de una molécula a otra a tenido gran importancia en el desarrollo de la química. Esta observación provee las bases para la construcción de esquemas de adición de grupos y es exemplificada por la constancia con que los grupos funcionales contribuyen a las propiedades termodinámicas y espectroscópicas. La teoría cuántica de átomos en moléculas, de las siglas en inglés (QTAIM) fue desarrollada por Richard Bader y colaboradores [87]. Esta teoría se apoya en observables cuánticos como la densidad electrónica  $\rho(r)$  y densidad electrónica para responder a la pregunta de cuáles son las bases electrónicas de esta transferencia de propiedades empírica. Otras preguntas relacionadas que el QTAIM intenta responder son:

- ¿Qué es un átomo dentro de una molécula o un cristal?
- ¿Cómo un átomo o grupo de ellos puede ser transferido cuando los potenciales externos son muy diferentes?
- ¿Se pueden definir sin ambigüedades los enlaces en las moléculas?

A lo largo de la siguiente explicación se usará la palabra molécula para hacer referencia a sistemas extendidos como polímeros, complejos unidos débilmente y cristales iónicos y moleculares sumado a la definición tradicional de un grupo de átomos simple, finito y aislado químicamente.

### 3.9.2. La topología de la densidad electrónica

La topología de la densidad electrónica está dominada por las fuerzas atractivas del núcleo, que les imparte su característica topológica principal: un máximo marcado en la posición de cada núcleo. Una consecuencia del dominio del el máximo nuclear en la distribución de densidad electrónica es la asociación de un átomo con una región del espacio en la cual los límites están determinados por el balance de las fuerzas el núcleo ejerce sobre los electrones. Un punto crítico en la función de densidad electrónica es un punto en el espacio para el cual la primera derivada de la densidad es cero (Ec. 3.31).

$$\nabla\rho = \check{i}\frac{d\rho}{dx} + \check{j}\frac{d\rho}{dy} + \check{k}\frac{d\rho}{dz} \rightarrow \begin{cases} = \vec{0} & \text{En puntos críticos y en } \infty \\ \text{generalmente } \neq \vec{0} & \text{En todos los otros puntos} \end{cases} \quad (3.31)$$

En donde el vector cero significa que cada derivada individual en el operador gradiente da cero y no que sólo la suma da cero. El gradiente de una función escalar como  $\rho(r)$  evaluado en un punto es un vector que apunta en la dirección que  $\rho(r)$  aumenta a mayor velocidad y posee una magnitud igual al valor de esa velocidad. El máximo en la posición de un núcleo constituye un tipo de punto crítico (CP) llamado CP nuclear. Una aproximación importante que se realiza es considerar que el tamaño de los núcleos es finito. Esto resulta en una cúspide en  $\rho(r)$  en la posición del núcleo. Esto hace que la función no sea suave con lo que la derivada no puede definirse matemáticamente en ese punto, pero sin embargo, topológicamente se comporta como un punto crítico, por eso lo definimos así con anterioridad. Uno puede determinar si el

punto crítico corresponde a un máximo local, a un mínimo local o a un punto silla considerando las segundas derivadas, que son los elementos del tensor  $\Delta\Delta\rho$ . Las nueve derivadas existentes pueden ser organizadas en la llamada “matriz Hessiana” que cuando es evaluado en el punto crítico ubicado en  $r_c$  se escribe de la forma expresada en la siguiente ecuación (Ec. 3.32).

$$A(r_c) = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial x \partial y} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial x \partial z} \\ \frac{\partial^2 \rho}{\partial y \partial x} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial y^2} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial y \partial z} \\ \frac{\partial^2 \rho}{\partial z \partial x} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial z \partial y} & \frac{\partial^2 \rho}{\partial z^2} \end{pmatrix}_{r=r_c} \quad (3.32)$$

La matriz anterior puede ser diagonalizada debido a que es simétrica y real. Así tenemos que:

$$A(r_c) = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 \rho}{\partial x'^2} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{\partial^2 \rho}{\partial y'^2} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{\partial^2 \rho}{\partial z'^2} \end{pmatrix}_{r=r_c} = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 \end{pmatrix} \quad (3.33)$$

En la cual  $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$  son las curvaturas de los ejes de coordenadas  $x'$ ,  $y'$ ,  $z'$ . Estos ejes de coordenadas se eligieron de tal forma que quedan superpuestos con los ejes principales de curvatura del punto crítico. Una propiedad importante de la Hessiana es que su traza no depende de rotaciones en el sistema de coordenadas. La traza de la Hessiana de la densidad se conoce como el Laplaciano de la densidad, y cuando  $x=x'$ ,  $y=y'$ ,  $z=z'$  está dado por la siguiente expresión:

$$\nabla^2 \rho(r) = \nabla \cdot \nabla \rho(r) = \frac{\partial^2 \rho(r)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \rho(r)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \rho(r)}{\partial z^2} \quad (3.34)$$

$$= \lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 \quad (3.35)$$

Los CP son clasificados de acuerdo a su rango ( $\omega$ ) y a su firma ( $\sigma$ ) y se simbolizan por  $(\omega, \sigma)$ . El rango es el número de curvaturas distintas de cero de la función  $\rho$  en el CP. Un punto crítico que posee un  $\omega < 3$  es matemáticamente inestable y desaparece ante pequeñas perturbaciones de la densidad producidas por el movimiento de los núcleos. La presencia de estos puntos críticos indican un cambio en la topología de la densidad y por lo tanto un cambio en la estructura molecular. Por eso la mayoría de las veces no se observan valores menores a 3 para moléculas cuya distribución de carga se encuentra en equilibrio. La mayoría de las veces se obtienen valores de  $\omega = 3$ . La firma es la suma algebraica de las firmas de las curvaturas, cada una de las tres curvaturas contribuye a la firma total en  $+/- 1$  dependiendo si la curvatura es positiva o negativa. Existen cuatro tipos de puntos críticos estables:

- $(3, -3)$ : tres curvaturas negativas,  $\rho$  es un máximo local
- $(3, -1)$ : dos curvaturas negativas,  $\rho$  es máximo en un plano y es mínimo en el eje perpendicular a ese plano
- $(3, +1)$ : dos curvaturas positivas,  $\rho$  es mínimo en un plano y es máximo en el eje perpendicular a ese plano
- $(3, +3)$ : tres curvaturas positivas,  $\rho$  un mínimo local

Cada uno de estos puntos críticos descriptos arriba es identificado con un elemento de la estructura química: (3,-3), punto crítico nuclear (PCN); (3,-1), punto crítico de enlace (PCE); punto crítico de anillo (PCA), punto crítico de caja (PCC). El número y tipo de puntos críticos que pueden coexistir en una molécula o cristal sigue la siguiente relación topológica:

$$n_{NCP} - n_{BCP} + n_{RCP} - n_{ccp} = \begin{cases} 1 & (\text{Para moléculas aisladas}) \\ 0 & (\text{Cristales infinitos}) \end{cases} \quad (3.36)$$

El primer tramo de la ecuación 3.36 se conoce como la relación de Poincaré-Hopf (PH) [113] y se aplica a sistemas aislados como moléculas (según la acepción tradicional). La segunda igualdad es conocida como la ecuación de Morse [114] y se aplica a sistemas periódicos infinitos. El conjunto de números críticos para un sistema particular se conoce como “conjunto característico”. La violación de la ecuación 3.36 implica un conjunto característico inconsistente, que nos hemos saltado un punto crítico y que una posterior búsqueda del mismo es necesaria. Por otra lado que la ecuación 3.36 se satisfaga no implica que el conjunto característico esté completo. Como en la práctica los errores que llevan a que la ecuación 3.36 se satisfaga cuando el conjunto característico está incompleto son poco frecuentes, la misma se utiliza como criterio de consistencia y totalidad del conjunto anterior. Un punto crítico de anillo siempre es encontrado en de un anillo enlazado químicamente. Cuando varios anillos están conectados de manera que en su interior encierran un espacio intersticial, aparece un punto crítico de caja. En la figura 3.6 se observa

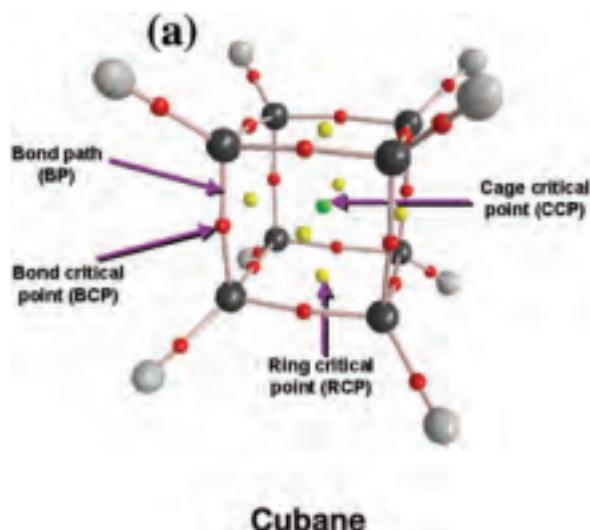


Figura 3.6: Gráfico molecular del cubano en donde se ven los enlaces y los diferentes puntos críticos: nucleares (coloreados por elemento: C=negro, H=blanco), de enlace (puntos rojos), de anillo (puntos amarillos) y de caja (puntos verdes)

el gráfico molecular del cubano. El enlace es una línea de densidad electrónica máxima que une los núcleos de dos átomos enlazados químicamente. En el cubano los enlace se arreglan entre los vértices de un cubo formando 6 anillos con la consecuente aparición de un punto crítico de anillo en el centro de cada una de las caras. Estos 6 anillos encierran el volumen de un cubo en su interior. Como resultado un punto crítico de caja aparece en el centro del cubo. Si se observa en detalle la figura 3.6, podemos observar cierta curvatura en los enlaces que se debe a la gran tensión anular de esta molécula inestable. Todos los puntos críticos de caja reportados en la literatura hasta el 2005 estaban delimitados por al menos 3 superficies anulares aunque matemáticamente sólo baste con dos, como estableció Bader en 1990 [113].

### 3.9.2.1. La topología de la densidad electrónica dicta la forma de los átomos en las moléculas

El pronunciado máximo de la densidad electrónica en las posiciones de los núcleos da lugar a una rica topología. Esta topología encarna una particionado natural del espacio en regiones mononucleares,  $W$ , que se identifican como los átomos dentro de las moléculas. La superficie que limita a un átomo dentro de una molécula es aquella a través de la cual el campo de vectores gradiente de la densidad electrónica es cero. Es decir, no es cruzada por ningún vector gradiente  $[\nabla\rho(r)]$  en ningún punto. Esto equivale a satisfacer la siguiente condición:

$$\nabla\rho(r) \cdot n(r) = 0, r \in S(\Omega) \quad (3.37)$$

Donde  $r$  es el vector posición y  $n(r)$  es el vector normal a la superficie  $S(\Omega)$ .

En la figura 3.7 se representan la densidad electrónica y el campo de vectores gradiente en el plano que contiene a los átomos de la molécula  $\text{BF}_3$ . La figura contrasta las superficies de cero flujo, las que dividen el espacio en cuencas monoatómicas separadas con una superficie arbitraria cortada a través de la densidad. En la parte izquierda de la figura se grafica la densidad electrónica pero como esta sería igual del lado izquierdo debido a la geometría de la molécula, se indica en la parte izquierda el campo de vectores gradiente. Las líneas de campo de los vectores gradiente dividen al espacio molecular en 4 cuencas, 3 que corresponden a los átomos de flúor y una que corresponde al átomo de bromo. Cada línea de campo converge hacia un núcleo, el cual

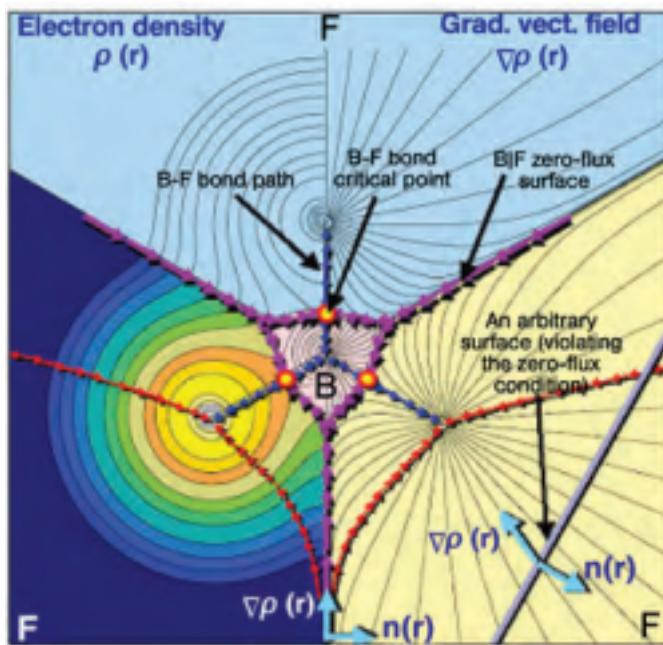


Figura 3.7: Gráfico de densidad electrónica y del campo de vectores gradiente correspondiente al  $\text{BF}_3$ .

actúa como atractor de esas líneas. Esta región del espacio barrida por el vector gradiente es identificada como la cuenca de un átomo en una molécula (Atoms In Molecules o AIM).

Un átomo en una molécula se define como un núcleo y su cuenca asociada. Cada cuenca está unida por una o un número de superficies de flujo cero. Ocasionalmente un máximo local puede ocurrir en posiciones que no se corresponden con los núcleos atómicos, esto pasa especialmente en metales [115, 116]; y semiconductores, [117, 118]. Esto ocurre también en sistemas como el electrón solvatado [119] y en las posiciones correspondientes a los defectos en los cristales. Los máximos no nucleares, también conocidos como atractores no nucleares (ANN), son topológicamente indistinguibles de los máximos nucleares, por lo que estos sistemas cuánticos son conocidos

como pseudo-átomos. Estos pseudo átomos pueden estar unidos (compartir una superficie de flujo cero) con átomos o con otros pseudo-átomos en una molécula. Estos ANN son de gran importancia para caracterizar el enlace metálico y son de importante interés teórico. Cabe destacar que no existen superficies de flujo cero entre átomos que no estén enlazados. Estas superficies son características de las interacciones de enlace.

