

UCH-FC
300-2
R618e
c. 1

**ESTUDIO FISICOQUÍMICO DE β -CARBOLINAS:
APLICACIÓN A SISTEMAS BIOLÓGICOS**



Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Química

Facultad de Ciencias

Por

Pilar Isabel Rivas Cardemil

Junio, 2004

Director de Tesis: Dr. Bruce Cassels Niven

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado en Química presentada por la candidata

Pilar Isabel Rivas Cardemil

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 12 de Abril de 2002.

Director de Tesis:

Dr. Bruce Cassels Niven

Bruce Cassels Niven

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Prof. Francesca Faini (Presidenta)

F. Faini

Dr. Fernando Castañeda

F. Castañeda

Dr. Antonio Morello

A. Morello

Prof. Arturo Squella

A. Squella

Dr. Alejandro Toro-Labbé

A. Toro-Labbé



Agradecimientos

Mi sincero agradecimiento a mi director de tesis, Dr. Bruce Cassels, por todo el apoyo brindado tanto a este trabajo como a mi persona, en especial en la etapa final de su desarrollo.

Esta tesis nunca hubiera podido realizarse sin la colaboración de los profesores que, siendo especialistas en su área y con absoluto desinterés, me apoyaron con su invaluable experiencia y conocimientos. Más aún, muchos de ellos me dieron un espacio en sus laboratorios, donde se realizó toda la parte experimental de esta Tesis, y, en algunos casos, trabajaron codo a codo conmigo. A los profesores Dr. Antonio Morello, Dra. Yolanda Repetto, Dr. Arturo Squella, Dra. Soledad Bollo, Dr. Luis Núñez, Dr. Claudio Olea, Dr. Renato Contreras, Dr. Gerald Zapata, Dr. Miguel Reyes, Dra. Cecilia Scorza, Dr. Fernando Dajas, Dr. Rodolfo Silveira, mi más profundo agradecimiento y admiración, en especial, por su calidad humana.

Agradezco a las siguientes Instituciones por las Becas y Proyectos que me otorgaran y que permitieran la realización y financiamiento de esta Tesis:

- Comisión Nacional de Investigación en Ciencia y Tecnología (CONICYT), beca para alumnos de Doctorado.
- Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONDECYT), Proyecto N° 2950013 para alumnos de Postgrado.
- Beca PG-95 del Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile, para proyectos de investigación.

A mis padres y hermanos todo su cariño y apoyo, especialmente en los momentos difíciles.

Agradezco a Raúl Riquelme toda la luz que me trajo, en medio de tanta oscuridad.

A mis amigas y amigos, Isabel Salas, Rebeca Orellana, Angélica Hernández, Érika Lang, Marcia Henríquez, Gerald Zapata, Claudio Olea, Marco Rebolledo,

Tomás Delgado, Andrés Leiva, Pablo Jaque, Eduardo Sobarzo, Esteban Reyes, su cariño y preocupación. Porque estuvieron allí para compartir y celebrar las alegrías y disipar las tristezas. También a todos mis compañeros del laboratorio de Química Biodinámica y del doctorado, con quienes compartí tan gratos momentos.

Al Dr. Claudio Romo y al Dr. Rubén Bustos del Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Santiago de Chile y al Instituto Milenio para Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología, quienes, a pesar de haberme contratado bajo el régimen de Jornada Completa, me permitieron dedicar una parte de mi tiempo de trabajo para dar término a esta Tesis.

A todos los profesores y administrativos de esta Escuela que, con su entusiasmo y palabras de aliento, me instaron a seguir adelante en este trabajo.

A Dios, su Amor y Presencia constante, que me inspiraron y fortalecieron, y cuya obstinación para que este trabajo tuviera fin, llegó a ser mayor que la mía.

**A mi Camila, ojos de miel,
la niña más linda del mundo.**

INDICE DE MATERIAS

Lista de Abreviaturas.....	xiv
Resumen.....	xv
Summary.....	xix
CAPITULO 1. Introducción.....	1
1.1 β -Carbolinas: Antecedentes generales.....	1
1.2 Actividad biológica de β -carbolinas.....	4
1.2.1 Inhibición enzimática.....	4
1.2.2 Unión a receptores.....	5
1.2.3 Actividad quimioterapéutica.....	6
1.2.4 Otras propiedades biológicas de los alcaloides β -carbolínicos.....	7
1.2.5 Toxicidad de β -carbolinas: genotoxicidad y la enfermedad de Parkinson.....	7
1.3 Biotransformación de β -carbolinas.....	8
1.4 Características fisico-químicas de β -carbolinas.....	9
1.4.1 Espectros de absorción electrónica, de emisión electrónica y determinación de la constante de acidez K_a	9
1.4.2 Lipofilia.....	13
1.4.3 Formación de complejos de transferencia de carga.....	15
1.4.4 Oxidación electroquímica de β -carbolinas.....	16
1.4.5 Estudios teóricos.....	17
1.5 Hipótesis, objetivos y organización de la Tesis.....	17
Referencias.....	22
CAPITULO 2. Estudio teórico de la reactividad global y local del sistema 1-metilnicotínico-<i>lumiflavina</i>.....	26

2.1	Introducción.....	26
2.1.1	Antecedentes generales.....	26
2.1.2	La reacción de transhidrogenación entre lumiflavina y 1-metilnicotinamida.....	28
2.1.3	Reacción de transhidrogenación en el sistema lumiflavina-1-metilnicotinamida: antecedentes teóricos.....	30
2.2	Modelo teórico.....	32
2.2.1	Descriptores de reactividad.....	32
2.2.2	El Principio de Ácidos y Bases Duros y Blandos (HSAB) local.....	36
2.3	Metodología.....	41
2.4	Resultados y Discusión.....	41
2.4.1	Blandura grupal.....	41
2.4.2	Interacciones específicas.....	48
2.5	Conclusiones.....	52
	Referencias.....	54
CAPÍTULO 3. Estudio teórico de la interacción β-carbolina-lumiflavina y su aplicación a la inhibición de la monoaminoxidasa A.....		
3.1	Introducción.....	57
3.2	Formación de complejos de transferencia de carga entre β -carbolinas y flavinas.....	57
3.3	Oxidación de aminas catalizada por MAO.....	60
3.4	β -Carbolinas y la inhibición de monoaminoxidasas.....	62
3.5	Metodología.....	65
3.5.1	Cálculos teóricos	65
3.5.2	Actividad inhibitoria de MAO de β -carbolinas.....	67
3.5.2.1	Compuestos químicos.....	67
3.5.2.2	Ensayos enzimáticos.....	68
3.5.2.3	Condiciones cromatográficas.....	69

3.6 Resultados y discusión.....	70
3.6.1 Geometría de las β -carbolinas estudiadas teóricamente.....	70
3.6.2 Actividad IMAO de algunas β -carbolinas.....	72
3.6.3 Estudio de la interacción β -carbolina-lumiflavina sobre la base de descriptores de estructura electrónica.....	75
3.6.3.1 Descriptores de estructura electrónica de β -carbolinas.....	75
3.6.3.2 Aspectos generales de la interacción lumiflavina- β -carbolina.....	79
3.6.3.3 Aspectos específicos de la interacción lumiflavina- β -carbolina en la formación de complejos de transferencia de carga en solución.....	80
3.6.3.4 Aspectos específicos de la interacción lumiflavina- β -carbolina en la actividad IMAO-A.....	86
Referencias.....	89

CAPÍTULO 4. Estudio de la oxidación y reducción electroquímica de β -carbolinas

por voltametría cíclica lineal91

4.1 Introducción.....	91
4.2 Oxidación química y bioquímica de 1-metil-6-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.....	92
4.3 Actividad antioxidante de β -carbolinas.....	95
4.4 Métodos.....	97
4.4.1 Compuestos químicos.....	97
4.4.2 Voltametría cíclica lineal (VCL) de β -carbolinas en medio acuoso.....	97
4.4.3 Voltametría cíclica lineal (VCL) de β -carbolinas en medio aprótico.....	98
4.4.4 Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) del radical 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolinio.....	98
4.5 Resultados y discusión.....	99
4.5.1 Reducción de β -carbolinas por VCL en medio acuoso.....	99
4.5.2 Oxidación de β -carbolinas por VCL en medio acuoso.....	103

4.5.3 Reducción de β -carbolinas por VCL en medio aprótico.....	107
4.5.4 Oxidación de β -carbolinas por VCL en medio aprótico.....	112
4.5.5 Resonancia Paramagnética Electrónica del radical 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolinio.....	115
4.5.6 Potenciales redox de β -carbolinas y descriptores de estructura electrónica.....	118
4.5.6.1 Medio acuoso, pH 7.....	118
4.5.6.2 Medio aprótico, DMSO.....	122
4.5.7 Actividad antioxidante de β -carbolinas y descriptores de estructura electrónica.....	126
Referencias.....	131
 CAPITULO 5. Efecto de algunos alcaloides β-carbolínicos en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	
5.1 Introducción.....	132
5.2. Metodología.....	134
5.2.1. Compuestos químicos.....	134
5.2.2. Parásitos.....	134
5.2.3. Inhibición del crecimiento del cultivo.....	135
5.2.4. Consumo de oxígeno.....	135
5.2.5 Toxicidad de la droga.....	135
5.3 Resultados y discusión.....	136
5.3.1 Efecto de β -carbolinas en cultivos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	136
5.3.2 Efecto de β -carbolinas en la respiración de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	138
5.3.3 Relación entre la actividad inhibitoria de β -carbolinas sobre el crecimiento de cultivos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> con otros parámetros fisicoquímicos y con los descriptores de estructura electrónica.....	143
5.3.3.1 Cepa Tulahuén.....	143
5.3.3.2 Cepa LQ.....	148
5.3.4 Relación entre la actividad inhibitoria de β -carbolinas sobre la	

respiración de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> con otros parámetros físicoquímicos y con los descriptores de estructura electrónica.....	151
5.3.4.1 Cepa Tulahuén.....	151
5.3.4.2 Cepa LQ.....	155
Referencias.....	162
CAPITULO 6: Conclusiones Generales.....	164
6.1 Reactividad global y local del sistema 1-metilnicotinamida-lumiflavina.....	164
6.2 Descriptores de estructura electrónica de las β -carbolinas.....	165
6.3 β -Carbolinas y formación de complejos de transferencia de carga con flavinas.....	166
6.4 β -Carbolinas y actividad IMAO-A.....	166
6.5 Reducción de β -carbolinas en ambiente acuoso.....	166
6.6 Oxidación de β -carbolinas en ambiente acuoso.....	167
6.7 Reducción de β -carbolinas en DMSO.....	167
6.8 Oxidación de β -carbolinas en DMSO.....	168
6.9 Generación electroquímica de un radical libre de la 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.....	168
6.10 Actividad antioxidante de β -carbolinas.....	168
6.11 Efecto de alcaloides β -carbólicos en el crecimiento de cultivos de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	169
6.12 Actividad inhibitoria de β -carbolinas sobre el crecimiento de cultivos de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> y su relación con otros parámetros físicoquímicos y con los descriptores de estructura electrónica.....	169
Apéndice I: Métodos mecano-cuánticos.....	171
Apéndice II: La función de fukui.....	187
Apéndice III: Voltamogramas cíclicos de β-carbolinas en DMSO.....	193
Apéndice IV: Publicaciones generadas por esta tesis.....	201

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Constantes de ionización para el equilibrio de protonación del Nitrógeno piridínico de β -carbolinas a 25° C.....	12
Tabla 1.2: Logaritmos de los coeficientes de partición en octan-1-ol/agua ($\log P_{O-A}$) y en ciclohexano/agua ($\log P_{C-A}$).....	14
Tabla 2.1: Índices de reactividad local para lumiflavina y 1-metilnicotinamida.....	43
Tabla 2.2: Índices de reactividad global para lumiflavina y 1-metilnicotinamida.....	49
Tabla 3.1: Constantes de equilibrio (K_{DA}) para la asociación riboflavina- β -carbolina.....	59
Tabla 3.2: Constantes de equilibrio (K_{DA}) para la asociación FAD- β -carbolina.....	59
Tabla 3.3: Constantes de inhibición de MAO de β -carbolinas.....	64
Tabla 3.4: Energías totales y ángulos de enlace de β -carbolinas calculados al nivel de teoría B3LYP/6-31G.....	70
Tabla 3.5: Angulos diédricos de dihidro- y tetrahidro- β -carbolinas.....	71
Tabla 3.6: Actividades IMAO-A e IMAO-B de algunas β -carbolinas en enzimas provenientes de cerebro de rata.....	73
Tabla 3.7: Indices de reactividad global para lumiflavina y β -carbolinas neutras.....	76
Tabla 3.8: Indices de reactividad global para lumiflavina y β -carbolinas protonadas en el N-2.....	77
Tabla 4.1: Actividad antioxidante de triptaminas y β -carbolinas.....	96
Tabla 4.2: Reducción de β -carbolinas en medio prótico.....	101
Tabla 4.3: Oxidación de β -carbolinas en medio prótico.....	105

Tabla 4.4: Reducción de β -carbolinas en DMSO.....	110
Tabla 4.5: Oxidación de β -carbolinas en DMSO.....	115
Tabla 5.1: Efecto de harmina y harmano en el crecimiento de cultivos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> de cepas Tulahén y LQ.....	138
Tabla 5.2: Efecto de alcaloides β -carbolínicos en el consumo de oxígeno de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> de las cepas Tulahuén y LQ.....	139
Tabla 5.3: Toxicidad de algunos alcaloides β -carbolínicos hacia epimastigotes de <i>T. cruzi</i> de la cepa Tulahuén.....	141

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Alcaloides β -carbolínicos con distinto grado de insaturación.....	1
Figura 1.2: Síntesis de 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolinas a través de la reacción de condensación de Pictet-Spengler.....	2
Figura 1.3: Síntesis de 3,4-dihidro- β -carbolinas a través de la reacción de condensación de Bischler-Napieralski.....	3
Figura 1.4: Biotransformación de 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolinas.....	8
Figura 2.1: Estados de oxidación observados para el núcleo isoaloxazínico.....	27
Figura 2.2: Reacción de transhidrogenación entre lumiflavina (LF) y 1-metilnicotinamida (NH).....	29
Figura 2.3: a) Conformación del complejo FAD/NADP obtenido de la estructura cristalina de la Glutathiona Reductasa (1GET.pdb). Para mayor simplicidad no se muestra la apoproteína. b) Lumiflavina y 1-metilnicotinamida como modelo teórico utilizado para representar la conformación del complejo FAD/NADP mostrado en a).....	32
Figura 2.4: Regiones moleculares de lumiflavina y 1-metilnicotinamida con valores similares de blanduras grupales. Sistema LF-NH (a); sistema LFH ¹⁺ -NH (b); sistema LFH ₂ -N ⁺ (c); sistema LFH ⁵⁺ -NH (d).....	42
Figura 3.1: Mecanismo propuesto para la oxidación de aminas catalizada por MAO.....	61
Figura 3.2: Estructura de las β -carbolinas estudiadas teóricamente.....	66
Figura 3.3: Actividades IMAO-A (a) y B (b) de algunas β -carbolinas.....	74
Figura 3.4: Relación entre las constantes de asociación FAD- β -carbolina (K_{FAD-BC}) y la constante de inhibición de MAO-A (K_{MAO-A}) para una serie de	

<i>β-carbolinas.</i>	81
Figura 3.5: Relación entre las constantes de asociación K_{RF-BC} (a) y K_{FAD-BC} (b) y el potencial químico electrónico (μ) de las β -carbolinas.....	82
Figura 3.6: Relación entre las constantes de asociación K_{RF-BC} (a) y K_{FAD-BC} (b) y la electrofilia(ω) de las β -carbolinas.....	83
Figura 3.7: Relación entre las constantes de asociación K_{RF-BC} (a) y K_{FAD-BC} (b) y la transferencia de carga (ΔN) de las β -carbolinas.....	84
Figura 3.8: Relación entre las constantes de asociación K_{RF-BC} (a) y K_{FAD-BC} (b) y la carga crítica (N_{MAX}) de las β -carbolinas.....	85
Figura 3.9: Relación entre las constantes de inhibición K_{IMAO-A} y el potencial químico electrónico (μ) de β -carbolinas.....	86
Figura 3.10: Relación entre las constantes de inhibición K_{IMAO-A} y la electrofilia (ω) de β -carbolinas.....	87
Figura 3.11: Relación entre las constantes de inhibición K_{IMAO-A} y la transferencia de carga (ΔN) de β -carbolinas.....	87
Figura 4.1: Oxidación electroquímica de 1-metil-6-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.....	93
Figura 4.2: Voltamogramas cíclicos en medio prótico de norharmano(a), harmano (b), harmina (c) y harmol (d). Velocidad de barrido, 1000 mV/s. Barrido inicial en el sentido catódico.....	100
Figura 4.3: Voltamogramas cíclicos en medio prótico de harmalina (a) y harmalol (b). Velocidad de barrido, 1000 mV/s. Barrido inicial en el sentido catódico.....	101
Figura 4.4: Voltamogramas cíclicos en medio prótico de harmina (a), harmano (b), norharmano (c) y harmol (d). Velocidad de barrido, 50 mV/s.	

Barrido inicial en el sentido anódico.....	103
Figura 4.5: Voltamogramas cíclicos en medio prótico de harmalina (a) y harmalol (b). Velocidad de barrido, 50 mV/s. Barrido inicial en el sentido anódico.....	104
Figura 4.6: Voltamogramas cíclicos en medio prótico de THBC (a) y AHTC (b). Velocidad de barrido, 50 mV/s. Barrido inicial en el sentido anódico.....	104
Figura 4.7: Voltamogramas cíclicos en medio aprótico de harmina.HCl (a) y harmalina HCl (b). VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido catódico.....	108
Figura 4.8: Voltamogramas cíclicos en medio aprótico de harmina (a) y harmalina (b). VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido catódico.....	109
Figura 4.9: Voltamogramas cíclicos en medio aprótico de norharmano (a) y harmina (b). VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido anódico.....	113
Figura 4.10: Voltamogramas cíclicos en medio aprótico de harmalina (a) y THBC (b). VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido anódico.....	114
Figura 4.11: Espectro de EPR del radical de la N-tert-butil- α -fenilnitrona enlazada a la 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.....	117
Figura 4.12: Estructura química tentativa del radical N-tert-butil- α -fenilnitroxido enlazado a la 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.....	117
Figura 4.13: Relación entre el potencial de reducción a pH 7 (E_R) y la electrofilia (ω) de las β -carbolinas neutras (a) y protonadas en N-2 (b).....	119
Figura 4.14: Relación entre el potencial de reducción a pH 7 (E_R) y la carga crítica (N_{MAX}) de las β -carbolinas neutras (a) y protonadas en N-2 (b).....	120
Figura 4.15: Relación entre el potencial de oxidación a pH 7 (E_o) y el potencial	

químico electrónico (μ) de β -carbolinas neutras.....	122
Figura 4.16: Relación entre el potencial de reducción en DMSO (E_R) y el potencial químico electrónico (μ) de β -carbolinas neutras.....	123
Figura 4.17: Relación entre el potencial de reducción (E_R) en DMSO para el proceso S3, la electrofilia (ω) y la carga crítica (N_{MAX}) de β -carbolinas protonadas.....	124
Figura 4.18: Relación entre el potencial de reducción (E_R) en DMSO y el potencial químico electrónico (μ) de β -carbolinas protonadas en el proceso S3 (a) y S2 (b).....	125
Figura 4.19: Relación entre el potencial de oxidación (E_o) a pH 7 y la actividad antioxidante (CI_{50}) en medio no enzimático de β -carbolinas neutras.....	127
Figura 4.20: Relación entre la actividad antioxidante (CI_{50}) en medio no enzimático y el potencial químico (μ) de β -carbolinas protonadas.....	128
Figura 4.21: Relación entre la actividad antioxidante (CI_{50}) en medio enzimático, la carga crítica (N_{MAX}) (a) y la blandura (S) de β -carbolinas neutras.....	130
Figura 5.1: Efectos de varias β -carbolinas en el crecimiento de epimastigotes de cepas Tulahuén y LQ de <u>Trypanosoma cruzi</u> ..	137
Figura 5.2: Correlación entre la inhibición del consumo de oxígeno y la inhibición del crecimiento de epimastigotes de <u>T. cruzi</u> para las cepas Tulahuén y LQ.....	140
Figura 5.3: Relación entre la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de <u>T. cruzi</u> y las constantes de asociación (K_{DA}) riboflavina- β -carbolina (a) y FAD- β -carbolina para la cepa Tulahuén.....	144
Figura 5.4: Relación entre la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de <u>T. cruzi</u> y la carga crítica (N_{MAX}) de β -carbolinas neutras.....	145
Figura 5.5: Relación entre la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de	

<i>T. cruzi</i> , la electrofilia (a) y la carga crítica (b).....	146
Figura 5.6: Relación entre la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y la actividad antioxidante no dependiente de enzimas (CI_{50}).....	147
Figura 5.7: Relación entre la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y la lipofilia ($\log P_{OA}$) de β -carbolinas.....	148
Figura 5.8: Relación entre la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y las constantes de asociación (K_{DA}) riboflavina- β -carbolina (a) y FAD- β -carbolina para la cepa LQ.....	149
Figura 5.9: Relación entre la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y el potencial de reducción en DMSO de β -carbolinas protonadas.....	150
Figura 5.10: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y las constantes de asociación (K_{DA}) riboflavina- β -carbolina (a) y FAD- β -carbolina para la cepa Tulahuén.....	152
Figura 5.11: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , la dureza química (a) y la carga crítica (b) de β -carbolinas neutras.....	153
Figura 5.12: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , la electrofilia (a) y la carga crítica (b) de β -carbolinas protonadas.....	154
Figura 5.13: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y las constantes de asociación (K_{DA}) riboflavina- β -carbolina (a) y FAD- β -carbolina para la cepa LQ.....	156
Figura 5.14: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , la electrofilia (a) y la carga crítica (b) de β -carbolinas neutras en la cepa LQ.....	157
Figura 5.15: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , la electrofilia (a) y la carga crítica (b) de β -carbolinas protonadas	

en la cepa LQ.....158

Figura 5.16: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de *T. cruzi* y la dureza química de β -carbolinas neutras en la cepa LQ.....159

Figura 5.17: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de *T. cruzi*, el potencial químico electrónico (a) y la transferencia de carga hacia LFH1+ (b) de β -carbolinas protonadas en la cepa LQ.....160

Lista de abreviaturas

B3LYP	Funcional híbrido de tres parámetros de Becke usando el funcional de correlación de Lee, Yang y Parr
CTC	Complejo de transferencia de carga
DFT	Teoría de Funcionales de la Densidad
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EPR	Resonancia Paramagnética Electrónica
FAD	Flavina adenina dinucleótido (forma oxidada)
FMN	Flavina mononucleótido (forma oxidada)
HOMO	Orbital molecular ocupado de más alta energía
HSAB	Ácidos y bases duros y blandos
LUMO	Orbital molecular desocupado de más baja energía
MAO-A	Monoaminoxidasa A
MAO-B	Monoaminoxidasa B
NAD(P) ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato), forma oxidada
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato), forma reducida
RFN	Riboflavina (forma oxidada)
VCL	Voltimetría Cíclica Lineal

Resumen

El esqueleto β -carbolínico, 9-H-pirido[3,4-b]indol, es la unidad básica de un grupo de alcaloides indólicos, de variada actividad biológica. Los mecanismos de acción de β -carbolinas a nivel del sistema nervioso central o como agentes anticancerígenos se conocen cada vez con mayor claridad. Sin embargo, respecto de las propiedades quimioterapéuticas y de la actividad enzimática, la literatura sólo informa los resultados de las pruebas de cribado, desconociéndose hasta el momento los modos de acción.

Esta tesis presenta un estudio físico-químico de estos alcaloides, centrado en dos áreas: el estudio de las propiedades electrónicas y de descriptores de reactividad química, definidos en el marco conceptual de la Teoría de Funcionales de la Densidad, calculados a nivel de teoría B3LYP/6-31G, y un estudio electroquímico, realizado a través de voltametría cíclica lineal, en ambiente acuoso y a diferentes pH, y en un solvente aprótico (DMSO). Se presenta además por primera vez la detección - por resonancia paramagnética electrónica (EPR) y en presencia de un atrapador de radicales libres - de una especie radicalaria producto de la oxidación electroquímica de una tetrahidro- β -carbolina en ambiente aprótico.

Puesto que la literatura informa que las β -carbolinas forman complejos de transferencia de carga con flavinas (FAD, riboflavina), se estudió además, a través de los descriptores de reactividad, la reacción de transferencia de hidruro entre las moléculas de lumiflavina (7,8,10-trimetilisoaloxazina) y 1-metilnicotinamida como un modelo simplificado del sistema FAD-NAD(P)H, presente en los procesos catalíticos de numerosas enzimas, el cual podría ser intervenido por las β -carbolinas a través de una interacción FAD- β -carbolina.

Sobre la base de los resultados obtenidos se evaluó la correlación existente entre las características físico-químicas y la actividad biológica que presentan una serie de β -carbolinas. Se midió entonces la actividad inhibitoria de las flavoenzimas MAO-A y MAO-B de algunos de estos compuestos y la actividad tripanosomicida frente a dos cepas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, Tulahuén y LQ, de susceptibilidades diferentes frente al fármaco nifurtimox, utilizado clínicamente en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Respecto de la reacción de transferencia de hidruro en el sistema lumiflavina-1-metilnicotinamida, ésta se puede comprender como una interacción entre especies blandas, controlada por los orbitales de frontera y bien enmarcada en el principio de ácidos y bases duros y blandos de Pearson (HSAB). Descriptores globales como el potencial químico electrónico, la electrofilia y la blandura describen apropiadamente la reactividad del sistema estudiado. La regioespecificidad de la transferencia de hidruro estaría modulada por propiedades de regiones extendidas dentro de la molécula, las que incluirían más de un centro atómico. En este trabajo se encontró que los sitios reactivos de las moléculas que participan en la interacción están ubicados en regiones de diferentes moléculas, con formas y tamaños similares y que presentan valores muy similares de blandura grupal, de acuerdo al principio HSAB local.

Respecto de los descriptores de estructura electrónica de las β -carbolinas, se observa que en el núcleo piridoindólico la dureza química y la blandura química dependen de la aromaticidad del sistema, mientras que el potencial químico electrónico depende del grado de insaturación de estos compuestos. La carga crítica, N_{MAX} , y la electrofilia presentan una tendencia menos clara ya que dependen tanto del potencial químico electrónico como de la dureza química, observándose que las dihidro- β -carbolinas son las más electrofílicas y las que presentan mayor valor de N_{MAX} , mientras que las tetrahidro- β -carbolinas son las menos

electrofilicas y de menor N_{MAX} . El análisis de los descriptores de reactividad en el sistema lumiflavina- β -carbolina sugiere que estos alcaloides se comportan como dadores de electrones frente a la molécula de lumiflavina, y tendrían gran afinidad por una de las formas protonadas de la lumiflavina.

En concordancia con los resultados de otros estudios acerca de la actividad IMAO-A y -B de β -carbolinas, éstas resultaron ser potentes inhibidoras de la MAO-A, e inhibidoras muy pobres de la MAO-B. La actividad IMAO-A de las β -carbolinas se correlaciona con la formación de complejos de transferencia de carga entre flavinas y β -carbolinas. La formación de complejos de transferencia de carga se correlaciona a su vez con el potencial químico electrónico, la electrofilia, la carga crítica y la transferencia de carga, mientras que la actividad IMAO-A muestra una fuerte dependencia del potencial químico electrónico, de la electrofilia y de la transferencia de carga.

La inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en la cepa LQ depende de la lipofilia de las β -carbolinas y de la unión de éstas a flavinas (riboflavina, FAD). La inhibición del consumo de oxígeno en esta misma cepa también dependería de la asociación β -carbolina-flavinas; además dependería del potencial químico electrónico, de la electrofilia, de la carga crítica y de la transferencia de carga. En la cepa Tulahuén tanto la inhibición del crecimiento de los cultivos como la inhibición del consumo de oxígeno de los epimastigotes dependen de la lipofilia, de la asociación β -carbolina-flavinas, de la electrofilia y de la carga crítica.

Respecto al estudio electroquímico por VCL de las β -carbolinas, a pH fisiológico la oxidación de algunos de estos compuestos sería compatible con los procesos redox de sistemas biológicos, mientras que la reducción de ellas sería incompatible con dichos sistemas. De manera general, la actividad antioxidante de las β -carbolinas se relaciona con

los potenciales de oxidación de estos compuestos. A pH 7 la reducción de estos alcaloides se correlaciona con la electrofilia y la carga crítica, mientras que la oxidación se correlaciona con el potencial químico electrónico. En medio aprótico (DMSO) la reducción de las β -carbolinas se correlaciona con el potencial químico electrónico, con la electrofilia y la carga crítica.

Por último, la 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina se oxida electroquímicamente en medio aprótico generando un radical libre de vida muy corta, detectable por EPR en presencia de un atrapador de radicales libres.

Summary

The β -carboline moiety, 9-*H*-pyrido[3,4-*b*]indole, is the basic scaffold of a group of indole alkaloids which have a variety of biological activities. The mechanisms of action of β -carbolines in the central nervous system or as anticancer agents are increasingly well known nowadays. Nevertheless, with regard to their chemotherapeutic properties or their enzymatic activities, the scientific literature only reports screening results, leaving these mechanisms less understood.

This thesis presents a physico-chemical study of these alkaloids, centered on two areas: one, in which the electronic properties and some chemical reactivity descriptors, defined in the context of the conceptual part of Density Functional Theory, are calculated for the β -carbolines at the B3LYP/6-31G level of theory; and the other, an electrochemical study based on cyclic voltametry, in aqueous media at different pH values, and in an aprotic solvent (DMSO). Also, this thesis presents for the first time the detection - using electron paramagnetic resonance (EPR) in the presence of a spin trapper- of a free radical species which is the product of the electrochemical oxidation of tetrahydro- β -carboline in an aprotic solvent.

The scientific literature reports that β -carbolines form complex associations with flavins (FAD, riboflavin) through a charge-transfer process. This fact led us to a theoretical study of the hydride transfer reaction between lumiflavine (7,8,10-trimethylisoalloxazine) and 1-methylnicotinamide, using their electronic properties and their chemical reactivity descriptors, as a simplified model of the FAD-NAD(P)H system which participates in the catalytic processes of a considerable number of enzymes, and with which β -carbolines could interfere through a FAD- β -carboline interaction.

Considering the results obtained, the relationship between physical-chemical characteristics and biological activity was evaluated for several β -carbolines. The MAOI-A and MAOI-B activities of some β -carbolines was determined. The trypanosomicidal activity towards epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* belonging to two the Tulahuén and LQ strains, which have different susceptibilities towards nifurtimox, a drug used clinically in the treatment of Chagas' disease, was also evaluated.

With regard to the hydride transfer reaction in the isoalloxazine-nicotinamide system, it can be understood as an interaction between soft species, controlled by frontier orbitals and nicely framed within the HSAB principle. The reactivity of the studied systems is well described by overall molecular descriptors derived from the conceptual part of DFT, such as the electronic chemical potential, electrophilicity and softness. Regiospecificity of the hydride transfer reaction in the isoalloxazine-nicotinamide system seems to be consistently modulated by properties of extended molecular regions, including more than one atomic centre. In this work it was found that reactive sites in interacting molecules are located in regions of the different molecular frameworks, with similar shapes and sizes, which display very similar group softnesses.

With regard to the electronic structure and the chemical reactivity descriptors of β -carbolines it was found that, in the pyridoindole moiety, the chemical hardness and the chemical softness depend on the aromaticity of the system, whilst the electronic chemical potential is dependent on the degree of insaturation for these compounds. The electrophilicity and the critical charge display a less clear trend, due to their dependence on both the electronic chemical potential and the chemical hardness: dihydro- β -carbolines are the most electrophilic analogues and they display the highest values for the critical charge, whilst tetrahydro- β -carbolines are the least electrophilic, and they display the lowest values of

the critical charge. Analysis of the reactivity descriptors in the lumiflavine- β -carboline system suggests that these alkaloids donate charge to the lumiflavine molecule; besides, β -carbolines should have high affinity for one of the protonated forms of lumiflavine.

Concerning the MAOI-A and -B activities of β -carbolines, the results obtained in this work are in agreement with those obtained by other authors: β -carbolines are potent inhibitors of MAO-A and very poor inhibitors of MAO-B. It was also found in this work that the MAOI-A activity is related to the formation of charge transfer complexes between flavins and β -carbolines. In turn, the formation of charge transfer complexes is correlated with the electronic chemical potential, electrophilicity, critical charge and charge transfer. MAOI-A activity shows a strong dependence on the electronic chemical potential, electrophilicity and charge transfer.

Inhibition of growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cultures of the LQ strain depends on the β -carbolines' lipophilicity and on the β -carboline-flavin association (riboflavin, FAD). The inhibition of oxygen uptake in this strain also seems to depend on the β -carboline-flavin association, on the electronic chemical potential, electrophilicity, critical charge and charge transfer. In the Tulahuén strain both the inhibition of culture growth and of oxygen uptake by the epimastigotes depends on lipophilicity, β -carboline-flavin association, electrophilicity and critical charge.

Regarding the linear cyclic voltammetric electrochemical study of β -carbolines at physiological pH, the oxidation of some of these compounds would be compatible with redox processes of biological systems; while the reduction of the same would not be possible with them. In general terms, the antioxidant activity of β -carbolines is related to the oxidation potentials of these compounds.

Finally, 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline is oxidised electrochemically in aprotic solution generating a free radical species with a very short half-life, making it only detectable by EPR in the presence of a spin trapper.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 β -Carbolinas: Antecedentes generales

El esqueleto β -carbólico, 9-H-pirido[3,4-b]indol, es la unidad básica de un grupo de alcaloides indólicos de gran interés biológico y farmacológico (Figura 1.1). Las β -carbolinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, habiendo sido aisladas de hongos y de especies de plantas de varias familias,¹ de invertebrados marinos^{1,2} y de fluidos y tejidos de mamíferos,^{3,4} desconociéndose hasta el momento el rol que cumplen en dichos organismos.

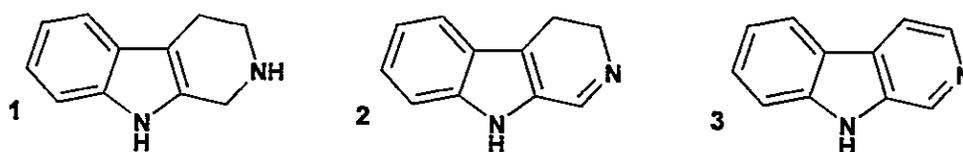


Figura 1.1: Alcaloides β -carbólicos con distinto grado de insaturación. 1,2,3,4-Tetrahidro- β -carbolina, 1. 3,4-Dihidro- β -carbolina, 2. β -Carbolina, 3.

El interés general en las β -carbolinas aumentó considerablemente luego que se desarrollaran métodos analíticos que permitieron detectar este tipo de alcaloides en tejidos y fluidos humanos como orina,⁵ sangre,⁶ cerebro,⁷ y cristalino del ojo.⁸ Estos antecedentes, sumados a la amplia y variada gama de actividad biológica que presentan estos alcaloides, han motivado numerosos e intensos estudios químicos y farmacológicos, centrados principalmente en la detección de β -carbolinas endógenas,⁹ en la función que pudieran cumplir en el organismo humano,⁷ y en el efecto de β -carbolinas provenientes de fuentes exógenas (comidas, bebidas, humo de cigarrillo, drogas naturales y sintéticas), en el sistema nervioso central de mamíferos.^{10, 11}

El origen de estos alcaloides en mamíferos, incluyendo el hombre, ha generado controversias. Las 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolinas (THBC) se sintetizan a través de la condensación de Pictet-Spengler entre derivados de triptamina y aldehidos (Figura 1.2); éstas pueden oxidarse posteriormente a 3,4-dihidro- β -carbolinas (DHBC) o a β -carbolinas (BC)¹¹ (Figura 1.1). Se ha descrito la síntesis de estos alcaloides a través de esta reacción de condensación, *in vivo* y en condiciones fisiológicas de pH y de temperatura, a partir de 2-(3-indolil)-etilaminas y aldehidos o ácidos biogénicos (triptamina, serotonina, 5-metoxitriptamina, acetaldehído, ácido pirúvico, ácido glioxílico).^{11,12} También se ha descrito que su biosíntesis aumenta tras la ingesta de alcohol o de la inoculación de precursores exógenos adecuados.^{13,14} Sin embargo, se ha informado que la formación de artefactos durante el proceso analítico y la ingesta de comidas y bebidas que ya contienen este tipo de alcaloides interfieren la identificación y cuantificación de β -carbolinas endógenas.^{10,14}

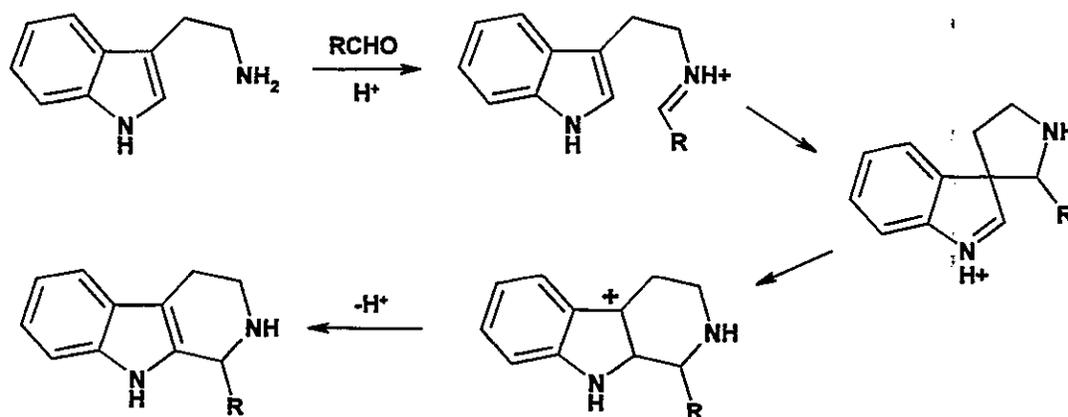
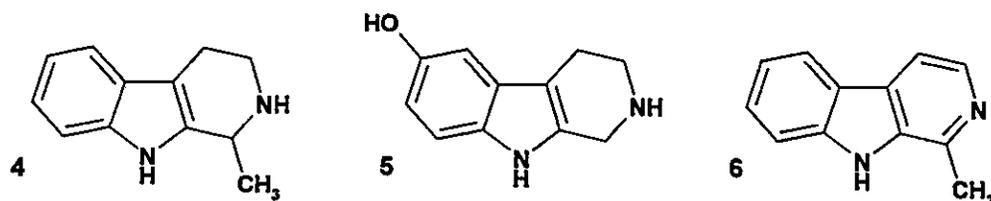


Figura 1.2: Síntesis de 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolinas a través de la reacción de condensación de Pictet-Spengler.

Las estructuras **1**, **4**, **5** y **6** se encuentran normalmente en orina y/o sangre humana, independientemente de la ingesta previa de precursores.^{7,10} Aún cuando se desconoce el papel de las β -carbolinas endógenas en mamíferos, se postula que actuarían como neuromoduladores o neurotransmisores falsos, y que participarían en fisiopatologías, desórdenes psiquiátricos y alcoholismo.⁵



La reactividad y la síntesis química de alcaloides β -carbolínicos han sido ampliamente descritas. Las condensaciones de Pictet-Spengler y de Bischler-Napieralski son los principales métodos utilizados en la preparación de tetrahidro y de dihidro- β -carbolinas respectivamente¹¹ (Figuras 1.1 y 1.3). Sin embargo, se han desarrollado numerosas rutas sintéticas con el objeto de incorporar nuevos sustituyentes y diversificar los patrones de sustitución en el esqueleto piridoindólico,^{2,15} a fin de verificar la estructura de nuevas β -carbolinas provenientes de fuentes naturales y de explorar la actividad biológica de estos alcaloides, obtenidos sintéticamente.