Los dominios electrónicos pueden ser definidos matemáticamente como las cuencas del campo de vectores gradiente de una función *ad-hoc* para la cual la función de localización electrónica (ELF) de Becke y Edgcomb provee una estimación excelente[120] Esta función exhibe un máximo en la posición más probable de los pares de electrones y cada máximo está rodeado por una cuenca donde existe una probabilidad elevada de encontrar el par electrónico. Esta cuenca corresponde cualitativamente con los pares electrónicos del modelo de la teoría de repulsión de pares electrónicos de valencia (TREPEV) y poseen la misma geometría [121].

La partición topológica del campo gradiente de ELF [122] muestra cuencas de atractores lo que corresponde a enlaces y pares solitarios. En una molécula uno puedo encontrar dos tipos de cuencas. Las cuencas que rodean a los núcleos de los elementos con  $Z>2$  y las cuencas correspondientes a los electrones de valencia. Estas cuencas de valencia están caracterizadas por el número de capas de valencia en las cuales participa. Este número se conoce como orden sináptico. Las cuencas monosinápticas corresponden a los pares solitarios del modelo de Lewis, y las cuencas polisinápticas corresponden a los electrones de enlace. En particular, las cuencas disinápticas corresponden a enlaces de dos centros. En el contexto del análisis de ELF el concepto de do-

minio es muy importante ya permite definir unidades químicas entre sistemas y caracterizar los dominios de valencia pertenecientes a dicha unidad.

Cualquier subconjunto de cuencas rodeadas por una isosuperficie  $n(r)=f$  se denomina dominio. Un dominio posee por lo menos un atractor, en este caso se denomina irreducible, si tiene más se lo denomina reducible. Al incrementar el valor  $n(r)$  un domino irreducible se divide en varios dominios los cuales poseen menos atractores que el dominio de partida. Existen tres tipos de dominios : nucleares, de valencia y mixtos o compuestos.

El análisis topológico de ELF puede ser usado para determinar la población de una cuenca [123], así como se realizó en esta Tesis. Se ha demostrado recientemente que el análisis topológico de ELF puede ser usado en el marco de un análisis de la distribución de momentos como se ha hecho para AIM [124]. La población de las cuencas se calcula integrando la función de densidad de un electrón en todo el volumen de la cuenca:

$$N = \int \rho(r) dr \quad (3.38)$$

La distribución de los momentos electrostáticos basadas en la partición del ELF, permite computar los momentos locales localizados en centros no atómicos como son los pares solitarios, enlaces sigma, y sistemas Pi. Esta contribución de los dipolos locales ha sido útil para racionalizar los efectos inductivos de polarización y los puentes de hidrógeno. Además al abordar el estudio de sistemas pi puede discutirse la multiplicidad de los enlaces y permite agrupar a las distintas moléculas de acuerdo a su orden de enlace.

### 3.9.2.2. Resumen de la aplicación del la Función de localización electrónica

La partición topológica del campo gradiente de ELF [124] muestra cuencas de atractores lo que corresponde a enlaces y pares solitarios. En una molécula uno puedo encontrar dos tipos de cuencas. Las cuencas que rodean a los núcleos de los elementos con  $Z>2$  y las cuencas correspondientes a los electrones de valencia. Estas cuencas de valencia están caracterizadas por el número de capas de valencia en las cuales participa. Este número se conoce como orden sináptico. Las cuencas monosinápticas corresponden a los pares solitarios del modelo de Lewis, y las cuencas polisinápticas corresponden a los electrones de enlace. En particular, las cuencas disinápticas corresponden a enlaces de dos centros.

En el contexto del análisis de ELF el concepto de dominio es muy importante ya permite definir unidades químicas entre sistemas y caracterizar los dominios de valencia pertenecientes a dicha unidad.

Cualquier subconjunto de cuencas rodeadas por una isosuperficie  $n(r)=f$  se denomina dominio. Un dominio posee por lo menos un atractor, en este caso se denomina irreducible, si tiene más se lo denomina reducible. Al incrementar el valor  $n(r)$  un domino irreducible se divide en varios dominios los cuales poseen menos atractores que el dominio de partida. Existen tres tipos de dominios : nucleares, de valencia y mixtos o compuestos.

El análisis topológico de ELF puede ser usado para determinar la población de una cuenca (Ec. 3.38).

### 3.9.3. El uso de las propiedades atómicas provenientes de la teoría cuántica de átomos en moléculas

Las propiedades atómicas para obtener y predecir varias contribuciones atómicas y de grupos funcionales a las propiedades moleculares observadas experimentalmente. Incluyendo por ejemplo calores de formación [125], susceptibilidades magnéticas [126], volúmenes moleculares [119], momentos eléctricos, polarizabilidad [127], intensidades de espectroscopía Raman y IR [128], cálculo de probabilidades de transición en espectroscopía [129], polarización dieléctrica en cristales y momentos cuadrupolares moleculares. Han sido usadas para proveer las bases de la localización y deslocalización electrónica [129]. Se utilizaron las propiedades atómicas para predecir las constantes de ácidez de ácidos débilesix. Permite predecir una amplia cantidad de propiedades biológicas y fisicoquímicas de los aminoácidos, así como el código genético y el efecto de mutaciones en la estabilidad de las proteínas. Permiten realizar predicciones respecto de las propiedades para HPLC, constantes de acoplamiento espín-espín en RMN, reconstrucción de moléculas a partir de fragmentos de átomos en moléculas, descripciones de enlaces puente de hidrógeno y efectos de polarización en nanotubos de carbono [127, 128, 129, 119].

### 3.9.4. Cálculo de la función de localización electrónica

Los valores de ELF fueron obtenidos con el programa ToPMod [130] al nivel de teoría CAM-B3LYP [131], [132] utilizando el conjunto de bases LACVP [102] (6-31+G\* [101, 100] para todos los átomos no metálicos (C, H,

O, N, S, Cl) y la base LANL2DZ [103] para el Fe presente en el sitio activo de la enzima. Las optimizaciones de los distintos complejos entre los inhibidores y el sitios activo reducido. se realizaron con el programa Gaussian 98 [97]. Las isosuperficies fueron graficadas con el programa VMD [133] a distintos valores de ELF

# Capítulo 4

## Resultados

*“Hay una fuerza motriz mas poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: La Voluntad”*

*Albert Einstein*

### 4.1. Acidez

Se utilizó el paquete de programas ACD Labs (ACD/pK<sub>a</sub>DB) para calcular los pK<sub>a</sub> de los compuestos de interés. Primero se realizó una curva de calibración con los compuestos de la tabla 4.1. Esto se hizo para poder validar los resultados obtenidos, para evaluar en qué medida los datos arrojados por el programa son representativos de las observaciones experimentales.

Con los datos de la tabla se construyó la curva de calibración (Fig 4.1).

Como la curva obtenida fue muy buena ( $R^2=0,98$ ) se procedió a calcular los pK<sub>a</sub> del NTBC y del Pinocembrín. Los resultados obtenidos fueron los mostrados en la tabla 4.2.

Tabla 4.1: Compuestos utilizados para realizar la curva de calibración. Los resultados experimentales fueron obtenidos de NIST [134].

Compuesto	Estructura	pK <sub>a</sub> experimental	pK <sub>a</sub> calculado
1		4,76	4,79
2		4,20	4,20
3		0,23	0,53
4		4,86	4,79
5		10,00	9,86

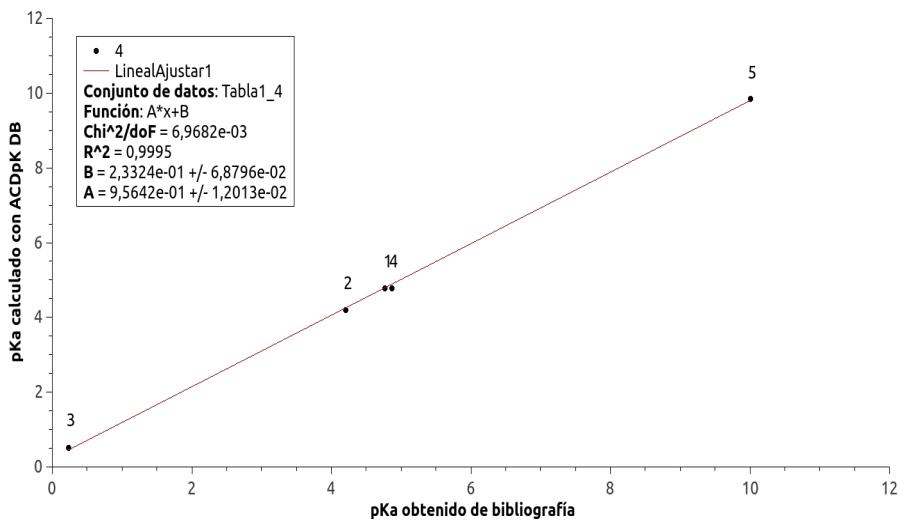
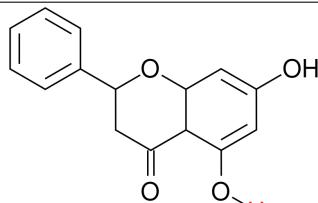
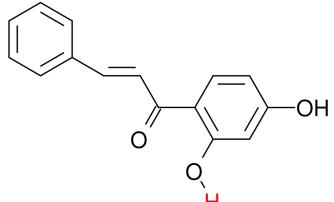
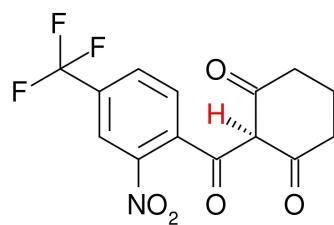
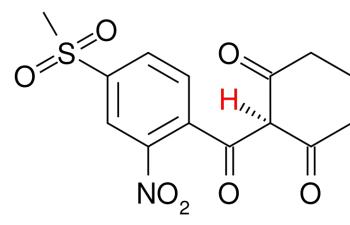


Figura 4.1: Curva de calibración realizada con los datos de la tabla 4.1. Los números corresponden a los compuestos de la tabla 4.1.

Tabla 4.2:  $pK_a$  calculados con el ACDLabs para los inhibidores en estudio. El  $pK_a$  calculado corresponde a la disociación del protón indicado en rojo en las distintas estructuras.

Compuesto	Estructura	$pK_a$	$\alpha$
Pinocembrín		7,56	0,06
2',4'-dihidroxichalcona		7,42	0,09
NTBC		2,81	1,00
Mesotriona		2,77	1,00

Los estudios in vitro realizados con la enzima se realizan en un buffer a una pH de 6,5 [81]. Partiendo de la ecuación 4.1 pude derivarse el grado de ionización ( $\alpha$ ) en función del  $pK_a$  y del pH (Ec. 4.2).

$$pH = pK_a - \log \left( \frac{[HA]}{[A^-]} \right) \quad (4.1)$$

$$\alpha = (1 + 10^{pK_a - pH})^{-1} \quad (4.2)$$

Con ella se calcularon los  $\alpha$  para cada compuesto de la tabla 4.2 y se muestran en la columna de la derecha de la tabla 4.2.

Se puede ver que al pH de acción de trabajo de la HPPD hay una marcada diferencia entre el grado de ionización de los inhibidores sintéticos preexistentes (NTBC y Mesotriona) y el de los compuestos descubiertos recientemente por Carpinella et al. [81] (Pinocembrín y 2',4'-dihidroxichalcona). Estos dos últimos compuestos se encuentran casi completamente en su forma neutra a un pH de 6,4.

También se calculó el  $pK_a$  de los compuestos elegidos para hacer la validación del método de *docking*. Los resultados se muestran en la tabla 4.3.

Como se ve en la tabla 4.3 todos los compuestos calculados resultaron tener un  $pK_a \ll pH_{trabajo}$ , por ese motivo fueron tratados como aniones a la hora de realizar los *dockings*.

Tabla 4.3:  $pK_a$  calculados para los inhibidores utilizados para validar el método de *docking*.

Compuesto	$pK_a$	+/-
1	3,12	0,60
2	2,87	0,25
NTBC	2,81	0,25
Mesotriona	2,77	0,25
6	3,69	0,25
7	3,09	0,25
8	3,50	0,25

## 4.2. Estudio conformacional

Se realizó un estudio conformacional de los compuestos en estudio de forma de encontrar el confórmero más estable para cada estructura. El diedro que se sometió a la evaluación se destaca en rojo, para cada inhibidor en las figuras 4.2, 4.3, 4.4 y 4.5. La importancia de realizar esta búsqueda del confórmero más estable radica en que para que el inhibidor pueda ligar al Fe del sitio activo de la enzima el inhibidor debe adoptar una conformación específica, si la misma no es la de menor energía, existirá un requerimiento energético mayor para que el compuesto pueda unirse al sitio activo, entonces será un inhibidor menos eficaz que aquel en el que la conformación más estable coincide con la necesaria para formar un complejo quelato con Fe(II).

Puede verse en las figuras 4.2, 4.3 y 4.4, que tanto para el Mesotriona como para el NTBC y el Pinocembrín, el confórmero más estable es el que corresponde al  $\text{diedro}=0$  esto significa que los dos oxígenos en cuestión (los que intervendrán en la complejación del hierro del sitio activo) se encuentran en posición *cis* (Fig. 4.6 (a)).

Por otro lado y a diferencia de esto último, vemos que en la figura 4.5 el

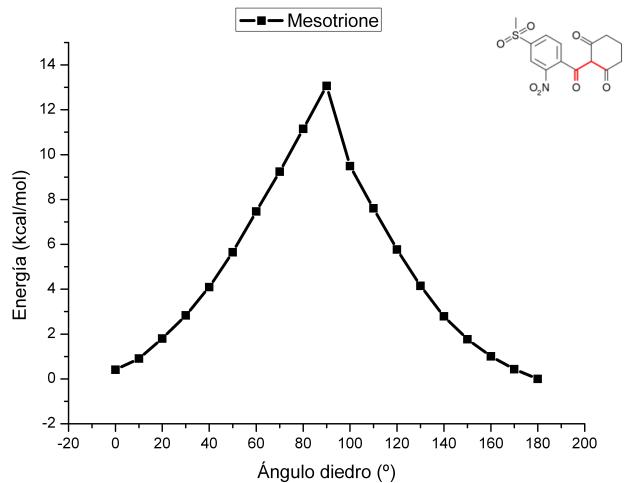


Figura 4.2: estudio conformacional del Mesotriona con CAM B3LYP

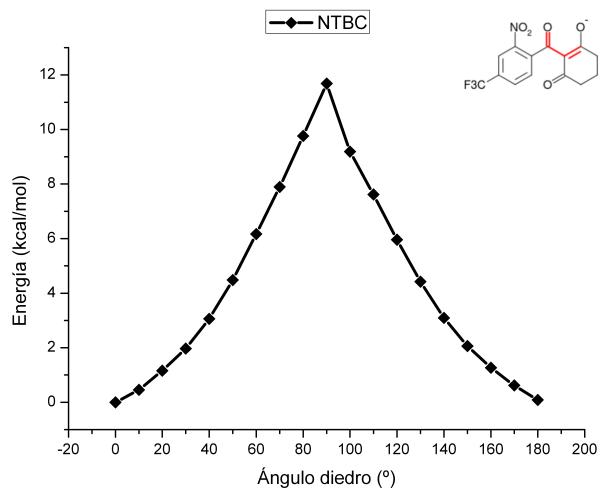


Figura 4.3: estudio conformacional de NTBC con CAM B3LYP

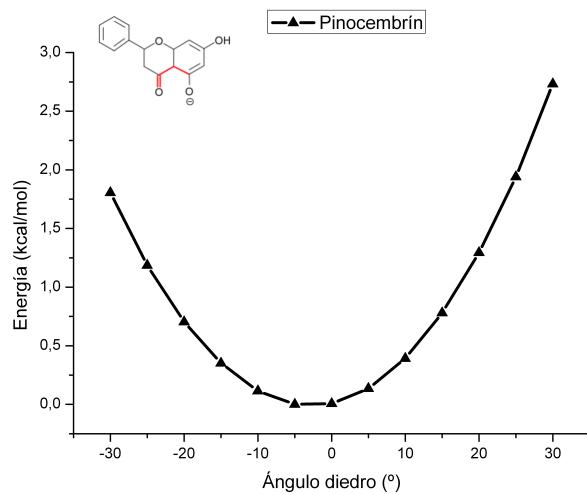


Figura 4.4: estudio conformacional de Pinocembrín con CAM B3LYP

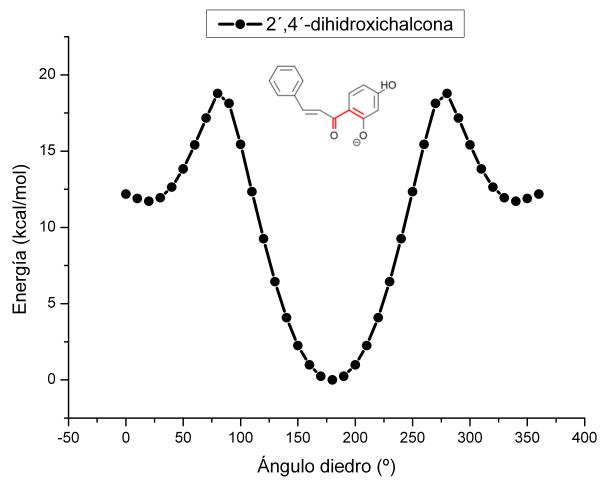


Figura 4.5: estudio conformacional de 2',4'-dihidroxichalcone con CAM B3LYP

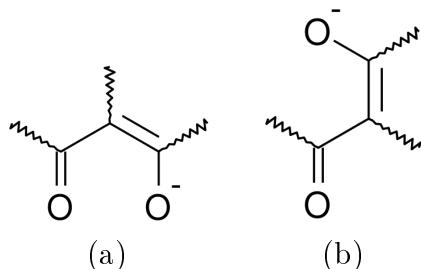


Figura 4.6: Posición relativa de los oxígenos para los confórmeros más estables. En (a) para el caso del NTBC, Mesotriona y Pinocembrín; (b) para la 2',4'-dihidroxichalcona.

confórmero de menor energía corresponde al diedro=180°, esto es cuando los oxígenos se encuentran en posición *trans* (Fig. 4.6 (b)).

Esta diferencia de conformaciones es de vital importancia porque la 2',4'-dihidroxichalcona debe realizar un giro de 180º en torno al enlace en cuestión para poder coordinarse con el Fe (II) del sitio activo de la HPPD. Esto es energéticamente desfavorable ya que existe una diferencia de aproximadamente 12,5 Kcal/mol entre ambos confórmeros (Fig. 4.5). Para realizar los *docking* se utilizaron los confórmeros más estables correspondientes a cada estructura.

### 4.3. *Docking*

#### 4.3.1. Validación del método

En la tabla 4.4 se muestran las energías de ligado de los confórmeros más frecuentes para cada inhibidor.

Tabla 4.4: Esquemas de compuestos utilizados para realizar la validación del método de *docking*. Se muestran también los  $pIC_{50}$  experimentales obtenidos de bibliografía. (a) HPPD de *Streptomyces avermitilis*, grilla chica. (b) HPPD de *Rattus norvegicus*, grilla chica.

Compuesto	Estructura	$pIC_{50}$	$\frac{-E_{\text{unión}}(\text{Kjoule} \cdot \text{mol}^{-1})}{(a)}$	$(b)$
1		7,34	9,26	9,40
2		7,30	8,92	8,00
NTBC		7,40	9,60	7,68
Mesotriona		7,57	8,20	8,32
6		5,27	5,27	6,67
7		6,30	6,30	6,84
8		4,95	4,95	5,05

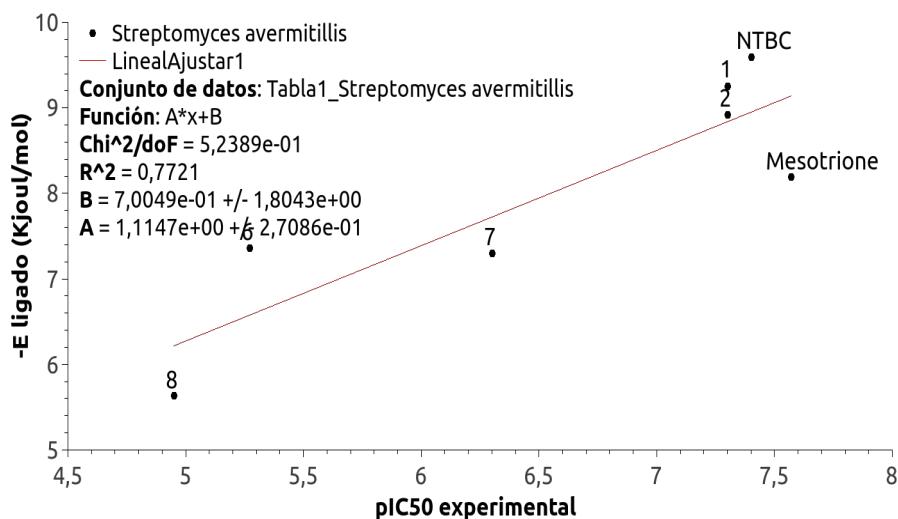


Figura 4.7: Se muestran los valores de energía de unión en  $Kjoule \cdot mol^{-1}$  respecto del  $\log \frac{1}{IC_{50}}$  para HPPD de *Streptomyces avermitilis*. Los compuestos numerados (1, 2, 6, 7 y 8) corresponden a los compuestos de la tabla 3.5.

Con los datos anteriores se construyeron gráficos (Fig. 4.7 y Fig. 4.8) en donde pueden compararse todas las energías calculados respecto de los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos experimentalmente [81, 109, 135].

Vemos que tanto para la HPPD de *Rattus norvegicus* (Fig. 4.8) como para la *Streptomyces avermitilis* (Fig. 4.7) los datos se ajustan razonablemente bien a una recta. Debe tenerse en cuenta que para lograr un mejor ajuste es necesario trabajar con un número muy grande de inhibidores, entre 30 y 40 [109, 110, 136], debido a la falta de tiempo no fue posible trabajar con tantos, pero aún así pudimos establecer una tendencia para poder estimar los órdenes de las energías de enlace para los inhibidores en estudio.

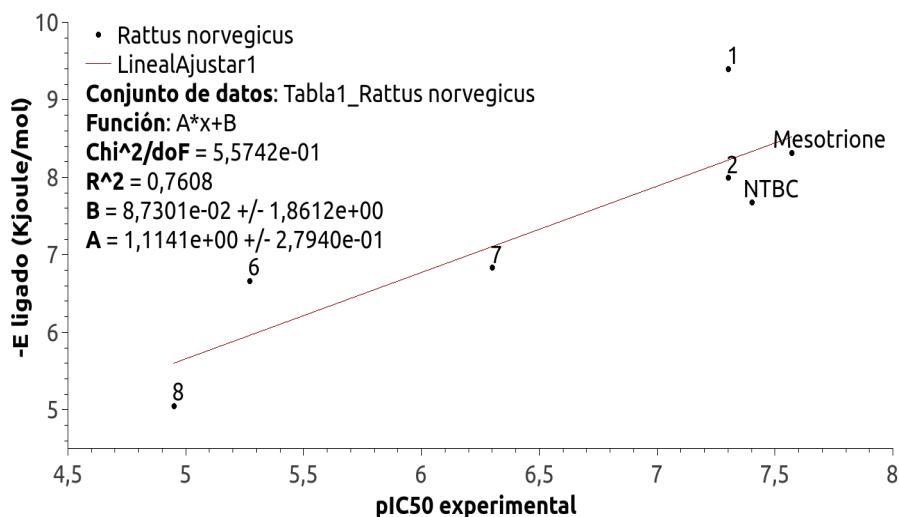


Figura 4.8: Se muestran los valores de energía de unión en  $Kjoule \cdot mol^{-1}$  respecto del  $\log \frac{1}{IC_{50}}$  para HPPD de *Streptomyces avermitilis*. Los compuestos numerados (1, 2, 6, 7 y 8) corresponden a los compuestos de la tabla 3.5.

Tabla 4.5: *docking* de inhibidores frente a la HPPD de *Streptomyces avermitilis*. E.L.: eficiencia del ligando; P. H.: cantidad de puentes de Hidrógeno.

Compuesto	-E <sub>unión</sub>	E. L.	K <sub>i</sub> (μM)	P. H.
Mesotriona	8,20	-0,33	2,80	2
NTBC	9,60	-0,30	8,25	1
Pinocembrín neutro	7,52	-0,40	3,10	3
2',4'-dihidroxichalcona neutro	7,51	-0,42	3,15	3

#### 4.3.2. *Docking* de los inhibidores estudiados en la presente Tesis

Se realizaron estudios de docking de los inhibidores en estudio frente a HPPD de *Streptomyces avermitilis* (1T47) y *Rattus norvegicus* (16Q1).

En el cuadro 4.7 se presenta un resumen de los datos obtenidos por *docking*. A continuación se presentan en la figura 4.9 algunas de las poses más frecuentes obtenidas de los *dockings*. Puedo verse en las tablas 4.5 y 4.6 que

Tabla 4.6: *docking* de inhibidores frente a la HPPD de *Rattus norvegicus* con grilla chica. E.L.: eficiencia del ligando; P. H.: cantidad de puentes de Hidrógeno.

Compuesto	-E <sub>uniión</sub>	E. L.	K <sub>i</sub> (μM)	P. H.
Mesotriona	8,32	-0,27	23,44	2
NTBC	7,68	-0,27	28,26	1
Pinocembrín neutro	6,27	-0,33	26,42	3
2',4'-dihidroxichalcona neutro	6,20	-0,35	25,73	3

Tabla 4.7: Resumen de datos obtenidos por *docking* comparados con los pIC<sub>50</sub> obtenidos experimentalmente. (a) HPPD de *Streptomyces avermitilis*; (b) HPPD de *Rattus norvegicus*. Los datos de IC<sub>50</sub> correspondientes al Pinocembrín y a la 2',4'-dihidroxichalcona fueron obtenidos de Carpinella et al. [81]. Todas las -E<sub>ligado</sub> se encuentran en Kjoule/mol.

Compuesto	pIC <sub>50</sub> experimental	-	
		E <sub>ligado</sub> (Kjoule·mol <sup>-1</sup> )	
		(a)	(b)
NTBC	7,40	9,60	7,68
Mesotriona	7,57	8,20	8,32
Pinocembrín neutro	4,14	7,52	6,27
2',4'-dihidroxichalcona neutro	3,34	7,51	6,20

el confórmero más probable de los *dockings* de los compuestos aniónicos presenta sólo 1 puente de hidrógeno, salvo el NTBC que posee 2, mientras que el de los compuestos neutros presenta 3 puentes de hidrógeno.

Observando la figura 4.9 vemos que el modo de ligado es diferente para los aniones que para los compuestos neutros. Puede verse en las figuras 4.9-c y 4.9-e que el inhibidor coordina con el Fe (esfera amarilla) del sitio activo por los oxígenos, mientras que en el caso de las sustancias neutras con las que trabajamos no lo hace. Esto podría explicarse por la cantidad mayor de puentes de hidrógeno que se establecen con la proteína en el caso de la sustancias neutras. Los mismos estabilizan otras posiciones de ligado.