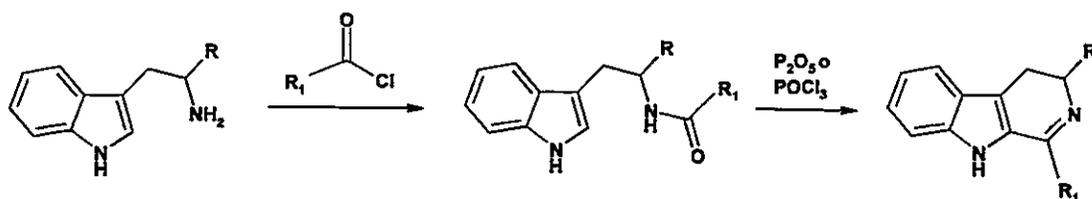


Figura 1.3: Síntesis de 3,4-dihidro- β -carbolinas a través de la reacción de condensación de Bischler-Napieralski.

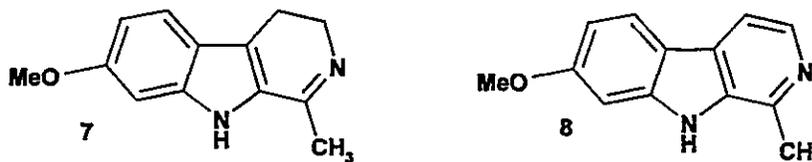
1.2 Actividad biológica de β -Carbolinas

Los alcaloides β -carbolínicos se encuentran presentes en plantas utilizadas ancestralmente en la medicina popular. Se han aislado de plantas de uso común en la medicina tradicional china y africana, y de preparaciones alucinogénicas utilizadas en rituales de tribus indígenas sudamericanas y de religiones de nuevo cuño originadas en Brasil. Dado que las plantas medicinales que contienen β -carbolinas se han utilizado con múltiples propósitos, se ha explorado la actividad biológica de estos compuestos, naturales o sintéticos, a través de numerosos estudios, que van desde simples pruebas de cribado (screening), al estudio de la interacción con sistemas específicos como enzimas o receptores. La literatura informa sobre los resultados de cientos de estos estudios en las últimas tres décadas. Una revisión exhaustiva de la actividad biológica de estos compuestos escapa al objetivo de esta tesis. Sin embargo se presenta a continuación una breve reseña de la investigación de la actividad biológica de las β -carbolinas donde éstas se perfilan de manera importante en el diseño de fármacos.

1.2.1 Inhibición enzimática

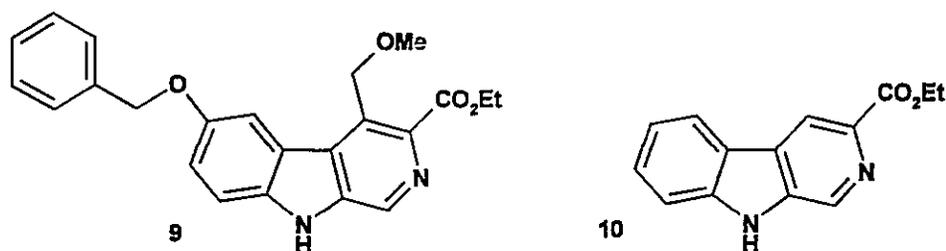
Los alcaloides β -carbolínicos más simples son inhibidores de varias enzimas, entre las que destacan las monoaminooxidasas A y B (MAO-A, MAO-B). Los compuestos **7** y **8** son potentes inhibidores de la enzima MAO-A, presentando valores de IC_{50} (concentración que inhibe la enzima en un 50%) en el intervalo 1-7 nM.^{16,17} También se ha informado sobre una actividad inhibitoria moderada de histamina-N-metil transferasa,¹⁸ acetilcolinesterasa,¹⁹ DNA topoisomerasas I ^{20, 21} y II ²² y de las quinasas CDK2 y CDK5 ²³ (CDK: cyclin-dependent kinase). El compuesto **3** inhibe la actividad de monooxigenasas de microsomas hepáticos de rata, pero estimula la actividad de una

epóxido hidrolasa de la misma fracción subcelular.²⁴ Se ha observado además que algunas β -carbolinas son inhibidoras débiles de la S-adenosil-L-metionina descarboxilasa²⁵ y de los complejos I y II de la cadena respiratoria.^{15, 26}



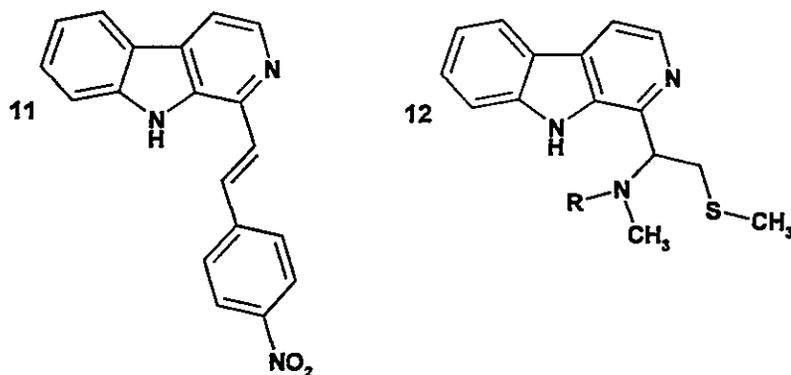
1.2.2 Unión a receptores

Muchas β -carbolinas poseen una alta afinidad por los receptores benzodiazepínicos (BzR) del cerebro, incluso mayor que la de algunas benzodiazepinas utilizadas clínicamente, pudiendo así bloquear la actividad de estas últimas.²⁷ Los alcaloides β -carbolínicos pueden ser agonistas de los BzR, como es el caso del compuesto ZK 93 423 (**9**), antagonistas o agonistas inversos como la 3-etoxicarbonil- β -carbolina **10**.²⁸ Por esta razón se han sintetizado una amplia variedad de β -carbolinas con las cuales se han realizado estudios de relación estructura-actividad en BzR.^{29, 30} Se ha informado además acerca de la unión de 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolinas a receptores serotoninérgicos^{31,32} (donde pueden actuar tanto de agonistas como de antagonistas) y colinérgicos.³³ Aunque de manera desconocida, las β -carbolinas interactúan en la transmisión dopaminérgica, aumentando o disminuyendo la concentración de dopamina en tejidos de ratas, dependiendo de la cantidad administrada.^{34,35}



1.2.3 Actividad quimioterapéutica

La actividad quimioterapéutica de los alcaloides β -carbolínicos también ha mostrado ser amplia. Se han sintetizado β -carbólinas con actividad antihelmíntica^{36,37} y antiprotozoaria (*Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica* entre otras).^{38,39} Estudios realizados sobre la actividad antibacteriana de estos compuestos, indican que son moderadamente activos frente a bacterias Gram-positivas.^{40,41} La actividad citotóxica frente a células tumorales ha mostrado ser interesante. La literatura informa sobre un gran número de β -carbólinas, naturales y sintéticas (ver compuestos 11 y 12), que inhiben el crecimiento de varios tipos de células cancerosas, entre ellas de ovarios, mamas, pulmones y riñones.^{42,43,44} La actividad antitumoral de estos alcaloides estaría asociada a la inhibición de las topoisomerasas I y II, las cuales controlan los diferentes estados topológicos del ADN. Producto de los estudios realizados en esta área, se han sintetizado β -carbólinas anticancerígenas diseñadas racionalmente.²³



1.2.4 Otras propiedades biológicas de los alcaloides β -carbolínicos

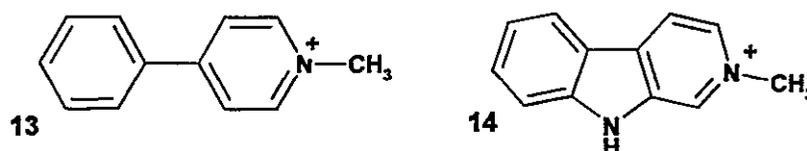
Se ha descrito que β -carbolinas como harmalina y harmina (compuestos **7** y **8**) entre otras, afectan el transporte de sodio en eritrocitos humanos, en axones de calamar y en músculo de *Balanus sp.*^{45,46} Estudios realizados en una serie de β -carbolinas mostró que poseen actividad antioxidante (la que se discutirá en el Capítulo 4 de esta Tesis), sugiriendo la formación de radicales piridoindólicos, cuya estabilidad dependería del patrón de sustitución de estos alcaloides.⁴⁷ También se ha informado sobre la síntesis de β -carbolinas con propiedades analgésicas, de muy baja toxicidad⁴⁸ y con propiedades antiinflamatorias similares a las de fármacos de uso clínico.⁴⁹

1.2.5 Toxicidad de β -carbolinas: genotoxicidad y la enfermedad de Parkinson

Se ha estudiado el potencial genotóxico de β -carbolinas simples como los compuestos **3**, **6**, **7** y **8** entre otros, observándose que no se comportan como verdaderos mutágenos, sino que lo hacen en forma indirecta al interactuar con el ADN formando aductos que, no obstante, no parecen tener un efecto carcinogénico.⁵⁰ Sin embargo, se ha observado también que tienen la habilidad de modificar la genotoxicidad de otras sustancias, aumentándola o disminuyéndola; es decir, se comportan como co-mutágenos,⁵⁰ siendo el mecanismo de esta acción desconocido.

La etiología de la enfermedad de Parkinson se desconoce. Se postula que existen agentes tóxicos endógenos y exógenos que inician la enfermedad en individuos genéticamente predispuestos⁵¹. El ión *N*-metil-4-fenil-piridinio **13**, (MPP⁺), es un conocido inductor del parkinsonismo. Como puede observarse, las β -carbolinas *N*-metiladas en el

nitrógeno piridínico (iones N-metil- β -carbolinio, ver estructura 14) tienen una gran similitud estructural con el MPP⁺, y, puesto que han sido aisladas del cerebro humano, se ha postulado que se comportarían como agentes patógenos de esta enfermedad.⁸ Se examinó la toxicidad de los iones β -carbolinio en el cerebro, comprobándose que causaban lesiones similares a las que causa el MPP⁺, pero de menor intensidad.⁵² Un estudio reciente mostró que las β -carbolinas N-metiladas se unen a una serie de proteínas del cerebro;⁵³ sin embargo, el efecto de esta unión y la relación que existe entre estas proteínas y la enfermedad de Parkinson continúa siendo un tema abierto.



1.3 Biotransformación de β -carbolinas

La literatura informa el estudio de la biotransformación de los ácidos carboxílicos de dos 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolinas (compuestos 15 y 16) ^{54,55,56} que generaron los metabolitos descarboxilados mostrados en el esquema presentado en la Figura 1.4.

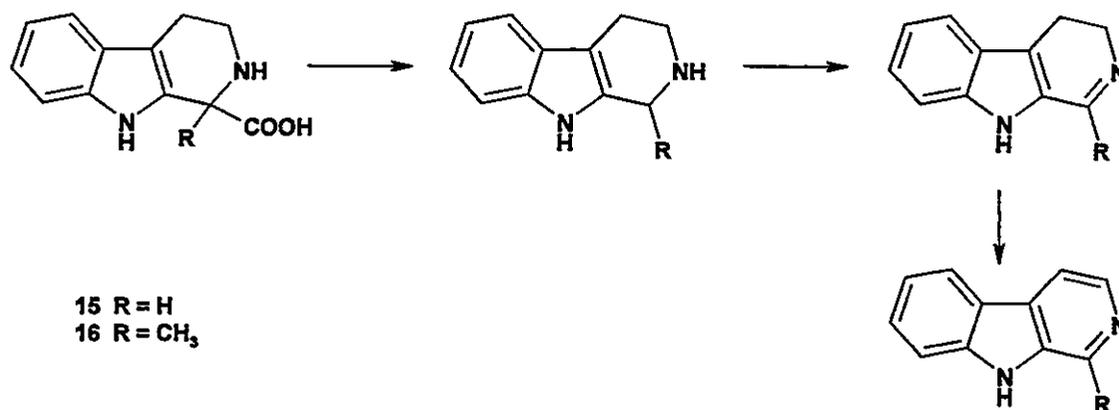
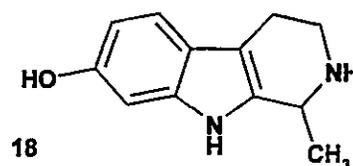
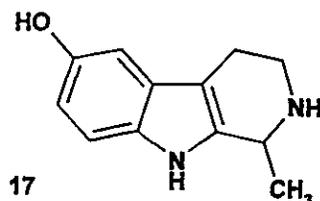


Figura 1.4: Biotransformación de 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolinas

En el caso del compuesto **15**, sólo se detectó la THBC y la DHBC correspondiente.^{54,55} Se ha informado también sobre la hidroxilación del compuesto **16**, que generó los compuestos **17** y **18**.⁵⁶ La metilación enzimática en N-2 (nitrógeno piridínico) también ha sido informada como parte del metabolismo de β -carbolinas y de tetrahidro- β -carbolinas, lo que ha suscitado bastante interés, ya que estos metabolitos estarían relacionados con la enfermedad de Parkinson, según se mencionara en la sección anterior.^{57,58} En tejidos de hígado y de pulmón humano se detectaron los metabolitos generados de la conjugación enzimática de β -carbolinas hidroxiladas, con sulfato y con ácido glucurónico.^{59, 60}



1.4 Características físico-químicas de β -carbolinas

1.4.1 Espectros de absorción electrónica, de emisión electrónica y determinación de la constante de acidez K_a

Los alcaloides β -carbolínicos presentan espectros de absorción electrónica UV-vis y de fluorescencia tanto en agua como en solventes no acuosos.^{16,61,62} Las β -carbolinas simples como los compuestos **1**, **3**, y **6** a **8** presentan una serie de bandas de absorción electrónica superpuestas, asociadas a transiciones $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$, entre los 200 y 400 nm.^{62,63} Mientras que la polaridad del solvente no altera significativamente

los espectros de absorción electrónica⁶², la protonación sí lo hace, observándose un corrimiento batocrómico de unos 30 a 50 nm^{63,63} en ambiente ácido. La protonación no afecta los espectros de absorción electrónica de las 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolinas en el intervalo de pH 1-7;^{16,64} sin embargo, en medio muy ácido o muy básico estos espectros no sólo sufren un corrimiento batocrómico, sino que además la formación de nuevas especies tautoméricas genera nuevas bandas de absorción que modifican el perfil de los espectros en las longitudes de ondas más cortas.^{64,65,65} Se ha observado además, que la *N*-alquilación del nitrógeno piridínico provoca un corrimiento batocrómico de ≈ 20 nm¹⁶.

Los espectros de fluorescencia de las β -carbolinas son dependientes de la polaridad del solvente y de la protonación.^{62,66,67} En el estado excitado las formas neutras y catiónicas de estos alcaloides formarían nuevos tautómeros, los que generarían espectros de emisión múltiples^{62,68} que presentan máximos entre los 350 y 480 nm. Los espectros de fluorescencia para los diferentes tipos de β -carbolinas son muy característicos para cada solvente, ya que las propiedades ácido-base de estos compuestos dependerían de las propiedades del solvente (constante dieléctrica, constante de autoprotólisis), lo que determina las especies que se forman en el estado excitado.⁶⁷⁻⁶⁹

Los espectros electrónicos de las β -carbolinas han sido estudiados no sólo por el interés químico que presentan, sino también con el objeto de utilizarlas como estándares de fluorescencia, para la calibración de equipos, determinación de rendimientos cuánticos,⁷⁰ y con el fin de investigar los sitios biológicos a los cuales se unen tales como el ADN.⁷¹

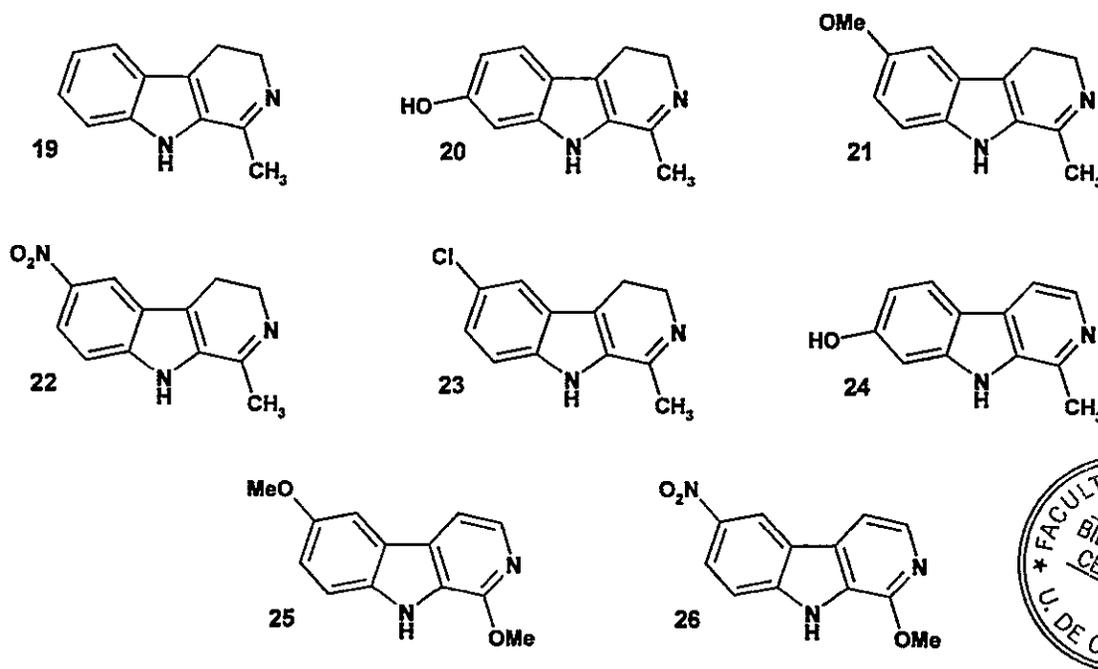
La Tabla 1.1 muestra los valores de las constantes de ionización para la protonación del nitrógeno piridínico de las β -carbolinas **1**, **3**, **6-8**, y **19-26**.^{63,65} Se observa

las β -carbolinas más ácidas corresponden a aquellas cuyo esqueleto pirdoindólico es aromático. Es interesante notar que, aunque se encuentran lejos del nitrógeno piridínico, los sustituyentes del anillo bencénico son capaces de transmitir sus efectos electrónicos a este centro. Como sugieren los autores, la influencia de estos sustituyentes en la acidez de este átomo parece operar principalmente a través de la conjugación de estos sistemas, más que depender del carácter electrodonante o electroatrayente de los sustituyentes. Sin embargo, pareciera que el efecto inductivo continúa siendo operativo, a juzgar por la influencia de la posición del grupo metoxilo en los valores de pK_a de los pares de compuestos **7-21** y **8-25**. El grupo 7-OMe se comporta como si estuviera en posición para y el grupo 6-OMe como si estuviera en meta con respecto al átomo de nitrógeno piridínico. Cabe destacar además el efecto debilitante de la acidez de los hidroxilos fenólicos de los compuestos **20** y **24**. Este efecto concuerda con el fuerte carácter electrodonante del grupo O^- , ya que los grupos fenólicos de estos compuestos se desprotonan a pH menor que el átomo de nitrógeno piridínico.⁶³

Tabla 1.1: Constantes de ionización para el equilibrio de protonación del nitrógeno piridínico de β -carbolinas a 25° C.

Compuesto	pK _a ¹	Nombre común
1, 2, 3, 4-Tetrahydro- β -carbolina		
1	8,60	THBC
3, 4-Dihidro- β -carbolinas		
19	8,99	Harmalano
7	9,54	Harmalina
20	11,30	Harmalol
21	9,21	
22	7,63	
23	9,39	
β -Carbolinas		
3	6,85	Norharmano
6	7,34	Harmano
8	7,73	Harmina
24	9,51	Harmol
25	6,91	
26	6,24	

¹ Valores tomados de las referencias 63 y 65



1.4.2 Lipofilia

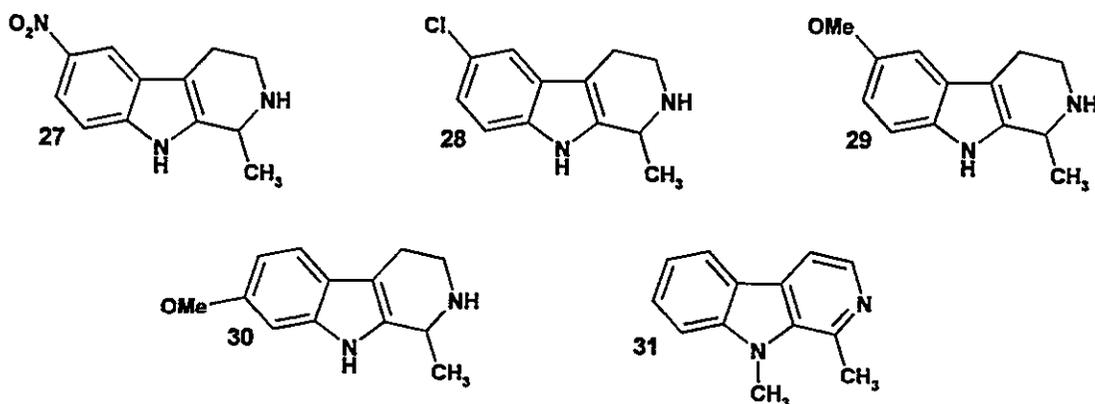
El carácter lipofílico de los alcaloides **1**, **3**, **4**, **6-8**, **20**, **24** y **27-31** fue estudiado a través de la determinación de los coeficientes de partición de las β -carbolidinas en su forma neutra en octanol-agua (P_{O-A}) y en ciclohexano-agua (P_{C-A}).^{72,73} Los resultados de la determinación de P_{O-A} y P_{C-A} se resumen en la Tabla 1.2. Las diferencias observadas en algunos resultados tienen su origen en las diferentes metodologías utilizadas por los autores: los resultados sin paréntesis corresponden a los obtenidos espectrofotométricamente,⁷⁴ mientras que los resultados entre paréntesis se obtuvieron por técnicas de cromatografía en capa fina.⁷³ La Tabla 1.2 también incluye el parámetro de Sélter,⁷⁴ $\Delta(\log P)$, definido como la diferencia entre $\log P_{O-A}$ y $\log P_{C-A}$, y considerado como un indicador de la capacidad donante de puentes de hidrógeno del compuesto. No existe una correlación clara entre la estructura de las β -carbolidinas y su carácter lipofílico. Las tetrahidro- β -carbolidinas (compuestos **1**, **4** y **27-30**) presentan valores de P_{O-A} y P_{C-A} inferiores a los que presentan las dihidro- β -carbolidinas y las

β -carbolinas. Se observa que la hidroxilación del anillo bencénico (compuestos **20** y **24**) disminuye el carácter lipofílico de estos alcaloides.

Tabla 1.2: Logaritmos de los coeficientes de partición en 1-octanol/agua ($\log P_{O-A}$) y en ciclohexano/agua ($\log P_{C-A}$).

Compuesto	$\log P_{O-A}$	$\log P_{C-A}^a$	$\Delta(\log P)^a$
1	1,98 ^a	-0,5	2,48
4	2,06	-0,8	2,86
27	2,07	-	-
28	2,30	-0,4	2,70
29	1,15	-0,5	1,65
30	1,37	-0,3	1,67
7	(3,71) ^b	-	-
20	(3,06)	-	-
3	2,65 (3,17)	-0,6	3,25
6	2,89 (3,50)	0,2	2,69
8	(3,56)	-	-
24	(3,06)	-	-
31	3,01	1,70	1,31

^aValores tomados de la referencia 74. ^bValores tomados de la referencia 73



Respecto del efecto de los sustituyentes en el anillo bencénico, los autores discuten que los valores de $\Delta(\log P)$ sugerirían que éstos modificarían la capacidad del átomo de nitrógeno indólico de donar puentes de hidrógeno (HBD), pero no se encontró una correlación entre parámetros propios de los sustituyentes y la capacidad HBD. Por último los autores discuten que los coeficientes de partición dependerían no sólo de la modificación de la capacidad HBD del nitrógeno indólico, sino también de la interacción de los mismos grupos sustituyentes con el solvente.

1.4.3 Formación de complejos de transferencia de carga

Se ha informado que las β -carbólinas forman complejos moleculares con flavinas como el grupo prostético FAD^{75,76} (flavina adenina dinucleótido) y riboflavina^{77,78} (RFN). Esta asociación molecular tendría su origen en la formación de complejos de transferencia de carga con una relación estequiométrica 1:1 (flavina/ β -carbolina), la que se determinó espectrofotométricamente, comparando los espectros de absorción electrónica de la flavina en ausencia y presencia de β -carbólinas. La estabilidad de estos complejos mostró ser dependiente de la sustitución y del grado de aromaticidad del anillo piridoindólico.

En el Capítulo 3 de esta Tesis se presentará una discusión más acabada de los resultados obtenidos del estudio de los complejos moleculares que las β -carbolinas forman con flavinas, donde se relacionarán con otras propiedades fisicoquímicas, que permitirían comprender de una manera más general las interacciones intermoleculares de estos alcaloides.

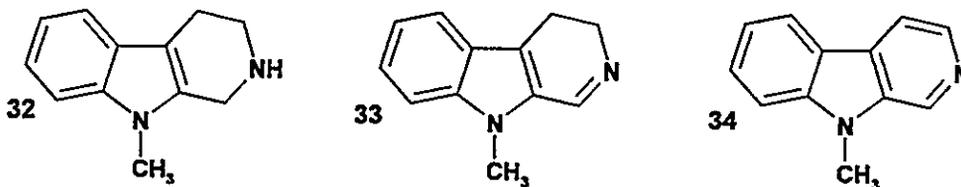
1.4.4 Oxidación electroquímica de β -carbolinas

La literatura informa el estudio de la oxidación electroquímica en solución acuosa de la 6-hidroxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina (compuesto **17**), por voltametría cíclica utilizando un electrodo de grafito.⁷⁹ El voltamograma cíclico presentó cuplas reversibles de oxidación y de reducción dependientes del pH. A pH fisiológico los potenciales de oxidación y de reducción de este compuesto son compatibles con los sistemas biológicos. Se demostró además que esta tetrahidro- β -carbolina se oxida biológicamente en presencia de las enzimas tirosinasa/O₂, ceruloplasmina/O₂ y peroxidasa/H₂O₂. Posteriormente se estudió el efecto del glutatión y del radical OH· en la oxidación biológica del mismo alcaloide (**17**), determinándose la estructura de nuevos productos de oxidación conjugados con glutatión.⁸⁰ Se estudió además *in vitro* el daño neurológico y la pérdida de glutatión causados por la interferencia del compuesto en estudio y de sus productos de oxidación en los procesos redox de neuronas serotoninérgicas.⁸¹

En el Capítulo 4 de esta tesis se completarán los antecedentes aportados por estos trabajos, en el marco de una caracterización electroquímica general de β -carbolinas.

1.4.5 Estudios teóricos

En los estudios teóricos realizados en β -carbolinas^{81,82}, cálculos semiempíricos a nivel AM1 de los compuestos **1-3**, **6**, **19** y **31-34**, se optimizó la geometría de estas moléculas, se calcularon las afinidades protónicas, las entalpías de desprotonación y se estudió la reactividad de estos compuestos a través de índices como la carga atómica neta, mapas de potenciales electrostáticos y densidades electrónicas de los orbitales de frontera. Tanto las afinidades protónicas calculadas como los mapas de potenciales electrostáticos predicen correctamente que la protonación en el nitrógeno piridínico está favorecida sobre la del nitrógeno indólico. Los estudios de reactividad, centrados en la sustitución electrofílica del sistema piridoindólico, discrepan de lo informado en la literatura o no existen datos experimentales para validar las predicciones de estos cálculos.



1.5 Hipótesis, objetivos y organización de la Tesis

Los mecanismos de acción de β -carbolinas a nivel del sistema nervioso central o como agentes anticancerígenos se conocen cada vez con mayor claridad. Sin embargo, respecto de las propiedades quimioterapéuticas, la literatura sólo informa sobre los resultados de las pruebas de cribado, desconociéndose hasta el momento los modos de acción antibacteriana, antihelmíntica o antiprotozoaria. El efecto que estos alcaloides ejercen en diferentes sistemas de neurotransmisión ha sido ampliamente

descrito y evaluado; sin embargo, la interacción de estas moléculas con las enzimas y receptores involucrados en estos sistemas aún se desconoce y es objeto de investigación. Dado que la actividad biológica de las moléculas se basa en las interacciones químicas que puedan establecer con los sitios donde actúan, se espera que una caracterización fisicoquímica de los alcaloides β -carbolínicos permita comprender con mayor profundidad el comportamiento biológico que éstos presentan. En el área de Fisicoquímica, y más específicamente en el área de la Química Cuántica, el marco conceptual de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT), basada en la idea de que la densidad electrónica es la propiedad fundamental capaz de describir los estados basales atómicos y moleculares,⁸³ ha proporcionado descriptores de estructura electrónica que han sido exitosos en describir y predecir la reactividad molecular.⁸³ Los fundamentos teóricos de la DFT utilizados en esta Tesis se revisan en el Apéndice I y en el Capítulo II.

En base a los antecedentes mencionados en este capítulo, se plantean en esta tesis las siguientes hipótesis de trabajo:

- Las características electroquímicas de las β -carbolinas y la generación biológica de radicales libres en éstas, provocarían la interferencia de los procesos de óxido-reducción naturales de sistemas biológicos.
- Los descriptores globales de estructura electrónica, definidos en el marco conceptual de la Teoría de Funcionales de la Densidad, serían útiles en la comprensión de la reactividad biológica de las β -carbolinas.

En base a estas hipótesis, se plantean los siguientes objetivos generales:

- Mejorar la comprensión de la actividad biológica de los alcaloides β -carbolínicos basada en las características fisico-químicas que presentan estas moléculas.
- Sobre la base de los resultados obtenidos, evaluar la correlación que pudiera existir entre las características fisico-químicas y la actividad biológica que presentan algunas β -carbolinas.

Los objetivos específicos a desarrollar en esta tesis son:

- Caracterizar algunos alcaloides β -carbolínicos en base al cálculo de descriptores de estructura electrónica, definidos en el marco de la Teoría de Funcionales de la Densidad.
- Estudiar la formación de complejos moleculares β -carbolina-flavina en base a los descriptores de estructura electrónica calculados.
- Caracterizar el comportamiento electroquímico de algunas β -carbolinas que presentan actividad biológica diversa.
- Evaluar la actividad tripanosomicida de una serie de β -carbolinas y realizar un análisis de esta actividad de acuerdo a la caracterización fisico-química desarrollada.

La formación de complejos moleculares entre β -carbolinas y flavinas puede ser crucial para la comprensión de una parte importante de la actividad biológica de estos compuestos. La unión de β -carbolinas a la porción flavínica de flavoenzimas como las de la cadena respiratoria o las monoaminoxidasas A y B podría interferir en los procesos catalíticos naturales de estas enzimas y por lo tanto alterar el funcionamiento normal de los organismos. No existe información cristalográfica

(estructura de difracción de rayos X) de estos complejos, lo que dificulta la comprensión de la interacción molecular β -carbolina-flavina. Sin embargo, sí existen datos cristalográficos de flavoenzimas unidas a sus sustratos naturales, los que podrían servir de modelo en el estudio de los complejos flavina-sustrato. En el Capítulo 2 de esta tesis se presenta un estudio teórico de la interacción entre la porción flavínica de la flavoenzima glutatión reductasa y el sustrato natural NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido reducido), basado en la estructura de rayos X del complejo que forman. En este estudio, enmarcado en la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT)⁸³ y del Principio de Ácidos y Bases Duros y Blandos de Pearson (HSAB),⁸⁴ se utilizaron descriptores de estructura electrónica que permitieron caracterizar la interacción entre estas moléculas y definir patrones de reactividad. Considerando los resultados obtenidos en el Capítulo 2, en el Capítulo 3 se presenta una caracterización teórica de una serie de β -carbolinas, y se analiza, en el mismo marco teórico, la correlación entre descriptores de estructura electrónica y la interacción de β -carbolinas con flavinas, en solución y en un sistema biológico (monoaminoxidasa A). Con el objeto de analizar la generación biológica de radicales derivados del esqueleto piridoindólico, en el Capítulo 4 se presenta una caracterización electroquímica de una serie de β -carbolinas biológicamente activas cuyos mecanismos de acción permanecen desconocidos. El estudio electroquímico, de oxidación y de reducción de β -carbolinas, se realizó por voltametría cíclica lineal, en ambiente acuoso y a diferentes pH, y en un solvente aprótico (DMSO). Se presenta además por primera vez la detección -por resonancia paramagnética electrónica (RPE)- de una especie radicalaria producto de la oxidación electroquímica de una tetrahidro- β -carbolina. En base a los descriptores de estructura electrónica calculados en el Capítulo 3 se analiza la correlación entre éstos y los potenciales de oxidación y de reducción observados. La actividad

antioxidante que presentan algunas β -carbolinas en sistemas biológicos se discute brevemente en el contexto de los resultados experimentales y teóricos obtenidos del estudio electroquímico. Finalmente, en el Capítulo 5 se presenta el estudio de la actividad tripanosomicida de una serie de β -carbolinas frente a epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (protozoo causante de la enfermedad de Chagas) pertenecientes a dos cepas que difieren en su sensibilidad frente al fármaco nifurtimox. La inhibición de la cadena respiratoria parece ser determinante de la actividad tripanosomicida de estos alcaloides. Las β -carbolinas estudiadas presentan un amplio rango de actividad tripanosomicida, lo que permite discutir la actividad a la luz de las características físico-químicas determinadas en esta tesis.

Referencias

- ¹ Love, B. E. *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, 28, 1.
- ² Hibino, S.; Choshi, T. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 66.
- ³ Susilo, R.; Rommelspacher, H. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1987**, 335, 70.
- ⁴ Tsuchiya, H.; Yamada, K.; Ohtani, S.; Takagi, N.; Todoriki, H.; Hayashi, T. *J. Neurosci. Meth.* **1995**, 62, 37.
- ⁵ Tsuchiya, H.; Ohtani, S.; Yamada, K.; Takagi, N.; Todoriki, H.; Hayashi, T. *J. Pharm. Sci.* **1994**, 83, 415.
- ⁶ Airaksinen, M. M.; Kari, I. *Med. Biol.* **1981**, 59, 21, y referencias citadas en el texto.
- ⁷ Matsubara, K.; Collins, M. A.; Akane, A.; Ikebuchi, J.; Neafsey, E. J.; Kagawa, M.; Shiono, H. *Brain Res.* **1993**, 610, 90.
- ⁸ Dillon, J.; Spector, A.; Nakanishi, K. *Nature* **1976**, 259, 422.
- ⁹ Tsuchiya, H.; Ohtani, S.; Yamada, K.; Takagi, N.; Hayashi, T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1994b**, 12, 1547.
- ¹⁰ Rommelspacher, H.; Susilo, R. *Prog. Drug Res.* **1985**, 29, 415, y referencias citadas en el texto.
- ¹¹ Glennon, R. A.; Dukat, M.; Grella, B.; Hong, S.-S.; Costantino, L.; Teitler, M.; Smith, C.; Egan, C.; Davis, K.; Mattson, M. V. *Drug Alcohol Depend.* **2000**, 60, 121.
- ¹² Callaway, J. C.; Gynther, J.; Poso, A.; Vepsäläinen, J.; Airaksinen, M. M. *J. Heterocyclic Chem.* **1994**, 31, 431.
- ¹³ Tsuchiya, H.; Yamada, K.; Tajima, K.; Hayashi, T. *Alcohol Alcoholism* **1996b**, 31, 197.
- ¹⁴ Bringmann, G.; Feineis, D.; Brückner, R.; Blank, M.; Peters, K.; Peters, E.-M.; Reichmann, H.; Janetzky, B.; Grote, C.; Clement, H.-W.; Weseman, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 1467.
- ¹⁵ Abramovitch, R. A.; Spencer, I. D. (1964) en *Advances in Heterocyclic Chemistry*, Academic Press: New York, Vol. 3, p. 79.
- ¹⁶ Fernández de Arriba, A.; Lizcano, J. M.; Balsa, M. D.; Unzeta, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, 46, 809.
- ¹⁷ Kim, H.; Sablin, S. O.; Ramsay, R. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, 337, 137.
- ¹⁸ Cumming, P.; Vincent, S. R. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, 44, 989.
- ¹⁹ Dekhane, M.; Dubois, L.; Blanchet, G.; Garrigue, H.; Sentenac-Roumanou, H.; Potier, P.; Dodd, R. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 2831.

- ²⁰ Funayama, Y.; Nishio, K.; Wakabayashi, K.; Nagao, M.; Shimoï, K.; Ohira, T.; Hasegawa, S.; Saijo, N. *Mutat. Res.* **1996**, 349, 183.
- ²¹ Sobhani, A. M.; Ebrahimi, S.-A.; Mahmoudian, M. *J. Pharmacy Pharm. Sci.* **2002**, 5, 19.
- ²² Lefebvre, F.; Madalengoiffa, J.; Orr, A.; Cuzi, T. J.; Lehnerf, E.; Macdonald, T.; Pommier, Y. *Cancer Res.* **1992**, 52, 4478.
- ²³ Yongcheng, S.; Wang, Y.; Teng, S. F.; Kesuma, D.; Deng, Y.; Duan, J.; Wang, J. H.; Qi, R. Z.; Sim, M. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1129.
- ²⁴ Bulleid, N. J.; Craft, J. A. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, 33, 1451.
- ²⁵ Lapinjoki, S. P.; Gynther, J. *Biochem. Int.* **1986**, 12, 847.
- ²⁶ Fields, J. Z.; Albores, R. R.; Neafsey, E. J.; Collins, M. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, 294, 539.
- ²⁷ Settimj, G.; Del Giudice, M. R.; Ferretti, R.; Cotichini, V.; Bruni, G.; Romeo, M.R. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, 30, 245.
- ²⁸ Stephens, D. N.; Shearman, G. T.; Kehr, W. *Psychopharmacology* **1984**, 83, 233.
- ²⁹ Sharma, R.C.; Ojha, T. N.; Tiwari, S.; Singh, P. *Drug Design Discov.*, **1992**, 9, 135.
- ³⁰ Coddington, P. W.; Roszak, A. W.; Szkaradzinska; Cook, J. M.; Hagen, T. J.; Allen, M. S. *Can. J. Chem.* **1995**, 73, 500.
- ³¹ Boksa, J.; Mokrosz, M. J.; Charakchieva-Minol, S.; Tatarczynska, E.; Klodzinska, A.; Wesolowska, A.; Miszial, S. *Polish J. Pharmacol.*, **2001**, 53, 501.
- ³² Singh, P.; Kumar, R. *J. Enzyme Inhib.* **2001**, 16, 491.
- ³³ Hider, R. C.; Smart, L.; Suleiman, M. S. *Eur. J. Pharmacol.* **1981**, 70, 429
- ³⁴ Pimpinella, G.; Palmery, M. *Neurosci. Lett.* **1995**, 189, 121.
- ³⁵ Baum, S. S.; Hill, R.; Rommelspacher H. *Life Sci.* **1995**, 56, 1715.
- ³⁶ Kumar, P.; Agarwal, S.; Bhakuni, D. *Indian J. Chem.* **1990**, 29B, 1077.
- ³⁷ Agarwal, A.; Agarwal, S. K.; Singh, S.N.; Fatma, N.; Chatterjee, R. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 225.
- ³⁸ Mitscher, L.; Showalter, H.; Shipchandler M.; Leu, R.; Beal, J. *Lloydia* **1972**, 35, 177.
- ³⁹ Anderson, L.; Harris, A.; Phillipson, J. *J. Nat. Prod.* **1983**, 46, 374.
- ⁴⁰ Prinsep, M. R.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G. *J. Nat. Prod.* **1991**, 54, 1068.
- ⁴¹ Begum, S.; Usmani, S. B.; Siddiqui, B. S.; Saeed, S. A.; Famaz, S.; Khan, K. A.; Khan, S. A.; Khalid, S. M.; Zia, A. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1996**, 46 (II), 1163.
- ⁴² Quefin-Leclercq, J.; Coucke, P.; Delaude, C.; Warin, R.; Bassleer, R.; Angenot, L. *Phytochemistry* **1991**, 30, 1697.