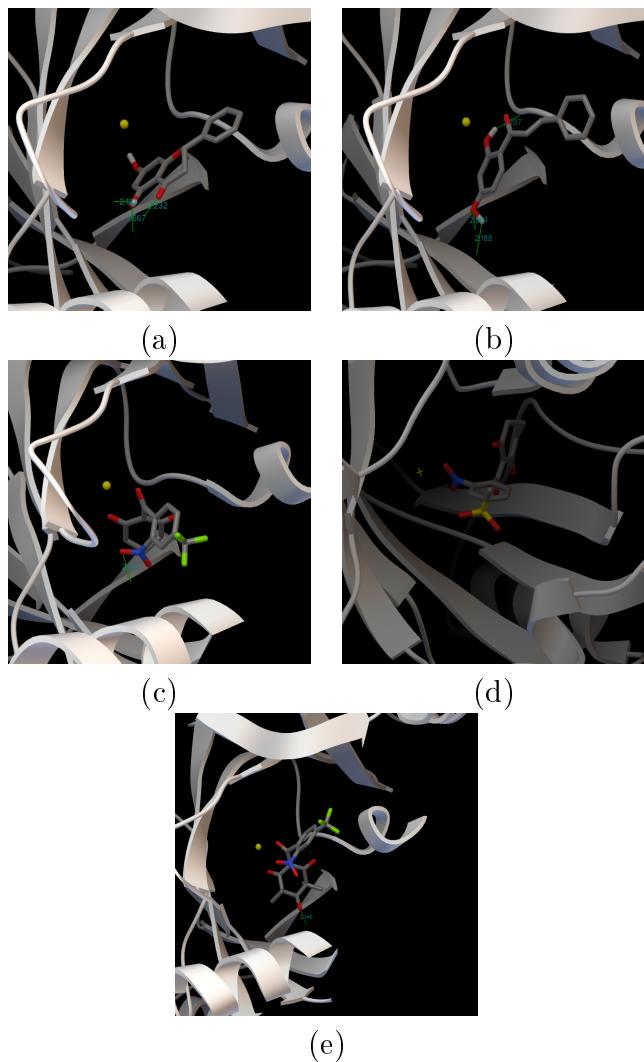


Figura 4.9: Poses de los confórmeros más frecuentes ligados a HPPD de *Rattus norvegicus*. Las imágenes para HPPD de *Streptomyces avermitilis* no se muestran por ser análogas. Se observa el sitio activo de la enzima. En amarillo se muestra el Fe del sitio activo. En rojo los oxígenos, en verde los Flúor, en negro los carbonos, en azul los nitrógenos, en blanco la estructura terciaria de la HPPD. En líneas verdes se indican los puentes de hidrógeno. Los inhibidores son los siguientes: (a) Pinocembrín neutro, (b) 2',4'-dihidroxichalcona neutro, (c) NTBC aniónico, (d) Mesotriona aniónico, (e) compuesto 1 de la tabla 4.4.

Tabla 4.8: Se muestran las energías de reacción en (Kcal/mol) correspondientes a la reacción esquematizada en la figura 3.3. Se utilizó el potencial híbrido CAM-B3LYP con el conjunto de bases LACVP. (a) Los cálculos se realizaron en vacío; (b) se utilizó 1,2-dicloroetano como solvente implícito.

Compuesto	$\Delta E_{reacción}$ (Kcal/mol)	
	(a)	(b)
NTBC	-59,6	-1,73
Mesotriona	-56,91	0,26
Pinocembrín anión	-75,6	-10,95
Pinocembrín neutro	2,31	0,2
2',4'-dihidroxichalcona	-62,91	-5,07

#### 4.4. Cálculos cuánticos

Trabajando con las poses más frecuentes obtenidas por medio de *docking*, se realizaron cálculos de búsqueda de geometrías de menor energía para los aductos formados, por medio de métodos cuánticos. Los resultados se muestran en las tablas 4.9 y 4.8. En la tabla 4.9 se observan los resultados obtenidos utilizando el conjunto de bases 6-31+G\* para todos los átomos, mientras que los de la tabla 4.8 se obtuvieron utilizando el conjunto de bases LACVP, que combina el conjunto 6-31+G\* para los átomos no metálicos con el conjunto de bases LANL2DZ para los metales de la primera serie de transición, en este caso el Fe.

Comparando la figura 4.10 con la figura 4.11 podemos ver que ambos conjuntos de bases muestran la misma tendencia, tanto en vacío como en DCE. Se observa que el único compuesto que se trabajó en forma neutra, el Pinocembrín, tanto en solvente como en vacío posee un  $\Delta E_{reacción} \gg 0$  esto se explica debido a la baja estabilidad del complejo formado. A partir de las tablas 4.9 y 4.8 podemos establecer un orden de estabilidad para los

Tabla 4.9: Se muestran las energías de reacción en (Kcal/mol) correspondientes a la reacción esquematizada en la figura 3.3. Se utilizó el potencial híbrido CAM-B3LYP con el conjunto de bases 6-31+G\*. (a) Los cálculos se realizaron en vacío; (b) se utilizó 1,2-dicloroetano como solvente implícito.

Compuesto	$\Delta E_{reacción}$ (kcal/mol)	
	(a)	(b)
NTBC	-70,55	-11,41
Mesotriona	-68,62	-10,82
Pinocembrín anión	-83,74	-19,12
Pinocembrín neutro	22,71	21,79
2',4'-dihidroxichalcona	-82,2	-17,75

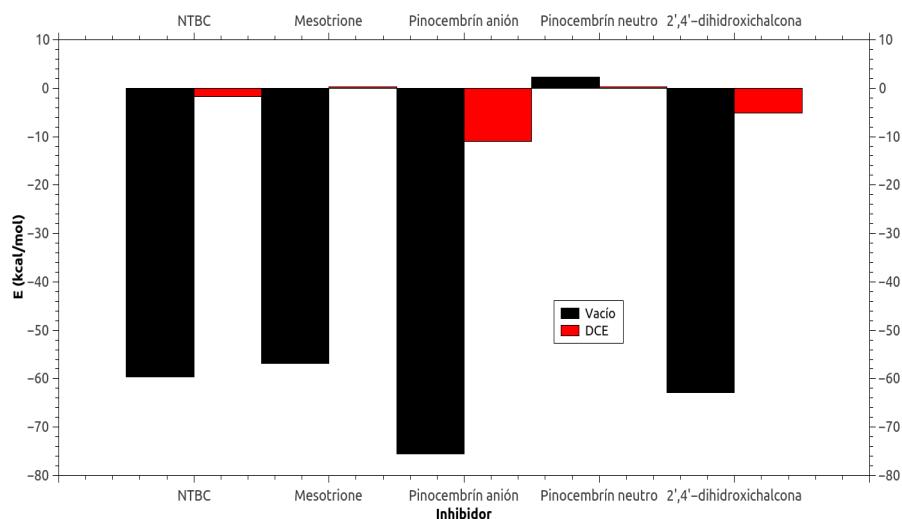


Figura 4.10: Diagrama de barras en el que se representan las distintas energías de reacción para cada inhibidor al nivel de teoría B3LYP utilizando bases 6-31+G\* para todos los átomos participantes. En negro se grafican las energías obtenidas en vacío mientras que en rojo se representan los valores obtenidos en vacío 1,2-dicloroetano (DCE).

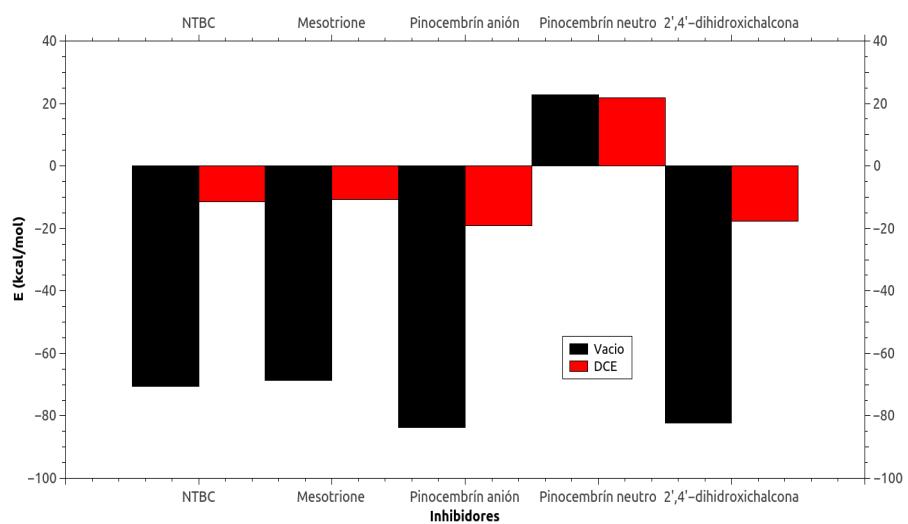


Figura 4.11: Diagrama de barras en el que se representan las distintas energías de reacción para cada inhibidor al nivel de teoría B3LYP utilizando bases 6-31+G\* para todos los átomos no metálicos participantes. Para el Fe se utilizó la base LANL2DZ. En negro se grafican las energías obtenidas en vacío mientras que en rojo se representan los valores obtenidos en vacío 1,2-dicloroetano (DCE).

complejos formados entre los distintos inhibidores y el sitio activo reducido de la HPPD: Pinocembrín aniónico > 2',4'-dihidroxichalcona aniónica > NTBC aniónico > Mesotrión aniónico ≫ Pinocembrín neutro.

Este orden de estabilidad es el mismo orden que se obtiene al ordenar las energías obtenidas por *docking* que se muestran en la tabla 4.7. Podemos ver entonces que los aniones forman complejos más estables que las sustancias neutras. Esto es consistente con los datos hallados mediante ELF (sección 4.5) y mediante *docking* (sección 4.3) como ya explicamos anteriormente.

Aunque los resultados obtenidos con ambos conjuntos de bases no reproducen con exactitud los resultados obtenidos experimentalmente por Carpinella et al. [81], son de utilidad para predecir a grandes rasgos la eficacia de un determinado compuesto como inhibidor de la HPPD. Es de esperar que los resultados no se ajusten de manera ideal ya que con el modelo de sitio activo reducido se pierden todas las interacciones entre el inhibidor y el resto de la proteína, que para realizar los cálculos cuánticos no se tuvo en cuenta.

Se puede ver también que los compuestos más ácidos son los menos estables. Los grupos atractores de electrones como el  $-CF_3$  en el caso del NTBC o el  $SO_2CH_3$  del Mesotrión estabilizan la carga negativa de la base conjugada, lo que aunque estabiliza al anión resultante debilita el enlace metal-ligando entre el inhibidor y el sitio activo de la enzima.

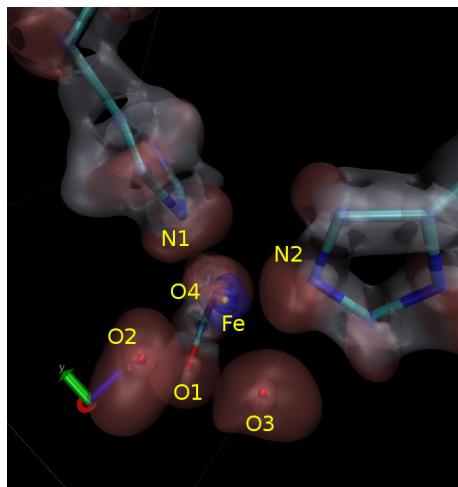


Figura 4.12: Isosuperficie para el sitio activo reducido con 2 moléculas de agua correspondiente a un valor de ELF de 0,65.

#### 4.5. Función de localización electrónica (ELF)

Los resultados obtenidos para los aductos entre el sitio activo reducido y los distintos inhibidores en estudio se observan debajo. En las figuras se pueden observar en rojo la representación de los pares libres, en azul los electrones no compartidos, nucleares, o “de core” y en blanco los electrones de enlace. Debe recordarse que la función de localización electrónica no representa directamente la densidad electrónica sino más bien representa una corriente de densidad electrónica ya que expresa el flujo con el que cambia la densidad electrónica. Para cada inhibidor y para el sitio activo coordinado con 2 moléculas de agua se presenta también una variación de la isosuperficie centrados en el átomo de Fe central. ELF=0,65 (a), ELF=0,70 (b), ELF=0,75.

Comparando las figuras 4.13, 4.15, 4.17, 4.19, 4.21 y 4.23 puede observarse que al aumentar el valor de ELF se comienzan a definir regiones ais-

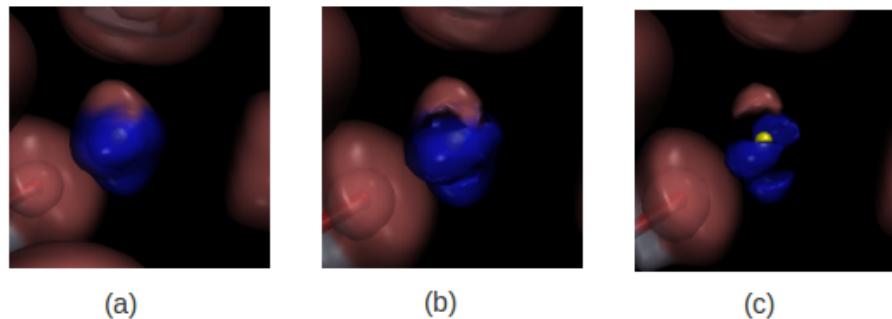


Figura 4.13: Isosuperficies en torno al átomo de Fe en el sitio activo con 2 moléculas de agua correspondientes a valores de ELF de (a) 0,65, (b) 0,70, (c) 0,75.

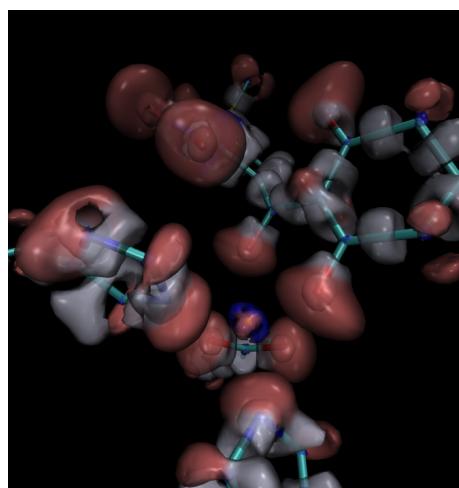


Figura 4.14: Isosuperficie para el sitio activo reducido con anión del Mesotriona correspondiente a un valor de ELF de 0,65.

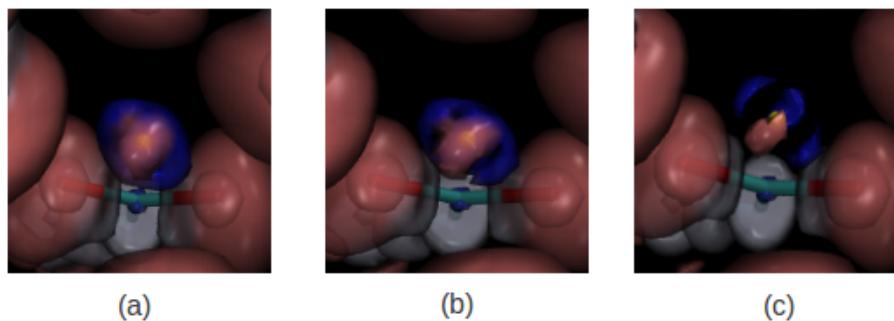


Figura 4.15: Isosuperficies en torno al átomo de Fe en el sitio activo con anión del Mesotriona correspondientes a valores de ELF de (a) 0,65, (b) 0,70, (c) 0,75.

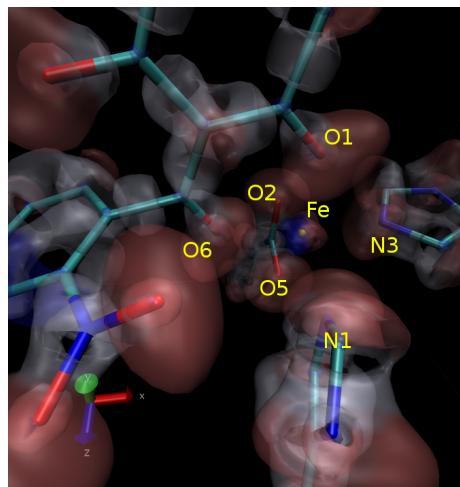


Figura 4.16: Isosuperficie para el sitio activo reducido con anión del NTBC correspondiente a un valor de ELF de 0,65.

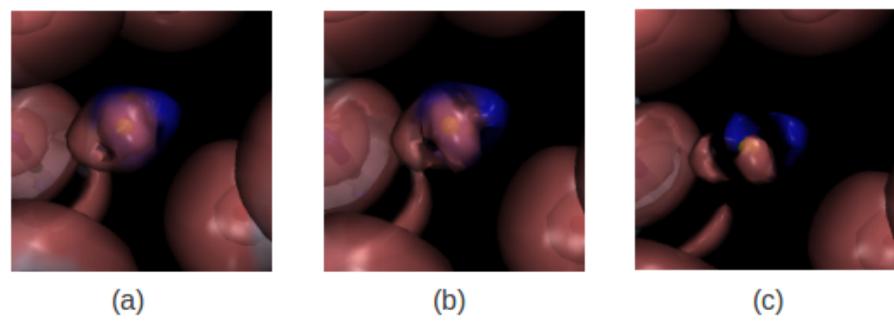


Figura 4.17: Isosuperficies en torno al átomo de Fe en el sitio activo con anión del NTBC correspondientes a valores de ELF de (a) 0,65, (b) 0,70, (c) 0,75.

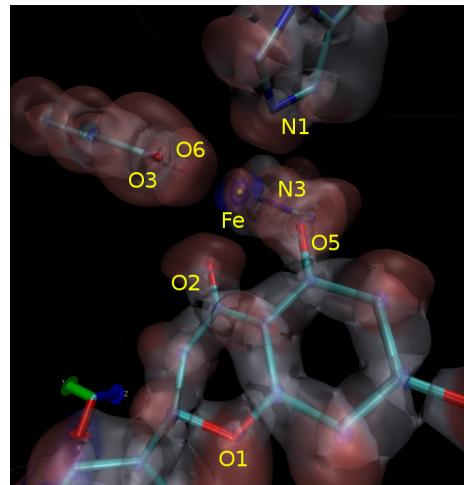


Figura 4.18: Isosuperficie para el sitio activo reducido con el anión del Pinocembrín correspondiente a un valor de ELF de 0,65.

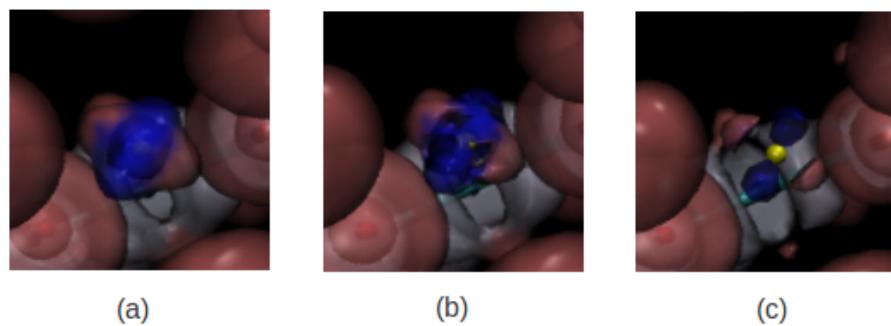


Figura 4.19: Isosuperficies en torno al átomo de Fe en el sitio activo con el anión del Pinocembrín correspondientes a valores de ELF de (a) 0,65, (b) 0,70, (c) 0,75.

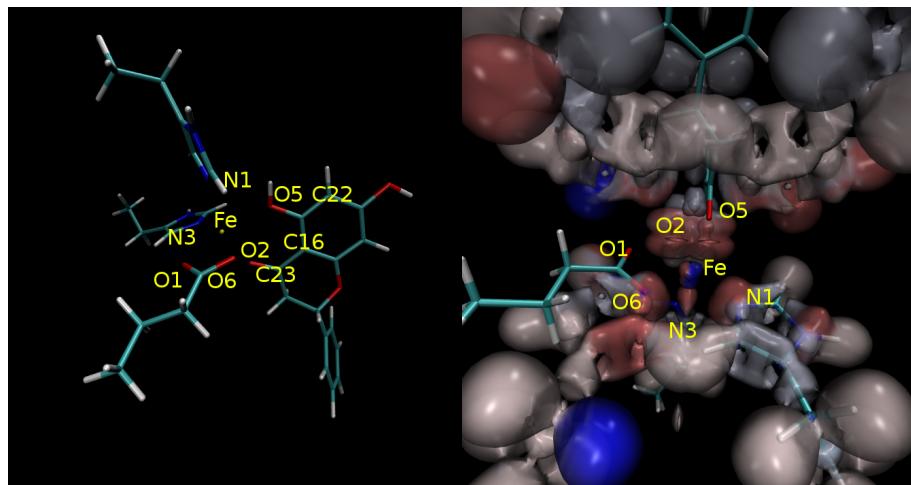


Figura 4.20: A la izquierda esquema con referencias del sitio activo reducido para ayudar a la interpretación del gráfico de la derecha, que muestra la isosuperficie para el sitio activo reducido con el Pinocembrín neutro correspondiente a un valor de ELF de 0,65.

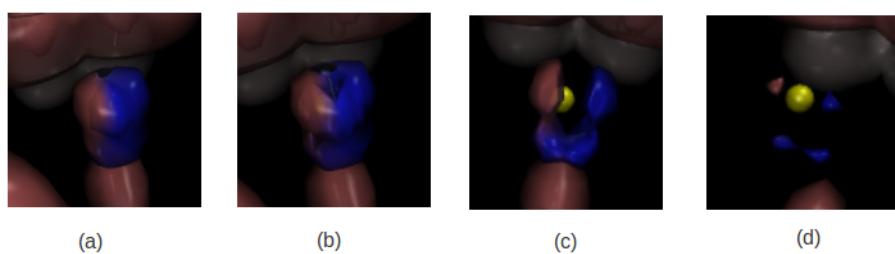


Figura 4.21: Isosuperficies en torno al átomo de Fe en el sitio activo con Pinocembrín neutro correspondientes a valores de ELF de (a) 0,65, (b) 0,70, (c) 0,75, (d) 0,81.

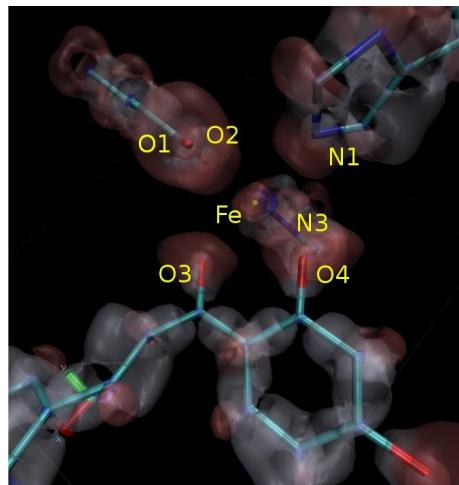


Figura 4.22: Isosuperficie para el sitio activo reducido con el anión de 2',4'-dihidroxichalcona correspondiente a un valor de ELF de 0,65.

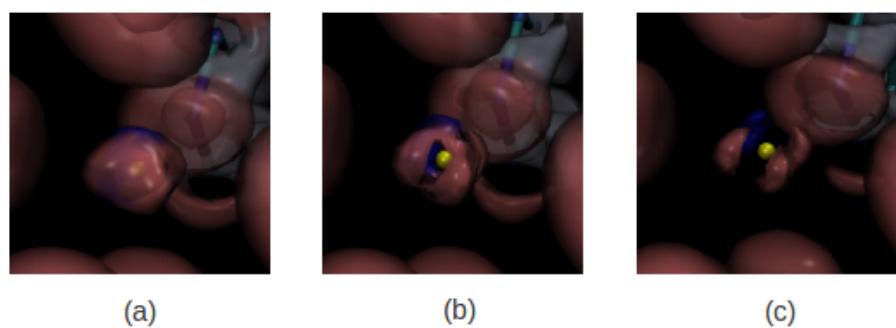


Figura 4.23: Isosuperficies en torno al átomo de Fe en el sitio activo con anión de 2'-4'-dihidroxichalcona correspondientes a valores de ELF de (a) 0,65, (b) 0,70, (c) 0,75.

ladas unas de otras, que se conocen con el nombre de dominios irreducibles. También puede observarse que para todos los compuestos cuyos ELF fueron calculados utilizando el anión (Mesotriona, NTBC, anión del Pinocembrín y 2',4'-dihidroxichalcona) los dominios irreducibles comienzan a observarse a un valor de ELF de 0,75 aproximadamente. Mientras que en el compuesto de Pinocembrín neutro se requieren incrementos mayores de ELF para que la isosuperficie cambie apreciablemente, observándose los dominios irreducibles a recién a valores de ELF de 0,81 aproximadamente. (Fig. 4.21). Esto refleja la mayor covalencia o menor carácter iónico de los enlaces del Fe con sus ligandos para el caso del Pinocembrín neutro respecto del resto de los compuestos estudiados. A su vez se realizó un análisis poblacional de las cuencas. La población de las cuencas se calcula integrando la función de densidad de un electrón en todo el volumen de la cuenca según la ecuación 3.

$$N = \int p(r)dr \quad (4.3)$$

Los resultados se observan en la tabla 4.10. En las columnas de las izquierdas se indican las referencias de las cuencas, “V” hace referencia a los pares electrónicos de valencia. Los electrones de core no se incluyeron en la tabla por no ser relevantes para el análisis que hicimos. Entre paréntesis se indica el o los átomos implicados en el enlace, estos coinciden con las referencias en amarillo de las figuras 4.12, 4.16, 4.18, 4.20, 4.22. En las columnas centrales se indica la población electrónica de las cuencas que se obtiene mediante la ecuación 4.3. En las columnas de la derecha se expresa la contribución atómica del Fe a las poblaciones en cuestión. Estos resultados confirman el carácter

covalente del aducto con Pinocembrín neutro lo que se ve reflejado en la tabla 4.10-(e). En ella se observa que a diferencia del resto de los compuestos existen cuencas de valencia que involucran carbonos del esqueleto carbonado del inhibidor. Esto ocurre debido que al aumentar el grado de covalencia la deslocalización de la carga es mayor. Algunos autores sostienen que la variabilidad de las cuencas asinápticas (aquellas coloreadas en verde en tabla 4.10) pueden correlacionarse con el grado de deslocalización del enlace[137], lo que describe bastante bien la situación para los aductos formados con NT-BC y el anión del Pinocembrín cuya población en las cuencas asinápticas es de aproximadamente 10 mientras que para el Pinocembrín neutro es de 8 solamente. Por otro lado comparando la figura 4.21-c correspondiente al Pinocembrín neutro con la 4.19-c correspondiente al Pinocembrín ionizado que este último funciona mejor como quelante del Fe en el sitio activo debido a que 2 de las cuencas monosinápticas aparecen como “de valencia” mientras que en el Pinocembrín neutro sólo lo hace uno. Esta mayor estabilidad de los compuestos iónicos frente a los neutros fue confirmada con los cálculos cuánticos realizados, (Fig. 4.10 y 4.11). El conocimiento de esta mayor estabilidad de los compuestos aniónicos como inhibidores de la HPPD es de radical importancia a la hora de diseño de nuevos fármacos. Ya que como se conoce el pH de trabajo de la enzima en cuestión (6,4) se puede conocer entonces cual debe ser el  $pK_a$  de los nuevos inhibidores que se diseñen con el fin de que a ese pH tengan un  $\alpha$  considerable.