- ⁴³ Ishida, J.; Wang, H.-K.; Bastow, K. F.; Hu, C. Q.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3319.
- ⁴⁴ Kuo, P.-C.; Shi, L.-S.; Damu, A. G.; Su, S. R.; Huang, C.-H.; Ke, C.-H.; Wu, J.-B.; Lin, A.-J.; Bastow, F. F.; Lee, K. H.; Wu, T.-S. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1324.
- ⁴⁵ Dunn, M. J.; Hunt, W. J. *Pharmacol. Exp. Ther.* **1975**, *193*, 903.
- ⁴⁶ Lea, T. J.; Ashley, C. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *664*, 74.
- ⁴⁷ Tse, S. Y. H.; Mak, I.-T.; Dickens, B. F. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *42*, 459.
- ⁴⁸ Siddiqui, S.; Siddiqui, B.; Begum, S. Z. *Naturforsch.* **1986**, *41b*, 1583
- ⁴⁹ Hamaguchi, F.; Ohki, S. *Heterocycles* **1977**, *8*, 383.
- ⁵⁰ De Meester, C. *Mutat. Res.* **1995**, *339*, 139.
- ⁵¹ Jenner, P.; Shapira, A. H. V.; Marsden, C. D. *Neurology* **1992**, *42*, 2241.
- ⁵² Neafsey, E. J.; Albores, R.; Gearhart, D.; Kindel, G.; Raikoff, K.; Tamayo, F.; Collins, M. A. *Brain Res.* **1995**, *675*, 279.
- ⁵³ Gearhart, D. A.; Toole, P. F.; Warren Beach, J. *Neurosc. Res.* **2002**, *44*, 255.
- ⁵⁴ Gynther, J.; Lapinjokyo, S. P.; Airaksinen, M. M.; Peura, P. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35*, 2671.
- ⁵⁵ Susilo, R.; Damm, H.; Rommelspacher, H.; Höfle, G. *Neurosci. Lett.* **1987**, *81*, 325.
- ⁵⁶ Tsuchiya, H.; Todoriki, H.; Hayashi, T. *Pharmacol. Biochem.* **1995**, *52*, 677.
- ⁵⁷ Matsubara, K.; Neafsey, E. J.; Collins, M. A. *J. Neurochem.* **1992**, *59*, 511.
- ⁵⁸ Matsubara, K.; Collins, M. A.; Neafsey, E. J. *J. Neurochem.* **1992**, *59*, 505.
- ⁵⁹ Wong, K. P.; Wong, K. F. *Biogenic Amines* **1985**, *2*, 93.
- ⁶⁰ Tan, T. M. C.; Sit, K. H.; Wong, K. P. *Anal. Biochem.* **1990**, *185*, 44.
- ⁶¹ Dias, A.; Varela, A. P.; Miguel, M. da G.; Macanita, A. L.; Becker, R. S. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 10290.
- ⁶² Douglas, K. T.; Sharma R. K.; Walmsley, J.; Hider, R. *Molec. Pharmacol.* **1983**, *23*, 614.
- ⁶³ Balón, M.; Hidalgo, J.; Guardado, P.; Muñoz, M. A.; Carmona, C. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 99.
- ⁶⁴ Balón, M.; Hidalgo, J.; Guardado, P.; Muñoz, M. A.; Carmona, C. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 91.
- ⁶⁵ Balón, M.; Muñoz, M. A.; Carmona, C.; Hidalgo, J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1988**, 1165.
- ⁶⁶ Biondic, M. C.; Erra-Balsells, R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 887.
- ⁶⁷ Biondic, M. C.; Erra-Balsells, R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1992**, 1049.

-
- ⁶⁸ Reyman, D.; Pardo, A.; Poyato, J. M. L. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 10408.
- ⁶⁹ Krishnamurthy M.; Dogra, S. K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1986**, 1247.
- ⁷⁰ Pardo, A.; Reyman, D.; Poyato, J. M. L.; Medina, F. J. *Luminesc.* **1992**, *51*, 269.
- ⁷¹ Molero, M. L.; Hazen, M. J.; Pérez-Gorroño, A. I.; Stocker, J. C. *Acta Histochem.* **1995**, *97*, 1995.
- ⁷² Biagi, G. L.; Pietrogrande, M. C.; Barbaro, A. M.; Guerra, M. C.; Borea, P. A.; Cantelli Forti, G. J. *Chromatogr.* **1989**, *469*, 121.
- ⁷³ Guardado, P.; Balón, M.; Carmona, C.; Muñoz, M. A.; Domene, C. J. *Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 106.
- ⁷⁴ Seiler, P. *Eur. J. Med. Chem.* **1974**, *9*, 473.
- ⁷⁵ Codoñer, A.; Monzó, I. S.; Tomás, F.; Valero, R. *Spectrochim. Acta* **1986**, *42 A*, 765.
- ⁷⁶ Codoñer, A.; Monzó, I. S.; Tomás, F.; Valero, R. *Spectrochim. Acta* **1987**, *42 A*, 1379.
- ⁷⁷ Codoñer, A.; Monzó, I. S.; Ortiz, C.; Olba, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1989**, 107.
- ⁷⁸ Codoñer, A.; Medina, P.; Ortiz, C.; Jover, E. *Spectrochim. Acta* **1993**, *49 A*, 321.
- ⁷⁹ Zhang, F.; Goyal, R. N.; LeRoy-Blank, C.; Dryhurst, G. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 82.
- ⁸⁰ Han, Q.-P.; Dryhurst, G. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1494.
- ⁸¹ Hidalgo, J.; Balón, M.; Carmona, C.; Muñoz, M.; Pappalardo, R. R.; Sánchez-Marcos, E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1990**, 65.
- ⁸² Carmona, C.; Hidalgo, J.; Sánchez-Marcos, E.; Pappalardo, R. R.; Muñoz, M.; Balón, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1990**, 1881.
- ⁸³ Geerlings, P.; De Prof., F.; Langenaeker, W. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1793.
- ⁸⁴ Parr, R. G.; Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7512.

CAPÍTULO 2. ESTUDIO TEÓRICO DE LA REACTIVIDAD GLOBAL Y LOCAL DEL SISTEMA 1-METILNICOTINAMIDA-LUMIFLAVINA

2.1 Introducción

2.1.1 Antecedentes generales

Las flavinas (riboflavina, FMN, FAD) son cofactores de una amplia familia de enzimas, las flavoenzimas, involucradas en numerosas funciones biológicas. La deshidrogenación de una gran variedad de sustratos,¹ la mediación de procesos de transferencia de uno o dos electrones,² la activación del oxígeno molecular³ o la mediación de procesos fotobiológicos⁴ son sólo algunos ejemplos de la versatilidad que presentan estas enzimas. Las flavinas se encuentran fuertemente unidas a las apoproteínas de manera covalente o no covalente. Un aspecto importante de la actividad biológica de estas enzimas es que, a pesar de su versatilidad, su reactividad se encuentra restringida al núcleo 7,8-dimetilisoaloxazínico (Figura 2.1), común a todas las flavinas. Los grupos ribitol, pirofosfato o ribosa de las diferentes cadenas que pueden estar unidas al nitrógeno 10 del anillo isoaloxazínico no están directamente involucradas en el proceso catalítico, sino en el anclaje del cofactor a la proteína, como lo demuestran estudios cristalográficos.^{5,6,7}

El núcleo isoaloxazínico de las flavinas puede existir en tres estados de oxidación: las formas oxidada, radicalaria y reducida, que se muestran en la Figura 2.1. Dependiendo del pH del medio cada estado de oxidación presenta a su vez diferentes especies protonadas. Según se muestra esquemáticamente en la Figura 2.1, la forma oxidada de la flavina se puede reducir a la forma semiquinonoide por la adición de un

electrón; la extensa conjugación del sistema isoaloxazínico permite que este radical sea especialmente estable, permitiendo su detección por resonancia paramagnética electrónica (EPR).⁸ La adición de un segundo electrón genera la forma totalmente reducida. La reducción completa de flavinas oxidadas también puede lograrse a través de un proceso a dos electrones, sin un intermediario detectable.²

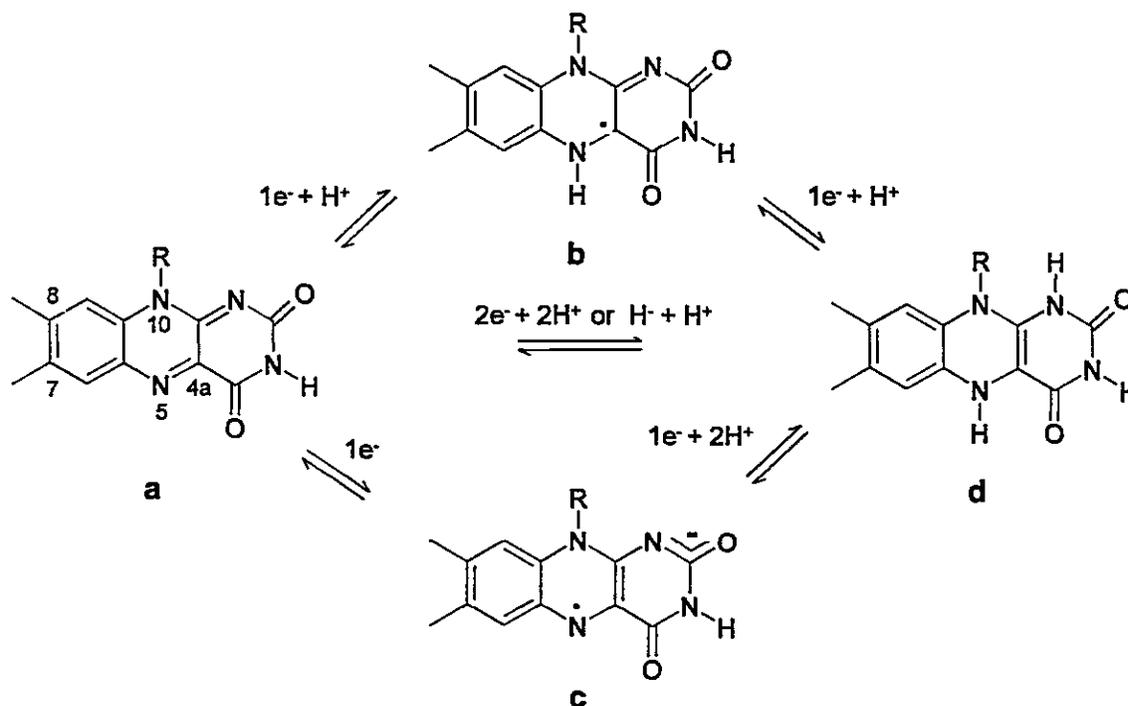


Figura 2.1: Estados de oxidación observados para el núcleo isoaloxazínico. Forma oxidada (a); radical "azul" (b); radical "rojo" (c); forma reducida (d).

La reactividad de las flavinas parece estar modulada por los diferentes estados de oxidación y de protonación del anillo isoaloxazínico,^{4,9} así como por el entorno proteico del sitio de unión de la flavina.^{10,11} Además, el uso de flavinas artificiales como sondas de sitios activos,^{12,13} ha permitido obtener información mecanística importante

relacionada con la forma en que la apoproteína puede modular la reactividad de la isoaloxazina.^{14,15}

Sobre la base de las pruebas experimentales disponibles, Massey y Hemmerich propusieron que las flavoproteínas podían ser clasificadas en cinco grupos principales, de acuerdo a su reactividad.¹² La regioespecificidad y las propiedades espectrales de dos de estos grupos sugieren características estructurales comunes que determinarían el tipo de reacción involucrada en la catálisis. Un grupo, al cual pertenecen las deshidrogenasas/oxidasas, se caracteriza por un radical semiquinonoide "rojo" y por la formación de un puente de hidrógeno entre la apoproteína y el átomo N-1 de la isoaloxazina, lo que gatilla la activación del átomo N-5 hacia el ataque nucleofílico (ver Figura 2.1). Otro grupo, al cual pertenecen las transferasas electrónicas, se caracteriza por un radical semiquinonoide "azul" y por la formación de un puente de hidrógeno entre la apoproteína y el N-5 de la isoaloxazina, activando el átomo C-4a frente al el ataque nucleofílico. Esta clasificación general ha sido parcialmente corroborada sobre la base de estudios experimentales y teóricos.^{16,17}

2.1.2 La reacción de transhidrogenación entre lumiflavina y 1-metilnicotinamida

Las moléculas de NAD(P)H y NAD(P)⁺ son dadores y aceptores de electrones respectivamente, que comúnmente participan en procesos catalíticos de flavoenzimas que involucran la transferencia de dos electrones.^{2,18} Como en el caso de la isoaloxazina en las flavinas, la reactividad en las cuplas NAD(P)H/NAD(P)⁺ se restringe al anillo nicotinamídico (ver NH en la Figura 2.2). En estas enzimas se transfiere directamente el equivalente a un ión hidruro entre los átomos C-4 de la nicotinamida y N-5 de la isoaloxazina, según se muestra en la Figura 2.2. Este mecanismo general está apoyado por estructuras cristalográficas disponibles para varias enzimas, que muestran

el anillo nicotinamídico ubicado casi paralelamente sobre el anillo del medio de la isoaloxazina, a una distancia de aproximadamente 3.5 Å según se puede ver en la Figura 2.3a.^{5,6,19} Esta reacción de transhidrogenación puede ocurrir directamente en el sitio activo de una enzima, como en las reductasas flavínicas,²⁰ o en un sitio alostérico donde la isoaloxazina, reducida u oxidada por la nicotinamida, es un intermediario de la catálisis.^{2,12,21} Aunque la estereoquímica de esta reacción se conoce, se han propuesto diferentes mecanismos electrónicos para explicar la transferencia de hidruro en el sistema isoaloxazina-nicotinamida, lo que ha generado controversia en torno a este tema.^{18,22,23} Además, se ha propuesto que no sólo N-5 sino también N-1 y C-4a en el anillo isoaloxazínico serían candidatos para recibir el ión hidruro desde la nicotinamida, siendo el impedimento estérico en esas posiciones el único argumento expuesto para explicar la selectividad de esta reacción.^{7,16}

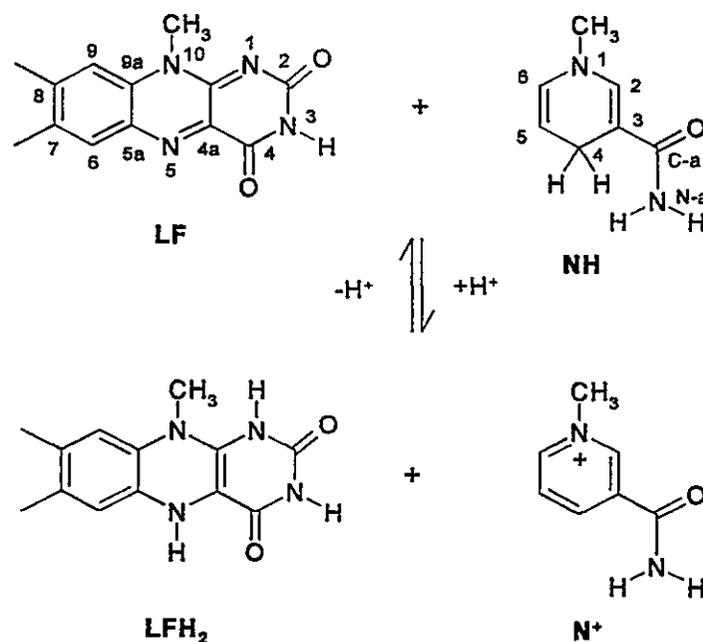


Figura 2.2: Reacción de transhidrogenación entre lumiflavina (LF) y 1-metilnicotinamida (NH).

2.1.3 Reacción de transhidrogenación en el sistema lumiflavina-1-metilnicotinamida: antecedentes teóricos

Estudios teóricos a niveles semiempírico^{24,25} y *ab initio*^{17,26,27} han entregado una buena descripción de la geometría, energía y propiedades electrónicas de la molécula de isoaloxazina. Todos estos estudios predicen una estructura plana para la forma oxidada (LF en la Figura 2.2), protonada o no, y una estructura doblada o "de mariposa" para el heterociclo reducido (LFH₂ en la Figura 2.2). Estudios sobre el estado de transición de la reacción de transferencia de hidruro en el sistema lumiflavina-1-metilnicotinamida, realizados a nivel semiempírico y *ab initio*, revelaron que existía un arreglo óptimo para la interacción de los orbitales frontera de ambas moléculas, con una superposición máxima de los orbitales participantes, donde los coeficientes de N-5 de la isoaloxazina exhiben la mayor contribución al LUMO.²⁸ Estudios posteriores realizados sobre estructuras hipotéticas de estados de transición en diferentes flavoenzimas que catalizan reacciones de transhidrogenación, permitieron concluir que existe un modelo molecular mínimo capaz de describir la transhidrogenación en estas enzimas. El arreglo geométrico del modelo molecular para el estado de transición es independiente del nivel de teoría utilizado para realizar los cálculos.²³ Estos estudios también sugieren que la isoaloxazina oxidada sufre un cambio conformacional, desde una estructura plana como reaccionante a una estructura doblada en el estado de transición.²⁹ En el caso de la enzima glutatona reductasa la geometría del modelo molecular concuerda con la estructura cristalina de la enzima en unión con NADPH.⁵ Una investigación de los orbitales moleculares empleando el método de Hückel extendido, realizada con el objeto de explorar las propiedades regionales del sistema lumiflavina-1-metilnicotinamida, mostró que, durante la transferencia de hidruro, existe una región en la molécula de nicotinamida desde donde los electrones pueden ser

donados, y otra región complementaria en el anillo de isoaloxazina donde pueden ser aceptados. Los autores proponen también la formación de un complejo molecular de transferencia de carga donde estas regiones se superponen en el espacio, antes que ocurra la transferencia del ión hidruro.³⁰

El propósito de este estudio es proporcionar nuevos antecedentes que permitan mejorar la comprensión que se tiene acerca de la reacción de transhidrogenación que ocurre en el complejo FAD/NAD(P) de las flavoenzimas. En este capítulo se explora la reactividad global y local de los núcleos isoaloxazínico del FAD y nicotinamídico del NAD(P), utilizando descriptores de estructura electrónica definidos en el marco conceptual de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT).^{31,32} La geometría del complejo FAD/NAD(P) se obtuvo de la estructura cristalina de la enzima Glutathione Reductasa (1GET.pdb),⁵ según se muestra en la Figura 2.3a. Puesto que la reactividad química del complejo se centra en los núcleos isoaloxazínico y nicotinamídico, se escogieron las moléculas de lumiflavina (7,8,10-trimetilisoaloxazina) y 1-metilnicotinamida como un modelo simplificado para representar los complejos presentes en las enzimas, según se muestra en la Figura 2.3b. También se consideraron en este estudio las moléculas de lumiflavina oxidada y protonadas en N-1 y en N-5, de acuerdo a la propuesta de Massey y Hemmerich (Figuras 2.4b y 2.4d).¹² La blandura regional, s_G , que se extiende a más de un átomo, se utilizó para localizar regiones reactivas en las moléculas que participan de esta interacción química.^{33,34}

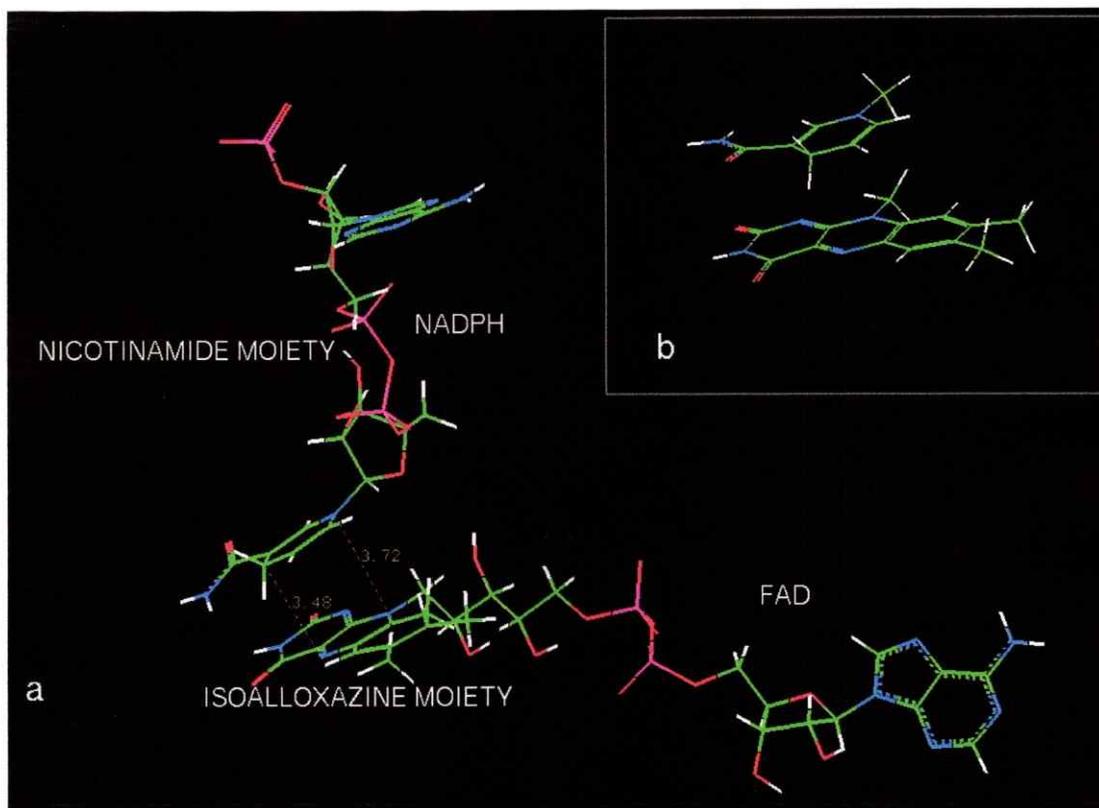


Figura 2.3: a) Conformación del complejo FAD/NADP obtenido de la estructura cristalina de la *Glutathione Reductasa* (1GET.pdb). Para mayor simplicidad no se muestra la apoproteína. b) Lumiflavina y 1-metilnicotinamida como modelo teórico utilizado para representar la conformación del complejo FAD/NADP mostrado en a).

2.2 Modelo teórico

2.2.1 Descriptores de reactividad

La Teoría de Funcionales de la Densidad proporciona una descripción útil del estado basal de los sistemas moleculares (ver Apéndice I).^{31,32} Conceptos como potencial químico electrónico (μ), dureza química (η), blandura química (S) y electrofilia (ω) constituyen cantidades bien definidas que describen convenientemente la reactividad de un sistema.^{35,36,37,38}

En la Teoría de Funcionales de la Densidad la expresión diferencial fundamental que describe el cambio de energía desde un estado basal a otro es³¹

$$(2.1) \quad dE = \mu dN + \int \rho(r) \delta v(r) dr$$

donde N es el número total de electrones, $\rho(r)$ es la densidad electrónica, $v(r)$ es el potencial externo y μ es el multiplicador Lagrangiano asociado a la optimización de la densidad electrónica de un sistema, que debe cumplir la condición:³⁹

$$(2.2) \quad \delta(E - \mu \rho(r)) = 0$$

Se ha demostrado que μ se puede escribir como la derivada parcial de la energía del sistema con respecto al número total de electrones a un potencial externo $v(r)$ fijo:³⁹

$$(2.3) \quad \mu = \left(\frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(r)}$$

El potencial químico electrónico μ es el descriptor natural de la dirección de la transferencia de carga durante una interacción química: los sistemas (átomos, moléculas) que van a interactuar deben alcanzar un potencial químico común en el equilibrio.³¹

La primera derivada parcial de μ con respecto a N a potencial externo fijo, entrega la dureza química del sistema, η , en el contexto del principio de ácidos y bases duros y blandos (HSAB) de Pearson:³²

$$(2.4) \quad \eta = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \mu}{\partial N} \right)_v = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right)_v$$

La dureza química η se ha asociado a la resistencia del sistema a modificar su densidad electrónica. Tanto a μ como a η se les ha dado una definición operacional en términos del potencial de ionización vertical I y de la afinidad electrónica A .³² Una aproximación posterior basada en el Teorema de Koopmans, permite calcular μ y η en términos de la energía de los orbitales de frontera HOMO y LUMO de acuerdo a la siguientes ecuaciones:^{31,32}

$$(2.5) \quad \mu \cong -\frac{(I + A)}{2} \approx \frac{\epsilon_L + \epsilon_H}{2}$$

$$(2.6) \quad \eta \cong I - A \approx \epsilon_L - \epsilon_H$$

donde ϵ_L y ϵ_H son las energías de los niveles LUMO y HOMO respectivamente.

Otra cantidad pertinente es la blandura química S , introducida como el recíproco de la dureza química, asociada a la polarizabilidad electrónica del sistema. Se le ha dado la siguiente expresión operacional utilizando una aproximación de diferencias finitas:³¹

$$(2.7) \quad S = \frac{1}{I - A} \cong \frac{1}{\epsilon_L - \epsilon_H}$$

Se ha propuesto recientemente que la electrofilia global de un ligando se puede describir por el índice electrofílico ω , que mide la energía de estabilización cuando el sistema adquiere una cantidad de carga electrónica desde el medio ambiente. Este índice ha sido definido por la siguiente relación cuantitativa:⁴⁰

$$(2.8) \quad \omega = \frac{\mu^2}{2\eta}$$

Además de los índices de reactividad global, existe un conjunto de descriptores locales que han sido relacionados con la selectividad de las moléculas en ciertas reacciones de sistemas orgánicos.^{41,42} La función de Fukui, $f(\mathbf{r})$, es uno de los descriptores locales más utilizados en el análisis de la reactividad química asociada a átomos o grupos funcionales en una molécula.^{31,32,34-36,43} La función de Fukui se puede definir como la variación de la densidad electrónica en el punto \mathbf{r} en el espacio, promovida por un cambio en el número de electrones N , a potencial externo constante $v(\mathbf{r})$:³¹

$$(2.9) \quad f(\mathbf{r}) = \left[\frac{\partial \rho(\mathbf{r})}{\partial N} \right]_{v(\mathbf{r})}$$

Un valor alto de este índice local está asociado con una reactividad alta en ese punto de la región molecular cuando se trata de moléculas con durezas químicas bajas o blanduras químicas altas.⁴⁴ Se han presentado diversas fórmulas operacionales para evaluar este índice, las que se revisan en el Apéndice II. A través de la función de Fukui se han derivado dos índices de reactividad local, la blandura local s_k , y la electrofilia local ω_k , condensados al átomo k :³¹

$$(2.10) \quad s_k^\pm = f_k^\pm S$$

$$(2.11) \quad \omega_k = f_k^\pm \omega$$

donde f_k es la función de Fukui en el sitio k en la dirección de un aumento (+) o una disminución (-) del número de electrones.^{31,32} Estos índices están asociados con un ataque nucleofílico y electrofílico en el sitio k respectivamente. Cabe destacar que, de

acuerdo a las ecuaciones (2.10) y (2.11), la blandura local y la electrofilia local están distribuidas de acuerdo a la función de Fukui.

2.2.2 El Principio de Ácidos y Bases Duros y Blandos (HSAB) local

El principio de Ácidos y Bases Duros y Blandos (HSAB) de Pearson. Pearson³² definió dos categorías de ácidos y bases, de acuerdo a la dureza o blandura de las moléculas, a saber, los ácidos y bases duros y los ácidos y bases blandos. Propuso entonces el principio de los Ácidos y Bases Duros y Blandos (HSAB) que propone que los ácidos duros prefieren reaccionar con las bases duras, mientras que los ácidos blandos prefieren reaccionar con las bases blandas. Más adelante Klopman³¹ propuso que las interacciones duro-duro estarían controladas por cargas, mientras que las interacciones blando-blando estarían controladas por los orbitales frontera HOMO y LUMO.

La selectividad en las reacciones entre ácidos y bases, en el marco del principio de HSAB, establece que las interacciones favorecidas serán aquellas que involucran sitios en el ácido de Lewis que presentan valores de blandura muy cercanos a los presentes en la base de Lewis.³⁸ Por otro lado, Gázquez y Méndez³³ demostraron que la interacción entre dos moléculas no ocurre necesariamente a través de los átomos más blandos de las moléculas, sino más bien a través de átomos de blandura similar. Este principio se conoce como el Principio de Ácidos y Bases Duros y Blandos local, y ha sido estudiado por varios grupos con el objeto de comprender su validez, y para predecir los átomos que reaccionan en pares de moléculas.^{45,46,47,48}

Gázquez y Méndez³³ derivaron el principio HSAB local a partir de la energía de interacción entre dos especies químicas A y B. Desde un punto de vista global se tiene que:

$$(2.12) \quad \Delta E_A = \mu_A \Delta N_A + \eta_A (\Delta N_A)^2/2 \quad \text{y}$$

$$(2.13) \quad \Delta E_B = \mu_B \Delta N_B + \eta_B (\Delta N_B)^2/2$$

ecuaciones en las cuales los cambios en el potencial externo de A y B han sido despreciados, y la transferencia de carga desde una especie a otra se ha expresado como:

$$(2.14) \quad \mu_{AB} = \mu_A + \eta_A \Delta N_A/2 = \mu_B + \eta_B \Delta N_B/2$$

Puesto que $\Delta N_A + \Delta N_B = 0$, entonces

$$(2.15) \quad \mu_{AB} = (\mu_A S_A + \mu_B S_B) / (S_A + S_B)$$

$$(2.16) \quad \Delta E_A = S_A (\mu_{AB}^2 - \mu_A^2) / 2$$

$$(2.17) \quad \Delta E_B = S_B (\mu_{AB}^2 - \mu_B^2) / 2$$

donde se ha utilizado la relación inversa que existe entre los descriptores S y η .

El cambio en el Gran Potencial⁴⁹, $\Delta\Omega$, de los átomos o subunidades moleculares A y B, donde

$$(2.18) \quad \Omega = E - \mu N$$

sería

$$(2.19) \quad \Delta\Omega_A = -(\mu_B - \mu_A)^2 S_B^2 S_A / 2 (S_A + S_B)^2$$

$$(2.20) \quad \Delta\Omega_B = -(\mu_B - \mu_A)^2 S_A^2 S_B / 2 (S_A + S_B)^2$$

luego de utilizar la ecuación (2.14) y que $\Delta\Omega_A + \Delta\Omega_B = \Delta E_A + \Delta E_B$.

Con el objeto de comprobar el principio HSAB se demostró que, para una diferencia de potencial químico dado, $\mu_B - \mu_A$, y para una S_B dada, la minimización de $\Delta\Omega_A$ con respecto a S_A lleva, precisamente a que $S_A = S_B$. De manera análoga, la minimización de $\Delta\Omega_B$ con respecto a S_B lleva a que $S_B = S_A$. Bajo estas condiciones $(\Delta\Omega_A)_{\min} \approx (\Delta\Omega_B)_{\min}$.

Si una interacción entre dos moléculas A y B ocurre a través de los átomos k de A y l de B, cada átomo de A y B debe cumplir con la condición de igualar los potenciales químicos electrónicos de todos los átomos a un valor μ_{AB} a través de una transferencia de carga de manera que

$$(2.21) \quad \mu_{AB} = \mu_A + \eta_{Ak} \Delta N_{Ak} = \mu_B + \eta_{Bl} \Delta N_{Bl}$$

Puesto que el valor μ_{AB} está determinado por la interacción global entre A y B y está determinada por la ecuación (2.15), se encuentra que,

$$(2.22) \quad \Delta N_{Ak} = S_A S_B f_{Ak} (\mu_B - \mu_A) / (S_A + S_B) \quad y$$

$$(2.23) \quad \Delta N_{Bl} = S_A S_B f_{Bl} (\mu_B - \mu_A) / (S_A + S_B)$$

Mientras que los cambios de energía y los cambios en el Gran Potencial debido a k en A y a l en B están dados por:

$$(2.24) \quad \Delta E_{Ak} = S_{Ak} (\mu_{AB}^2 - \mu_A^2) / 2$$

$$(2.25) \quad \Delta E_{Bl} = S_{Bl} (\mu_{AB}^2 - \mu_B^2) / 2$$

$$(2.26) \quad \Delta\Omega_{Ak} = -(\mu_B - \mu_A)^2 S_B^2 S_A f_{Ak} / 2 (S_A + S_B)^2$$

$$(2.27) \quad \Delta\Omega_{BI} = -(\mu_B - \mu_A)^2 S_A^2 S_B f_{BI} / 2 (S_A + S_B)^2$$

al considerar que

$$S_A = \sum_{k=1}^K s_{Ak} \quad \text{pues} \quad \sum_{k=1}^K f_{Ak} = 1$$

Las ecuaciones (2.22) y (2.23) indican que, mientras mayor es el valor de la función de Fukui, mayor es la transferencia de carga.

De la ecuación (2.26) se obtiene que el cambio en el del átomo k se minimiza cuando $S_A = S_B$, si $(\mu_B - \mu_A)$, S_B , y f_{Ak} tienen valores fijos. De manera similar, la minimización de $\Delta\Omega_{BI}$ con respecto a S_B , a valores fijos de $(\mu_B - \mu_A)$, S_A , y f_{BI} lleva a la condición $S_A = S_B$. De esta manera, el principio HSAB global implica que el Gran Potencial de los átomos A y B llega a un valor mínimo cuando ambas especies tienen aproximadamente la misma blandura.

Ahora bien, si la interacción entre A y B ocurre a través de los átomos k de A y l de B, se puede suponer que la situación más favorable corresponde a

$$(2.28) \quad (\Delta\Omega_{Ak})_{\min} \approx (\Delta\Omega_{Bl})_{\min}$$

Gázquez y Méndez³³ establecieron que otra condición de minimización de $\Delta\Omega_1$ pertinente correspondía a:

$$(2.29) \quad f_{Ak} \approx f_{Bl}$$

y ya que $S_A = S_B$, entonces

$$(2.30) \quad S_{Ak} \approx S_{Bk}$$

Esto es, que la interacción entre A y B se favorece cuando ocurre a través de aquellos átomos cuyas blanduras son aproximadamente iguales: el principio HSAB local.

Otros autores⁴⁶ destacan que, en virtud de la ecuación (2.10), como $S_{Ak} = S_A f_{Ak}$ y $S_{Bk} = S_B f_{Bk}$, S_A puede o no ser igual a S_B , y f_{Ak} no necesariamente debe ser igual a f_{Bk} . Estos mismos autores⁴⁶ demuestran que la minimización de $\Delta\Omega_{Ak}$ respecto de S_{Ak} (a través de la derivada parcial), manteniendo fijos $(\mu_B - \mu_A)$ y S_{Bk} , exige que $S_{Ak} \approx S_{Bk}$.

Con el objeto de caracterizar una región molecular, que incluyera más de un átomo, en este trabajo se utilizó el concepto de blandura grupal de acuerdo a la ecuación definida por Krishnamurty y Pal:³⁴

$$(2.31) \quad S_G = \sum_{k \in G} s_k^\pm$$

donde s_k^\pm se define según la ecuación (2.10).

De este modo, en este estudio se buscaron regiones activas en las moléculas de lumiflavina y 1-metilnicotinamida con valores similares de blandura. Estas regiones, al simular los datos cristalográficos disponibles, se encontrarían muy cerca en el espacio durante el proceso catalítico (ver Figuras 2.3a y 2.3b). Se consideró además que estas regiones reactivas deberían tener formas y tamaños similares en cada molécula, con el objeto de obtener la mejor interacción posible entre ellas. Se buscaron entonces regiones con formas similares y con el mismo número de átomos en cada molécula,

que incluyeran los sitios reactivos N-5 y C-4 α de lumiflavina y C-4 de 1-metilnicotinamida.

2.3 Metodología

Todos los cálculos se realizaron al nivel B3LYP/6-31G, utilizando el programa Gaussian 98.⁵⁰ La geometría de las moléculas estudiadas se optimizó completamente. Las estructuras minimizadas concuerdan plenamente con estudios previos de las moléculas de lumiflavina, oxidada y reducida, y de 1-metilnicotinamida.^{27,28} Los descriptores de estructura electrónica globales μ , η , S y ω , se calcularon de acuerdo a las ecuaciones (2.5) a (2.8) respectivamente. Las funciones de Fukui, f^\pm se obtuvieron a través de la metodología desarrollada por Contreras y col., descrita en el Apéndice II, sección A II.^{43,51} Los índices de reactividad local S_k^\pm y ω_k se calcularon de acuerdo a las ecuaciones (2.10) y (2.11).

2.4 Resultados y Discusión

2.4.1 Blandura grupal

Se ha sugerido que, a distancias cortas, las interacciones de algunas moléculas que presentan actividad biológica podrían ocurrir a través de regiones dentro de las moléculas más bien que a través de todo el esqueleto.^{30,34} De hecho, la reactividad en las flavoproteínas parece estar restringida principalmente a regiones relativamente pequeñas del sistema isaloxazínico que contienen los átomos N-5 y C-4 α .^{1,2,4,12} Por otro lado se ha encontrado que el principio de HSAB de Pearson permite determinar la especificidad y/o eficiencia en la catálisis enzimática y en las interacciones droga-receptor.^{52,53} En este trabajo se tomaron en cuenta estas observaciones al explorar la

reactividad regioespecífica del sistema lumiflavina-1-metilnicotinamida, que se muestra en la Figura 2.3b, en el contexto del principio de HSAB local.³³

La Tabla 2.1 reúne las propiedades locales para lumiflavina y 1-metilnicotinamida en sus diferentes estados de oxidación y protonación. El análisis de la blandura grupal, s_G , para el par **LF-NH** (ver Figura 2.4a), calculado de acuerdo a la ecuación (31), muestra que la blandura grupal de **LF** (el electrófilo), considerando los átomos C-4a, N-5 y C-5a, y el valor de s_G correspondiente en **NH** (el nucleófilo), calculada considerando los átomos C-3, H₁ y C-5 de NH, muestran valores muy similares:

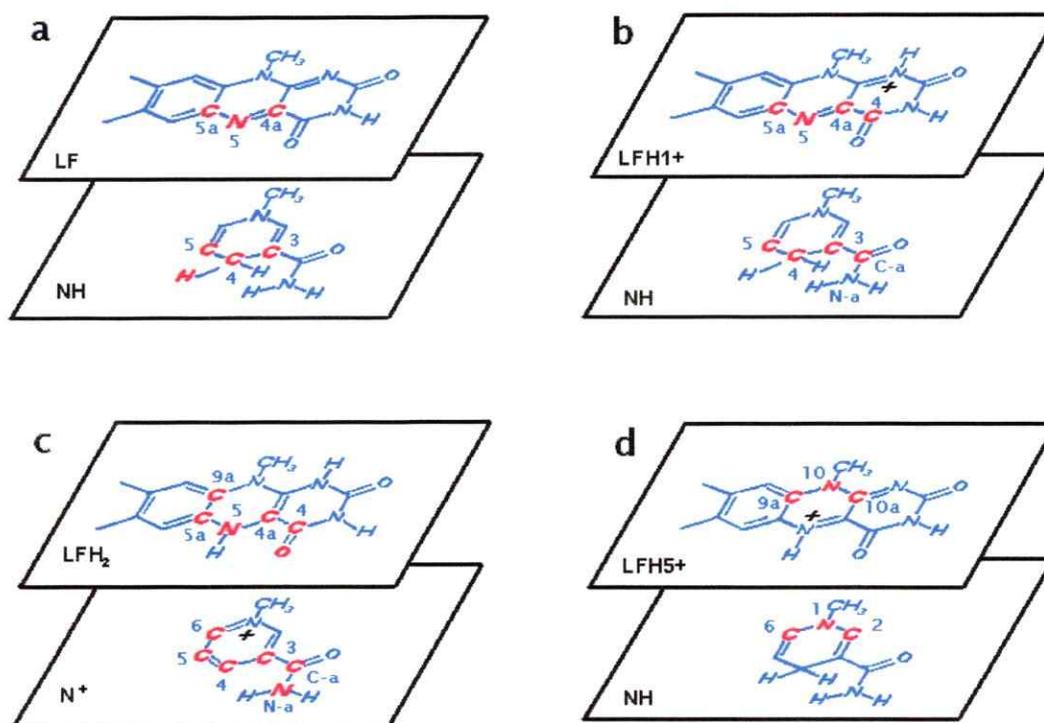


Figura 2.4: Regiones moleculares de lumiflavina y 1-metilnicotinamida con valores similares de blanduras grupales. Sistema LF-NH (a); sistema LFH1⁺-NH (b); sistema LFH₂-N⁺ (c); sistema LFH₅⁺-NH (d).