Tabla 4.10: Compendio de tablas que resumen las poblaciones electrónicas para cada cuenca y la contribución a las mismas del átomo de Fe que se encuentra en el sitio activo de la enzima. Cada tabla corresponde a un sitio activo con diferentes ligandos: (a) 2',4'-dihidroxichalcona aniónico, (b) NTBC aniónico, (c) 2 moléculas de agua, (d) Pinocembrín aniónico, (e) Pinocembrín neutro. Los colores hacen referencia al átomo sobre el que se calculó la cuenca: magenta corresponde a hierro; rojo a oxígeno; azul a nitrógeno; verde corresponde a las cuencas asinápticas y negro al carbono.

(a)			(b)			(c)		
Cuenca	Pob.	Contr.	Cuenca	Pob.	Contr.	Cuenca	Pob.	Contr.
		atom. Fe			atom. Fe			atom. Fe
V(Fe)	3,18	3,18	V(Fe)	3,17	3,17	V(Fe)	3,13	3,13
V(Fe)	3,72	3,71	V(Fe)	0,52	0,52	V(O1)	2,53	0,07
V(O1)	2,50	0,05	V(O1)	2,79	0,06	V(O2)	3,68	0,05
V(O2)	2,68	0,01	V(O2)	2,44	0,03	V(O3)	3,62	0,05
V(O3)	2,53	0,03	V(O5)	2,53	0,03	V(O3)	3,32	0,01
V(O4)	2,73	0,03	V(O6)	2,91	0,02	V(N1)	3,03	0,09
V(N1)	2,99	0,04	V(N2)	2,98	0,05	V(N2)	3,02	0,11
V(N3)	3,04	0,03	V(N4)	2,94	0,04	V(Asyn)	2,19	2,19
V(Asyn)	2,40	2,39	V(Asyn)	2,39	2,39	V(Asyn)	2,00	1,99
V(Asyn)	4,17	4,17	V(Asyn)	3,45	3,44	V(Asyn)	2,94	2,94
V(Asyn)	0,33	3,33	V(Asyn)	2,77	2,75	V(Asyn)	1,93	1,93
V(Asyn)	0,07	0,07	V(Asyn)	1,58	1,58	V(Asyn)	1,80	1,80
(d)			(e)					
Cuenca	Pob.	Contr.	Cuenca	Pob.	Contr.			
		atom. Fe			atom. Fe			
V(Fe)	2,72	2,71	V(Fe)	3,21	3,15			
V(O2)	2,84	0,07	V(Fe)	2,70	2,09			
V(O3)	2,50	0,02	V(O1)	2,99	0,11			
V(O5)	2,74	0,02	V(O5)	2,09	1,2			
V(O6)	2,49	0,03	V(O5)	2,87	1,65			
V(N1)	3,03	0,05	V(O6)	2,34	0,02			
V(N3)	2,97	0,04	V(N1)	3,00	0,09			
V(Asyn)	1,97	1,97	V(N3)	3,03	0,09			
V(Asyn)	2,97	2,96	V(Asyn)	1,56	1,55			
V(Asyn)	3,44	3,44	V(Asyn)	2,72	2,72			
V(Asyn)	1,02	1,02	V(Asyn)	3,42	3,42			
V(Asyn)	1,76	1,76	V(Asyn)	0,31	0,31			
			V(C16,C23)	2,17	0,70			
			V(C22,C23)	1,13	0,42			
			V(C23,O5)	4,52	2,62			

# Capítulo 5

## Conclusiones

*“El Universo tiene sus leyes, todas ellas extrañas a los contradictorios sueños y deseos de la humanidad, y en cuya formulación no tenemos más arte ni parte que las palabras con que burdamente las nombramos.”*

*J. Saramago, Ensayo sobre la lucidez.*

Habiendo realizado los cálculos de pK<sub>a</sub> de las distintas especies con las que se trabajaron, el programa ACD/pK<sub>a</sub> DB se pudo inferir una predicción confiable de los mismos 4.1. El orden de acidez para los 4 inhibidores que se cotejaron en la presente Tesis fue el siguiente: Pinocembrín ≈2',4'-dihidroxichalcona < NTBC < Mesotriona

Los resultados obtenidos obtenidos en *docking*, muestran que el orden de estabilidad para los complejos calculados es el siguiente: Pinocembrín neutro ≈2',4'-dihidroxichalcona neutro < Mesotriona < NTBC.

Este orden puede explicarse principalmente por la diferencia de carga de

los compuestos. Para realizar los *dockings* tanto el Pinocembrín como la 2',4'-dihidroxichalcona se trabajaron de forma neutra, mientras que el Mesotriona y el NTBC fueron trabajados como aniones. Podemos ver analizando las poses de la figura 4.9, que el modo de ligado de los aniones es notablemente distinto al de los compuestos neutros analizados. En el caso de estos últimos, la menor estabilidad del enlace inhibidor-Fe permite la formación mayor cantidad de enlaces intermoleculares del tipo puente de hidrógeno (Tablas 4.5 y 4.6). A su vez la formación de estos puentes de hidrógenos le impiden a estos compuestos neutros adquirir la conformación necesaria para lograr un enlace más estable con el átomo metálico.

Este orden de estabilidades es apoyado parcialmente por los resultados cuánticos (Sección 4.4). Si bien por falta de tiempo no se incluyeron los cálculos cuánticos con la 2',4'-dihidroxichalcona neutra, podemos ver que el orden de estabilidad propuesto por este método es el siguiente: Pinocembrín neutro <<Mesotriona <NTBC <2',4'-dihidroxichalcona aniónico <Pinocembrín aniónico.

Los cálculos realizados con ambos conjuntos de bases nos muestran las mismas tendencias (Fig. 4.10 y 4.11). Vemos también que el ajuste a los datos experimentales no fue demasiado bueno. Es aquí cuando debemos recordar que para realizar los cálculos cuánticos se trabajó con el sitio activo reducido, es decir con 3 de todos los aminoácidos que posee la proteína. Si bien nos permitió estimar la eficacia de los distintos inhibidores, este reduccionismo trae aparejado consigo el inconveniente de la ausencia de las interacciones entre el inhibidor y el resto de la macromolécula (a diferencia de lo que veíamos en *docking*).

No obstante, la información obtenida de los modelos cuánticos es sumamente valiosa. Por ejemplo, si el pinocembrín fuera lo suficientemente ácido como para ser anión a pH fisiológico, sería un ligando excelente del complejo de Fe(II). Los grupos más fuertemente tomadores de electrones (presentes en Mesotriona y NTBC) aumentan la acidez del compuesto y por lo tanto es más probable encontrarlos como aniones a pH fisiológico. Pero también debilitan la fuerza del enlace de coordinación, lo que disminuye esta parte de la energía de ligado (que es fruto no sólo de la coordinación sino también de interacciones hidrofóbicas, puentes hidrógenos y otras analizadas en este trabajo). Esto permite obtener información súmamente útil para el diseño de nuevos inhibidores o para derivatizar productos naturales aislados de modo de aumentar su actividad inhibitoria. La derivatización del pinocembrín con grupos suavemente tomadores que sólo bajen el  $pK_a$  ligeramente sin afectar sensiblemente la fuerza del enlace de coordinación es una de las ideas surgidas de este trabajo y está actualmente poniéndose en marcha computacional y luego experimentalmente en el grupo.

Utilizamos la Función de Localización Electrónica, (ELF). La misma fue descripta hace pocos años [131, 132, 138] y hace aún menos que se utiliza en sistemas biológicos de varios átomos [121, 123, 119]. Mediante esta técnica pudimos inferir una descripción detallada del enlace metálico del sitio activo (Sección 4.5) y fundamentar cualitativamente el orden de inhibición propuesto anteriormente por los cálculos cuánticos. Pudimos establecer que en el caso del Pinocembrín neutro la deslocalización de la carga era mayor (tabla 4.10-e) que para los compuestos aniónicos, esto provoca que existe una menor densidad de carga negativa sobre los átomos de oxígeno para formar el enlace

ligando-metal.

Por otro lado, dentro de los compuestos aniónicos, confirmamos mediante el cálculo poblacional de las cuencas (Ec. 4.3) que esta deslocalización aumenta con la acidez del compuesto. Esto es una conclusión muy importante, ya que el objetivo último de esta Tesis es contribuir al diseño efectivo de nuevos fármacos. Sabemos entonces que para que nuestro compuesto sea eficaz como inhibidor de la HPPD, este debe ser lo suficientemente ácido como para que se encuentre ionizado al pH de trabajo de la enzima (aproximadamente 6,4) pero no demasiado ácido como para que los grupos atractores de electrones deslocalicen en gran medida la carga sobre los oxígenos, ya que esto último desestabiliza la unión metal-ligando.

Además es necesario hacer mención a la descripción del sitio activo. En la presente Tesis se trabajó con un sitio activo pentacoordinado, con 2 moléculas de agua[5]. Sin embargo desde hace un tiempo está teniendo mayor peso la hipótesis que involucra 3 moléculas de agua en el sitio activo [109, 136, 110]. Por eso, ya estamos trabajando en el grupo y se continuará como trabajo a futuro, en la descripción de este nueva forma de coordinación. Si bien 1 de las 3 aguas no participa directamente en la reacción de complejación con el inhibidor, creemos que pueda tener algún rol como catalizador, de manera que su ausencia en la descripción del sitio activo pudo ser significativa.

# Capítulo 6

## Agradecimientos

Quiero agradecer este trabajo a muchas personas que me acompañaron y ayudaron durante el mismo:

A mi director Mariano Vera por haberme aceptado en su grupo, por introducirme a una rama de la química completamente nueva para mí, por haberme ayudado con esta tesis en todo momento, y por haberla leido y correjido cuando más lo necesitaba.

A Cristina, mi codirectora, por ayudarme siempre, por explicarme lo inexplicable, por la paciencia, por corregirme la redacción y por haberme acompañado a lo largo de este arduo trabajo que fue para mí la confección de esta Thesis.

A los dos muchas gracias por enseñarme, por el buen humor, y por respetar siempre mis horarios y mi “doble vida” como estudiante de bioquímica en todo momento.

A Leo Tosoni por haberme dedicado mañanas enteras para explicarme como usar los programas y por haber tenido paciencia.

A todos mis profesores y al Departamento de Química.

A la Universidad Nacional de Mar del Plata.

A Cecilia Carpinella y a todo su grupo de la Universidad de Córdoba por habernos proporcionado los datos experimentales.

A Pucho, mi científico preferido, por haber hecho de la ciencia un juego para mí, el más fascinante y entretenido de todos. Por mostrarme Islas olvidadas y perdidos tesoros, por dejarme jugar con el Capitán Nemo y desolados Robinsones. Gracias por dejar mi imaginación volar y por estar para mí en todo momento y lugar. Gracias a él juego mucho, me divierto mucho, estudio mucho y trato de ser todo lo bueno que puedo.

A Mucha por todo su amor y paciencia, por enseñarme historia y arte, por alentarme siempre y por ayudarme a estudiar las cosas de memoria. Por toda su Fe en mí, por hacer que nunca baje los brazos.

A Flor, quien desde que entró en mi vida puso mi mundo de cabeza. Por ser el amor de mi vida, por toda su pasión, por preguntarme el porqué de todo, por las tardes de Pelis, por ganarme al Bowling y por bancarme con los nervios de punta estos últimos dos meses.

A mis amigos de la facu, Pame, Sol, Pri, Anto, Lau por toda su ayuda a lo largo de estos cinco años, por siempre acomodar sus horarios para que yo pueda cursar, por todas las teorías que me pasaron, por todo su aliento y buena onda. Por estar ahí siempre para mí.

A Lea, por escucharme siempre y bancarme en todas, por cubrirme cuando no iba a clases y por supuesto por llevarme a pescar tantos peces.

A Dieguito, Mani, Sala, Vilchez, El Topo, Cónedor y Rocío por ser los mejores amigos que se pueda tener. Por estar siempre para mí. Los quiero

con toda mi alma.

A mis dos piratas preferidos Agustín y Gastón por estar a mi lado desde que tengo memoria. Gracias por el Fernet, la cerveza y los asados, no tengo palabras para ellos.

A Cecilia Mendive, por su infinita buena onda y por estar siempre.

A Carlos Diaz por transmitirme su amor por el conocimiento.

Al Colegio Illia, por enseñarme a estudiar, por abrirme la mente a un mundo maravilloso donde la belleza no está ahí afuera, sino en los ojos del que ve, gracias por enseñarme a mirar.

A Andy, mi hermanita preferida, por nunca cansarse de hacerme cafés mientras yo estudio, por ser la mejor compañera para ver Series.

A mi Lili, por derretirse para mi con cada mimo, por acurrucarse en el sillón conmigo cuando me siento a estudiar.

Y a mi Bodoque que camina conmigo a donde quiera que voy.

Sin ustedes yo no sería el que soy y no habría hecho nada de lo que hice. Muchas gracias por todo.

## Índice de figuras

## ÍNDICE DE FIGURAS

136

2.10. Estructura del NTBC (compuesto azul) enlazado en el sitio activo de la HPPD de <i>S. avermitilis</i> . . . . .	24
2.11. Pinocembrín . . . . .	27
2.12. 2',4'-dihidroxichalcona . . . . .	27
2.13. Ejemplo de ligandos bidentados . . . . .	29
2.14. Estructura del agente quelante porfirina . . . . .	30
2.15. En (a), estructura del complejo hemocoordinado con $\text{Fe}^{2+}$ y en (b) estructura de coordinación de la hemoglobina. . . . .	31
2.16. Arreglo de electrones en un complejo de alto espín (a) y en otro de bajo espín (b) . . . . .	33
2.17. Orbital híbrido $\text{sp}^3\text{d}^2$ . . . . .	33
2.18. Orbital híbrido $\text{sp}^3\text{d}^3$ . . . . .	34
2.19. Representación de enlace metal-ligando como interacción ácido-base de Lewis. . . . .	34
2.20. Desdoblamiento de energía de los orbitales d en un campo cristalino octaédrico. . . . .	35
2.21. Excitación del electrón del complejo del orbital d de menor energía a otro de mayor energía por irradiación de luz a 510 nm.	36
2.22. Serie espectroquímica. . . . .	36
2.23. Desdoblamiento del campo cristalino en una serie de complejos octaédricos del cromo (III). . . . .	37
2.24. Representación de los orbitales d y p. . . . .	38
2.25. Diagrama de niveles de energía de los orbitales de un complejo $\text{ML}_6$ . . . . .	39

3.1. Representación esquemática de las contribuciones a la solvatación en el planteo del campo de reacción. a) Se genera la cavidad donde va el soluto (pérdida de entropía asociada a la “energía de cavitación.” b) El soluto es polarizado por el solvente y este a su vez se polariza por el soluto, lo que se asocia a la contribución electrostática; además habrá un potencia de interacción de van der Waals a nivel superficial (corta distancia, resaltado en fucsia) . . . . .	61
3.2. Sitio activo reducido. Las 2 aguas de coordinación no aparecen en el presente esquema. . . . .	64
3.3. Esquema de reacción utilizado para los cálculos cuánticos realizados. . . . .	64
3.4. El cromosoma que contiene cada una de los torsiones de la molécula, la rotación (definida como cuaternión) y la translación. Cada torsión, translación o rotación es un gen. La translación y la rotación se definen a partir de centro de rotación (punto en verde) que puede o no coincidir con el centro masas. . . . .	74
3.5. Protocolo de la química computacional. . . . .	86
3.6. Gráfico molecular del cubano en donde se ven los enlaces y los diferentes puntos críticos: nucleares (coloreados por elemento: C=negro, H=blanco), de enlace (puntos rojos), de anillo (puntos amarillos) y de caja (puntos verdes) . . . . .	92
3.7. Gráfico de densidad electrónica y del campo de vectores gradiente correspondiente al $\text{BF}_3$ . . . . .	94





4.13. Isosuperficies en torno al átomo de Fe en el sitio activo con 2 moléculas de agua correspondientes a valores de ELF de (a) 0,65, (b) 0,70, (c) 0,75. . . . .	120
4.14. Isosuperficie para el sitio activo reducido con anión del Mesotriona correspondiente a un valor de ELF de 0,65. . . . .	120
4.15. Isosuperficies en torno al átomo de Fe en el sitio activo con anión del Mesotriona correspondientes a valores de ELF de (a) 0,65, (b) 0,70, (c) 0,75. . . . .	121
4.16. Isosuperficie para el sitio activo reducido con anión del NTBC correspondiente a un valor de ELF de 0,65. . . . .	121
4.17. Isosuperficies en torno al átomo de Fe en el sitio activo con anión del NTBC correspondientes a valores de ELF de (a) 0,65, (b) 0,70, (c) 0,75. . . . .	121
4.18. Isosuperficie para el sitio activo reducido con el anión del Pinocembrín correspondiente a un valor de ELF de 0,65. . . .	122
4.19. Isosuperficies en torno al átomo de Fe en el sitio activo con el anión del Pinocembrín correspondientes a valores de ELF de (a) 0,65, (b) 0,70, (c) 0,75. . . . .	122
4.20. A la izquierda esquema con referencias del sitio activo reducido para ayudar a la interpretación del gráfico de la derecha, que muestra la isosuperficie para el sitio activo reducido con el Pinocembrín neutro correspondiente a un valor de ELF de 0,65. . . . .	123

4.21. Isosuperficies en torno al átomo de Fe en el sitio activo con Pinocembrín neutro correspondientes a valores de ELF de (a) 0,65, (b) 0,70, (c) 0,75, (d) 0,81. . . . .	123
4.22. Isosuperficie para el sitio activo reducido con el anión de 2',4'-dihidroxichalcona correspondiente a un valor de ELF de 0,65. .	124
4.23. Isosuperficies en torno al átomo de Fe en el sitio activo con anión de 2'-4'-dihidroxichalcona correspondientes a valores de ELF de (a) 0,65, (b) 0,70, (c) 0,75. . . . .	124

# Índice de tablas

3.1.	Compuestos utilizados para validar los pK <sub>a</sub> obtenidos para los inhibidores en estudio. . . . .	42
3.2.	Inhibidores en estudio en el presente trabajo. . . . .	43
3.3.	Análisis conformacional. Se indica en rojo el diedro que se varió durante el análisis. . . . .	63
3.4.	Detalle de bases y solventes utilizados para los cálculos cuánticos de la presente Tesis. El lector debe recordar que para todos los cálculos realizados se utilizó el funcional híbrido CAM-B3LYP. . . . .	65
3.5.	Esquemas de compuestos utilizados para realizar la validación del método de <i>docking</i> . . . . .	83
3.6.	pIC <sub>50</sub> experimentales obtenidos de bibliografía. . . . .	84
4.1.	Compuestos utilizados para realizar la curva de calibración. Los resultados experimentales fueron obtenidos de NIST [134].	101
4.2.	pK <sub>a</sub> calculados con el ACDLabs para los inhibidores en estudio. El pK <sub>a</sub> calculado corresponde a la disociación del protón indicado en rojo en las distintas estructuras. . . . .	102

4.3. pK <sub>a</sub> calculados para los inhibidores utilizados para validar el método de <i>docking</i> . . . . .	104
4.4. Esquemas de compuestos utilizados para realizar la validación del método de <i>docking</i> . Se muestran también los pIC <sub>50</sub> experimentales obtenidos de bibliografía. (a) HPPD de <i>Streptomyces avermitilis</i> , grilla chica. (b) HPPD de <i>Rattus norvegicus</i> , grilla chica. . . . .	109
4.5. <i>docking</i> de inhibidores frente a la HPPD de <i>Streptomyces avermitilis</i> . E.L.: eficiencia del ligando; P. H.: cantidad de puentes de Hidrógeno. . . . .	111
4.6. <i>docking</i> de inhibidores frente a la HPPD de <i>Rattus norvegicus</i> con grilla chica. E.L.: eficiencia del ligando; P. H.: cantidad de puentes de Hidrógeno. . . . .	112
4.7. Resumen de datos obtenidos por <i>docking</i> comparados con los pIC <sub>50</sub> obtenidos experimentalmente. (a) HPPD de <i>Streptomyces avermitilis</i> ; (b) HPPD de <i>Rattus norvegicus</i> . Los datos de IC <sub>50</sub> correspondientes al Pinocembrín y a la 2',4'-dihidroxichalcona fueron obtenidos de Carpinella et al. [81]. Todas las -E <sub>ligado</sub> se encuentran en Kjoule/mol. . . . .	112
4.8. Se muestran las energías de reacción en (Kcal/mol) correspondientes a la reacción esquematizada en la figura 3.3. Se utilizó el potencial híbrido CAM-B3LYP con el conjunto de bases LACVP. (a) Los cálculos se realizaron en vacío; (b) se utilizó 1,2-dicloroetano como solvente implícito. . . . .	115



# Bibliografía

- [1] R. P. Hausinger *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 39, pp. 21–68, 2004.
- [2] S. W. E. W. E. Knox *Methods Enzymol.*, vol. 2, pp. 287–300, 1955.
- [3] H. W. P. M. J. I. P. Gissen, M.A. Preece *Metab. Dis.*, vol. 26, pp. 13–16, 2003.
- [4] E. M. T.W. Goodwin, *Introduction to Plant Biochemistry*. 1983.
- [5] G. R. Moran *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 433, pp. 117–128, 2005.
- [6] B. K. E. B. A. F. M. F. M. D. R. J. B. J. K. R. C. G. S. R. Huhn, H. Stoermer *Hum. Genet.*, vol. 102, pp. 305–313, 1998.
- [7] T. M. I. M. E. P. T. M. A. B. C. S. D. D. F. E. K. Tomoeda, H. Awata *Mol. Genet. Metab.*, vol. 71, pp. 506–510, 2000.
- [8] I. K. J. K. J.J. Onuffer, B.T Ton *Protein. Sci.*, vol. 4, pp. 1743–1749, 1995.

- [9] M. P. A. G. J. B. A. M. D. K. N. Mohan, P. McKiernan *Eur. J. Pediatr.*, vol. 158 (Suppl 2), pp. S49–S54, 1999.
- [10] S. E.A. Kvittingen *J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, vol. 184, pp. 27–34, 1986.
- [11] E. A. L. O. H. B. S. S. Lindstedt, E. Holme *Lancet*, vol. 340, pp. 813–817, 1992.
- [12] B. L. D. Jr. *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 62, pp. 765–767, 1998.
- [13] G. L. S. Ahmad, J.H. Teckman *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 134, pp. 266–268, 2002.
- [14] G. C. C. T. M. Gunsior, J. Ravel *Biochemistry*, vol. 43, pp. 663–674, 2004.
- [15] T. F. E. R. G.H. Wada, J.H. Fellman *J. Biol. Chem.*, vol. 250, pp. 6720–6726, 1975.
- [16] S. L. M. R. B. Lindblad, G. Lindstedt *J. Biol. Chem.*, vol. 252, pp. 5073–5084, 1977.
- [17] T. M. B. F. G. H. D.J. Buckthal, P.A. Roche *Methods Enzymol.*, vol. 142, pp. 132–138, 1987.
- [18] J. F. G. A. R. H. S. S. I.M. Fritze, L. Linden *Plant Physiol.*, vol. 134, pp. 1388–1400, 2004.
- [19] D. C. M. F. D. P. T. W. C. Yang, J.W. Pflugrath *Biochemistry*, vol. 43, pp. 10414–10423, 2004.

- [20] D. S. P. B. A. R. E. P.-P. C. C.-A. L. Serre, A. Sailland *Structure Fold. Des.*, vol. 7, pp. 977–988, 1999.
- [21] D. H. G. M. J. Brownlee, K. Johnson-Winters *Biochemistry*, vol. 43, pp. 6370–6377, 2004.
- [22] K. T. S. M. J. B. S. Han, L.D. Eltis *Science*, vol. 270, pp. 976–980, 1995.
- [23] J. B. L.D. Eltis *J. Bacteriol.*, vol. 178, pp. 5930–5937, 1996.
- [24] V. F. K. H. G. B. J. H.-I. A. C. S. J. B. P.L. Roach, I.J. Clifton *Nature*, vol. 375, pp. 700–704, 1995.
- [25] K. H. C. M. I. C. C. S. Z. Zhang, J. Ren *FEBS Lett.*, vol. 517, pp. 7–12, 2002.
- [26] L. Q. J. E.L. Hegg *Eur. J. Biochem.*, vol. 250, pp. 625–629, 1997.
- [27] E. S. J. M. R. H. D.A. Hogan, S.R. Smith *J. Biol. Chem.*, vol. 275, pp. 12400–12409, 2000.
- [28] M. L. T. H. S. R. A. P. A. T. H. L. J. B. C. S. J. H. I. A. K. Valegard, A.C. van Scheltinga *Nature*, vol. 394, pp. 805–809, 1998.
- [29] K. H. Z. Z. J. B. C. S. J. C. C. G. T. H. A. T. v. S. K. V. J. V. J. H. I. A. A. D. R. B. M.D. Lloyd, H.J. Lee *J. Mol. Biol.*, vol. 287, pp. 943–960, 1999.
- [30] D. S. J. B. K. H. C. S. Z. Zhang, J. Ren *Nat. Struct. Biol.*, vol. 7, pp. 127–133, 2000.

- [31] K. H. I. C. J. B. C. S. H.J. Lee, M.D. Lloyd *J. Mol. Biol.*, vol. 308, pp. 937–948, 2001.
- [32] R. W. I. C. A. P. C. S. R.C. Wilmouth, J.J. Turnbull *Structure (Camb.)*, vol. 10, pp. 93–103, 2002.
- [33] M. S. M. T. H. S. R. W. C. S. I.J. Clifton, L.X. Doan *J. Biol. Chem.*, vol. 278, pp. 20843–20850, 2003.
- [34] S. L. B. Lindblad, G. Lindstedt *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 92, pp. 7446–7449, 1970.
- [35] M. Rundgren *J. Biol. Chem.*, vol. 252, pp. 5094–5099, 1977.
- [36] Y. F. M. L. C. M. J. P. A. W. J.E. Baldwin, N.P. Crouch *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 5, pp. 1255–1260, 1995.
- [37] M. R. J. Denum, S. Lindstedt, *Oxidases and Related Redox Systems*. Albany: Pergamon Press, 1982.
- [38] B. O. S. Lindstedt *Methods Enzymol.*, vol. 142, pp. 139–142, 1987.
- [39] Y. C. R.A. Pascal Jr., M.A. Oliver *Biochemistry*, vol. 24, pp. 3158–3165, 1985.
- [40] E. Holme *Biochemistry*, vol. 14, pp. 4999–5003, 1975.
- [41] K. K. R. Myllyla, L. Tuderman *Eur. J. Biochem.*, vol. 80, pp. 349–357, 1977.
- [42] K. K. L. Tuderman, R. Myllyla *Eur. J. Biochem.*, vol. 1977, pp. 341–348, 80.

- [43] R. M. K. K. U. Puistola, T.M. Turpeenniemi-Hujanen *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 611, pp. 51–60, 1980.
- [44] V. D. L. E. De Carolis *J. Biol. Chem.*, vol. 268, pp. 5504–5511, 1993.
- [45] I. C. J. D. H. J. L. N. B. J. B. R. H. P. R. J.M. Elkins, M.J. Ryle *Biochemistry*, vol. 41, pp. 5185–5192, 2002.
- [46] R. B. M. G. C. T. E. S. E.G. Pavel, J. Zhou *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, pp. 743–753, 1998.
- [47] B. B. M. G. C. T. E. S. J. Zhou, W.L. Kelly *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, pp. 7388–7398, 2001.
- [48] G. M. E. S. M.L. Neidig, M. Kavana *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, pp. 4486–4487, 2004.
- [49] M. K. T. N. G. M. K. Johnson-Winters, V.M. Purpero *Biochemistry*, vol. 42, pp. 2072–2080, 2003.
- [50] B. T. J. B. J. C. K. J.C. Price, E.W. Barr *Biochemistry*, vol. 42, pp. 7497–7508, 2003.
- [51] G. M. M. R. R. H. D.A. Proshlyakov, T.F. Henshaw *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, pp. 1022–1023, 2004.
- [52] R. Hellyer *Aust. J. Chem.*, vol. 21, pp. 2825–2828, 1968.
- [53] N. N. F. D. J.G. Romagni, G. Meazza *Febs. Lett.*, vol. 480, pp. 301–305, 2000.
- [54] C. T. R.A. Gray, R.J. Russay *US patent 4*, vol. 202, p. 840, 1980.