Tabla 2.1: Índices de reactividad local para lumiflavina y 1-metilnicotinamida

Molécula	Sitio (k)	f^+ (k)	f^- (k)	s^+ (k) (au)	s^- (k) (au)	ω (k) (eV)
NH	N-1	0.0192	0.2683		1.6380	0.0159
	C-2	0.3040	0.0366		0.2236	0.2507
	C-3	0.1242	0.2583		1.5768	0.1025
	C-4	0.0000	0.0126		0.0768	0.0000
	C-5	0.1737	0.1829		1.1166	0.1433
	C-6	0.1030	0.0416		0.2539	0.0850
	C-a	0.1334	0.0030		0.0181	0.1101
	H _i	0.0002	0.0417		0.2544	0.0002
N ⁺	C-3	0.0746		0.4821		0.7071
	C-4	0.3251		2.1001		3.0807
	C-5	0.0060		0.0390		0.0572
	C-6	0.2425		1.5663		2.2976
	C-a	0.0087		0.0561		0.0823
	N-a	0.0043		0.0276		0.0404
LF	N-1	0.0259		0.2116		0.0867
	C-4a	0.1419		1.1584		0.4745
	N-5	0.2513		2.0508		0.8401
	C-5a	0.0000		0.0000		0.0000
LFH1 ⁺	C-4	0.0227		0.1679		0.2480
	C-4a	0.0747		0.5524		0.8163
	N-5	0.2731		2.0195		2.9842
	C-5a	0.0134		0.0991		0.1464

Tabla 1. (Continuación).

Molécula	Sitio (k)	$f^+(k)$	$f^-(k)$	$s^+(k)$ (au)	$s^-(k)$ (au)	$\omega(k)$ (eV)
LFH5 ⁺	C-4a	0.2487		2.8821		4.4581
	N-5	0.1966		2.2784		3.5242
	C-9a	0.0622		0.7208		1.1150
	N-10	0.0996		1.1542		1.7854
	C-10a	0.0151		0.1750		0.2707
LFH ₂	C-4	0.1556	0.0238		0.1881	0.1614
	C-4a	0.0645	0.1136		0.8987	0.0670
	N-5	0.0003	0.2567		2.0306	0.0003
	C-5a	0.0486	0.0418		0.3310	0.0504
	C-9a	0.0570	0.0699		0.5530	0.0592
	O-4	0.1098	0.0504		0.3990	0.1139

$$\begin{aligned}
 (9a) \quad s^+_{\text{G LF}} &= s^+(\text{C-4a}) + s^+(\text{N-5}) + s^+(\text{C-5a}) \\
 &= 1.1584 + 2.0508 + 0.0000 = 3.2092
 \end{aligned}$$

y

$$\begin{aligned}
 (9b) \quad s^-_{\text{G NH}} &= s^-(\text{C-3}) + s^-(\text{H1}) + s^-(\text{C-5}) \\
 &= 1.5768 + 0.2544 + 1.1166 = 2.9478
 \end{aligned}$$

Los valores de blandura grupal para las moléculas de **LF** y **NH** son similares en un 91.8%. La orientación de estas moléculas concuerda con el modelo experimental en la Figura 2.3a. Al incluir el valor de la blandura local de C-4 (ver Figura 2.4a), lo que rompe la condición de la igualdad en el número de átomos en cada unidad del par **LF-NH**, pero no cambia significativamente ni el tamaño ni la forma de las regiones consideradas, la similitud de valores de s_{G} aumenta a un 94.2%. Ninguna otra región o

átomo de la molécula mejora la semejanza de estos valores, aún cuando se consideren átomos lejanos a la región activa.

Para el sistema **LFH1⁺-NH** que se muestra en la Figura 2.4b (lumiflavina oxidada y protonada en N-1), se encontró que las regiones activas constituidas por los átomos C-4, C-4a, N-5 y C-5a de **LFH1⁺** (el electrófilo), y C-a, C-3, C-4 y C-5 de **NH** (el nucleófilo) concentran los valores de s_G de mayor similitud:

$$(10a) \quad s_G^+ \text{LFH1}^+ = s^+(\text{C-4}) + s^+(\text{C-4a}) + s^+(\text{N-5}) + s^+(\text{C-5a}) \\ = 0.1679 + 0.5524 + 2.0195 + 0.0991 = 2.8389$$

y

$$(10b) \quad s_G^- \text{NH} = s^-(\text{C-a}) + s^-(\text{C-3}) + s^-(\text{C-4}) + s^-(\text{C-5}) \\ = 0.0181 + 1.5768 + 0.0768 + 1.1166 = 2.7883$$

Para este sistema (ver Figura 2.4b) la similitud de valores de blandura grupal alcanza el 98.6%.

De acuerdo a datos cristalográficos,⁶ la transhidrogenación desde **LFH₂** a **N⁺** debería involucrar el mismo arreglo geométrico que la reacción en el sentido inverso (ver Figura 2.2). En el sistema **LFH₂-N⁺**, mostrado en la Figura 2.4c, los átomos C-4, C-4a, N-5, C-5a, C-9a y O-4 (oxígeno unido a C-4) de **LFH₂** estarían superpuestos en el espacio a los átomos C-a, C-3, C-4, C-5, C-6 y N-a de **N⁺**. El análisis de blandura grupal predice la siguiente distribución:

$$(11a) \quad s_G^- \text{LFH}_2 = s^-(\text{C-4}) + s^-(\text{C-4a}) + s^-(\text{N-5}) + s^-(\text{C-5a}) + s^-(\text{C-9a}) + s^-(\text{O-4}) \\ = 0.1881 + 0.8987 + 2.0306 + 0.3310 + 0.5530 + 0.3990 = 4.4004$$

y

$$(11b) \quad s_G^+ \text{N}^+ = s^+(\text{C-a}) + s^+(\text{C-3}) + s^+(\text{C-4}) + s^+(\text{C-5}) + s^+(\text{C-6}) + s^+(\text{N-a}) \\ = 0.0461 + 0.4821 + 2.1001 + 0.0390 + 1.5663 + 0.0276 = 4.2712$$

con una similitud de valores de s_G de 97.3% entre ambas subunidades, en una orientación congruente con la que muestra el modelo cristalográfico (ver Figura 2.4c).

Para el sistema **LFH5⁺-NH** (Figura 2.4d), existe alguna controversia en cuanto a la factibilidad de la reacción entre NAD(P)H y la flavina oxidada y protonada en N-5. Mientras que los datos de RMN han entregado pruebas que apoyarían la existencia de puentes de hidrógeno entre la apoproteína y N-5 de la flavina en la enzima OYE (Old Yellow Enzyme), una reductasa flavínica, el valor de pK_a calculado para el átomo N-5 de la flavina oxidada contradice esta hipótesis.⁵⁴ La similitud de blanduras globales en este sistema, 52.7%, es pobre en comparación a las encontradas en los otros sistemas en estudio. Cuando las blanduras grupales incluyen los átomos activos (N-5, C-4a de **LFH5⁺** y C-4 de **NH**), la semejanza de valores es aún más pobre (ver Tabla 2.1 y Figura 2.4d). En este trabajo se pudo encontrar para otras regiones valores similares de s_G , con una similitud de un 96.9%, pero las regiones consideradas (átomos C-9a, N-10 y C-10a en la molécula de lumiflavina, átomos N-1, C-2, y C-6 en la molécula de nicotinamida) no incluyen los centros activos. Este resultado sugeriría que descriptores locales más específicos, como la electrofilia local, podrían ser determinantes en la reactividad, como en los casos de los sistemas **LF-NH**, **LFH1⁺-NH** y **LFH2-N⁺**, lo que se discutirá en la sección siguiente.

Cabe hacer notar que el concepto de blandura grupal en función de la adición de las blanduras locales, aunque reciente, no es nuevo. Ha sido utilizado para predecir la reactividad de compuestos carbonílicos³⁴ y para analizar la reactividad de un polipéptido utilizado para modelar un canal iónico (K^+).⁵⁵ La comparación de blanduras locales entre átomos provenientes de dos moléculas diferentes que interactúan es un concepto más antiguo. Se ha utilizado con excelentes resultados para explicar y predecir la estereoselectividad de las reacciones de cicloadición de

Diels-Alder, ^{46,56} y para predecir sitios de interacción en catalizadores.^{48,57} De esta manera, no debiera sorprender que utilizar estos dos conceptos en conjunto -la reactividad de las moléculas asociada al principio HSAB local y la construcción de una blandura regional a partir de las blanduras locales en torno a los sitios reactivos- sea útil para comprender, y probablemente para predecir, la interacción y/o reactividad de sistemas químicos y bioquímicos.

En resumen, en este estudio se encontraron regiones en las moléculas de lumiflavina (profundada o no) y de 1-metilnicotinamida que presentan tamaños, formas y valores de blandura grupal similares. De acuerdo a los antecedentes cristalográficos, son estas mismas regiones en las moléculas de FAD y NAD(P) las que están en contacto durante el proceso catalítico. Sobre la base de estos resultados, en este trabajo se sugiere que, cuando las moléculas de FAD y NAD(P) se enfrentan a distancias cortas, sus regiones activas se orientarían para optimizar la interacción a través del reconocimiento de regiones moleculares con valores similares de blandura grupal, de acuerdo al principio de HSAB local.

2.4.2 Interacciones específicas

Si bien en este trabajo la comparación de las blanduras grupales entrega información relevante con respecto a la orientación de las moléculas que interactúan, mostrando un excelente acuerdo con el principio de HSAB, la reactividad del sistema sólo quedaría descrita al incorporar otros descriptores de reactividad como la electrofilia.

La Tabla 2.2 resume los índices de reactividad global calculados para lumiflavina y 1-metilnicotinamida, en sus estados oxidados y reducidos. Las estructuras de lumiflavina oxidada protonadas en N-1 y en N-5 (**LFH1⁺** y **LFH5⁺**) también se consideraron. Los valores del potencial químico electrónico (μ) de las moléculas estudiadas predicen correctamente que la densidad electrónica fluye desde **NH** a **LF**, **LFH1⁺** o **LFH5⁺**, y desde **LFH₂** a **N⁺**, dependiendo de la dirección de la catálisis enzimática. Los valores de electrofilia sugieren el siguiente orden: **LFH5⁺** > **LFH1⁺** > **N⁺** > **LF** > **LFH₂** > **NH**. Se observa que la protonación de **LF** aumenta su electrofilia, y por lo tanto podría esperarse que la protonación en N-1 o en N-5 sea el primer paso en algunos mecanismos catalíticos donde el ataque nucleofílico sea determinante. Si se considera que la electrofilia y la nucleofilia se ubican en extremos opuestos de una misma escala, entonces los valores de ω indican apropiadamente que **LF**, **LFH1⁺** y **LFH5⁺** se comportan como electrófilos frente a **NH** (que, a su vez, se comportaría como nucleófilo), mientras que **N⁺** se comportaría como electrófilo frente a **LFH₂**. Según lo establece la ecuación (2.11), el sitio de mayor electrofilia será el que exhibe el mayor valor de la función de Fukui electrofílica, es decir, el sitio activo del electrófilo.

Tabla 2.2: Índices de reactividad global para lumiflavina y 1-metilnicotinamida.

Molécula	μ (eV)	η (eV)	S (au)	ω (eV)	ΔN (e)
N ⁺	-8.9349	4.2129	6.4591	9.4748	0.8185 ^a
NH	-2.7115	4.4575	6.1046	0.8247	
LFH5 ⁺	-9.1751	2.3481	11.5888	17.9256	0.9497 ^b
LFH1 ⁺	-8.9677	3.6798	7.3948	10.9272	0.7688 ^b
LF	-4.7216	3.3342	8.1613	3.3432	0.2580 ^b
LFH ₂	-2.6718	3.4393	7.9120	1.0378	

^aTransferencia de carga desde LFH₂ a N⁺. ^bTransferencia de carga desde NH a lumiflavina neutra o protonada.

Como se mencionara anteriormente, no sólo N-5, sino también N-1 y C-4a se consideran como las posiciones más favorables para recibir el ión hidruro desde la nicotinamida en la molécula de LF. Una inspección de los valores de electrofilia local en la Tabla 2.1 muestra que N-5 posee el valor más alto (0.8401 eV), seguido de C-4a y de N-1 (0.4745 y 0.0867 eV respectivamente). De esta manera, los resultados de este trabajo indican que N-5 sería el sitio preferido frente a un ataque nucleofílico, más allá del impedimento estérico impuesto por la apoproteína, como lo propusieran algunos autores.⁷ Cabe destacar que en NH la electrofilia local en C-4 es nula y que la del hidrógeno transferido (H_t) es muy baja (0.0002), lo cual está de acuerdo con el comportamiento nucleofílico de NH con respecto a LF. Estos resultados concuerdan además con experimentos realizados con flavoenzimas, en los cuales se usó [4-³H]NADH como sustrato reductor, y donde se detectó la transferencia del ión hidruro al átomo N-5 de la isaloxazina.⁵⁸ Cuando la transhidrogenación ocurre en sentido inverso, desde N-5 de LFH₂ a C-4 de N⁺, el mayor valor de electrofilia local se encuentra en C-4 de N⁺, en completo acuerdo con los mecanismos propuestos.⁶ También se observa en este sistema el comportamiento nucleofílico de N⁺ con respecto a LFH₂, representado por los

bajos valores de las electrofilias locales en esta molécula. Los índices locales de **LFH1⁺** indican que la protonación en N-1 aumenta la electrofilia de N-5 casi cuatro veces con respecto al mismo sitio en **LF**, mientras que la de C-4a se ve casi doblada. La protonación en N-5 aumenta fuertemente el poder electrofílico en C-4a (diez veces) con respecto a **LF**, mientras que este índice para N-5 es levemente superior al que se alcanza en **LFH1⁺**.

La blandura global, calculada usando la ecuación (2.7), indica que el valor de *S* de **NH** es similar a las blanduras globales de **LF**, **LFH1⁺** y de **LFH5⁺** en un 74.8%, 82.6% y 52.7% respectivamente (valores obtenidos de la Tabla 2.2). Los valores de *S* para **LFH₂** y **N⁺** alcanzan una similitud de un 81.6%. Debido a que en la reacción de transferencia de hidruro entre flavinas oxidadas y NAD(P)H no está claro si las flavinas están o no protonadas en N-1 o en N-5,^{16,54} pero en la reacción inversa – entre flavinas reducidas y **NAD(P)⁺** - la protonación es irrelevante al considerar la reacción total, este estudio sugiere que se debería tomar este último valor, 81.6%, como un referente enzimático relativo para esta reacción. En este contexto la reacción entre **NH** y **LFH1⁺** debería estar favorecida sobre **LF** o **LFH5⁺**, de acuerdo al principio de HSAB de Pearson.⁵⁹ Los valores de blandura global calculados en este trabajo indican claramente que la reactividad en el sistema lumiflavina-1-metilnicotinamida es una consecuencia de una interacción entre ácidos y bases blandas, donde la ruptura y la formación de enlaces covalentes - como la reacción de transhidrogenación- es el resultado característico de este tipo de interacciones.⁶⁰

Por último se discutirá brevemente la transferencia de carga en la interacción entre **LF** y **NH**. La literatura informa que, en algún punto de varios mecanismos catalíticos de flavoenzimas, las flavinas forman complejos de transferencia de carga con sustratos como NAD(P)H o con otros residuos del sitio activo de algunas

enzimas.^{4,21,61} Se han propuesto tres mecanismos diferentes para la transferencia de hidruro: 1) transferencia de un ión hidruro en un solo paso; 2) transferencia de un electrón seguida de la transferencia de un átomo de hidrógeno o la secuencia inversa, y 3) transferencia de dos electrones y de un protón en tres pasos.^{23,62} Un análisis de los valores de transferencia de carga, ΔN , entre las moléculas A y B, en la Tabla 2.2, se realizó según la versión de Pearson de la ecuación de Ohm³¹: $\Delta N = (\mu_A - \mu_B) / (\eta_A + \eta_B)$. Los resultados muestran que cuando la transhidrogenación ocurre entre **N⁺** y **LFH₂**, se obtiene un valor relativamente alto de ΔN (0.8185 e), lo que indica entonces que el primer o tercer mecanismo podrían estar operando, ambos involucrando la transferencia de dos electrones, en concordancia con la capacidad característica de la nicotínamida oxidada de aceptar dos electrones en forma simultánea.⁶¹ La transhidrogenación entre **NH** y lumiflavina protonada también muestra valores altos de ΔN (0.7688-0.9497e), sugiriendo de igual manera la presencia de un proceso a dos electrones. En contraste, se observa un valor bajo de ΔN para la transhidrogenación desde **NH** a **LF** (0.2580e). Este resultado podría relacionarse con un proceso a un electrón en un primer paso (i.e. el segundo mecanismo), en completo acuerdo con los resultados de un estudio teórico del estado de transición para la transferencia de hidruro en varias enzimas.²³ Resulta interesante que los valores de ΔN se puedan relacionar con los mecanismos propuestos para esta reacción: valores pequeños de ΔN podrían relacionarse con mecanismos radicalarios, mientras que valores más altos podrían estar asociados a mecanismos de transferencia de dos electrones. Además parece ser que, independientemente de la dirección de la catálisis o de si la lumiflavina está o no protonada, existe siempre un proceso de transferencia de carga asociado a la transferencia de hidruro entre lumiflavina y 1-metilnicotínamida.

Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de Massey y Hemmerich¹² en términos de que existen aspectos estructurales comunes que determinan el tipo de reacción catalizada y su regioespecificidad: la protonación de N-1 del núcleo isaloxazínico promueve la activación de N-5 hacia el ataque nucleofílico, mientras que la protonación en N-5 activa la posición C-4a frente al ataque nucleofílico. Sin embargo, Massey y Hemmerich restringieron su propuesta a enzimas capaces de estabilizar los radicales flavínicos "azul" o "rojo" (ver Figura 2.1) como las transferasas electrónicas y las deshidrogenasas/oxidasas respectivamente. Los resultados de este trabajo indican que la proposición de Massey y Hemmerich puede ampliarse a enzimas cuyos intermediarios radicalarios sean muy inestables o no se formen, tales como las flavoproteínas que catalizan reacciones de transhidrogenación, la primera división dentro de su clasificación de flavoenzimas. Además estos resultados sugieren que, cuando la deshidrogenación enzimática ocurre a través de un ataque nucleofílico, la posición del puente de hidrógeno que pudiera formarse entre la isaloxazina y la apoproteína determinaría el sitio de ataque nucleofílico (N-5 o C-4a de la isaloxazina).

2.5 Conclusiones

La reacción de transhidrogenación en el sistema lumiflavina-1-metilnicotinamida se puede comprender como una interacción entre especies blandas, controlada por los orbitales de frontera y bien enmarcada en el principio de HSAB. Descriptores globales, derivados de la parte conceptual de la Teoría de Funcionales de la Densidad, tales como el potencial químico electrónico, la electrofilia y la blandura describen apropiadamente la reactividad del sistema estudiado.

La regioespecificidad de la reacción de transhidrogenación en el sistema lumiflavina-1-metilnicotinamida estaría modulada por propiedades de regiones extendidas dentro de la molécula, las que incluirían más de un centro atómico. En este trabajo se encontró que los sitios reactivos de las moléculas que participan en la interacción están ubicados en regiones de diferentes moléculas, con formas y tamaños similares y que presentan valores muy similares de blandura grupal. El principio de HSAB parece ser fundamental para entender algunos aspectos de la catálisis enzimática, no sólo a nivel molecular global, sino también cuando se debe considerar la regioespecificidad de las reacciones involucradas. En este trabajo se encontró que la blandura grupal, calculada usando las funciones de Fukui, aparece como un índice que puede ser útil para identificar regiones moleculares activas de moléculas que interactúan a distancias cortas. Sin embargo, otras propiedades condensadas a átomos, como la electrofilia local, también son determinantes de la reactividad. El índice de blandura grupal podría ser especialmente útil para comprender interacciones de apilamiento entre macromoléculas y sustratos, no sólo en la catálisis enzimática, sino también en la intercalación de moléculas en el ADN y en las interacciones droga-receptor.

Referencias

- ¹ Fitzpatrick, P. F. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 299.
- ² Ghisla, S.; Massey, V. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *181*, 1
- ³ Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22459.
- ⁴ Weber, S.; Möbius, K.; Richter, G.; Kay, C. W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3790.
- ⁵ Mittl, P. R.; Berry, A.; Scrutton, N. S.; Perham, R. N.; Schulz, G. E. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 1504.
- ⁶ Karplus, P. A.; Daniels, M. J.; Herriot, J. R. *Science* **1991**, *251*, 60.
- ⁷ Tanner, J. J.; Lei, B.; Tu, S.-C.; Krause, K. L. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13531.
- ⁸ Stuehr, D. J.; Ikeda-Saito, M. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 20547.
- ⁹ Bradley, L. H.; Swenson, R. P. *Biochemistry* **1999**, *38*, 12377
- ¹⁰ Efimov, I.; Cronin, C. N.; McIntire, W. S. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2156.
- ¹¹ Zhou, Z.; Swenson, R. P. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15980.
- ¹² Massey, V.; Hemmerich, P. *Biochem. Soc. Trans.* **1980**, *8*, 246
- ¹³ Ghisla, S.; Massey, V. *Biochem. J.* **1986**, *239*, 1.
- ¹⁴ Tedeschi, G.; Chen, S.; Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 2512.
- ¹⁵ Harris, C. M.; Sanders, S. A.; Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 4561.
- ¹⁶ Shinkai, S.; Honda, N.; Ishikawa, Y.; Manabe, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6286.
- ¹⁷ Wouters, J.; Durant, F.; Champagne, B.; André, J.-M. *Int. J. Quant. Chem.* **1997**, *64*, 721.
- ¹⁸ Walsh, C. *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 148.
- ¹⁹ Lantwin, C. B.; Schlichting, I.; Kabsch, W.; Pai, E. F.; Krauth-Siegel, R. L. *Proteins* **1994**, *18*, 161.
- ²⁰ Fieschi, F.; Nivière, V.; Frier, C.; Décourt, J.-L.; Fontecave M. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30392.
- ²¹ Hubbard, P. A.; Shen, A. L.; Paschke, R.; Kasper, C. B.; Kim, J.-J. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 29163.
- ²² Hemmerich, P.; Nagelschneider, G.; Veeger, C. *FEBS Lett.* **1970**, *8*, 69.
- ²³ Andrés, J.; Moliner, V.; Safont, V. S.; Aulló, J. M.; Díaz, W.; Tapia, O. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1996**, *371*, 299.
- ²⁴ Song, P.-S. *J. Phys. Chem.*, **1968**, *72*, 536.
- ²⁵ Sun, M.; Moore, T.; Song, P.-S. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 1730.
- ²⁶ Meyer, M.; Hartwig, H.; Schomburg, D. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1996**, *364*, 139.
- ²⁷ Zheng, Y.-J.; Ornstein, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9402.
- ²⁸ Sustmann, R.; Sicking, W.; Schulz, G. E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 1023.

-
- ²⁹ Díaz, W.; Aulló, J. M.; Paulino, M.; Tapia, O. *Chem. Phys.* **1996**, *204*, 195.
- ³⁰ Park, B.-K.; Doh, S.-T.; Son, G.-S.; Kim, J.-M.; Lee, G.-Y. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1994**, *15*, 291.
- ³¹ Parr, R. G.; Yang, W. (1989) en *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*; Oxford University Press: New York.
- ³² Geerlings, P.; De Proft., F.; Langenaeker, W. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1793.
- ³³ Gázquez, J. L.; Méndez, F. *J. Phys. Chem. A* **1994**, *98*, 4591.
- ³⁴ Krishnamurty, S.; Pal, S. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 7639.
- ³⁵ Pérez, P.; Aizman, A.; Contreras, R. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 3964.
- ³⁶ Domingo, L. R.; Arnó, M.; Contreras, R.; Pérez, P. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 952.
- ³⁷ Pérez, P.; Simon-Manso, Y.; Aizman, A.; Fuentealba, P.; Contreras, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4756.
- ³⁸ Pérez, P.; Toro-Labbé, A. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 1557.
- ³⁹ Parr, R. G.; Donnelly, R. A.; Levy, M.; Palke, W.E. *J. Phys. Chem.* **1978**, *68*, 3801.
- ⁴⁰ Parr, R. G.; Szentpály, L.; Liu, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999** *121*, 1922.
- ⁴¹ Contreras, R.; Domingo, L. R.; Andrés, J.; Pérez, P.; Tapia, O. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 1367.
- ⁴² Pérez, P.; Toro-Labbé, A.; Aizman, A.; Contreras, R. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4747.
- ⁴³ Contreras, R.; Fuentealba, P.; Galván, M.; Pérez, P. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *304*, 405.
- ⁴⁴ Li, Y.; Evans, J. N. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995** *117*, 7756.
- ⁴⁵ Krishnamurty, S.; Roy, R. K.; Vetrivel, R.; Iwata, S.; Pal, S. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 7253.
- ⁴⁶ Damoun, S.; Van de Woude, G.; Méndez, F.; Geerlings, P. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 886.
- ⁴⁷ Méndez, F.; Romero, M. de L.; De Proft., F.; Geerlings, P. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5774.
- ⁴⁸ Chatterjee, A.; Iwasaki, T.; Takeo, E. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 2489.
- ⁴⁹ Chattaraj, P. K.; Hsing, L.; Parr, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1855.
- ⁵⁰ Gaussian 98: Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudín, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.;

Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; González, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andrés, J. L.; González, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. Gaussian Inc.; Pittsburgh, PA, 1998.

⁵¹ Fuentealba, P.; Pérez, P.; Contreras, R. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 2544.

⁵² Li, Y.; Evans, J. N. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1996**, *93*, 4612.

⁵³ Aliste, M. P. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2000**, *507*, 1.

⁵⁴ Fox, K. M.; Karplus, P. A. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 9357.

⁵⁵ Ireta, J.; Galván M.; Cho, K; Joannopoulos, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9771.

⁵⁶ Cong, Y.; Yang, Z.-Z.; Wang, C.-S.; Liu, X.-C.; Bao, X.-H *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *357*, 59.

⁵⁷ Langenaeker, W.; Coussement, N.; De Prof., F.; Geerlings, P. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 3010.

⁵⁸ Louie, D.; Kaplan, N. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 5691.

⁵⁹ Pearson, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533.

⁶⁰ Chattaraj, P. K. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 511.

⁶¹ Batie, C. J.; Kamin, H. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 11214.

⁶² Iribarne, F.; Paulino, M.; Tapia, O. *Theor. Chem. Acc.* **2000**, *103*, 451.

CAPÍTULO 3. ESTUDIO TEÓRICO DE LA INTERACCIÓN β -CARBOLINA-LUMIFLAVINA Y SU APLICACIÓN A LA INHIBICIÓN DE LA MONOAMINOOXIDASA A

3.1 Introducción

El esqueleto β -carbolínico (9-H-pirido[3,4-b]indol) ha sido objeto de intensos estudios químicos y bioquímicos debido al reconocido interés farmacológico que presenta, según se señalara en el Capítulo 1 de esta tesis. Sin embargo, existen pocos estudios teóricos que permitan comprender tanto la reactividad química^{1,2} como la actividad biológica³ de estos compuestos. Los cálculos semiempíricos realizados en el estudio de las β -carbolinas utilizando la metodología AM1 predicen correctamente las propiedades estructurales y los sitios de protonación de estas moléculas. Sin embargo, el estudio de la reactividad, realizado con la misma metodología y analizado en base a las densidades electrónicas de los orbitales de frontera, de las cargas atómicas netas y de los mapas de potenciales electrostáticos,⁴ entrega respuestas parciales, y en algunos casos se contraponen con la evidencia experimental o no existen datos experimentales para validarla.

3.2 Formación de complejos de transferencia de carga entre β -carbolinas y flavinas

Se ha observado que las flavinas (riboflavina, FMN, FAD) forman complejos de transferencia de carga (CTC) con sustratos biológicos o con residuos de los sitios activos de algunas enzimas.^{5,6} Por otro lado, β -carbolinas como harmina y harmalina

(estructuras **8** y **7** respectivamente) son potentes inhibidoras de la enzima monoaminoxidasa A.^{7,8} Puesto que la monoaminoxidasa A contiene como grupo prostético moléculas de FAD (flavina adenina dinucleótido), un grupo de autores estudió la formación de CTC entre los alcaloides norharmano (**3**), harmano (**6**), harmol (**24**), harmina (**8**), harmalol (**20**), harmalina (**7**) y 6-metoxiharmalano (**21**) y las flavinas riboflavina (RFN)^{9,10} y FAD,^{11,12} en un intento por encontrar una posible explicación de la actividad inhibitoria de estas moléculas.

Los complejos moleculares se detectaron por espectrofotometría, a través de la diferencia entre espectros de una solución de flavina y de la misma solución con concentraciones variables de β -carbolina. Los espectros se registraron a pH 6 en un buffer de fosfato, en un intervalo de temperatura de 5 a 45° C. Los complejos de transferencia de carga se formaron con una relación estequiométrica 1:1 (flavina/ β -carbolina). Se midió la constante de asociación K_{DA} , correspondiente al equilibrio



donde D es el donador de electrones (flavina), A el aceptor de electrones (β -carbolina), y DA el complejo molecular. Se tiene entonces que

$$(3.2) \quad K_{DA} = [DA] / [D] [A]$$

Las Tablas 3.1 y 3.2 muestran los valores de K_{DA} obtenidos experimentalmente para las asociaciones riboflavina- β -carbolina y FAD- β -carbolina respectivamente. También se indican los valores de λ_{max} con sus respectivos coeficientes de extinción molar, ϵ_{CT} , de las bandas de absorción de los complejos.

Tabla 3.1: Constantes de equilibrio (K_{DA}) para la asociación riboflavina- β -carbolina

Donor	λ_{max} (nm)	ϵ_{TC} (l/mol cm)	K_{DA} (l/mol)			
			5° C	15° C	27° C	45° C
Norharmano [†] (3)	491	1750	344	271	195	134
Harmano (6)	492	1460	548	414	314	220
Harmol (24)	495	1760	993	708	496	286
Harmina (8)	494	1660	1400	1057	735	411
Harmalol [‡] (20)	494	2715	321	230	190	115
Harmalina (7)	496	1430	611	496	351	248
6-Metoxiharmalano (21)	492	3895	476	389	154	134

[†] Valores obtenidos de la referencia 9. [‡] Valores obtenidos de la referencia 10.

Tabla 3.2: Constantes de equilibrio (K_{DA}) para la asociación FAD- β -carbolina

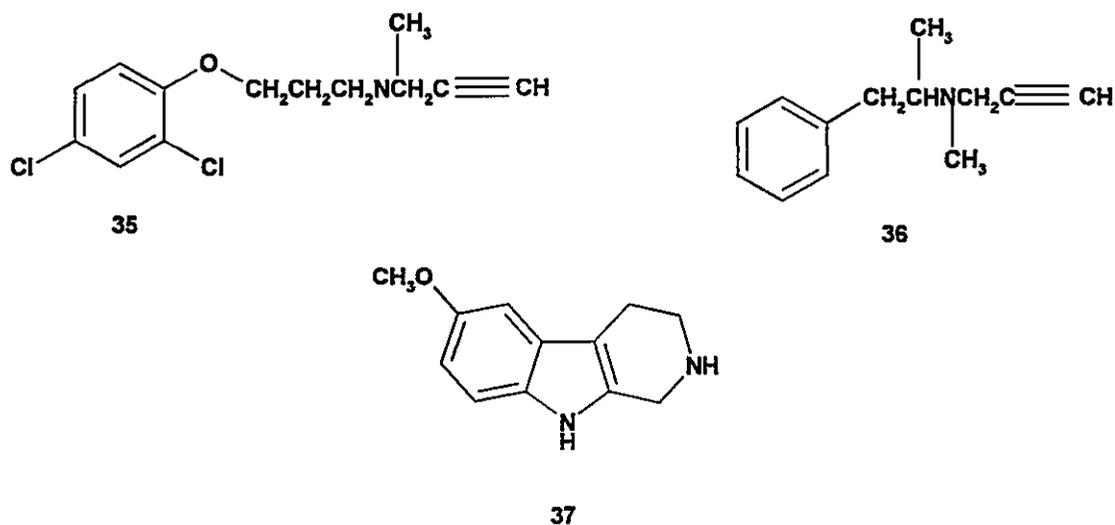
Donor	λ_{max} (nm)	ϵ_{TC} (l/mol cm)	K_{DA} (l/mol)			
			5° C	15° C	25° C	45° C
Norharmano [†] (3)	499	1645	257	219	152	128
Harmano (6)	499	1125	852	630	509	346
Harmol (24)	502	1425	1400	783	560	314
Harmina (8)	503	1395	1802	1111	752	459
Harmalol [‡] (20)	505	3280	264	160	125	-
Harmalina (7)	506	1670	443	359	273	184
6-Metoxiharmalano (21)	504	2000	561	449	391	237

[†] Valores obtenidos de la referencia 11. [‡] Valores obtenidos de la referencia 12.

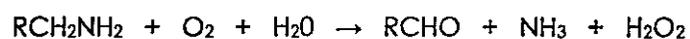
Se observa que la banda de absorción de los complejos aparece a longitudes de onda (491-506 nm) donde tanto las β -carbolinas como las flavinas estudiadas son transparentes. La temperatura afecta negativamente la formación de los complejos, de manera que K_{DA} disminuye cuando la temperatura aumenta. Se observa también que los valores de K_{DA} de las dihidro- β -carbolinas son menores que los de las β -carbolinas totalmente aromáticas correspondientes (comparar harmína con harmalina y harmol con harmalol), lo que estaría de acuerdo con que la nube π está íntimamente involucrada en la transferencia de carga, según proponen los autores.¹⁰ El efecto de los sustituyentes en el núcleo piridoindólico se discute en términos del efecto que éstos tienen en la polaridad de la molécula (orden de polaridad propuesto: $H < OH < CH_3$).⁹ Por último, los autores sugieren que los grupos OH estarían involucrados en otras interacciones como puentes de hidrógeno y/o interacciones con el solvente.⁹⁻¹¹

3.3 Oxidación de aminas catalizada por MAO

Las monoaminoxidasas (MAO) son flavoenzimas que catalizan la degradación de aminas neuroactivas y vasoactivas en el sistema nervioso central y en tejidos periféricos.¹³ Existen dos formas principales, la isoenzima A y la isoenzima B, las que son inhibidas selectivamente por clorgilina (**35**) y L-deprenil (**36**) respectivamente.¹⁴ Los compuestos que inhiben la MAO A presentan efectos antidepresivos, mientras que los compuestos que inhiben la MAO B se utilizan en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.¹⁵



La desaminación oxidativa que catalizan las MAO para dar el aldehído correspondiente se representa por la siguiente ecuación:¹³



Se ha propuesto el siguiente mecanismo de catálisis enzimática para MAO A y

B:

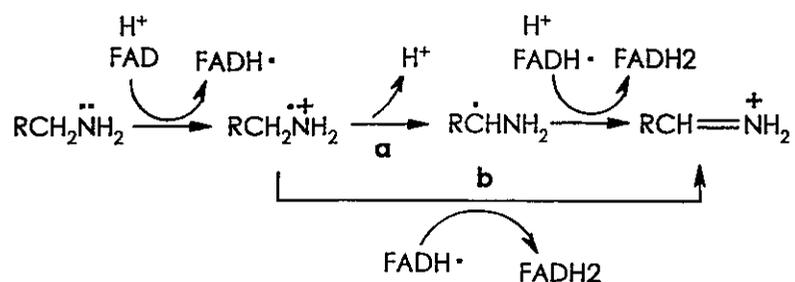


Figura 3.1: Mecanismo propuesto para la oxidación de aminas catalizada por MAO.

El mecanismo propuesto en la Figura 3.1 involucra inicialmente la transferencia de un electrón desde la amina al grupo prostético FAD de la enzima, generándose un radical catiónico de la amina y un radical flavínico (ver Figura 2.1). La oxidación posterior a través de la transferencia de un protón y de la transferencia de un segundo electrón desde la amina a la forma semiquinónica del FAD produciría el catión iminio y la forma reducida del FAD.¹⁶ También se ha propuesto como mecanismo el ataque nucleofílico del par electrónico de la amina desprotonada a la posición 4a de la flavina (ver Figura 2.2 para la numeración).¹⁷ Un tercer mecanismo propuesto es el ataque nucleofílico del par electrónico de la amina a la posición 4a de la flavina, concertado con la ruptura de un enlace C-H en la posición α con respecto al grupo amino.¹⁸ Todos estos mecanismos se han propuesto en base a pruebas experimentales.

Existe un amplio consenso en que el mecanismo propuesto en la Figura 3.1 ocurriría preferentemente en la MAO B. A diferencia de los mecanismos propuestos basados en un ataque nucleofílico en la posición 4a de la flavina, de acuerdo con el mecanismo de la Figura 3.1 se ha observado la formación de un aducto entre el radical catiónico y N-5 de la forma semiquinónica de la flavina.¹⁹ De esta manera pareciera que las diferencias mecanísticas entre las isoformas de la MAO radicarían en el ataque radicalario o nucleofílico en los pasos iniciales de la catálisis y en la formación de aductos covalentes y reversibles en las posiciones 4a o N-5.

3.4 β -Carbolinas y la inhibición de monoaminoxidasas

Puesto que las β -carbolinas endógenas son principalmente tetrahydro- β -carbolinas, los primeros informes sobre la actividad inhibitoria de MAO correspondieron a este tipo de alcaloides, de baja actividad inhibitoria.²⁰ Estudios de inhibición posteriores realizados con β -carbolinas con diferente grado de insaturación informaron

actividades inhibitorias superiores, pero no suficientes como para ser consideradas buenos inhibidores de MAO.²¹ Las bajas actividades obtenidas en estos trabajos antiguos parecen deberse a la incapacidad de diferenciar entre las isoformas A y B al utilizar triptamina en la determinación de la actividad, ya que ésta es sustrato de ambas isoenzimas.

El descubrimiento de inhibidores selectivos de MAO-A y MAO-B ha hecho posible la medición específica de la actividad inhibitoria de diversas moléculas en diferentes tejidos, lo que ha sido de gran utilidad clínica debido a las diferentes potencialidades terapéuticas que presentan los inhibidores de la MAO-A y de la MAO-B.

La Tabla 3.3 resume los valores de constantes de inhibición (K_i) de β -carbolinas frente a MAO-A y MAO-B obtenidas desde diferentes tejidos: cerebro de rata,²² retina de vacuno²³ e hígado humano.²⁴

Se observa que todas las β -carbolinas utilizadas, con excepción del norharmano, son inhibidores selectivos de MAO-A. Además, tanto la harmina como la harmalina son inhibidores potentes de esta enzima. Se observa que la presencia de un grupo metilo en la posición 1 y la presencia de un grupo metoxilo en la posición 7 (ver estructura 1 en la Figura 3.2 de este capítulo para la numeración) aumentan la actividad IMAO-A de estos compuestos, mientras que un metoxilo en la posición 6 o un hidroxilo en la posición 7 disminuyen la actividad. Estas conclusiones parecen aplicarse tanto a las β -carbolinas totalmente aromáticas como a las dihidro- β -carbolinas. La diferencia de los valores de K_i de la MAO-A con el mismo sustrato se explica considerando que, de diferentes tejidos, se obtienen diferentes isoenzimas con diferentes afinidades por los sustratos. Con respecto a la MAO-B, las β -carbolinas

resultaron ser inhibidores pobres de esta enzima, con la excepción del norharmano, que presenta una potencia inhibitoria moderada.

Tabla 3.3: Constantes de inhibición de MAO de β -carbolinas

Compuesto	K _i MAO-A (nM)			K _i MAO-B (nM)
	T1 ^a	T2 ^b	T3 ^c	T1 ^a
Norharmano (3)	2200		3340	730
Harmano (6)	220	27	260	57000
Harmina (8)	6,7	3,8	5	ND
6-Metoxiharmano (25)		872		
Harmol (24)	258	155		590000
Harmalina (7)	6,4	6,7	48	62000
6-Metoxiharmalano(21)		597	390	
Harmalol (20)	430	273		130000
THBC (1)	2200	1850		140000
THH (4)	103			100000
6-MTHBC (37)		1750		
Clorgilina (35)	6,3			ND
L-Deprenil (36)	ND			15

Las enzimas MAO-A y/o MAO-B se obtuvieron de los siguientes tejidos: ^a T1, cerebro de rata (valores extraídos de la referencia 22); ^b T2, retina de vacuno (valores extraídos de la referencia 23); ^c T3, hígado humano (valores extraídos de la referencia 24). THBC, 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina; THH, 1,2,3,4-tetrahidroharmano; 6-MTHBC, 6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina. ND, no se detectó inhibición.

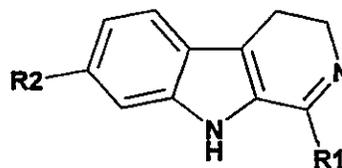
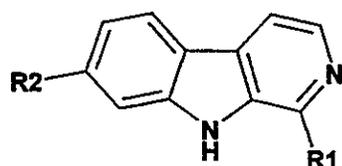
En este capítulo se presenta una descripción teórica de una serie de β -carbolinas y se analiza la interacción entre estos alcaloides y las flavinas riboflavina y FAD, basada en los antecedentes experimentales descritos en la sección 3.2, y de los descriptores de estructura electrónica definidos en el marco conceptual de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) y del Principio de Ácidos y Bases Duros y Blandos

(HSAB).²⁵ Posteriormente se explora la actividad biológica de β -carbolinas frente a la flavoenzima MAO-A, basada en los antecedentes experimentales descritos en la sección 3.4 y considerando los descriptores de estructura electrónica en conjunto con otras características fisicoquímicas como la lipofilia y el pK_a . Se presenta además el resultado de la medición de la actividad inhibitoria de las enzimas MAO-A y MAO-B de dos β -carbolinas cuya actividad no era conocida al iniciar este trabajo.

3.5 Metodología

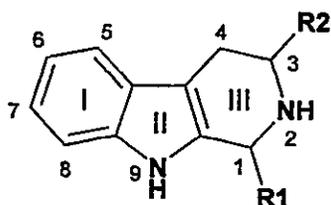
3.5.1 Cálculos teóricos

Todos los cálculos se realizaron a nivel B3LYP/6-31G, utilizando el programa Gaussian 98.²⁶ La Figura 3.2 muestra las estructuras de las β -carbolinas analizadas teóricamente, cuya geometría se optimizó completamente. Al igual que en el Capítulo 2 de esta tesis, se escogió la molécula lumiflavina (ver LF en la Figura 2.2) como modelo simplificado de las flavinas FAD y riboflavina. Se consideró además la serie de β -carbolinas de la Figura 3.2, de amplia y variada actividad biológica, y que a pH fisiológico (7.4) se encontrarían protonadas en N-2: norharmano (NHH+), harmano (HNOH+), harmina (HNAH+), harmol (HOLH+), harmalina (HLNAH+), harmalol (HLOLH+) y THBC (THBCH+).

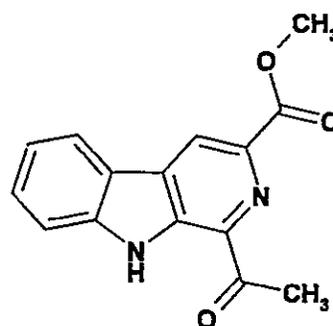


- (3) R1 = R2 = H (Norharmano)
 (6) R1 = CH₃, R2 = H (Harmano)
 (38) R1 = H, R2 = OCH₃
 (8) R1 = CH₃, R2 = OCH₃ (Harmina)
 (39) R1 = H, R2 = OH
 (24) R1 = CH₃, R2 = OH (Harmol)

- (40) R1 = R2 = H (DHBC)
 (41) R1 = CH₃, R2 = H (Harmalano)
 (7) R1 = CH₃, R2 = OCH₃ (Harmalina)
 (20) R1 = CH₃, R2 = OH (Harmalol)



- (1) R1 = R2 = H (THBC)
 (42) R1 = CH₃, R2 = COOH (AHTC)



(43) BCF

Figura 3.2: Estructura de las β -carbolidinas estudiadas teóricamente.

Los descriptores de estructura electrónica potencial químico electrónico (μ), dureza química (η), blandura química (S) y electrofilia (ω) se calcularon de acuerdo a las ecuaciones (2.5) a (2.8). El descriptor N_{MAX} (carga crítica), asociado a la máxima cantidad de carga que un electrófilo puede aceptar desde su entorno, se define por la siguiente relación cuantitativa: ²⁵

$$(3.1) \quad N_{MAX} = -\frac{\mu}{\eta}$$

mientras que el descriptor ΔN , asociado a la transferencia de carga desde una molécula de mayor a otra de menor potencial químico electrónico se ha definido cuantitativamente según la expresión de Pearson de la ley de Ohm,²⁵

$$(3.2) \quad \Delta N = \frac{\mu_A - \mu_B}{2(\eta_A + \eta_B)}$$

donde $\Delta N > 0$.

3.5.2 Actividad inhibitoria de MAO de β -carbolinas

3.5.2.1 Compuestos químicos

Todos los compuestos químicos utilizados fueron de la más alta pureza disponible en el mercado. Los solventes tetrahidrofurano (THF) y acetonitrilo (ACN) fueron de calidad para HPLC de la firma Merck. Los clorhidratos de norharmano (**3**), harmina (**8**) y harmalina (**7**) se obtuvieron de Aldrich. El ácido harman-1,2,3,4-tetrahidro-3-carboxílico (AHTC, **42**) se obtuvo de Sigma. La β -carbolina BCF (1-acetil-3-carbometoxi- β -carbolina, **43**) fue gentilmente donada por la profesora Francesca Faini.²⁷ Los compuestos 5-hidroxitriptamina (5-HT), ácido 5-hidroxi-indolilacético (5-HIAA), 4-dimetilaminofeniletamina (DMAPEA), ácido 4-dimetilaminofenilacético (DMAPAA), β -nicotinamida adenina dinucleótido (β -NAD) y la enzima aldehído deshidrogenasa (AldDH) de levadura se obtuvieron de Sigma.

3.5.2.2 Ensayos enzimáticos

El efecto de las β -carbolinas **3**, **7**, **8**, **42** y **43** en la actividad de las MAO-A y MAO-B se estudió utilizando una suspensión mitocondrial cruda de cerebro de rata. El tejido se preparó utilizando cerebro de rata sin cerebelo.²⁸ Las ratas macho, Sprague-Dawley, pesaron 200-240 g. La actividad de la MAO mitocondrial se determinó por CLAE (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia) con detección electroquímica, utilizando sustratos selectivos para la isoforma A (5-HT) y para la isoforma B (DMAPEA).^{28,29}

Para determinar la inhibición de la MAO-A se incubó una mezcla consistente en 25 μL de una solución 50 μM de 5-HT (en una concentración final 2,5 μM en un volumen final de 0,5 mL); 225 μL de un tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4; el inhibidor cuya actividad sería medida en concentraciones que variaron entre 10 nM y 100 μM , en 50 μL de agua destilada; y 200 μL de la suspensión mitocondrial.³⁰ Para la MAO-B la mezcla de incubación consistió en 25 μL de una solución de DMAPEA 100 μM (en una concentración final 5 μM en un volumen final de 0,5 mL); 105 μL de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4; AldDH (0,8 unidades) y β -NAD (0,6 μmol) disueltos en 200 μL del tampón de fosfato; el inhibidor cuya actividad sería medida en concentraciones que variaron entre 10 nM y 100 μM , en 50 μL de agua destilada; y 120 μL de la suspensión mitocondrial.³⁰ Las reacciones comenzaron con la adición de la suspensión mitocondrial. Las mezclas se incubaron por 10 min (MAO-A) y 5 min (MAO-B) a 37 °C en un baño de agua con agitación constante en tubos de Eppendorf abiertos. Las reacciones se detuvieron con la adición de 200 μL de HClO_4 1 M. Las mezclas se centrifugaron a 15000 x g por 5 min a 4 °C y se inyectó una alícuota de 50 μL del sobrenadante en el equipo de CLAE. Se realizaron además experimentos de control sin

inhibidores y blancos sin suspensión mitocondrial. En todos los casos los volúmenes se ajustaron con el tampón de fosfato 0,1 M. Cada experimento con inhibidor se realizó por triplicado. Para calcular la actividad de las MAO se consideraron las alturas de los picos cromatográficos de 5-HT, DMAPEA y sus respectivos metabolitos principales generados por acción de la MAO, 5-HIAA y DMAPAA. Los valores de IC_{50} se determinaron de los gráficos de % de inhibición, calculados en relación a experimentos realizados en las mismas condiciones pero sin inhibidor, versus \log [Inhibidor].

3.5.2.3 Condiciones cromatográficas

Se utilizó una columna de fase reversa C18 (ODS 250 x 4,6 mm, BIOPHASE, U.S.A.) y un detector amperométrico (BAS LC-3A). El flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min, con la siguiente composición: 31,5 g de ácido cítrico, 908 mL de agua bidestilada, NaOH 12 N en cantidad suficiente para ajustar el pH a un valor de 3, 200 mg de sulfato de octilo, 42 mL de ACN y 50 mL de THF. La sensibilidad del detector fue de 10 nA y el potencial de oxidación se fijó en 0,85 V utilizando un electrodo de trabajo de carbono vítreo versus un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

3.6 Resultados y discusión

3.6.1 Geometría de las β -carbolinas estudiadas teóricamente

Las tablas 3.4 y 3.5 reúnen las energías totales y los principales parámetros geométricos calculados al nivel de teoría B3LYP/6-31G para las β -carbolinas en estudio.

Tabla 3.4: Energías totales y ángulos de enlace de β -carbolinas calculados al nivel de teoría B3LYP/6-31G.

Compuesto	Energía Total (ua)	Angulo de Enlace (°)	
		C8a-N9-C9a	C1-N2-C3
Norharmano (3)	-533,3670	109,4	119,2
Harmano (6)	-572,6797	109,3	120,0
38	-647,8503	109,3	119,1
Harmina (8)	-687,1629	109,3	119,9
39	-608,5560	109,4	119,1
Harmol (24)	-647,8686	109,3	119,9
BCF (43)	-913,7790	109,4	119,8
DHBC (40)	-534,5451	108,7	117,5
Harmalano (41)	-573,8588	108,8	118,5
Harmalina (7)	-688,3415	108,9	118,3
Harmalol (20)	-649,0472	108,8	118,4
THBC (1)	-535,7581	109,0	115,8
AHTC (42)	-763,5667	109,1	117,3
<i>β-Carbolinas protonadas en N-2</i>			
NHH+	-533,7677	109,3	123,9
HNOH+	-573,0839	109,2	124,9
HNAH+	-687,5722	109,3	124,7
HOLH+	-648,2755	109,2	124,7
HLINAH+	-688,7610	108,7	122,6
HLOLH+	-649,4641	108,7	122,8
THBCH+	-536,1442	108,6	112,1

Tabla 3.5: Ángulos dihédricos de dihidro- y tetrahidro- β -carbolinas

Compuesto	Ángulos dihédricos ($^{\circ}$)		
	C1-N2-C3-C4	C4-C4a-C4b-C5	C8a-N9-C9a-C1
DHBC (40)	31,9	5,2	177,3
Harmalano (41)	32,7	4,8	177,3
Harmalina (7)	33,3	5,1	176,9
Harmalol (20)	33,0	5,1	176,9
THBC (1)	65,7	0,6	179,1
AHTC (42)	66,5	1,5	179,1
β -Carbolinas protonadas en N-2			
HLINAH+	38,9	6,1	173,8
HLOLH+	38,3	6,1	173,8
THBCH+	66,5	1,5	179,6

Todas las β -carbolinas totalmente aromáticas, protonadas o no, son completamente planas, con todos los valores de ángulos dihédricos iguales a 0° o 180° , incluyendo los de los sustituyentes, los que no afectan la planaridad de estas moléculas en su conformación más estable.

En las dihidro- β -carbolinas el sistema indólico (anillos I y II, ver estructura 1 en la Figura 3.2) es casi completamente plano, presentando desviaciones inferiores a 1° en los ángulos dihédricos incluyendo también los de los sustituyentes. Sin embargo, y de acuerdo a la naturaleza sp^3 de los C-3 y C-4, en el anillo III el enlace C4-C4a se desvía entre 5° y 6° del plano del sistema indólico (dependiendo de la protonación), mientras que el enlace C9a-C1 lo hace entre 3° y 6° (ver Tabla 3.5). El ángulo dihédrico formado por los átomos C1-N2-C3-C4 presenta valores en torno a los 33° en las moléculas neutras y 38° en las moléculas protonadas.

Las tetrahydro- β -carbolinas, de manera similar a las dihydro- β -carbolinas, presentan un sistema indólico bastante plano, incluso con desviaciones inferiores a $0,2^\circ$, menores que en el caso de los alcaloides con el anillo piridínico dihidrogenado. Los enlaces C4-C4a y C9a-C1 se desvían entre $0,6^\circ$ y $1,5^\circ$ del plano indólico respectivamente. El ángulo dihédrico formado por los átomos C1-N2-C3-C4 presenta valores en torno a los 66° independientemente de la protonación de la molécula.

El ángulo de enlace que incluye a N-9 en (C8a-N9-C9a) permanece casi inalterado, independientemente de la geometría del resto de la molécula, de la protonación y de la sustitución que ésta presenta (ver Tabla 3.4). En cambio, el ángulo de enlace que incluye a N-2 (C1-N2-C3) en las moléculas neutras varía desde 119° , en concordancia con la naturaleza sp^2 de este átomo en las β -carbolinas totalmente aromáticas, a 115° en el sistema tetrahydro, en concordancia con la naturaleza sp^3 del átomo de N. La protonación en N-2 genera la apertura del ángulo C1-N2-C3 en alrededor de 4° en las β -carbolinas y dihydro- β -carbolinas. En cambio parece ser que en las especies tetrahydrogenadas el protón en N-2, con una geometría cercana a la de un tetraedro regular (112°), permite la mayor estabilización a esta molécula.

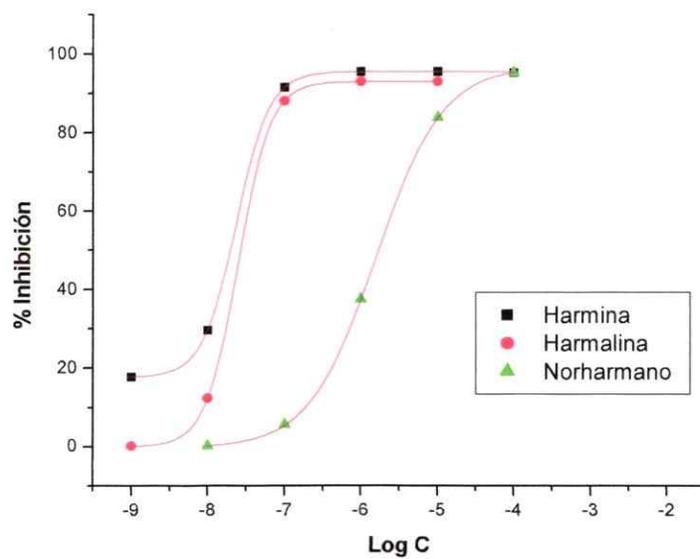
3.6.2 Actividad IMAO de algunas β -carbolinas

Se estudió la actividad IMAO-A y B en isoenzimas provenientes de cerebro de rata de cinco β -carbolinas: norharmano, harmina, harmalina, BCF y AHTC (ver Figura 3.2). En los casos de BCF (43) y AHTC (42) se informa la actividad IMAO por primera vez. La Tabla 3.6 y la Figura 3.3 resumen los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 3.6: Actividades IMAO-A e IMAO-B de algunas β -carbolinas en enzimas provenientes de cerebro de rata.

Compuesto	Concentración (M)	% Inhibición		CI ₅₀ (nM)		K _i (nM)	
		MAO-A	MAO-B	MAO-A	MAO-B	MAO-A	MAO-B
Norharmano	10 ⁻⁴	95,1	93,8	1600	840	1572	452
	10 ⁻⁵	83,7	92,6				
	10 ⁻⁶	37,3	49,1				
	10 ⁻⁷	5,5	18,6				
	10 ⁻⁸	0,0	0,0				
Harmina	10 ⁻⁴	95,1	51,8	23	2800	22,6	1505
	10 ⁻⁵	95,4	45,8				
	10 ⁻⁶	95,4	10,9				
	10 ⁻⁷	91,4	0,0				
	10 ⁻⁸	29,6	-				
	10 ⁻⁹	17,7	-				
Harmalina	10 ⁻⁴	92,8	18,0	25	-	24,6	-
	10 ⁻⁵	92,8	0,0				
	10 ⁻⁶	92,8	-				
	10 ⁻⁷	88,0	-				
	10 ⁻⁸	12,3	-				
	10 ⁻⁹	0,0	-				
BCF	10 ⁻⁴	12,0	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁵	0,0	5,3				
AHTC	10 ⁻⁴	0,0	2,5	-	-	-	-

(a)



(b)

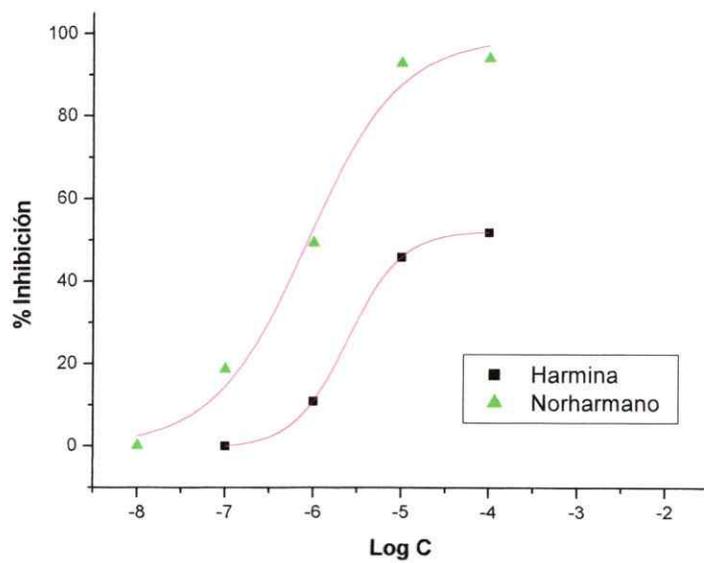


Figura 3.3: Actividades IMAO-A (a) y B (b) de algunas β -carbolinas.

Las actividades IMAO-A de norharmanto, harmina y harmalina concuerdan con los resultados informados por otros autores (ver Tabla 3.3). En este trabajo la harmina resultó ser un IMAO-A levemente más potente que la harmalina, con una $K_i = 22,6$ nM, mientras que el norharmanto es un IMAO-A de menor potencia. AHTC y BCF poseen actividades IMAO muy bajas (inferiores al 12% en concentraciones 100 μ M). Con respecto a la actividad IMAO-B, sólo el norharmanto se destaca presentando una $K_i = 452$ nM. La harmina es un inhibidor pobre de MAO-B, mientras que la harmalina no es activa como IMAO-B.

3.6.3 Estudio de la interacción β -carbolina-lumiflavina sobre la base de descriptores de estructura electrónica.

3.6.3.1 Descriptores de estructura electrónica de β -carbollinas.

Las Tablas 3.7 y 3.8 resumen los índices de reactividad global calculados para las β -carbollinas en estudio. Con el objeto de simplificar el análisis se incluyeron los descriptores calculados en el Capítulo 2 para las moléculas de lumiflavina oxidada y protonadas en el N-1 o en el N-5 (LF, LFH1⁺ y LFH5⁺, ver Figuras 2.2 y 2.4).

Tabla 3.7: Índices de reactividad global para lumiflavina y β -carbolinas neutras.

Molécula	μ (eV)	η (eV)	ω (eV)	S (ua)	N_{MAX}	ΔN^a	$\Delta N1^b$	$\Delta N5^c$
LF	-4,7216	3,3342	3,3431	8,1613	1,4161			
LFH1+	-8,9677	3,6798	10,9272	7,3948	2,4382			
LFH5+	-9,1751	2,3481	17,9256	11,5888	3,9075			
NH ^d	-3,4798	4,7125	1,2848	5,7743	0,7384	0,1543	0,6543	0,8066
HNO	-3,3648	4,7128	1,2012	5,7740	0,7140	0,1686	0,6680	0,8229
38	-3,3597	4,8363	1,1669	5,6265	0,6947	0,1667	0,6589	0,8094
HNA	-3,2621	4,8660	1,0934	5,5922	0,6704	0,1780	0,6680	0,8196
39	-3,4503	4,8690	1,2225	5,5888	0,7086	0,1550	0,6458	0,7932
HOL	-3,3413	4,8763	1,1448	5,5804	0,6852	0,1681	0,6580	0,8075
BCF	-4,2115	4,0170	2,2078	6,7741	1,0484	0,0694	0,6183	0,7798
DHBC	-3,3634	4,2167	1,3413	6,4533	0,7976	0,1799	0,7101	0,8853
HLNO	-3,2536	4,3051	1,2294	6,3207	0,7557	0,1922	0,7160	0,8900
HLNA	-3,0704	4,1936	1,1240	6,4889	0,7322	0,2193	0,7494	0,9332
HLOL	-3,1365	4,1958	1,1724	6,4855	0,7476	0,2105	0,7408	0,9228
THBC	-2,5435	5,2007	0,6220	5,2323	0,4891	0,2552	0,7238	0,8785
AHTC	-2,8650	4,8554	0,8453	5,6044	0,5901	0,2267	0,7154	0,8760

^a Transferencia de carga desde las β -carbolinas hacia LF. ^b Transferencia de carga desde las β -carbolinas hacia LFH1+. ^c Transferencia de carga desde las β -carbolinas hacia LFH5+. ^d Abreviaturas: NH, norharmario; HNO, harmario; HNA, harmarina; HOL, harmol; HLNO, harmalano; HLNA, harmalina; HLOL, harmalol.

Tabla 3.8: Índices de reactividad global para lumiflavina y β -carbolinas protonadas en el N-2.

Molécula	μ (eV)	η (eV)	ω (eV)	S (ua)	N_{MAX}	ΔN^a	$\Delta N1^b$	$\Delta N5^c$
LF	-4,7216	3,3342	3,3431	8,1613	1,4161			
LFH1+	-8,9677	3,6798	10,9272	7,3948	2,4382			
LFH5+	-9,1751	2,3481	17,9256	11,5888	3,9075			
NHH+	-7,9718	3,7141	8,5551	7,3265	2,1463	0,4611	0,1351	0,1985
HNOH+	-7,7620	3,8153	7,8955	7,1222	2,0344	0,4252	0,1612	0,2293
HNAH+	-7,4294	3,7206	7,4176	7,3137	1,9968	0,3838	0,2082	0,2876
HOLH+	-7,6073	3,8450	7,5254	7,0771	1,9785	0,4019	0,1812	0,2532
HLNAH+	-7,4967	3,1933	8,7997	8,5215	2,3476	0,4251	0,2144	0,3029
HLOLH+	-7,6422	3,2466	8,9946	8,3815	2,3539	0,4438	0,1918	0,2740
THBCH+	-6,4320	4,7109	4,3910	5,7763	1,3654	0,2126	0,3025	0,3886

^a Transferencia de carga desde LF hacia las β -carbolinas. ^b Transferencia de carga desde las β -carbolinas hacia LFH1+. ^c Transferencia de carga desde las β -carbolinas hacia LFH5+.

En las moléculas neutras se observa que el potencial químico electrónico (μ) depende del grado de insaturación: mientras mayor es el grado de insaturación, menor es el potencial químico electrónico de las moléculas; así, las tetrahydro- β -carbolinas presentan los mayores valores de μ , mientras que las β -carbolinas totalmente aromáticas presentan los menores valores.

Sin embargo la dureza química, η , depende del grado de aromaticidad del sistema. Las moléculas indólicas sin conjugación adicional son las más duras (tetrahydro- β -carbolinas), seguidas de las β -carbolinas totalmente aromáticas. Consecuentemente, las dihydro- β -carbolinas son las moléculas más blandas, o con mayor capacidad de polarización, lo que concuerda con el hecho experimental de que las 3,4-dihydro- β -carbolinas se oxidan fácilmente en presencia de un agente oxidante, a diferencia de las 1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolinas, bastante estables en condiciones similares.³¹

La carga crítica, N_{MAX} , y la electrofilia, ω , presentan una tendencia menos clara, ya que dependen tanto de μ como de η . Al comparar moléculas con el mismo patrón de sustitución y con diferente grado de insaturación se observa el siguiente orden en ambos descriptores: dihidro- β -carbolinas > β -carbolinas > tetrahidro- β -carbolinas. Al parecer la dureza química de estas moléculas prevalece por sobre el potencial químico electrónico.

Con respecto a los sustituyentes del sistema piridoindólico, al estudiar la serie de las β -carbolinas se observa que un grupo metilo en el C-1 y un hidroxilo o metoxilo en el C-7 aumentan el potencial químico y la dureza, mientras que disminuyen la electrofilia, la blandura y la carga crítica en el siguiente orden: 7-MeO > 1-CH₃ > 7-OH. El efecto de cada uno de los sustituyentes parece ser aditivo (ver Tabla 3.7).

La protonación cambia notablemente la distribución electrónica en las β -carbolinas estudiadas (Tabla 3.8). Los índices de reactividad de las β -carbolinas totalmente aromáticas y de las dihidro- β -carbolinas se asemejan notablemente. Los compuestos dihidro continúan siendo los más blandos (y los menos duros) de la serie protonada, y también presentan los mayores valores de electrofilia y carga crítica. El potencial químico electrónico de las moléculas protonadas disminuye notablemente con respecto a las moléculas neutras, mientras que la electrofilia aumenta también en forma considerable. Todas las moléculas protonadas, con la excepción de la THBCH⁺, disminuyen su dureza química y por lo tanto aumentan su blandura, respecto de las moléculas neutras.

3.6.3.2 Aspectos generales de la interacción lumiflavina- β -carbolina.

Un análisis de la Tabla 3.7 indica que los valores del potencial químico electrónico (μ) de las moléculas estudiadas predicen que la densidad electrónica fluye desde las β -carbolinas neutras hacia la isoaloxazina, protonada o no. El flujo electrónico desde las β -carbolinas protonadas hacia LF sería inexistente, y sería muy bajo hacia LFH1+ y hacia LFH5+. Sin embargo, la interacción entre dos especies cargadas positivamente como lo serían la isoaloxazina protonada y las β -carbolinas protonadas difícilmente ocurra, por lo cual sólo los alcaloides neutros interactuarían con las flavinas. Todas las β -carbolinas neutras son menos electrofílicas que la isoaloxazina, en cualquiera de sus estados de protonación.

Según se mencionara en la sección 3.2, las β -carbolinas forman asociaciones moleculares con flavinas a través de una transferencia de carga. Los valores de ΔN indicarían que efectivamente existe una transferencia de carga asociada a la interacción lumiflavina- β -carbolina, y que ésta estaría favorecida cuando la isoaloxazina está protonada. Se desprende de la Tabla 3.7 que las moléculas de dihidro- y tetrahidro- β -carbolinas presentan valores de ΔN mayores que las especies completamente aromáticas, aunque muy similares entre sí.

La similitud de valores de S entre β -carbolinas y LF varía en el intervalo de 64,1% (THBC) a 83% (BCF). En el caso de la LFH1+ varía entre 70,1% (THBC) y 91,6% (BCF). Para la LFH5+ la similitud de valores de blanduras globales es baja, variando entre 45,1% (THBC) y 58,4% (BCF). De acuerdo al principio de ácidos y bases duros y blandos de Pearson (HSAB),²⁴ las β -carbolinas en estudio tendrían mayor afinidad por LFH1+ y luego por LF. Sin embargo, estos resultados sólo sugerirían que la afinidad de las β -carbolinas por la isoaloxazina depende del estado de protonación de esta última. Como la protonación de la isoaloxazina depende del sitio de la enzima en la que se encuentra,

es posible que la actividad de las β -carbolinas sobre diferentes flavoenzimas esté modulada de una manera gruesa por el estado de protonación de la isoaloxazina frente a la cual estos alcaloides presentarían diferentes afinidades en el contexto del principio HSAB.

3.6.3.3 Aspectos específicos de la interacción lumiflavina- β -carbolina en la formación de complejos de transferencia de carga en solución.

Aún cuando existen pocos datos experimentales que midan tanto la asociación flavina- β -carbolina como la actividad IMAO-A de las mismas β -carbolinas, la Figura 3.4 muestra la relación entre las constantes de asociación FAD- β -carbolina (K_{FAD-BC}) y la constante de inhibición de MAO-A (K_{IMAO-A}) para una serie de β -carbolinas según los datos de las Tablas 3.2 y 3.3. Se observa una correlación lineal que sugeriría que efectivamente la actividad IMAO-A de las β -carbolinas dependería de la formación de complejos de transferencia de carga con la flavina de la enzima. Cabe destacar que la actividad IMAO-A de las β -carbolinas se midió con precisión algunos años después de que se detectara la formación de CTC.

Con el fin de estudiar la dependencia que pudiera existir entre la estructura electrónica de las β -carbolinas y su capacidad de formar CTC con flavinas, se graficaron los descriptores de estructura electrónica calculados teóricamente (resumidos en la Tabla 3.7) junto con las constantes K_{FAD-BC} , y las constantes de asociación entre riboflavina y β -carbolinas, K_{RF-BC} , obtenidas experimentalmente para una serie de β -carbolinas (Tablas 3.1 y 3.2). Los resultados se resumen en las Figuras 3.5 a 3.8.

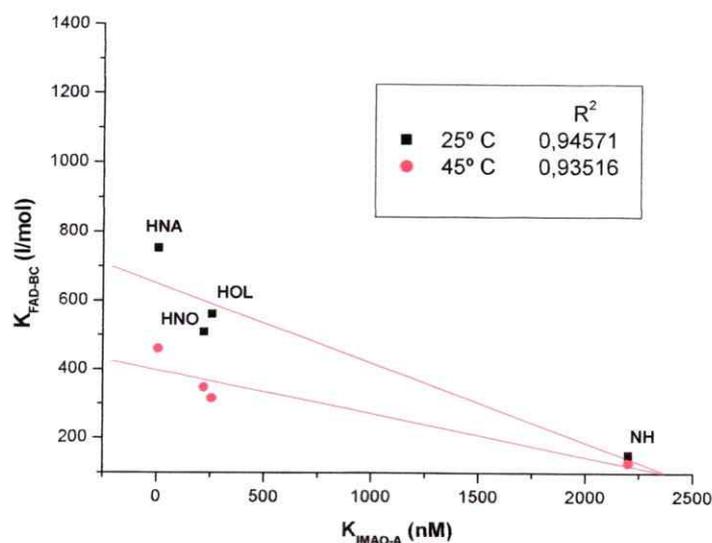


Figura 3.4: Relación entre las constantes de asociación FAD- β -carbolina ($K_{\text{FAD-BC}}$) y la constante de inhibición de MAO-A ($K_{\text{IMAO-A}}$) para una serie de β -carbolicinas. Datos tomados de las Tablas 3.2 y 3.3

Se observa una buena correlación entre la formación de CTC entre las flavinas riboflavina (RF) y FAD y los siguientes descriptores de estructura electrónica de las β -carbolicinas: potencial químico electrónico, electrofilia, transferencia de carga (donde la carga se transferiría a **LF**) y carga crítica. No se encontró ninguna correlación entre la formación de CTC de RF-BC o FAD-BC ni con la dureza química ni con la blandura. La estabilidad de los complejos RF-BC tiene una excelente correlación con la electrofilia y la carga crítica; la correlación es inferior con el potencial químico electrónico y con la transferencia de carga. Cabe destacar que los experimentos de formación de CTC se realizaron en ambiente acuoso, mientras que los descriptores de estructura electrónica se calcularon en el vacío. El hecho de que la electrofilia de moléculas neutras no se vea afectada de manera importante por el solvente³² podría explicar la mantención de esta tendencia. Las estabildades de los complejos FAD-BC se correlacionan muy

bien con la electrofilia, la transferencia de carga y el potencial químico electrónico, sobre todo a temperaturas cercanas a aquellas a las que se realizaron las caracterizaciones de los CTC (36° C).

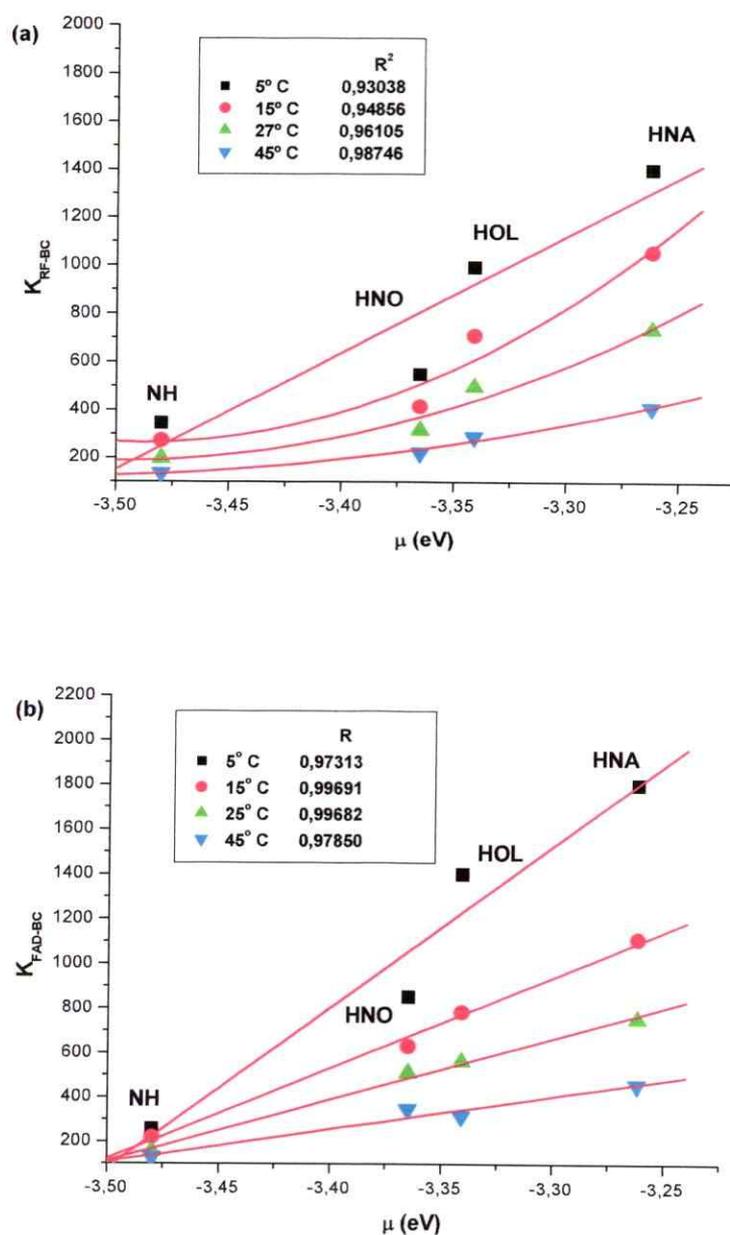


Figura 3.5: Relación entre las constantes de asociación K_{RF-BC} (a) y K_{FAD-BC} (b) y el potencial químico electrónico (μ) de las β -carbolinas.

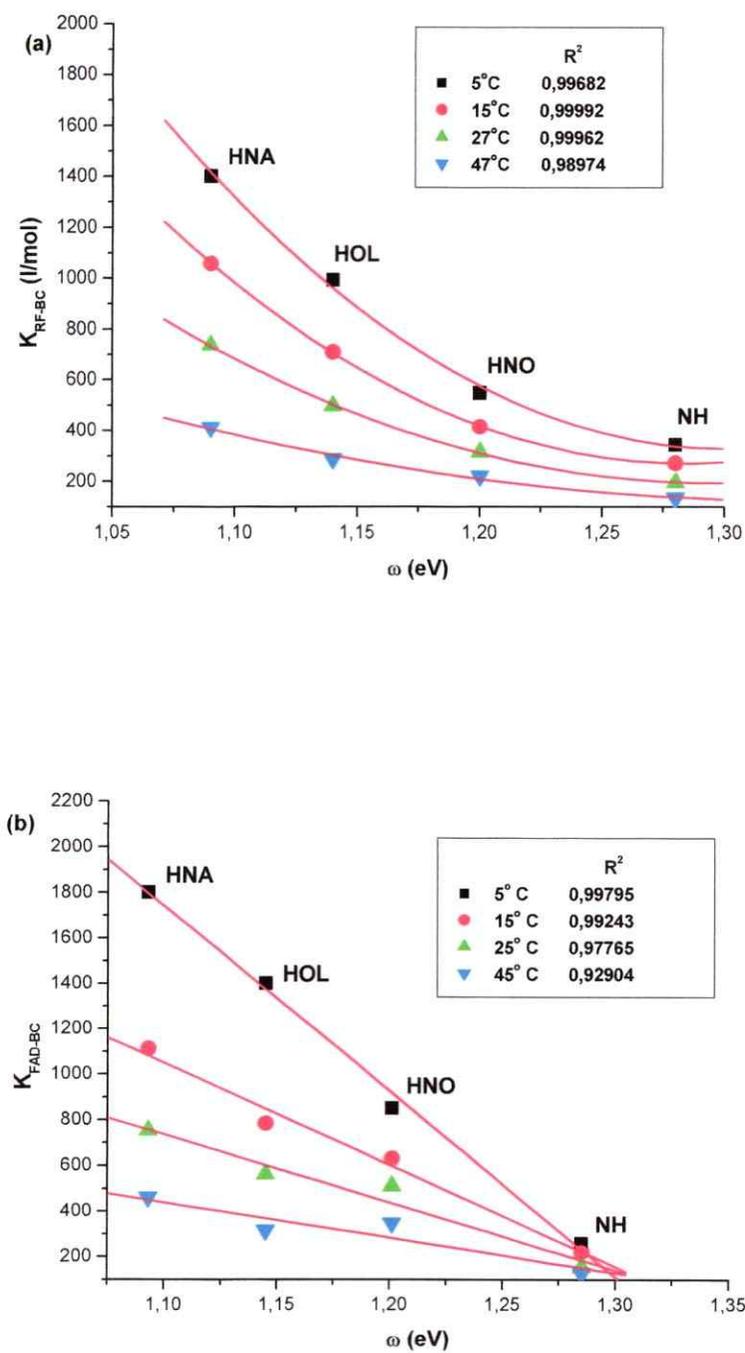


Figura 3.6: Relación entre las constantes de asociación K_{RF-BC} (a) y K_{FAD-BC} (b) y la electrofilia (ω) de las β -carbolinas.