- [55] P. B. H. K. A. Schulz, O. Ort *Febs Lett.*, vol. 318, pp. 162–166, 1993.
- [56] J. Secor *Plant Physiol.*, vol. 106, pp. 1429–1433, 1994.
- [57] J. M. S. D. O. A. Y. L. M. K. E. T. R. H. L. C. M. M. P. Prisbylla, B. C. Onisko in *Brighton Crop Protection Conference* (Weeds, ed.), pp. 731–738, 1993.
- [58] M. M. I. Garcia, D. Job *Biochemistry*, vol. 39, pp. 7501–7507, 2000.
- [59] T. L. D. Y. S.W. Lin, Y.L. Lin *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 10, pp. 1297–1298, 2000.
- [60] T. L. D. Y. Y. L. Lin, Y. L. Lin *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 10, pp. 843–845, 2000.
- [61] Z. S. J. Z. Q. Y. M. Huang, D.Y. Yang *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 12, pp. 2271–2275, 2002.
- [62] D. Y. Z. S. Q. Y. M.L. Huang, J.W. Zou *Journal of Molecular Structure*, vol. 589-590, pp. 321–328, 2002.
- [63] T. F. T. H. D. H. J. T. R. W. G. Mitchell, D.W. Bartlett *Pest Manag. Sci.*, vol. 57, pp. 120–128, 2001.
- [64] L. B. L. G. P. Sutton, C. Richards *Pest Manag. Sci.*, vol. 58, pp. 981–984, 2002.
- [65] G. K. W.J. Michaely *US Patent 4*, vol. 780, p. 127, 1988.
- [66] M. P. I. B. M. M. D. F. P. A. M. H. Y. A. L. G. W. G. C. Phornphutkul, W.J. Introne *N. Engl. J. Med.*, vol. 347, pp. 2111–2121, 2002.

- [67] G. M. M. Kavana *Biochemistry*, vol. 42, pp. 10238–10245, 2003.
- [68] Y. S. D. Y. C.S. Wu, J.L. Huang *J. Med. Chem.*, vol. 45, pp. 2222–2228, 2002.
- [69] P. Evans *Experientia*, vol. 39, pp. 274–275, 1983.
- [70] J. L. P. V. A. C. A. S. K.E. Pallett, S.M. Cramp *Pest Manag. Sci.*, vol. 57, pp. 133–142, 2001.
- [71] L. G. T. A. W. P. E. L. D. L. L. S. M.K. Ellis, A.C. Whitfield *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 9, pp. 24–27, 1996.
- [72] W. P. S. E. B. L. M.G. Hall, M.F. Wilks *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 52, pp. 169–177, 2001.
- [73] L. G. T. A. W. P. E. L. L. S. M.K. Ellis, A.C. Whitfield *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 133, pp. 12–19, 1995.
- [74] C. S. M.O. Sinnokrot *J. Phys. Chem.*, vol. 107, pp. 8377–8379, 2003.
- [75] D. D. S. Mecozzi, A.P. West *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, vol. 93, pp. 10566–10571, 1996.
- [76] D. D. J.C. Ma *Chem. Rev.*, vol. 97, pp. 1303–1324, 1997.
- [77] B. M. S. N. B. P. R. A. P. J. R. T. W. M. H. Douglas, J. W. van Klink *Phytochemistry*, vol. 65, p. 1255, 2004.
- [78] T. C. M. C. E. S. D. E. D. J. S. M. D. E. K. D. A. Kopsell, G. R. Armel *Agric. Food Chem.*, vol. 57, p. 6362, 2009.

- [79] A. M. R. J. G. R. S. O. D. D. N. I. A. K. E. A. A. F. E. D. B. E. Meazza Scheffler, M. R. Tellez *Phytochemistry*, vol. 60, p. 281, 2002.
- [80] A. S. N. S. C. M. C. C. F. E. Dayan, S. O. Duke *Phytochemistry*, vol. 68, p. 2004, 2007.
- [81] D. M. A. V. b. M. B. J. G. N. D. N. G. M. R. S. M. P. M. C. C. Maria Eugenia Chiari, Leonardo Tosoni *en preparacion*, 2013.
- [82] G. R. S. M. P. M. C. Carpinella, D. G. Andrione *Phytother. Res.*, vol. 24, p. 259, 2010.
- [83] S. M. P. M. C. C. M. E. Chiari, D. M. A. Vera *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 19, p. 3474, 2011.
- [84] E. H. Hernandez, *Estudio de la capacidad coordinante del diclofenac sodico y los iones contaminantes Pb(II), Cd(II), Zn(II) y Mn(II)*. PhD thesis, Universidad de las Americas Puebla, Escuela de Ciencias Departamento de Química y Biología, Cholula, Puebla, México, 2004.
- [85] I. Advanced Chemistry Development, *ACD/pK DB, version 6.00*. Toronto, On, Canada: [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com), 2012.
- [86] M. Meloun and S. Bordovska, “Benchmarking and validating algorithms that estimate pka values of drugs based on their molecular structure,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 389, pp. 1267–1291, 2007.
- [87] W. Koch and M. C. A. Holthausen, *Chemist’s Guide to Density Functional Theory*. D-69469 Weinheim, Federal Republic of Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2001.

- [88] C. J. Cramer, *Essential of Computational Chemistry. Theories and Models.* Chichester, West Sussex PO19 1UD, England: John Wiley & Sons, 2002.
- [89] R. G. Parr and W. Yang, *Density Functional Theory of Atoms and Molecules.* 200 Avenue, New York, New York 10016: Oxford University Press, Inc., 1989.
- [90] N. H. Coutinho K., Morgen, *Metodos de Quimica Teorica e Modelagem Molecular.* San Paulo, Brasil.: Editora Livraria da Fisica, 1 edicion ed., 2007.
- [91] F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry.* Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.: The Atrium, 2nd edition. ed., 2007.
- [92] Y. W. P. R. G. Lee, C., “Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density,” *Physical Review*, vol. B 37, pp. 785–789, 1988.
- [93] D. T. T. Yanai and N. Handy, “A new hybrid exchange-correlation functional using the coulomb-attenuating method (cam-b3lyp),” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 393, pp. 51–57, 2004.
- [94] S. E. Miertus, S. and J. Tomasi, “Electrostatic interaction of a solute with a continuum-a direct utilization of ab initio molecular potentials for the provision of solvent effects.,” *Chemical Physics*, vol. 55, pp. 117–129, 1981.

- [95] J. Tomasi and M. Persico, "Molecular interactions in solution: An overview of methods based on continuous distributions of the solvent," *Chemical Reviews*, vol. 94, pp. 2027–2094, 1994.
- [96] C. P. C. J. Langlet, J. and A. Pullman, "Improvements of the continuum model. 1. application to the calcuiation of the vaporization thermodynamic quantities of nonassociated liquids.,," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 92, pp. 1617–1631, 1988.
- [97] M. J. F. et al., *Gaussian 98*. Pittsburgh, PA: Gaussian Inc., 1998.
- [98] J. B. Foresman and A. E. Frisch, *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*. Pittsburgh, PA: Gaussian, Inc., 2nd ed. ed., 1996.
- [99] RCSB, "Pdb, protein data bank, an information portal to biological macromolecular structures," <http://www.rcsb.org>, 2012.
- [100] G. A. Petersson and M. A. Al-Laham, "A complete basis set model chemistry. ii. open-shell systems and the total energies of the first-row atoms," *J. Chem. Phys.*, vol. 94, pp. 6081–6090, 1991.
- [101] T. G. T. M. A. A.-L. W. A. S. G. A. Petersson, A. Bennett and J. Mantzaris, "A complete basis set model chemistry. i. the total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row atoms," *J. Chem. Phys.*, vol. 89, pp. 2193–2198, 1988.
- [102] Y. Yang, M. N. Weaver, and K. M. Merz, "Assessment of the 6-31+g\*\* + lanl2dz mixed basis set coupled with density functional theory meth-ods and the effective core potential: Prediction of heats of formation

- and ionization potentials for first-row-transition-metal complexes,” *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 113, no. 36, pp. 9843–9851, 2009. PMID: 19691271.
- [103] N. R. S. Chiodo and E. Sicilia, “Lanl2dz basis sets recontracted in the framework of density functional theory,” *J. Chem. Phys.*, vol. 125, p. 104107, 2006.
- [104] T. H. D. Jr. and P. J. Hay, *Modern Theoretical Chemistry*, vol. Vol. 3. Plenum, New York: Ed. H. F. Schaefer III, 1976.
- [105] G. D. S. H. R. S. H. R.-H. W. E. B. R. K. Morris, G. M. and A. J. Olson, “Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function.,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 19, pp. 1639–1662, 1998.
- [106] D. T. G. H. L. R. M. K. M. O. J. A. S. C. W. B. Case D. A., Cheatham T. E. and W. R., “The amber biomolecular simulation programs.,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 26, pp. 1668–1688, 2005.
- [107] L. Wesson and D. Eisenberg, “Atomic solvation parameters applied to molecular dynamics of proteins in solution.,” *Protein Science*, vol. 1, pp. 227–235, 1992.
- [108] G. D. S. H. R. H. W. E. H. S. B. R. O. A. J. Morris, G. M., “Automated docking of flexible ligands to receptors. autodock user’s guide. version 3.0.5,”

- [109] C. R. M. C. A. G. L. L. R. T. W. J. W. V. K. N. B. P. F. E. Dayan, N. Singh *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, pp. 5194–5200, 2009.
- [110] J.-W. Zou, C.-C. Luo, H.-X. Zhang, H.-C. Liu, Y.-J. Jiang, and Q.-S. Yu, “Three-dimensional qsar of hppd inhibitors, psa inhibitors, and anxiolytic agents: Effect of tautomerism on the comfa models,” *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 26, no. 2, pp. 494 – 504, 2007.
- [111] W. W. K. P. A. C. D. A. Wang, J., “Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations.,” *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 25, p. 247260, 2006.
- [112] W. R. M. C. J. W. P. A. C. D. A. Wang, J., “"development and testing of a general amber force field",” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 25, pp. 1157–1174, 2004.
- [113] R. F. Bader, *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*. United Kingdom: Oxford University Press, 1990.
- [114] P. Coppens, *X-ray Charge Densities and Chemical Bonding*. New York: Oxford University Press, Inc., 1997.
- [115] P. J. M. R. F. B. W. L. Cao, C. Gatti *Chem. Phys. Lett.*, vol. 141, pp. 380–385, 1897.
- [116] M. Sakata *Acta Cryst.*, vol. 46, pp. 263–270, 1990.
- [117] D. F. G. t. V. E. J. B. R. Y. De Vries, W. J. Briels *Can. J. Chem.*, vol. 74, pp. 1054–1058, 1996.

- [118] R. J. B. A. Taylor, C. F. Matta *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 3, pp. 1054–1063, 2007.
- [119] R. E. B. R. L. A. Haiduke, A. E. de Olivera *J. Phys. Chem.*, vol. 108, p. 6788, 2004.
- [120] K. E. A. D. Becke *J. Chem. Phys.*, vol. 92, p. 5397, 1990.
- [121] E. R. R. Guillespie *J. Comput. Chem.*, vol. 34, p. 396, 2007.
- [122] A. S. B. Silvi *Nature*, vol. 371, p. 683, 1994.
- [123] J. P. J. Piquemal *J. Comput. Chem.*, vol. online, 2008.
- [124] P. Popelier, *Atoms in Molecules: An Introduction*. Harlow, UK: Prentice-Hall, 2000.
- [125] J. R. C. C. C. R. F. Bader, M. T. Carroll *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 109, pp. 7968–7979, 1987.
- [126] R. H. C. J. R. D. C. K. M. Gough, M. M. Yacowar *J. Chem.*, vol. 74, pp. 1139–1144, 1996.
- [127] G. L. H. R. F. W. Bader, D. Bayles *J. Chem. Phys.*, vol. 112, pp. 10095–10105, 2000.
- [128] K. E. Laiding *Chem. Phys. Lett.*, vol. 185, pp. 483–489, 1991.
- [129] N. H. W. Y. G. Wang, C. F. Matta *J. Comput. Chem.*, vol. 24, pp. 1720–1729, 2003.

- [130] F. F. B. S. S. Noury, X. Krokiris, *TopMod*. Paris, France: Laboratoire de Chimie Theorique, CNRS and Universite Paris, 1997.
- [131] R. G. P. C. Lee, W. Yang *Phys. Rev.*, vol. B37, p. 785, 1988.
- [132] A. S. D. B. Chesnut *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, pp. 2335–2336, 1999.
- [133] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten *Journal of Molecular Graphics*, vol. 14, pp. 33–38, 1996.
- [134] T. N. I. of Standards and T. (NIST), “<http://www.nist.gov>,” *U.S. Department of Commerce*, 2012.
- [135] M. Ellis, A. Whitfield, L. Gowans, T. Auton, W. Provan, E. Lock, and L. Smith, “Inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione and 2-(2-chloro-4-methanesulfonylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 133, no. 1, pp. 12 – 19, 1995.
- [136] F. E. Dayan, S. O. Duke, A. Sauldubois, N. Singh, C. McCurdy, and C. Cantrell, “p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is a herbicidal target site for b-triketones from leptospermum scoparium,” *Phytochemistry*, vol. 68, no. 14, pp. 2004 – 2014, 2007. <ce:title>Phytochemical Society of North America</ce:title>.
- [137] A. T. LabbÃ©, ed., *Theoretical Aspects of Chemical Reactivity*. Elsevier, 2006.
- [138] A. D. Becke *J. Chem. Phys.*, vol. 98, p. 5648, 1993.