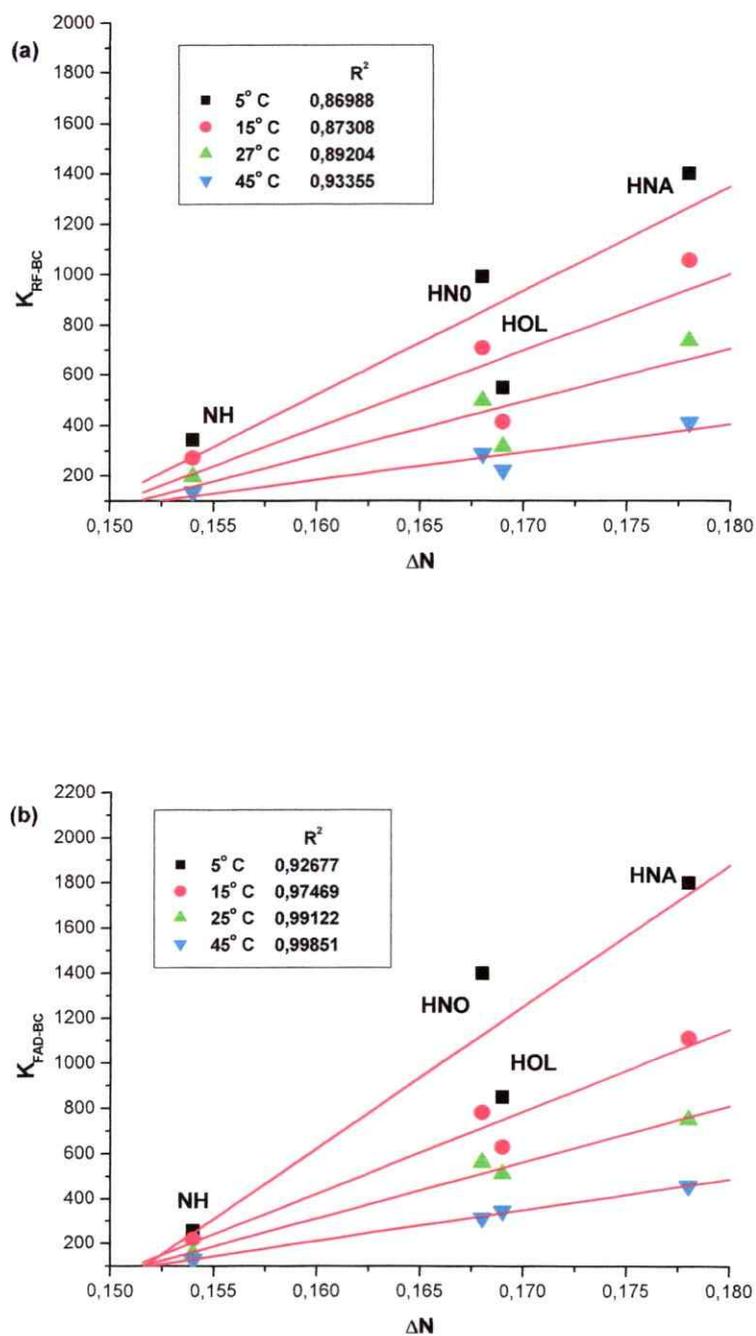


Figura 3.7: Relación entre las constantes de asociación K_{RF-BC} (a) y K_{FAD-BC} (b) y la transferencia de carga (ΔN) de las β -carbolinas.

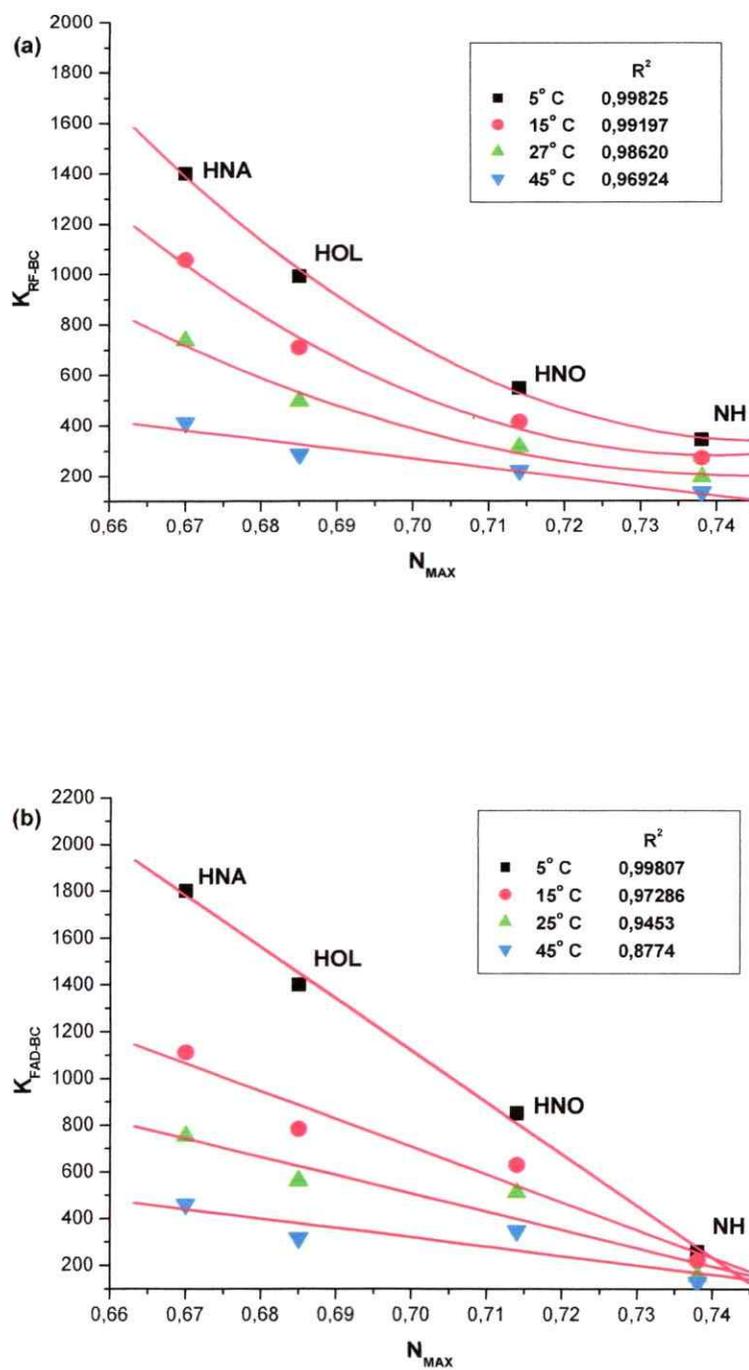


Figura 3.8: Relación entre las constantes de asociación K_{RF-BC} (a) y K_{FAD-BC} (b) y la carga crítica (N_{MAX}) de las β -carbolinas.

3.6.3.4 Aspectos específicos de la interacción lumiflavina- β -carbolina en la actividad IMAO-A.

Con el fin de observar el efecto de la estructura electrónica de las β -carbolinas en la actividad IMAO-A, se graficaron los descriptores de estructura electrónica calculados teóricamente (resumidos en la Tabla 3.7) junto con las constantes de inhibición $K_{\text{IMAO-A}}$, obtenidas experimentalmente para una serie de β -carbolinas (Tabla 3.3). Se consideraron en los gráficos los resultados de dos experimentos, con isoenzimas provenientes de dos tejidos. Los resultados de este análisis se resumen en las Figuras 3.9 a 3.11.

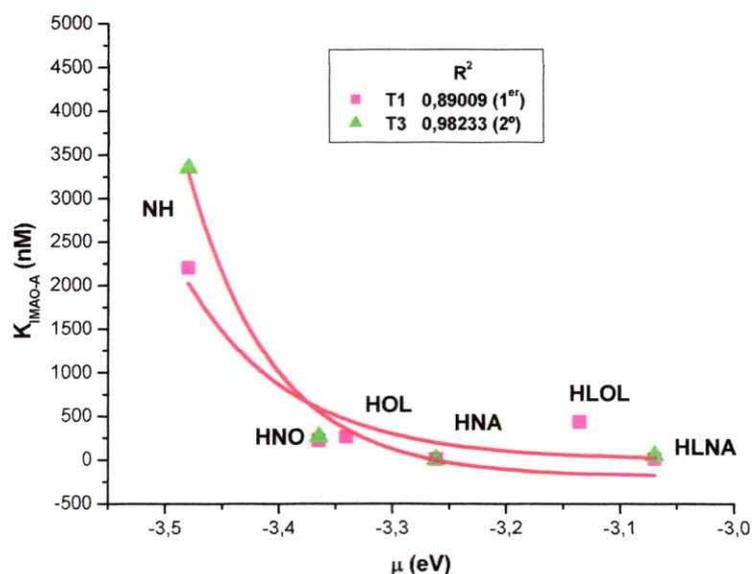


Figura 3.9: Relación entre las constantes de inhibición $K_{\text{IMAO-A}}$ y el potencial químico electrónico (μ) de β -carbolinas.

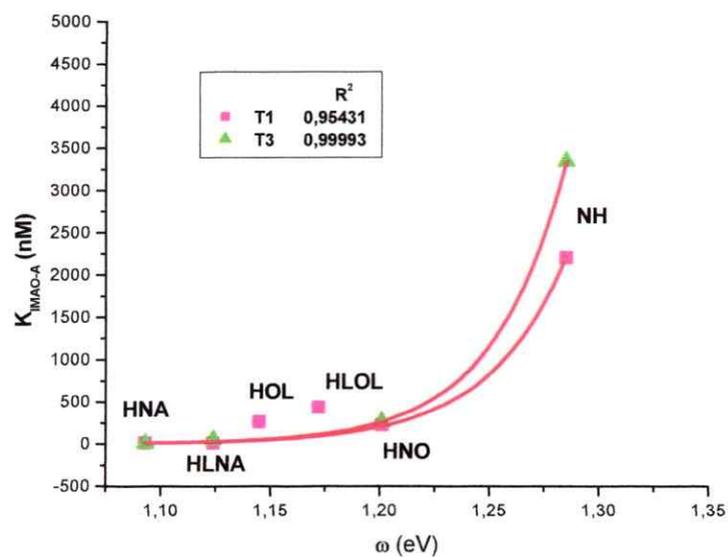


Figura 3.10: Relación entre las constantes de inhibición K_{IMAG-A} y la electrofilia (ω) de β -carbolinas.

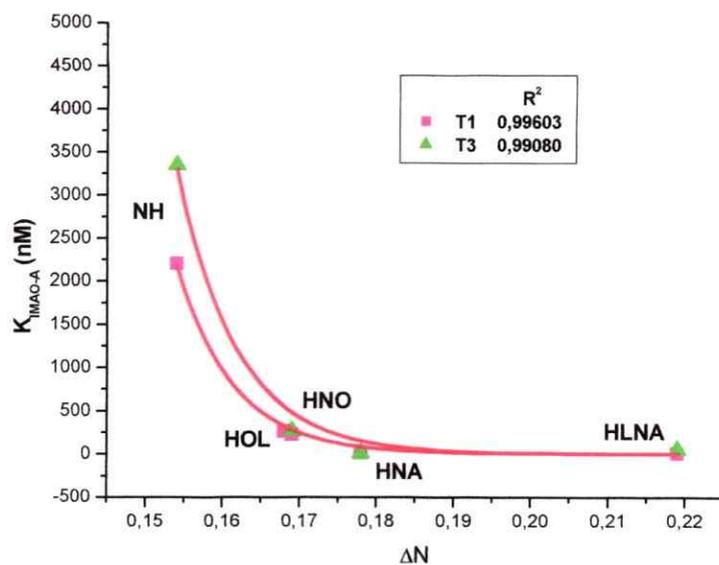


Figura 3.11: Relación entre las constantes de inhibición K_{IMAG-A} y la transferencia de carga (ΔN) de β -carbolinas.

Se observa una buena correlación entre la actividad IMAO-A de las β -carbolinas y los descriptores de estructura electrónica electrofílica, potencial químico electrónico y transferencia de carga. No se encontró correlación entre la actividad IMAO de β -carbolinas y los descriptores carga crítica, dureza química y blandura química. Cabe destacar que en los gráficos de las figuras 3.9 y 3.10 se han incluido las dihidro- β -carbolinas harmalina y harmalol (T1), encontrándose buenas correlaciones, las que mejoran notablemente en T3, en las que no se consideraron ni el harmol ni el harmalol en las mediciones experimentales. Se ha descrito que el sitio activo de las MAO contiene zonas hidrofóbicas,³³ donde parece posible que los grupos hidroxilo de los alcaloides harmol y harmalol generen interacciones desestabilizantes de la unión al sitio activo. Al parecer el microambiente de características hidrofóbicas del sitio de unión de las MAO muestra mayor semejanza con las condiciones de vacío en las que se calcularon los descriptores de estructura electrónica, lo que permite incluir a las dihidro- β -carbolinas y a las β -carbolinas dentro de una misma familia.

Referencias

- ¹ Carmona, C.; Hidalgo, J.; Sánchez-Marcos, E.; Pappalardo, R. R.; Muñoz, M.; Balón, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1990**, 1881.
- ² Muñoz, M.; Balón, M.; Hidalgo, J.; Carmona, C.; Pappalardo, R. R.; Sánchez-Marcos, E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1991**, 1729.
- ³ Martín, M.; Sanz, F.; Campillo, M.; Pardo, L.; Pérez, J.; Turmo, J.; Aulló, J. M. *Int. J. Quantum Chem.* **1983**, 23, 1643.
- ⁴ Hidalgo, J.; Balón, M.; Carmona, C.; Muñoz, M.; Pappalardo, R. R.; Sánchez-Marcos, E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1990**, 65.
- ⁵ Weber, S.; Möbius, K.; Richter, G.; Kay, C. W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3790.
- ⁶ Hubbard, P. A.; Shen, A. L.; Paschke, R.; Kasper, C. B.; Kim, J.-J. P. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 29163.
- ⁷ Fernández de Arriba, A.; Lizcano, J. M.; Balsa, M. D.; Unzeta, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, 46, 809.
- ⁸ Kim, H.; Sablin S. O.; Ramsay, R. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, 337, 137.
- ⁹ Codoñer, A.; Monzó, I. S.; Ortiz, C.; Olba, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1989**, 107.
- ¹⁰ Codoñer, A.; Medina, P.; Ortiz, C.; Jover, E. *Spectrochim. Acta* **1993**, 49 A, 321.
- ¹¹ Codoñer, A.; Monzó, I. S.; Tomás, F.; Valero, R. *Spectrochim. Acta* **1986**, 42 A, 765.
- ¹² Codoñer, A.; Monzó, I. S.; Tomás, F.; Valero, R. *Spectrochim. Acta* **1987**, 42 A, 1379.
- ¹³ Fitzpatrick, P. F. *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 299.
- ¹⁴ Fagervall, I.; Svante, B. R. *J. Neurochem.* **1986**, 47, 569.
- ¹⁵ Tertrud, J. W.; Langston, J. W. *Science* **1989**, 519.
- ¹⁶ Silverman, R. B.; Ding, C. Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4571.
- ¹⁷ Brown, L. E.; Hamilton, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 7225.
- ¹⁸ Miller, J. R.; Edmondson, D. E. *Biochemistry* **1999**, 38, 13670.
- ¹⁹ Silverman, R. B.; Zieske, P. A. *Biochemistry* **1985**, 24, 2128.
- ²⁰ Ho, B. T.; McIsaac, W. M.; Walter, K. E. *J. Pharm. Sci.* **1968**, 57, 1364.
- ²¹ Buckholtz, N. S.; Boggan, W. O. *Biochem. Pharmacol.* **1977**, 26, 1991.
- ²² May, T.; Rommelspacher, H.; Pawlik, M. *J. Neurochem.* **1991**, 56, 490.
- ²³ Fernández de Arriba, A.; Lizcano, J. M.; Balsa, M. D.; Unzeta, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, 46, 809.
- ²⁴ Kim, H.; Sablin S. O.; Ramsay, R. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, 337, 137.

-
- ²⁵ Parr, R.G.; Yang, W. (1989) en *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*; Oxford University Press: New York.
- ²⁶ Gaussian 98; Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; González, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andrés, J. L.; González, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. Gaussian Inc.; Pittsburgh, PA, 1998.
- ²⁷ Faini, F.; Castillo, M.; Torres, R. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 338.
- ²⁸ Reyes-Parada, M.; Scorza, M. C.; Silveira, R.; Dajas, F.; Costa, G.; Tipton, K. F.; Cassels, B. K. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 1365.
- ²⁹ Reyes-Parada, M.; Scorza, M. C.; Silveira, R.; Dajas, F.; Cassels, B. K. *Life Sci.* **1994**, *54*, 1955.
- ³⁰ Scorza, M. C.; Carrau, C.; Silveira, R.; Zapata-Torres G.; Cassels, B. K.; Reyes-Parada, M. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *54*, 1361.
- ³¹ Misztal, S.; Cegla, M. *Synthesis* **1985**, 1134.
- ³² Pérez, P.; Toro-Labbé, A.; Contreras R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5527.
- ³³ Wouters, J. *Curr. Med. Chem.* **1998**, *5*, 137.

CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LA OXIDACION Y REDUCCION ELECTROQUIMICA DE β -CARBOLINAS POR VOLTAMETRIA CICLICA LINEAL

4.1 Introducción

Se ha descrito que precursores indólicos de β -carbolinas como triptofano y triptaminas presentan actividad antioxidante, probablemente a través del atrapamiento de radicales libres endógenos derivados del oxígeno para generar radicales estabilizados en el anillo pirrólico.^{1,2} La literatura también informa que algunas β -carbolinas presentan actividad antioxidante y los autores sugieren la formación de radicales piridoindólicos a través de sistemas enzimáticos o no enzimáticos.³ En el caso de formarse tales radicales en el medio biológico, sería posible que la presencia de sistemas π extendidos y de subestructuras quinonoides en estos alcaloides interfiriera en los fenómenos redox de algunos sistemas biológicos, lo que podría dar cuenta de una parte de la actividad que presentan estos compuestos, especialmente en lo que se refiere a sus propiedades quimioterapéuticas. Los estudios electroquímicos realizados en β -carbolinas son escasos. La literatura informa el estudio de la oxidación de sólo una β -carbolina,^{4,5} cuyos resultados se presentarán en la sección siguiente. Sin embargo, este único estudio demuestra que efectivamente estos alcaloides son capaces de interactuar con sistemas enzimáticos y de reaccionar con metabolitos, alterando entonces los procesos bioquímicos propios de los organismos.

4.2 Oxidación electroquímica y bioquímica de 6-hidroxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina^{4,5}

La 6-hidroxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina (compuesto **17** en la Figura 4.1) es un compuesto endógeno, presente en trazas en el cerebro de mamíferos.⁶ Sin embargo su contenido en el cerebro aumenta considerablemente tras la ingesta de alcohol.⁷ Se cree que las tetrahidro- β -carbolinas biosintetizadas según el esquema de la Figura 1.2 se oxidan rápidamente generando una serie de metabolitos que parecen contribuir a la degeneración de las vías serotoninérgicas y catecolaminérgicas y a otros procesos neurodegenerativos propios del alcoholismo crónico, habiéndose sugerido también que tendrían un papel en la adicción alcohólica.⁸ Se realizó entonces un estudio electroquímico de la 6-hidroxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina^{4,5} con el objeto de reconocer otros posibles metabolitos generados por la oxidación de este compuesto y estudiar las alteraciones que pudieran provocar en los procesos redox normales de células nerviosas.

La oxidación electroquímica se estudió a pH 7 (solución tampón de fosfato) por voltametría cíclica lineal, utilizando un electrodo de grafito pirolítico.⁴ El voltamograma cíclico presenta tres cuplas reversibles. En el barrido anódico a pH 7 se observan picos de oxidación a +0,29 V y a +0,37 V; en el barrido catódico se observa un tercer pico, de reducción, a -0,18 V. Luego de realizar experimentos de oxidación electroquímica a potencial controlado, se aislaron productos cuya estructura se determinó por RMN y por espectrometría de masas.⁴ El esquema de la Figura 4.1 resume de una manera simplificada los principales procesos de oxidación y las estructuras de los productos aislados (**46-48**).

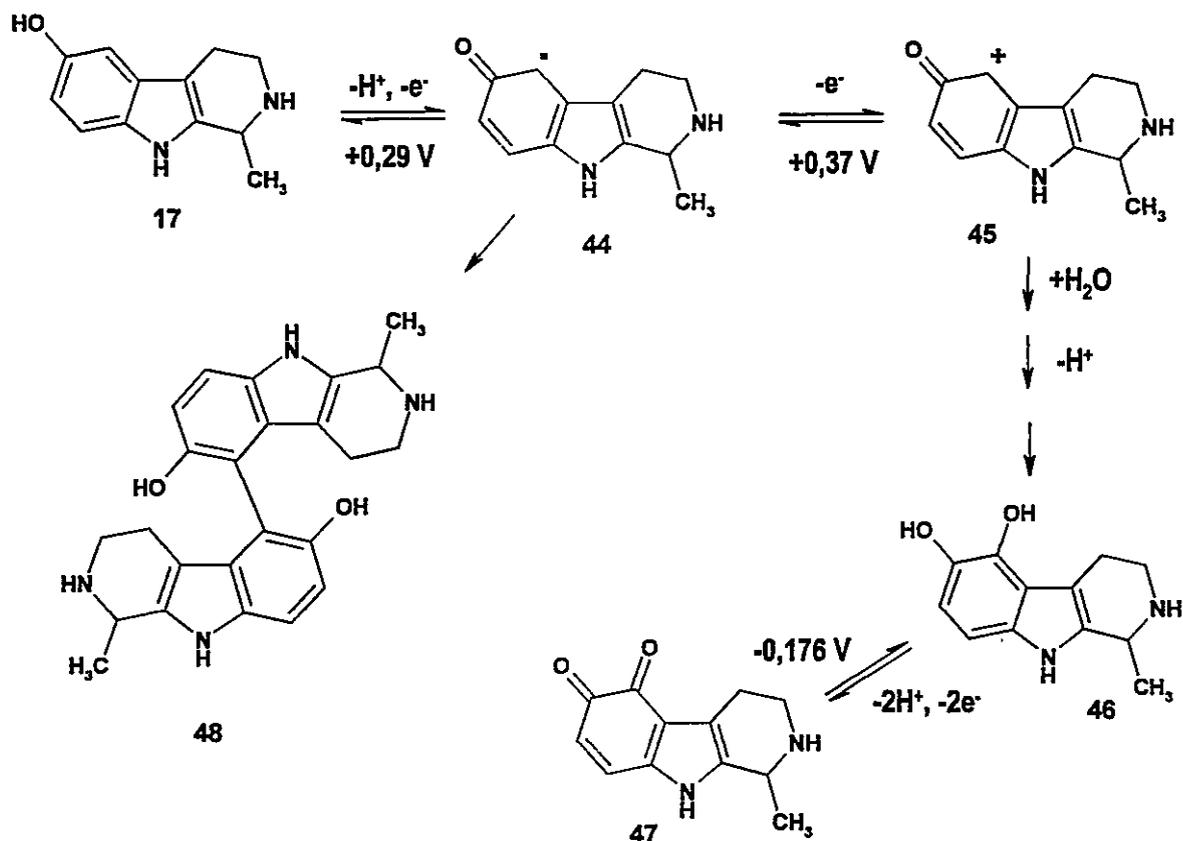


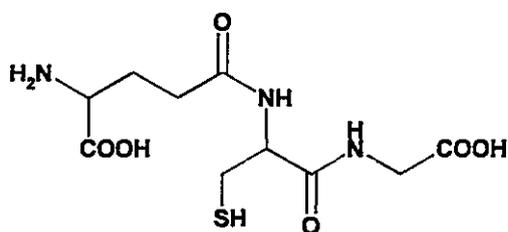
Figura 4.1: Oxidación electroquímica de 6-hidroxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahidro-β-carbolina (1). Esquema simplificado tomado de la referencia 4.

A +0,29 V el compuesto 17 se oxida a un radical libre intermediario que dimeriza para generar dos diastereómeros de 5,5'-bis(6-hidroxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahidro-β-carbolina) (48). El radical intermediario puede volver a oxidarse electroquímicamente y reaccionar con agua, para generar finalmente la 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro-β-carbolina-5,6-diona, estructura 47.⁴ Los diastereómeros de 48 se oxidan fácilmente y solamente se pueden observar como productos en las primeras etapas de la oxidación electroquímica controlada de 17.⁴

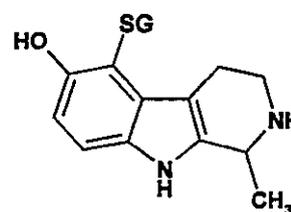
Un estudio enzimático realizado en el mismo trabajo reveló que, a pH fisiológico, las enzimas tirosinasa, ceruloplasmina y peroxidasa también catalizaron la oxidación

del compuesto **17** para generar principalmente los diastereómeros de **48** y cantidades bajas de la diona **47**.⁴

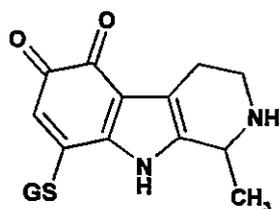
La oxidación electroquímica también se realizó en presencia de glutatión (**GSH**),⁴ lo que resultó en una disminución considerable de los diastereómeros de **48** y en la aparición del compuesto mayoritario 5-S-glutationil-6-hidroxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolina **49**.⁴ La oxidación enzimática con tirosinasa y peroxidasa en presencia de **GSH** generó este mismo producto en forma mayoritaria. En cambio la enzima ceruloplasmina produjo bajas cantidades de **49**.⁴



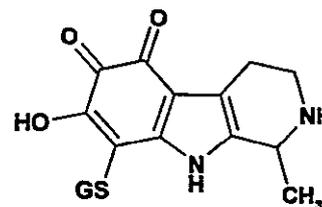
GSH



49



50



51

Un estudio posterior,⁵ en el cual la oxidación electroquímica de **17** se realizó en las siguientes condiciones: (a) presencia de cantidades variables de **GSH**, (b) en presencia de **GSH** y del radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) al mismo tiempo, produjo la generación de los siguientes metabolitos: **49** y **50** en presencia de **GSH** solamente; **50** y **51** en presencia de **GSH** y de $\text{OH}\cdot$.⁵ Reacciones posteriores de **17**, **47** y **50** con **GSH** y/o con

OH· resultaron en un aumento de las cantidades de H₂O₂ y de OH· en el medio, lo que, según estudios realizados *in vitro*, provocó daño oxidativo en axones serotoninérgicos y en terminales nerviosos, además de la pérdida irreversible de **GSH**.⁵

4.3 Actividad antioxidante de β -carbolinas

Como se mencionara en la introducción, dado que precursores de las β -carbolinas como triptofano y triptamina presentan actividad antioxidante,² se realizó un estudio de la potencialidad antioxidante de una serie de β -carbolinas,³ encontrándose que la presencia de sustituyentes como hidroxilo o metoxilo, y el grado de insaturación del sistema piridoindólico son determinantes importantes de esta actividad.³ La actividad antioxidante se estudió a través de la medición de la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos de ratas,³ incubados a pH 7,2 en sistemas generadores de radicales de oxígeno dependiente de enzimas (Fe⁺³ADP/NADPH) y no dependiente de enzimas (Fe⁺³ADP/dihidroxifumarato). La tabla 4.1 resume los resultados obtenidos.

Harmalol, harmalina, harmol y harmina inhibieron la lipoperoxidación en ambos sistemas (enzimático y no enzimático). La sustitución del grupo hidroxilo por el grupo metoxilo resultó en una disminución de la actividad antioxidante de hasta 15 veces. La deshidrogenación del anillo piridínico reduce drásticamente el efecto antioxidante (comparar harmol con harmalol y harmina con harmalina). Los autores proponen que la mayor capacidad antioxidante del harmol y harmalol se debería a una estabilización adicional de un radical piridoindolilo, a través de la formación de estructuras semiquinónicas. También discuten que el mayor efecto antioxidante del harmol en el sistema enzimático se debería a la inhibición de enzimas más que al atrapamiento de radicales.³

Tabla 4.1: Actividad antioxidante de triptaminas y β -carbolinas (pH 7,2).

Compuesto	CI ₅₀ (μ M)*	
	Fe ⁺³ ADP/NADPH	Fe ⁺³ ADP/dihidroxifumarato
5-OH-Triptofano	145	159
5-OH-Triptamina	5,6	2,8
5-MeO-Triptamina	10,1	4,0
Triptamina	17,8	4,0
Harmalol (20)	3,2	1,7
Harmalina (7)	10,4	23,9
Harmol (24)	213	38
Harmina (8)	>600	>600
Harmano (6)	11,7	145

* Concentración que inhibe la lipoperoxidación en un 50%. Datos tomados de la referencia 3.

En este capítulo se presenta un estudio del comportamiento electroquímico de algunas β -carbolinas con actividad biológica diversa. Se estudió la oxidación y la reducción de estos compuestos en medio acuoso y en medio aprótico a través de voltametría cíclica lineal (VCL). Se presenta además la detección, por resonancia paramagnética electrónica (EPR), de una especie radicalaria derivada de la 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina unida a un atrapador de radicales libres. Por último se analiza la correlación entre los descriptores de estructura electrónica calculados en el Capítulo 3 y los potenciales de oxidación, de reducción y la actividad antioxidante de las β -carbolinas estudiadas.

4.4 Métodos

4.4.1 Compuestos químicos

Todos los compuestos químicos utilizados fueron de la más alta pureza disponible en el mercado. Los solventes N,N-dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO) fueron de calidad analítica. Los clorhidratos de norharmano (**3**), harmano (**6**), harmina (**8**), harmol (**24**), harmalol (**20**) y las bases libres de harmalina (**7**) y THBC (**1**) se obtuvieron de Aldrich. El ácido harman-1,2,3,4-tetrahydro-3-carboxílico (AHTC, **42**) se obtuvo de Sigma. El clorhidrato de harmalina (**7**) fue gentilmente donado por la Dra. Silvia Sepúlveda (Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Santiago de Chile). Las bases libres de norharmano, harmano y harmina se obtuvieron en el laboratorio de Química Biodinámica, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile) a partir de sus clorhidratos.

4.4.2 Voltametría cíclica lineal (VCL) de β -carbolinas en medio acuoso.

Todas las β -carbolinas, en concentraciones 1 mM, se disolvieron en una mezcla de solución tampón Britton-Robinson 0,04 M:DMF (70/30). La fuerza iónica se llevó a 0,3 M con KCl. El pH se ajustó con soluciones concentradas de HCl o NaOH.

Los experimentos de voltametría cíclica se realizaron en un potenciostato Inelecsa, modelo PDC-1212 equipado con una celda electroquímica de 25 mL, Metrohm. Los electrodos de referencia y auxiliar fueron de calomelano y alambre de platino respectivamente. Como electrodo de trabajo se utilizó una gota colgante de mercurio en el estudio de electroreducción y un electrodo de carbono vítreo en el estudio de electrooxidación. Las mediciones se realizaron a pH 3, 7 y 11 bajo una

atmósfera de nitrógeno. Las velocidades de barrido se fijaron en 50 mV/s para las oxidaciones y en 1000 mV/s para las reducciones.

4.4.3 Voltametría cíclica lineal (VCL) de β -carbolinas en medio aprótico.

Los experimentos de voltametría cíclica en medio aprótico se realizaron en un equipo Weenking POS 88 con un registrador Kipp Zenen BD93 bajo una atmósfera de nitrógeno. Las β -carbolinas, en concentraciones 1 mM se disolvieron en DMSO que contenía perclorato de tetrabutilamonio (TBAP) como electrolito soporte (0,1 M). Los electrodos de referencia y auxiliar fueron de calomelano y alambre de platino respectivamente. Como electrodo de trabajo se utilizó una gota colgante de mercurio en el estudio de electroreducción y un electrodo de carbono vítreo en el estudio de electrooxidación. Las velocidades de barrido se variaron entre 100 mV/s y 2000 mV/s.

4.4.4 Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) del radical libre de *N*-*tert*-butil- α -fenilnitrona enlazado a la 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina

El espectro de EPR se registró en banda X (9,85 GHz) usando un espectrómetro Bruker ECS 106 equipado con cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo. La generación electroquímica del radical se realizó al potencial de oxidación obtenido en los experimentos de VCL, a una concentración de compuesto de 10^{-3} M con 0.1 M de TBAP usando DMSO como solvente. El radical, de vida corta, se detectó utilizando la técnica de atrapamiento de radicales⁹ ("spin trapping") utilizando como atrapador *N*-*tert*-butil- α -fenilnitrona.

4.5 Resultados y discusión

4.5.1 Reducción de β -carbolinas por VCL en medio acuoso.

Los resultados obtenidos se resumen en las Figuras 4.2 y 4.3, y en la Tabla 4.2.

Las Figuras 4.2 y 4.3 muestran que la reducción de β -carbolinas es irreversible a esa velocidad de barrido (1000 mV/s). Se realizaron experimentos con harmina en los cuales la velocidad de barrido se aumentó hasta 50 V/s, manteniéndose la condición de irreversibilidad en todos los pH en los que se realizó este estudio.

Ni THBC ni AHIC se reducen en el intervalo de potenciales estudiado, a ningún valor de pH. Para norharmano, harmalina y harmalol se observa que el potencial de reducción es dependiente del pH (potenciales menos negativos al aumentar la acidez del medio), probablemente debido a que la protonación de N-2 (ver Figura 3.2 para la numeración) a pH inferiores al pK_a de estos compuestos generaría especies catiónicas más propensas a la reducción (ver Tabla 1.1).

A pH 3 sólo harmalina y harmalol se reducen en torno a los -1135 mV. A pH 7 tanto las dihidro- β -carbolinas como las β -carbolinas se reducen entre los -1250 mV y los -1730 mV. A pH 11 sólo norharmano, harmalina y harmalol se reducen entre los -1350 y -1780 mV.

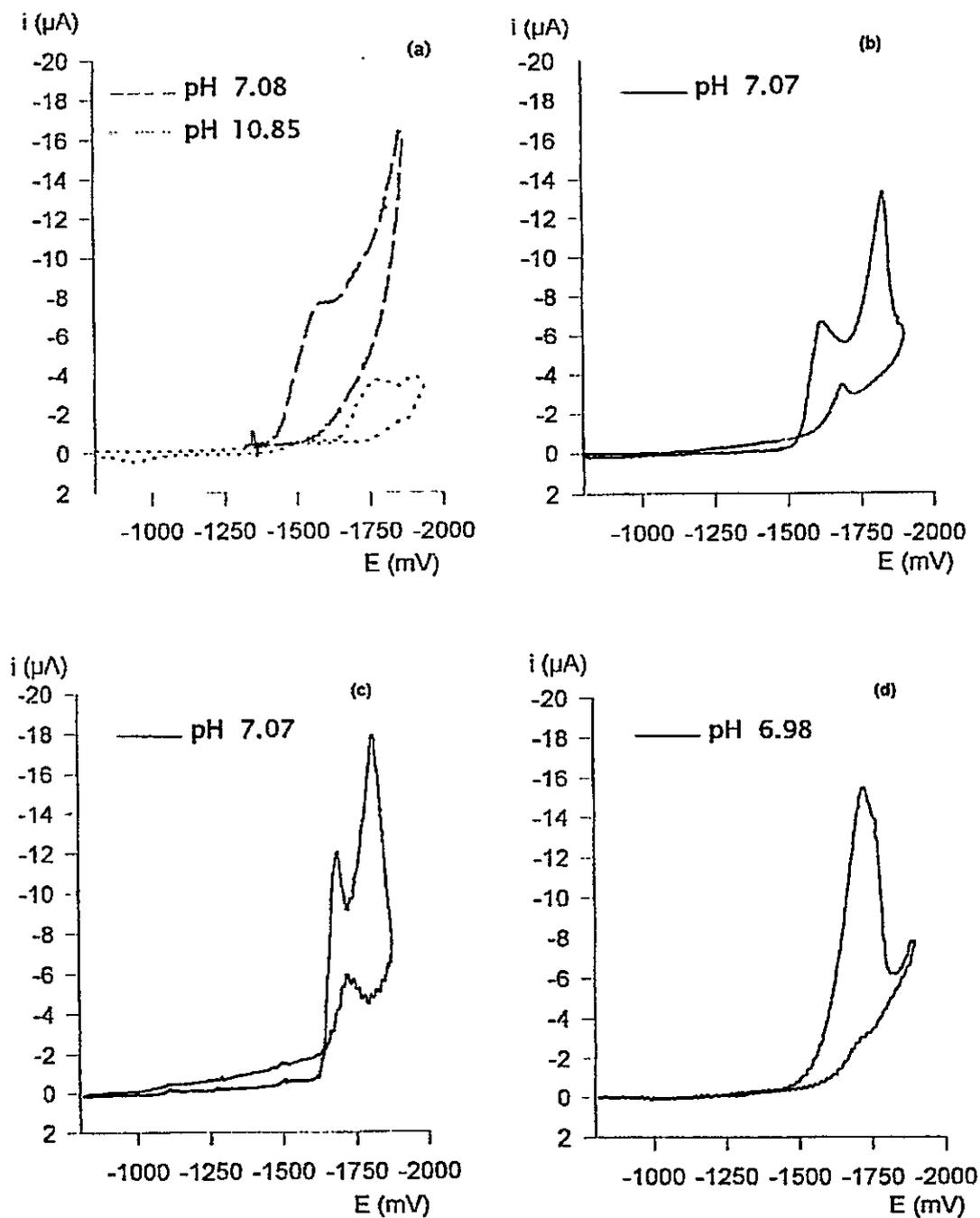


Figura 4.2: Voltamogramas cíclicos en medio prótico de norharmano (a), harmano (b), harmina (c) y harmol (d). Velocidad de barrido, 1000 mV/s. Barrido inicial en el sentido catódico.

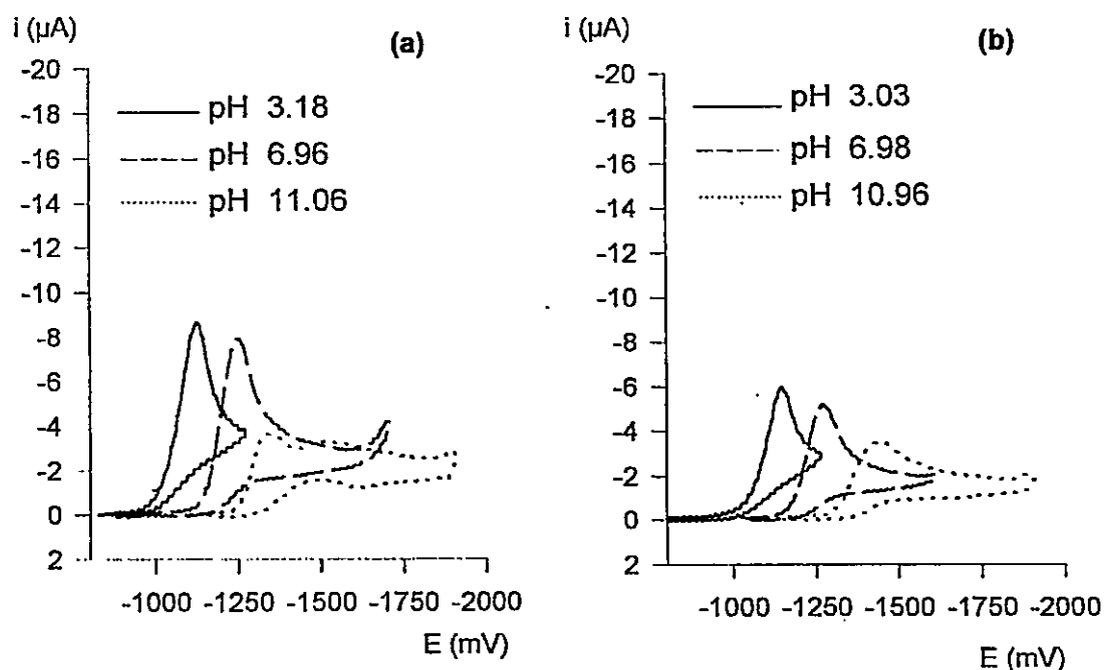


Figura 4.3: Voltamogramas cíclicos en medio prático de harmalina (a) y harmalol (b).

Velocidad de barrido, 1000 mV/s. Barrido inicial en el sentido catódico.

Tabla 4.2: Reducción de β -carbolinas en medio prático

Compuesto	Ep (mV) ^a					
	pH 3		pH 7		pH 11	
	S1 ^b	S1	S2	S1	S2	
Norharmano (3)	- ^c	-1586	-	-1785	-	
Harmano (6)	-	-1623	-1832	-	-	
Harmina (8)	-	-1690	-1811	-	-	
Harmol (24)	-	-1731	-	-	-	
Harmalina (7)	-1133	-1251	-	-1358	-1514	
Harmalol (20)	-1141	-1276	-	-1444	-	
THBC (1)	-	-	-	-	-	
AHTC (42)	-	-	-	-	-	

^aPotencial de pico catódico. ^bSeñal de reducción. ^cNo se detectó señal de reducción.

Puesto que las tetrahidro- β -carbolinas no se reducen en el intervalo de potenciales estudiados, mientras que los alcaloides dihidro y los totalmente aromáticos si lo hacen, es posible sugerir que la señal S1 correspondería a la reducción del doble enlace C1-N2 del esqueleto piridoindólico.

Las dihidro- β -carbolinas se reducen a potenciales menos negativos que las β -carbolinas, lo que podría explicarse considerando que, como estos compuestos contienen un doble enlace que no pertenece al sistema aromático, la reducción de ellos no involucra la pérdida de la energía de estabilización debido a la aromaticidad, presente en las β -carbolinas totalmente aromáticas. La presencia de los sustituyentes metilo en C-1 y metoxilo o hidroxilo en C-7 desplazan los potenciales de reducción de estos compuestos hacia valores más negativos, probablemente debido a que serían dadores de electrones, lo que desfavorecería la reducción.

En un estudio de los procesos de ionización en medio acuoso de β -carbolinas,⁹ se determinó que los pK_a de los grupos fenólico de harmol y harmalol son inferiores a los pK_a de los nitrógenos piridínicos (N-2): pK_a harmol = 7,86 (OH), 9,51 (NH); pK_a harmalol = 8,62 (OH), 11,3 (NH). De esta manera, a pH 7 existiría una proporción importante de estas moléculas en la forma zwitteriónica (protonadas en N-2 y desprotonadas en el oxígeno fenólico), menos propensas a la electroreducción. Este hecho podría explicar que tanto harmalol como harmol se reduzcan a potenciales más negativos que las otras β -carbolinas con el mismo grado de insaturación.

Según los resultados obtenidos, la reducción de β -carbolinas a pH fisiológico sólo ocurriría a potenciales muy negativos (-1251--1731 mV). Estos resultados sugerirían que estos compuestos no serían atrapadores de radicales libres biológicos a través de una reducción de ellas, ni serían sustratos de enzimas que participen en reducciones biológicas.

4.5.2 Oxidación de β -carbollinas por VCL en medio acuoso.

Los resultados obtenidos se resumen en las Figuras 4.4 a 4.6 y en la Tabla 4.3.

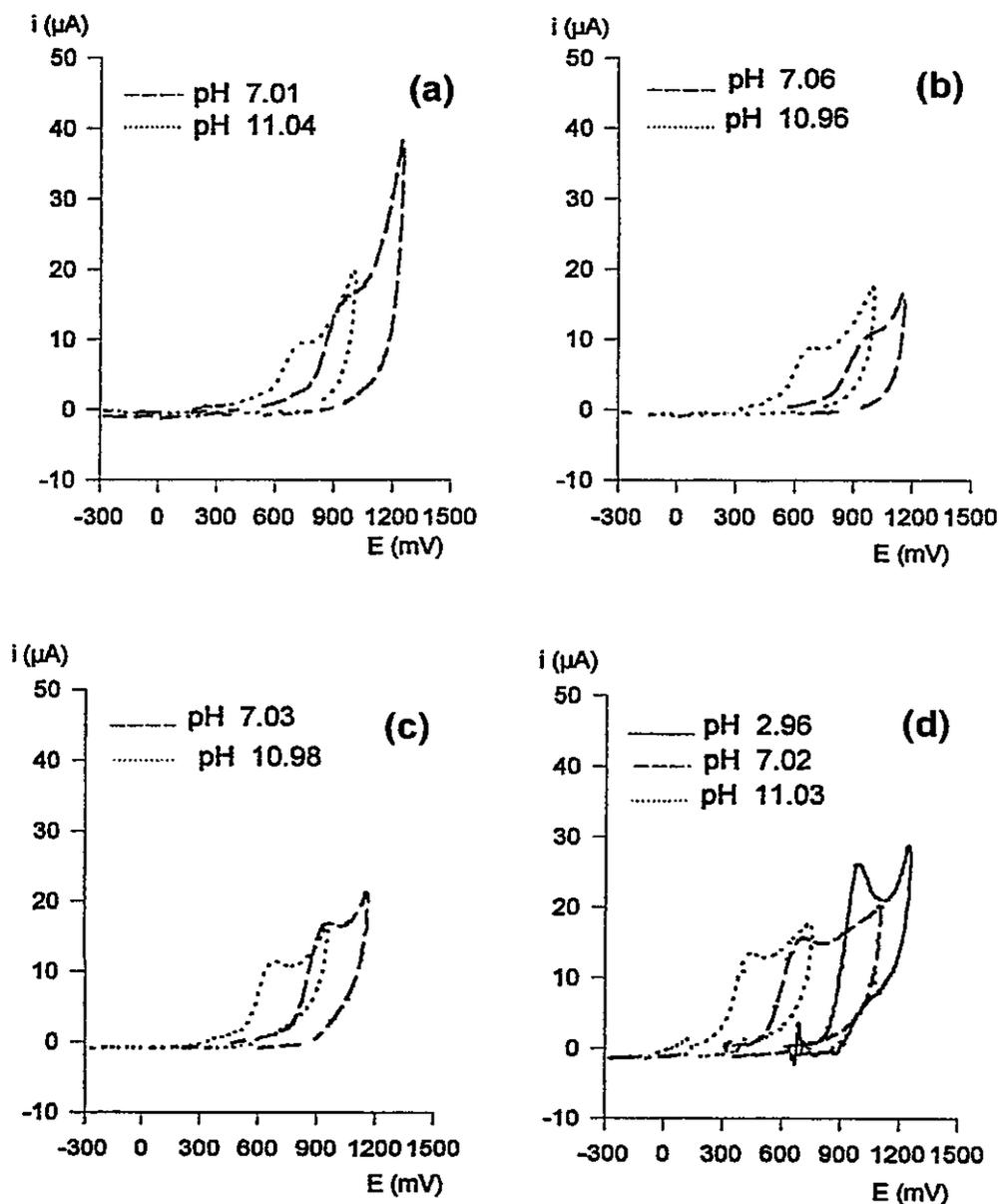


Figura 4.4: Voltamogramas cíclicos en medio prótico de harmina (a), harmalano (b), norharmalano (c) y harmol (d). Velocidad de barrido, 50 mV/s. Barrido inicial en el sentido anódico.

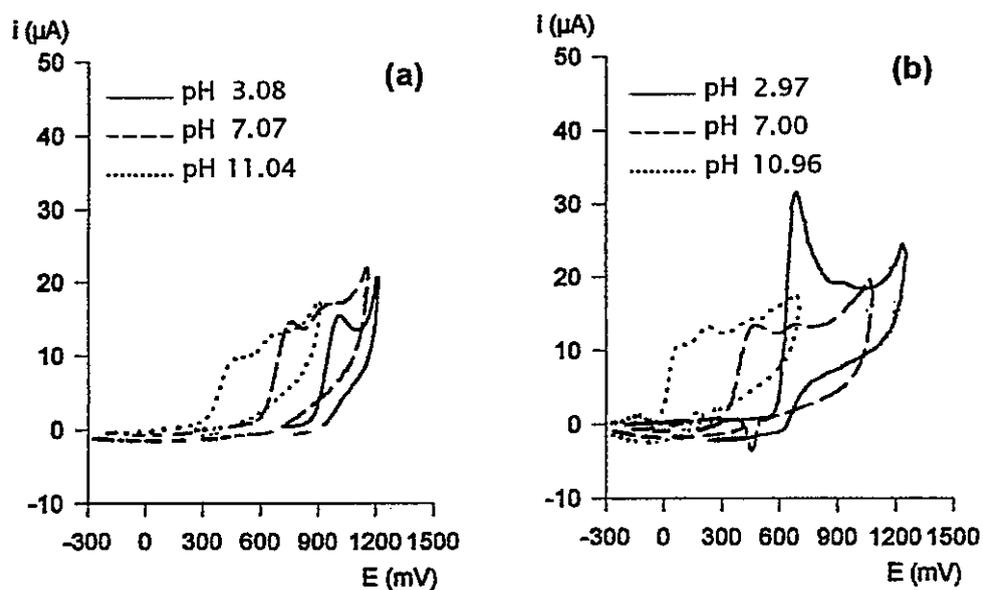


Figura 4.5: Voltamogramas cíclicos en medio prótico de harmalina (a) y harmalol (b).
Velocidad de barrido, 50 mV/s. Barrido inicial en el sentido anódico.

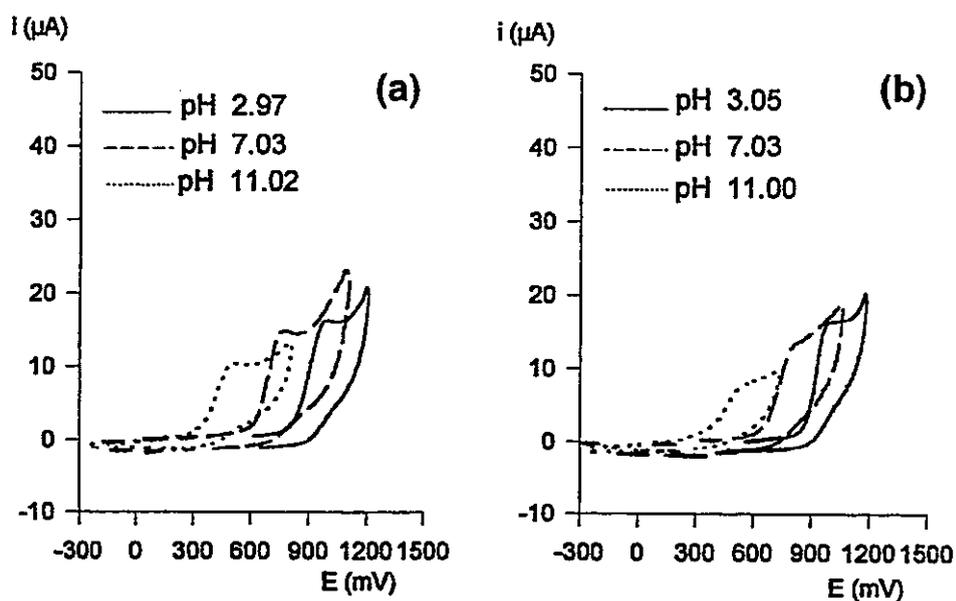


Figura 4.6: Voltamogramas cíclicos en medio prótico de THBC (a) y AHTC (b).
Velocidad de barrido, 50 mV/s. Barrido inicial en el sentido anódico.

Tabla 4.3: Oxidación de β -carbolinas en medio prótico.

Compuesto	Ep (mV) ^a						
	pH 3		pH 7		pH 11		
	S1 ^b	S2	S1	S2	S1	S2	S3
Norharmano (3)	- ^c	-	+990	-	+635	-	-
Harmano (6)	-	-	+990	-	+635	-	-
Harmina (8)	-	-	+940	-	+645	-	-
Harmol (24)	+955	-	+720	-	+380	+795	-
Harmalina (7)	+935	-	+795	+1035	+420	+640	-
Harmalol (20)	+655	+920	+435	+740	+40	+215	+395
THBC (1)	+925	-	+790	-	+465	-	-
AHTC (42)	+940	-	+790	+985	+510	+615	-

^a Potencial de pico anódico. ^b Señal de oxidación. ^c No se detectó señal de oxidación.

Al igual que la reducción de β -carbolinas, las Figuras 4.4, 4.5 y 4.6 muestran que la oxidación de estos compuestos es irreversible a 1000 mV/s. Experimentos realizados con harmalina, harmol, harmina y AHTC en los cuales la velocidad de barrido se varió entre 100 mV/s y 50000 mV/s mostró que la oxidación de estos compuestos es también irreversible a esas velocidades de barrido. Los potenciales de oxidación de todos los compuestos estudiados son dependientes del pH del medio. De manera análoga a lo que sucede en la reducción de estas moléculas, a pH cercanos y superiores al pK_a (Tabla 1.1) se generarían especies neutras más propensas a la oxidación, mientras que en medio ácido la protonación en N-2 dificultaría la oxidación.

A pH 3 sólo norharmano, harmano y harmina no se oxidan en el intervalo de potenciales estudiados, mientras que el resto de los alcaloides se oxida a potenciales entre los +650 mV y +950 mV.

A pH 7 todos los compuestos se oxidan a potenciales entre +430 mV y +950 mV. En los voltamogramas cíclicos correspondientes harmalina y harmalol, se observa una segunda señal de oxidación, también irreversible, a +740 mV y +1035 mV respectivamente.

A pH 11 todos los compuestos se oxidan a potenciales entre +40 mV y +650 mV. En los voltamogramas cíclicos obtenidos para harmol, harmalina y harmalol, se observa una segunda señal de oxidación, entre +215 mV y +795 mV.

Al igual que la oxidación de aminas biogénicas precursoras de la biosíntesis de β -carbolinas ocurre en una primera etapa a través de la salida de un electrón del esqueleto indólico,^{10,11} es posible que la oxidación de los alcaloides β -carbolínicos esté asociada a la salida de un electrón del esqueleto pirdoindólico, como también se ha demostrado que ocurre en la oxidación de la 6-hidroxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolina.⁴ Además, parece probable que una de las tres señales de oxidación de los voltamogramas correspondientes a harmalol se relacione con la oxidación de la función fenólica. A diferencia de la reducción de estos compuestos, la presencia de los sustituyentes metilo en C-1 y metoxilo en C-7 no parece afectar la oxidación de las β -carbolinas estudiadas.

Al igual que en la reducción, los alcaloides harmalina y harmalol, cuyos esqueletos pirdoindólicos incluyen un sistema π no aromático, poseen potenciales de oxidación menos positivos que los de las estructuras totalmente aromáticas (β -carbolinas), posiblemente debido a que la oxidación o reducción de las moléculas aromáticas implica una pérdida de la energía de estabilización asociada a la aromaticidad.

A pH fisiológico la oxidación de dihidro- β -carbolinas, de tetrahydro- β -carbolinas y de harmol ocurre a potenciales más cercanos a los involucrados en los procesos

biológicos (+435--+990 mV). Estos resultados sugerirían entonces que, en el caso de existir algún mecanismo de óxido-reducción involucrado en el modo de acción de las β -carbolinas, éste probablemente sólo ocurriría a través de la oxidación de ellas.

4.5.3 Reducción de β -carbolinas por VCL en medio aprótico

Los voltamogramas cíclicos de β -carbolinas en medio aprótico (DMSO) se muestran en las Figuras 4.7, 4.8 y en el Apéndice III. Estos se obtuvieron tanto para los clorhidratos de β -carbolinas como para sus bases libres. La Tabla 4.4 resume los resultados obtenidos.

De manera similar a lo que ocurre en medio acuoso, en ambiente aprótico la reducción de β -carbolinas, como bases libres o como clorhidratos, es un proceso irreversible cuando la velocidad de barrido varía entre 100 mV/s y 2000 mV/s. Todos los clorhidratos y las bases libres de las β -carbolinas estudiadas se redujeron en DMSO.

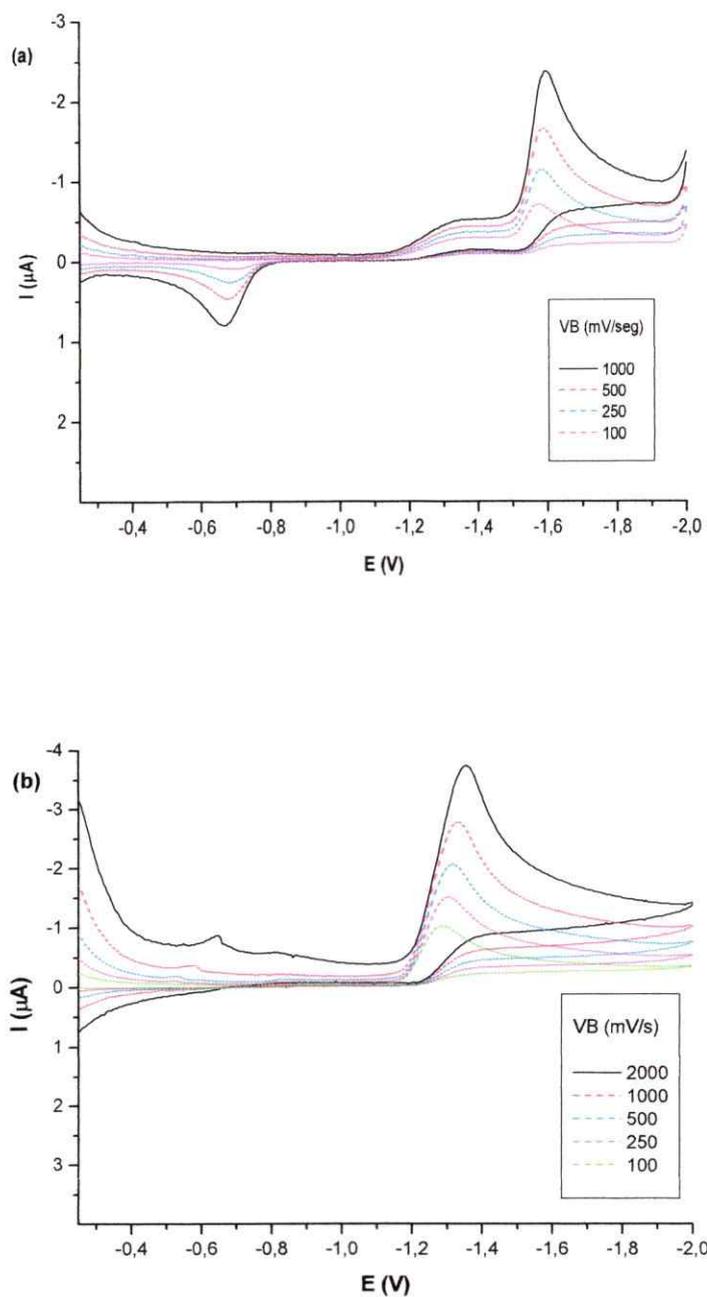


Figura 4.7: Voltamogramas cíclicos en medio aprótico de harmina.HCl (a) y harmalina HCl (b). VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido catódico.

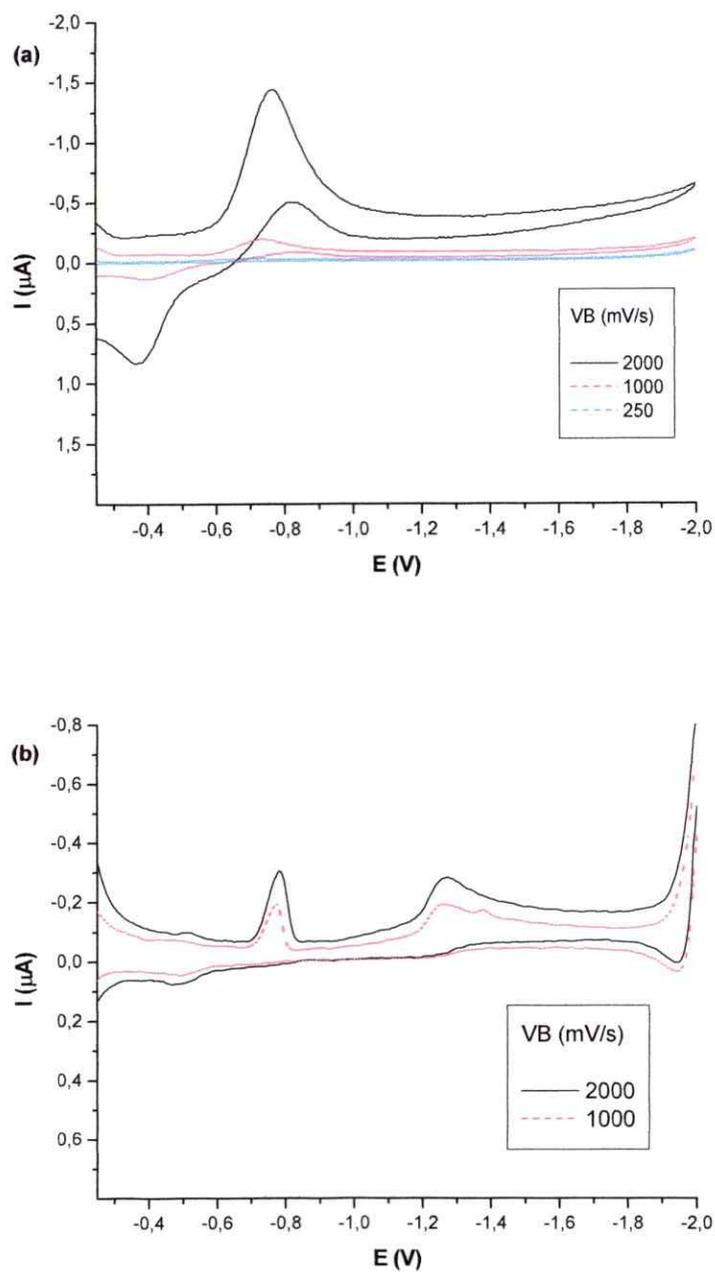


Figura 4.8: Voltamogramas cíclicos en medio aprótico de harmina (a) y harmalina (b).

VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido catódico.

Tabla 4.4: Reducción de β -carbolinas en DMSO

Compuesto	Ep (mV) ^a		
	S1 ^b	S2	S3
Norharmano HCl	- ^c	-	-1405
Harmano HCl	-	-1355	-1501
Harmina HCl	-	-1334	-1596
Harmol HCl	-791	-1365	-1642
Harmalina HCl	-	-1355	-
Harmalol HCl	-	-1279	-
Norharmano	-	-724	-
Harmano	-	-735	-
Harmina	-	-765	-
Harmalina	-	-781	-1269
THBC	-406	-851	-

^a Potencial de pico catódico. ^b Señal de reducción registrada a 2000 mV/s. ^c No se detectó señal.

En los clorhidratos de dihidro- β -carbolinas parece ocurrir un único proceso de reducción, (S2), entre -1279 y -1355 mV probablemente asociado a la reducción del doble enlace C1-N2. En las β -carbolinas totalmente aromáticas, ocurrirían dos procesos: el primero, (S2), entre -1334 y -1405 mV, que sería el mismo proceso que ocurre en los compuestos dihidro, es decir la reducción del enlace C1-N2, y a potenciales similares, y luego una segunda reducción, (S3), que estaría asociada a la reducción de los productos generados tras el primer proceso, lo que ocurriría entre -1405 y -1642.

Se observa también que los clorhidratos de β -carbolinas totalmente aromáticas (norharmano, harmano, harmina y harmol) presentan una señal de oxidación en el barrido anódico entre -560 mV y -671 mV que, a barrido de potencial corto (-500 a -900 mV) no aparece, lo que sugeriría que esa señal correspondería a la oxidación de algún compuesto generado luego de la reducción electroquímica de estas β -carbolinas

completamente aromáticas. Los sustituyentes metilo y metoxilo afectan de manera diferente los procesos de reducción S2 y S3: mientras que, al igual que en ambiente acuoso, la presencia de un metilo en C-1 y de un hidroxilo o metoxilo en C-7 desplaza el proceso S3 hacia potenciales más negativos, el proceso S2 parece sufrir una tendencia inversa, es decir se desplazaría hacia potenciales menos negativos.

Los resultados obtenidos para las bases libres sugieren que a mayor grado de insaturación el potencial de reducción es menos negativo. El carácter dador de los sustituyentes metilo y metoxilo parece afectar la reducción de las bases libres desplazando los potenciales de reducción hacia valores más negativos. Es posible que la señal de reducción de THBC a -406 mV se deba a la reducción de una impureza del compuesto dada la baja intensidad de esta señal.

Aún cuando los potenciales de reducción de las bases libres y del clorhidrato de harmol en DMSO son bastante negativos (-724 -- -791 mV), éstos se acercan más a los potenciales de reducción de algunos procesos biológicos, lo que permite sugerir que algunas β -carbolinas podrían interactuar con sitios biológicos caracterizados por ambientes apróticos y cuyas constantes dieléctricas sean similares a la del DMSO.¹² Además existen pruebas de que, al ser incorporados a péptidos, los potenciales redox de tirosina y triptofano cambian.² Se podría esperar entonces que la interacción de β -carbolinas con proteínas cambie los potenciales redox de las primeras.

AHTC presenta una serie de señales a -277, -347, -675 y -791 mV en el sentido de barrido catódico. En el sentido de barrido anódico se observan señales a -791 y -384 mV. Sólo la señal a -791 mV es comparable con las que presentan otras β -carbolinas, lo que sugeriría que las señales a potenciales menos negativos tendrían su origen en la reducción del grupo carboxilo y en la reducción de otros productos derivados de este proceso.

4.5.4 Oxidación de β -carbolinas por VCL en medio aprótico

Sólo las bases libres de las β -carbolinas (en sus distintos grados de insaturación) se oxidan en medio aprótico, con la excepción de AHTC y de harmano, que no se oxidan. Las Figuras 4.9 y 4.10 y la Tabla 4.5 resumen los resultados obtenidos.

Se observa que harmalina, la única β -carbolina no aromática, es la que se oxida a potencial menor. De las β -carbolinas aromáticas THBC, con un menor grado de insaturación, se oxida a un potencial menor que las totalmente aromáticas. Norharmano presenta una señal de reducción en el barrido catódico (+342 mV), lo que sugeriría la reducción de algún compuesto generado luego de la oxidación electroquímica de esta β -carbolina.

Con la excepción de harmalina, los potenciales de oxidación de estas moléculas en DMSO son más bien altos, lo que sugeriría que no serían metabolizadas por enzimas que participen de la oxidación de sustratos biológicos si el entorno del sitio activo es aprótico y de constante dieléctrica similar a la del DMSO.

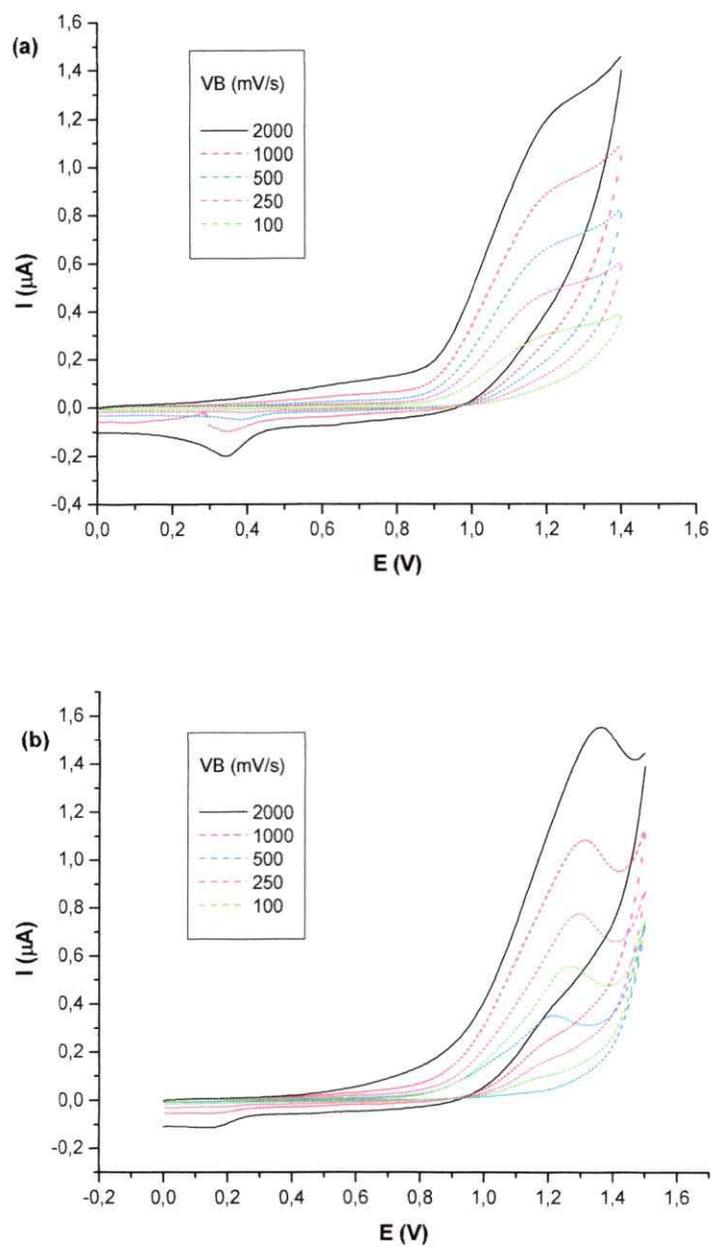


Figura 4.9: Voltamogramas cíclicos en medio aprótico de norharmano (a) y harmina (b). VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido anódico.

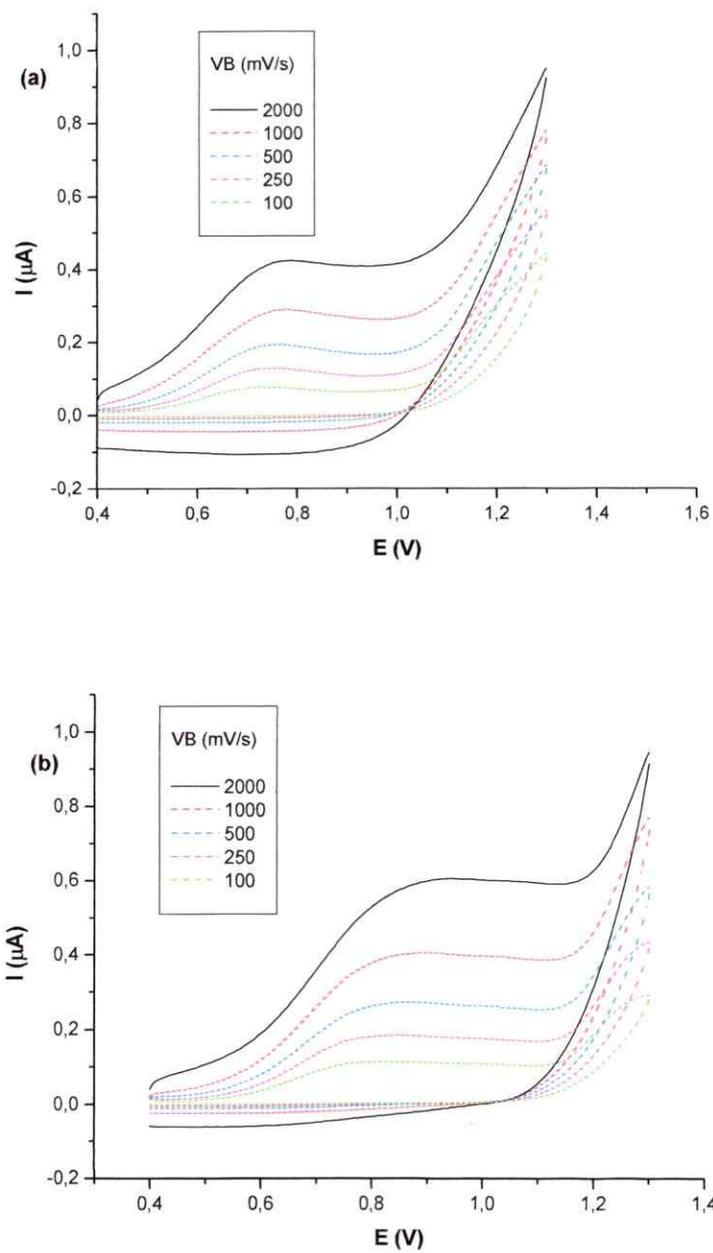


Figura 4.10: Voltamogramas cíclicos en medio aprótico de harmalina (a) y THBC (b). VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido anódico.

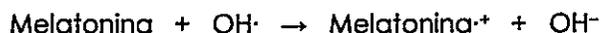
Tabla 4.5: Oxidación de β -carbolinas en DMSO

Compuesto	Ep (mV) ^a
Norharmano	+1239
Harmina	+1365
Harmalina	+789
THBC	+940

^a Potencial de pico anódico

4.5.5 Resonancia paramagnética electrónica del radical 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolinio atrapado con *N*-*tert*-butil- α -fenilnitrona

El atrapador de radicales OH \cdot endógeno más poderoso descubierto hasta el momento es la hormona melatonina, una indolamina muy similar a las β -carbolinas,¹⁴ de la que se cree que es el precursor inmediato del 6-metoxiharmano (**25**).¹⁵ Estudios realizados con esta hormona sugieren que su actividad antioxidante ocurriría a través de la transferencia de un electrón a radicales libres electrofílicos como OH \cdot para formar un radical catiónico indolilo, es decir,



Este proceso de oxidación ocurre electroquímicamente a +580 mV a pH fisiológico.⁹

Dada la actividad antioxidante que presentan las β -carbolinas, según se discutiera en la sección 4.3 (ver Tabla 4.1), se intentó la detección de un radical piridoindolilo a pH 7, generado electroquímicamente a través de la oxidación por VCL a velocidades de barrido altas (hasta 100 V/s). Sin embargo, no fue posible detectar radicales ni para harmalina ni para harmalol. Se recurrió entonces a la detección de un radical piridoindolilo generado por oxidación electroquímica en ambiente aprótico

(DMSO), mediante el estudio de su espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR).

Se detectó un radical de muy corta vida utilizando la técnica de atrapamiento de radicales ("spin trapping") con el atrapador *N*-*tert*-butil- α -fenilnitrona (PBN). La Figura 4.11 muestra el espectro de EPR del radical *N*-*tert*-butil- α -fenilnitroxido enlazado a la 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina (BC-PBN \cdot), mientras que la Figura 4.12 muestra una estructura química tentativa de este radical.

Las constantes de acoplamiento hiperfino del radical BC-PBN \cdot tienen los siguientes valores, que sugieren que el radical piridoindolilo que reacciona con el atrapador PBN estaría centrado en un carbono¹⁶:

$$a_N = 15,2 \text{ gauss}$$

$$a_H = 3,2 \text{ gauss}$$

Este resultado sugeriría que la actividad antioxidante que presentan las β -carbolinas podría explicarse a través de la formación de radicales piridoindolilo, probablemente generados por la reacción de estos alcaloides con radicales endógenos electrofilicos, de manera análoga a la melatonina.

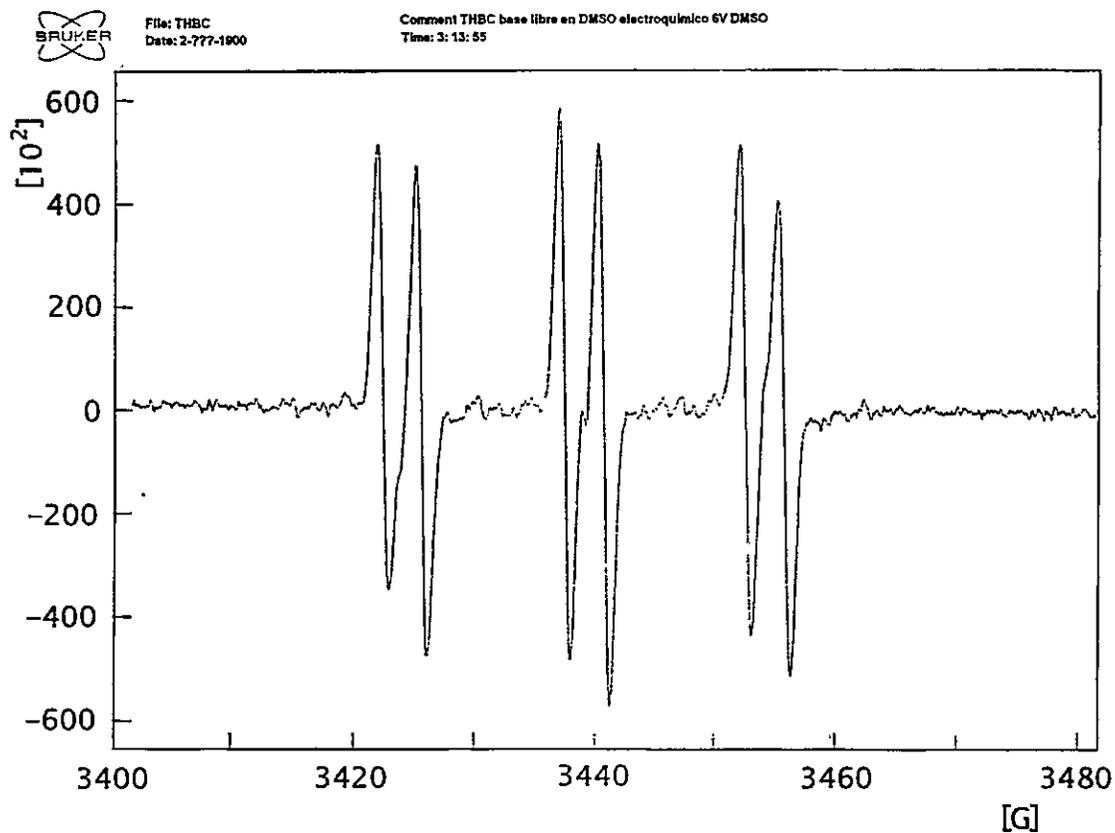


Figura 4.11: Espectro de EPR del radical de la *N*-*tert*-butil- α -fenilnitrona enlazada a la 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.

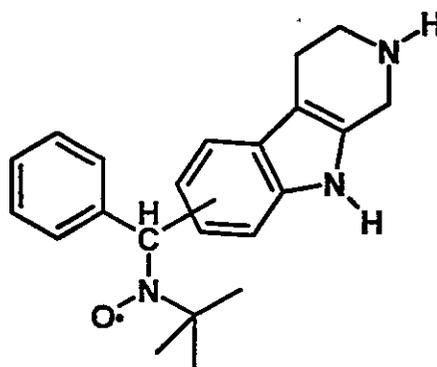


Figura 4.12: Estructura química tentativa del radical *N*-*tert*-butil- α -fenilnitroxido enlazado a la 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.

4.5.6 Potenciales redox de β -carbolinas y descriptores de estructura electrónica

4.5.6.1 Medio acuoso, pH 7

Al graficar los potenciales de oxidación o de reducción de las β -carbolinas en medio acuoso o en DMSO, en función de descriptores de estructura electrónica como la electrofilia (ω), la carga crítica (N_{MAX}), el potencial químico electrónico (η) o la blandura (S), se observa que, de manera general, las β -carbolinas se comportan como subfamilias de compuestos dependiendo del grado de insaturación que presentan. Así, al graficar por ejemplo los potenciales de reducción a pH 7 de dihidro- β -carbolinas junto con las β -carbolinas, no se encuentra ninguna correlación con los descriptores. Sin embargo sí es posible encontrar tendencias entre estos parámetros si se grafican en forma separada. De la misma manera, los alcaloides protonados en N-2 presentan propiedades diferentes, de manera que, aún cuando algunas tendencias entre parámetros se mantienen, no es posible encontrar una única correlación al graficar alcaloides neutros y sus homólogos protonados. Se desprende de estas observaciones que tanto el grado de insaturación del esqueleto piridoindólico como la protonación en N-2 de estas moléculas modifican sustancialmente la distribución electrónica de estos alcaloides.

Las Figuras 4.13 y 4.14 muestran la relación entre el potencial de reducción a pH 7 (E_R), la electrofilia (ω) y la carga crítica (N_{MAX}), de β -carbolinas neutras y protonadas en N-2.

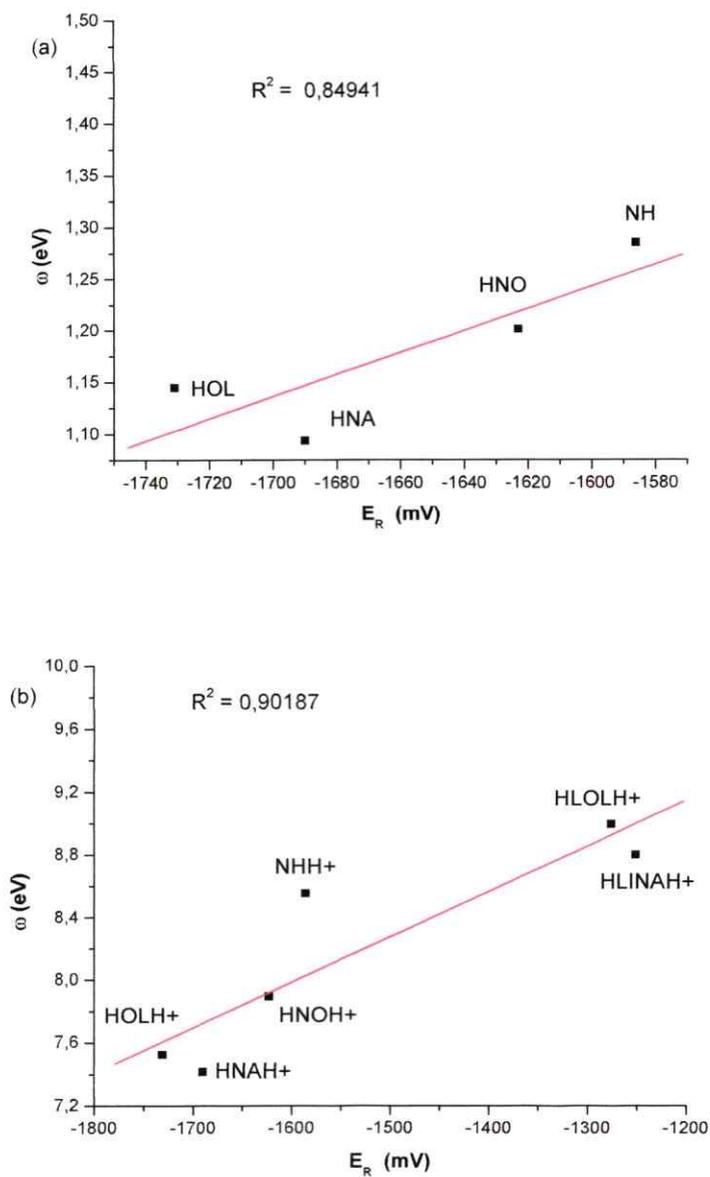


Figura 4.13: Relación entre el potencial de reducción a pH 7 (E_R) y la electrofilia (ω) de las β -carbolinas neutras (a) y protonadas en N-2 (b).

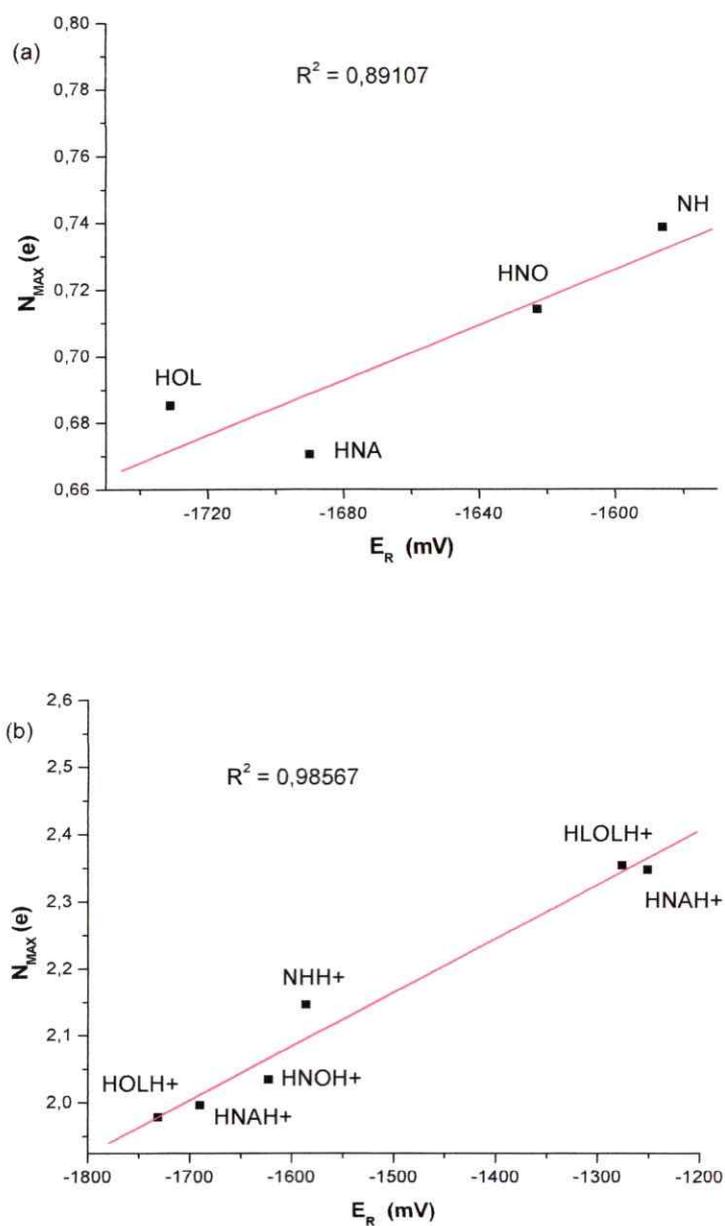


Figura 4.14: Relación entre el potencial de reducción a pH 7 (E_R) y la carga crítica (N_{MAX}) de las β -carbolinas neutras (a) y protonadas en N-2 (b).

Se observa que al aumentar la electrofilia o la carga crítica, los potenciales de reducción a pH 7 de las β -carbolinas se hacen más positivos; es decir, al aumentar la electrofilia o la carga crítica estos alcaloides se reducen con mayor facilidad. La correlación es pobre entre E_R y ω , tanto en las β -carbolinas neutras como en las protonadas. La correlación entre E_R y ΔN_{MAX} mejora notablemente y es especialmente buena cuando las β -carbolinas se encuentran protonadas. En el caso de las β -carbolinas neutras, las correlaciones mejoran sustancialmente si se excluye harmol ($R^2 \approx 0,995-0,999$). Se ha sugerido que tanto harmol como harmalol interactúan con el agua a través del hidroxilo fenólico;¹⁵ cabría esperar que esta interacción, probablemente a través de puentes de hidrógeno, también modifique la distribución electrónica de manera que el cálculo de descriptores de harmol y harmalol en ausencia de agua como solvente sea poco representativo de lo que está ocurriendo en el medio de reacción. Se desprende además de estos resultados, que la protonación en N-2 del esqueleto piridoindólico disminuye el efecto de la diferencia en el grado de insaturación en el anillo piridínico sobre la distribución electrónica de estos compuestos, y que probablemente disminuye también las diferencias en la solvatación de estos compuestos debido a la presencia o ausencia de hidroxilos fenólicos. No se encontró ninguna correlación con el potencial químico electrónico ni con la blandura de las β -carbolinas.

Con respecto al potencial de oxidación a pH 7, sólo se encontró una relación pobre con el potencial químico electrónico (μ), según se muestra en la Figura 4.15, la cual indicaría que, al aumentar el potencial químico electrónico, disminuye el potencial de oxidación. Es decir, las moléculas más "ricas" en electrones, como las tetrahydro- β -carbolinas, son las que se oxidarían más fácilmente. Esta relación parece ser muy sensible a la presencia de un grupo hidroxilo en C-7, ya que, al incluir en el

gráfico harmol y harmalol, esta tendencia se pierde completamente, probablemente a la interacción de los grupos fenólicos con el solvente (agua).

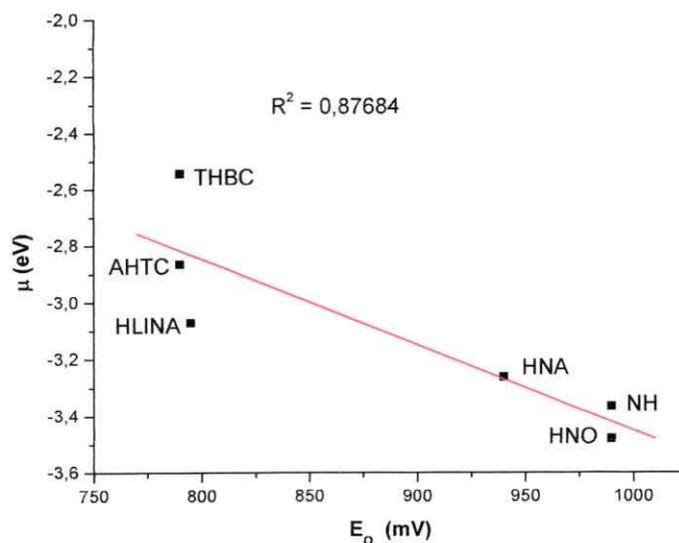


Figura 4.15: Relación entre el potencial de oxidación a pH 7 (E_0) y el potencial químico electrónico (μ) de β -carbolinas neutras.

4.5.6.2 Medio aprótico, DMSO

Los potenciales de reducción de β -carbolinas neutras en DMSO muestran una excelente correlación con el potencial químico electrónico (μ), como se observa en la Figura 4.16. Al aumentar μ los potenciales de reducción en DMSO se hacen más negativos. Es decir, las moléculas más "ricas" en electrones se reducen con mayor dificultad. No se encontró relación con los otros descriptores calculados en este trabajo.

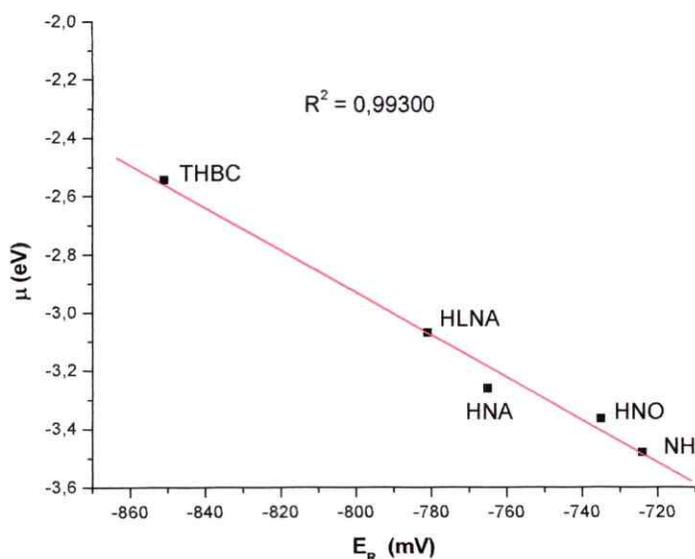


Figura 4.16: Relación entre el potencial de reducción en DMSO (E_R) y el potencial químico electrónico (μ) de β -carbolinas neutras.

En cuanto a las β -carbolinas protonadas, el proceso S3, asociado sólo a β -carbolinas totalmente aromáticas, presenta una buena correlación con la electrofilia y con la carga crítica, según se muestra en la Figura 4.17 y una correlación más bien pobre con el potencial químico electrónico, según se muestra en la Figura 4.18a. De manera similar a lo que sucede en medio acuoso a pH 7, al aumentar la electrofilia o la carga crítica los potenciales de reducción en DMSO se hacen más positivos, i. e. las β -carbolinas protonadas se reducen con mayor facilidad. También de manera similar a lo que ocurre en ambiente acuoso a pH 7, al aumentar el potencial químico electrónico el potencial de reducción en DMSO se hace más negativo.

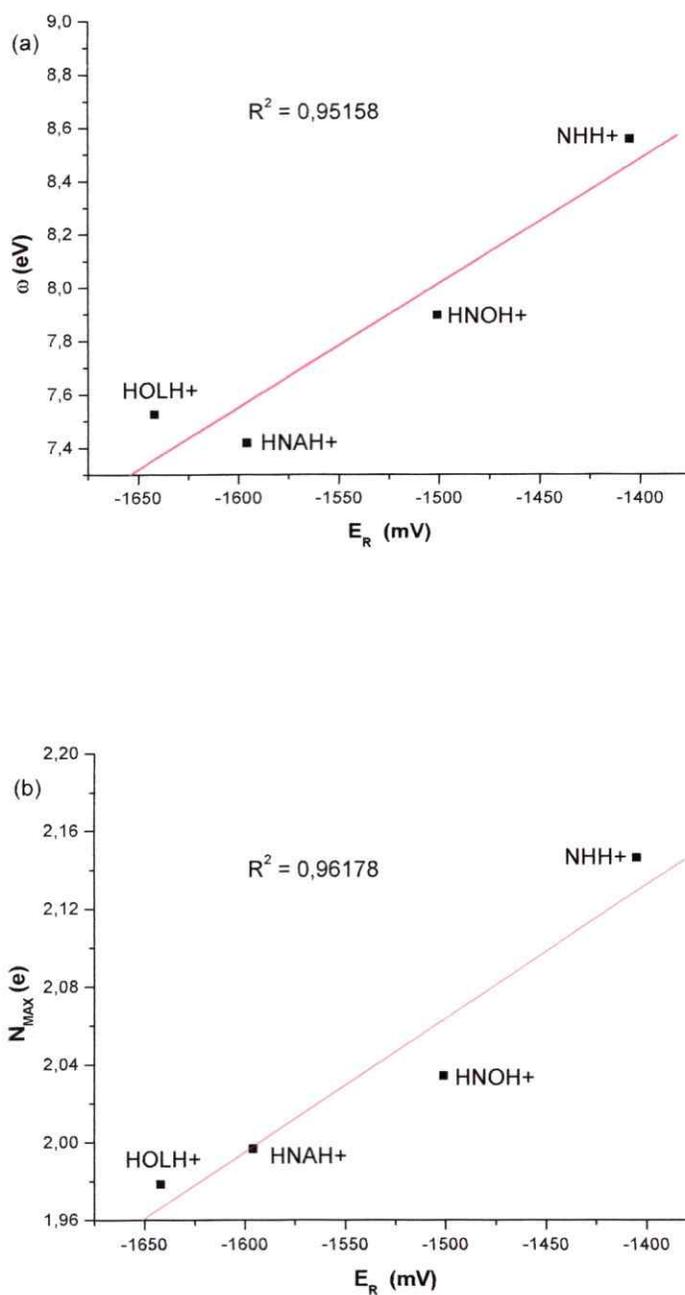


Figura 4.17: Relación entre el potencial de reducción (E_R) en DMSO para el proceso S3, la electrofilia (ω) y la carga crítica (N_{MAX}) de β -carbolinas protonadas.

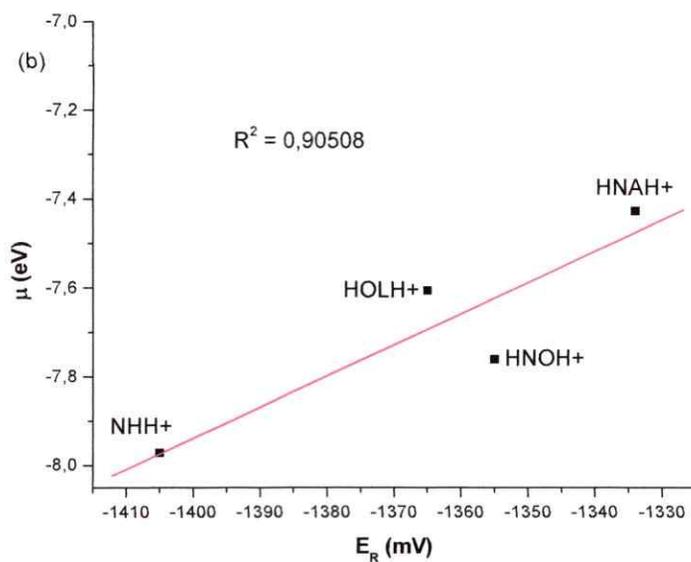
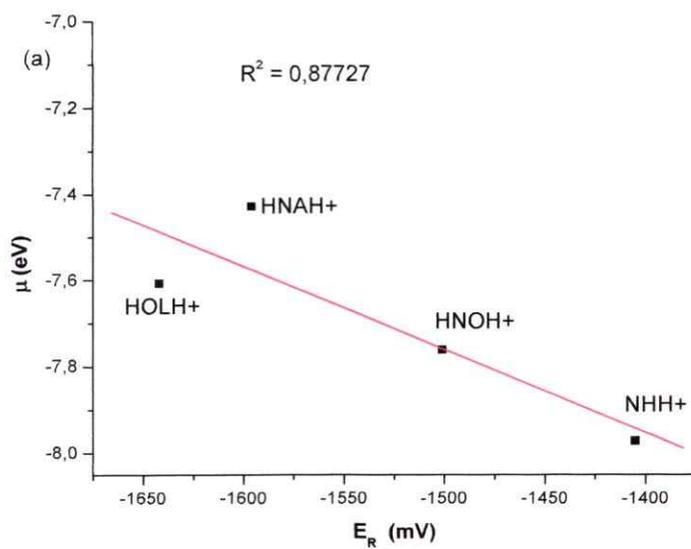


Figura 4.18: Relación entre el potencial de reducción (E_R) en DMSO y el potencial químico electrónico (μ) de β -carbolinas protonadas en el proceso S3 (a) y S2 (b).

Para el proceso S2, común a las dihidro- β -carbolinas y a las β -carbolinas protonadas, y que estaría asociado a la reducción del doble enlace C1-N2, se encontró sólo una correlación, entre el potencial de reducción en DMSO y el potencial químico electrónico, según se muestra en la Figura 4.18b. De manera inesperada y contrariamente a lo que ocurre con las tendencias encontradas para la oxidación en medio acuoso, para la reducción en DMSO de los alcaloides neutros (ver Figuras 4.15 y 4.16), y para la reducción en DMSO de los alcaloides protonados (Figura 4.18a), la tendencia indicaría que la reducción S2 de los compuestos protonados se desplaza hacia potenciales más positivos a mayor potencial químico electrónico. Es decir, mientras más "ricas" en electrones son las moléculas, más fácilmente se reducen. Esta tendencia podría explicarse al considerar que, para que el enlace doble C1-N2 se reduzca, el átomo de nitrógeno debe cambiar su hibridación desde sp^2 a sp^3 , es decir la densidad electrónica en torno a N2 debe aumentar. Podría ser entonces que, si el sistema indólico adyacente a este enlace y/o C1 están sustituidos con grupos dadores de electrones, el cambio de hibridación -necesario para la reducción del doble enlace- se vea favorecido.

4.5.7 Actividad antioxidante de β -carbolinas y descriptores de estructura electrónica

Como se discutiera en la sección 4.3, estudios realizados en β -carbolinas revelaron que presentaban actividad antioxidante, y que ésta dependía del patrón de sustitución de los compuestos estudiados.⁹ Los autores proponen que esta actividad se debería a la capacidad de las β -carbolinas de formar y estabilizar radicales libres, pero no discuten si esto ocurriría a través de la oxidación o de la reducción de ellas.

En una primera etapa se analizó la relación entre la actividad antioxidante (en medios enzimático y no enzimático) y los potenciales de reducción y de oxidación (en

medio acuoso a pH 7 y en DMSO). Desafortunadamente de las cinco β -carbolinas cuya actividad antioxidante se estudió, sólo cuatro de ellas pudieron ser incorporadas a este análisis, ya que el valor exacto de la actividad antioxidante de la harmina no fue determinado. Luego se analizó la correlación entre la actividad antioxidante (dependiente y no dependiente de enzimas) y los descriptores de estructura electrónica.

La Figura 4.19 muestra la relación que se encontró entre la actividad antioxidante no dependiente de enzimas y el potencial de oxidación en medio acuoso a pH 7. Los datos se tomaron de las tablas 4.1 y 4.3. Se observa que las moléculas con menor potencial de oxidación presentan mayor actividad antioxidante.

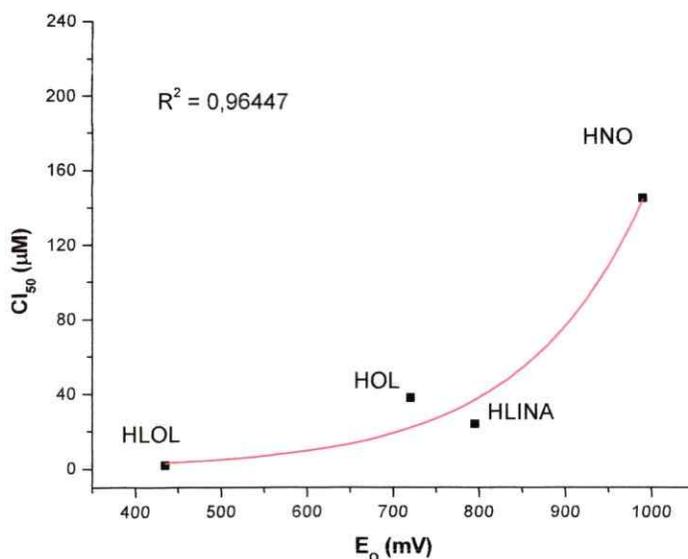


Figura 4.19: Relación entre el potencial de oxidación (E_0) a pH 7 y la actividad antioxidante (Cl_{50}) en medio no enzimático de β -carbolinas neutras.

Esta es la única relación que se encontró entre la actividad antioxidante y los potenciales redox de las β -carbolinas. Este resultado es congruente con las conclusiones obtenidas de la secciones 4.5.1 y 4.5.2, en las cuales se sugiere que las β -carbolinas no serían atrapadores de radicales libres biológicos a través de la reducción de ellas, sino más bien a través de su oxidación.

Respecto de la relación entre la actividad antioxidante no dependiente de enzimas de β -carbolinas y sus descriptores de estructura electrónica, la Figura 4.20 muestra la única relación encontrada, entre el valor de CI_{50} y el potencial químico electrónico (μ) de los alcaloides protonados. Mientras más positivo es μ , mayor es la actividad antioxidante de las β -carbolinas, lo que está de acuerdo con un proceso de oxidación (ver también Figura 4.15).

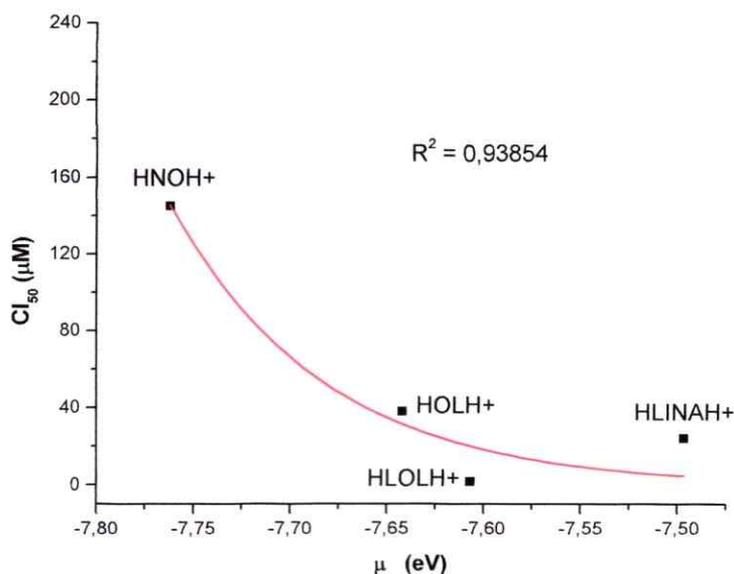


Figura 4.20: Relación entre la actividad antioxidante (CI_{50}) en medio no enzimático y el potencial químico (μ) de β -carbolinas protonadas.

La actividad antioxidante dependiente de enzimas presentaría una excelente correlación con la carga crítica (N_{MAX}) y una correlación pobre con la blandura (S) de las β -carbolinas neutras, según indica la Figura 4.21. Las tendencias indicarían que la actividad antioxidante aumenta si la carga crítica aumenta y que las β -carbolinas más blandas son aquellas que presentan mayor actividad antioxidante. Estas tendencias podrían sugerir que la actividad antioxidante de β -carbolinas en un medio enzimático podría asociarse no sólo a la interferencia de los procesos redox del sistema sino también a la interacción con alguna(s) enzima(s) presente en el medio de incubación (ver por ejemplo Figura 3.8).

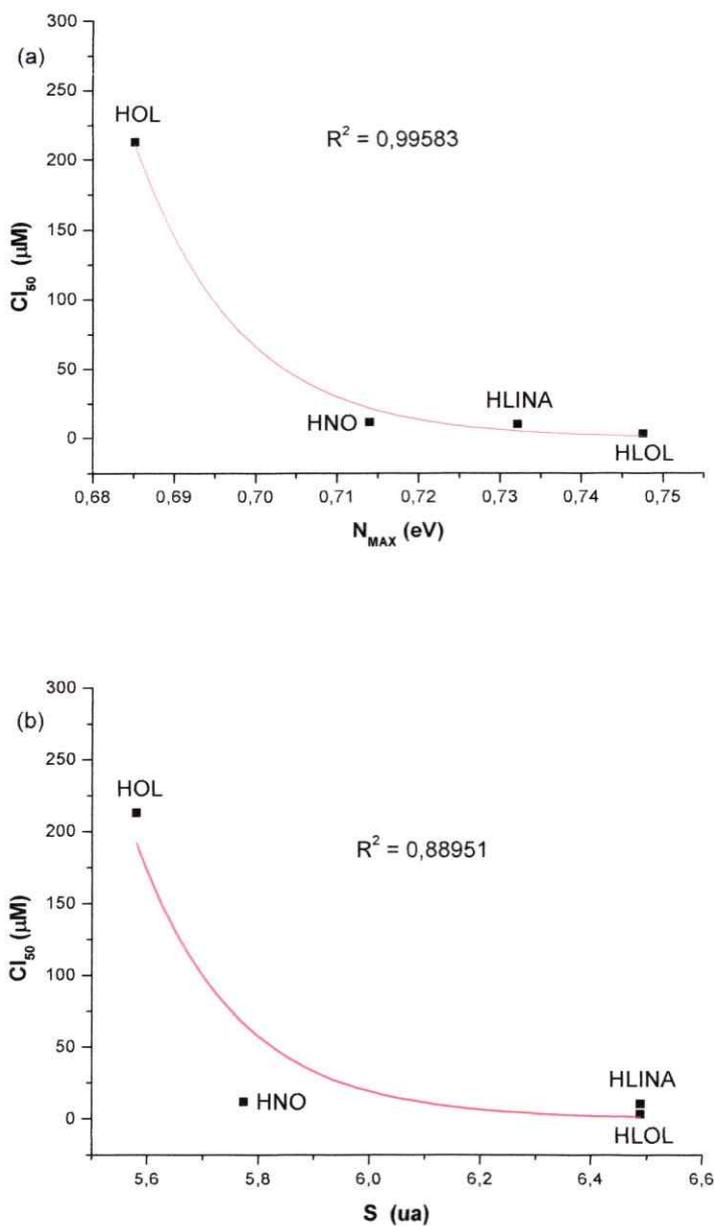


Figura 4.21: Relación entre la actividad antioxidante (CI₅₀) en medio enzimático, la carga crítica (N_{MAX}) (a) y la blandura (S) de β-carbolinas neutras.

Referencias

-
- ¹ Christen, S.; Peterhans, E.; Stocker, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 2506.
 - ² De Felippis, M. R.; Murthy, C. P.; Faraggi, M.; Klapper, M. H. *Biochemistry* **1989**, *28*, 4847.
 - ³ Tse, S. Y. H.; Mak, I.-T.; Dickens, B. F. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *42*, 459.
 - ⁴ Zhang, F.; Goyal, R. N.; LeRoy-Blank, C.; Dryhurst, G. J. *Med. Chem.* **1992**, *35*, 82.
 - ⁵ Han, Q.-P.; Dryhurst, G. J. *Med. Chem.* **1996**, *39*, 1494.
 - ⁶ Matsubara, K.; Collins, M. A.; Akane, A.; Ikebuchi, J.; Neafsey, E. J.; Kagawa, M.; Shiono, H. *Brain Res.* **1993**, *610*, 90.
 - ⁷ Tsuchiya, H.; Yamada, K.; Tajima, K.; Hayashi, T. *Alcohol Alcoholism* **1996b**, *31*, 197.
 - ⁸ Doak, R. L.; Hofman, R. B.; Elliot, G. R.; Seagraves, E.; Barchas, J. D. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1978**, *45*, 729.
 - ⁹ Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (2000) en *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3ª Edición, Oxford University Press: New York, p. 351.
 - ¹⁰ Douglas, K. T.; Sharma, R. K.; Walmsley, J. F.; Hider, R. C. *Molec. Pharmacol.* **1983**, *23*, 614.
 - ¹¹ Wrona, M. Z.; Dryhurst, G. J. *Org. Chem.* **1987**, *52*, 2817.
 - ¹² Hela, P. H.; Anipindi, N. R.; Priyadarsini, K. I.; O'Neill, P. J. *Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8606.
 - ¹³ Stryer, L. (1995) en *Biochemistry*, cuarta edición; Freeman, W. H. & Co., Nueva York, p. 532.
 - ¹⁴ Crespi, F.; Ratti, E.; Trist, D. *Analyst*, **1994**, *119*, 2193.
 - ¹⁵ Hardeland, R.; Reiter, R. J.; Poeggeler, B.; Tan D.-X. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1993**, *17*, 347.
 - ¹⁶ NIEHS SPIN-TRAP Database, <http://www.chm.bris.ac.uk>
 - ¹⁷ Codoñer, A.; Medina, P.; Ortiz, C.; Jover, E. *Spectrochim. Acta* **1993**, *49 A*, 321.

CAPITULO 5. EFECTO DE ALGUNOS ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS EN EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi*

5.1 Introducción

La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana) es un problema de salud serio en America Latina, donde más de 20 millones de personas se encuentran infectadas con *Trypanosoma cruzi*, el parásito protozooario que causa esta enfermedad. Los índices de mortalidad van de un 8 al 12 % dependiendo de la edad y del estado fisiológico del paciente.^{1,2}

Para tratar esta enfermedad se usan dos drogas nitroheterocíclicas, nifurtimox y benznidazol,³ sin embargo los serios efectos colaterales producidos en un 40-70 % de los pacientes fuerzan a la mitad de ellos a discontinuar el tratamiento.⁴ Además, se han detectado diferencias importantes en la susceptibilidad hacia estas drogas entre las variadas cepas de parásitos aisladas.^{5,2} El compuesto nifurtimox no se usa en algunos países debido a su toxicidad y su ineficacia en etapas crónicas de la enfermedad de Chagas. Debido a lo inadecuado de los regímenes terapéuticos disponibles, miles de compuestos químicos -tanto naturales como sintéticos- han sido probados como agentes antichagásicos, pero la toxicidad, probada o supuesta y la baja solubilidad en agua de muchos de ellos han limitado su uso.^{6,7}

Entre los compuestos probados, algunos alcaloides β -carbólicos han demostrado ser activos contra epimastigotes de especies de *Trypanosoma in vitro*.^{8,9} Los resultados obtenidos por los autores sugieren que la insaturación del anillo piridínico

y la sustitución en C-7 (ver Figura 3.2 para la numeración) aumentan la actividad tripanomicida.⁸

Como se mencionara en las secciones 1.1 y 1.2, los alcaloides β -carbolínicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Han sido aislados de hongos, de especies de plantas que pertenecen a varias familias, de organismos marinos¹⁰ y de fluidos y tejidos de mamíferos (incluyendo humanos).^{11,12} La actividad farmacológica de estos alcaloides es también muy diversa: han demostrado inhibir diferentes enzimas e interactuar con sistemas de neurotransmisión como receptores opioides, GABA, colinérgico muscarínico, serotonina y dopamina.¹³ Como agentes quimioterapéuticos, algunas β -carbolinas se han reportado citotóxicas para células cancerígenas¹³ y parasiticidas contra otros microorganismos diferentes de *Trypanosoma* spp.^{14,15}

La existencia endógena de algunas β -carbolinas en el hombre sugiere la presencia de rutas biosintéticas y metabólicas para estos compuestos, de manera que el cuerpo humano debería ser capaz reducir sus efectos tóxicos. Este hecho y la actividad quimioterapéutica de estos alcaloides, cuyos mecanismos de acción permanecen siendo desconocidos, impulsaron este grupo de trabajo a continuar estudiando el efecto de β -carbolinas en distintas cepas de *T. cruzi*, con el objeto de obtener una mejor comprensión respecto del modo de acción de estos alcaloides. Además, considerando que los regímenes terapéuticos de la enfermedad de Chagas pueden ser de larga duración (90-120 días),⁴ parece interesante determinar si el efecto de estos compuestos persiste en los cultivos, o si los parásitos desarrollan estrategias para evitar los efectos tóxicos de estos alcaloides. Esta información podría ser de gran utilidad en la búsqueda de compuestos guía en el diseño de drogas nuevas con baja toxicidad y alta eficacia en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

En este capítulo se informan los resultados obtenidos al tratar cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* pertenecientes a dos cepas chilenas: Tulahuén (con alta sensibilidad a nifurtimox) y LQ (con baja sensibilidad a nifurtimox),¹⁶ con β -carbolinas (ver Figura 3.2 para las estructuras) en un periodo de 14 días. Posteriormente los resultados se analizarán a la luz de la caracterización fisico-química que se ha desarrollado en esta tesis

5.2. Metodología

5.2.1. Compuestos químicos

Todos los compuestos químicos utilizados fueron de la más alta pureza disponible en el mercado. Los reactivos Triptosa, suero fetal ovino, extracto de levadura y triptona se adquirieron de Difco. Los clorhidratos o las bases libres de harmina, harmano, harmalina, harmol, harmalol, norharmano y 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina (THBC) se adquirieron de Aldrich. El ácido 3-Harmano-1,2,3,4-tetrahidrocarboxílico (AHTC), hemina y todos los otros reactivos químicos fueron obtenidos de Sigma.

5.2.2. Parásitos

Los epimastigotes de *T. cruzi* (cepas Tulahuén y LQ) de nuestra colección se cultivaron a 28 °C en un medio Diamond monofásico,¹⁷ siendo la sangre reemplazada por hemina. 4 μ M. El suero fetal se agregó en una concentración final de 4%.

5.2.3. Inhibición del crecimiento del cultivo

Las drogas se agregaron en soluciones de DMSO, para alcanzar las concentraciones finales en el medio de cultivo indicado en las tablas y figuras. No se observó efecto en el crecimiento celular o consumo de oxígeno atribuible a DMSO a las concentraciones usadas. El crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* se siguió por nefelometría utilizando frascos de cultivo con un brazo lateral.^{18,19} Los datos de CI_{50} y CI_{95-100} se calcularon por interpolación de las curvas de inhibición de crecimiento de cultivo a diferentes concentraciones en el 7^{mo} día de cultivo (fase exponencial).

5.2.4. Consumo de oxígeno

Las medidas de respiración se realizaron polarográficamente con un electrodo Clark N° 5331 (Yellow Spring Instrument) en un oxígrafo Gilson 5/6.²⁰ El volumen de la cámara fue de 2 ml y la temperatura se fijó en 28 °C. La cantidad de parásitos usados para los ensayos fue equivalente a 1 mg de proteína en la cepa Tulahuén y 0.5 mg en la cepa LQ. Los parásitos fueron resuspendidos en 0.05 M de buffer de fosfato de potasio, pH 7.4, conteniendo 0.107 M de cloruro de sodio.

5.2.5 Toxicidad de la droga

Para desarrollar las determinaciones de toxicidad, las drogas se agregaron a suspensiones de parásitos (10^6 - 10^7 células/ml) en concentraciones de 0.1 y 1 mM en agua o DMSO. Se observaron los cambios en la forma y motilidad de los parásitos después de 1, 20 y 40 h a 28 °C.²⁰

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Efecto de β -carbolinas en cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*

La Figura 5.1 muestra el efecto de algunas β -carbolinas en el crecimiento de epimastigotes de las cepas Tulahuén y LQ de *T. cruzi*. Las cepas Tulahuén alcanzan su fase estacionaria de crecimiento después de 9-11 días de cultivo, mientras que la cepa LQ lo hace después de 7-9 días de cultivo.

Aunque todos los compuestos son inhibidores activos del crecimiento, sólo la harmina tiene una actividad significativa a concentraciones 100 μ M. Harmina inhibe el crecimiento de la cepa Tulahuén en un 90% al 10^{mo} día y en un 88% el 7^{mo} día en la cepa LQ. Harmano muestra una inhibición de un 68% al 10^{mo} día en la cepa Tulahuén y de un 67% en la cepa LQ. Harmalina, norharmano y harmol muestran actividades moderadas y similares en la cepa Tulahuén con inhibición de los cultivos de un 45-47% después de 10 días. Harmalol, THBC y AHTC son inhibidores pobres del crecimiento de cultivos de la cepa Tulahuén, con un 29-34% de inhibición al 10^{mo} día. En la cepa LQ, harmalina inhibe el crecimiento de los cultivos en un 61% después de 7 días, mientras norharmano, harmol, harmalol, THBC y AHTC son menos activos contra epimastigotes, inhibiendo su crecimiento en un 17-35% al 7^{mo} día.

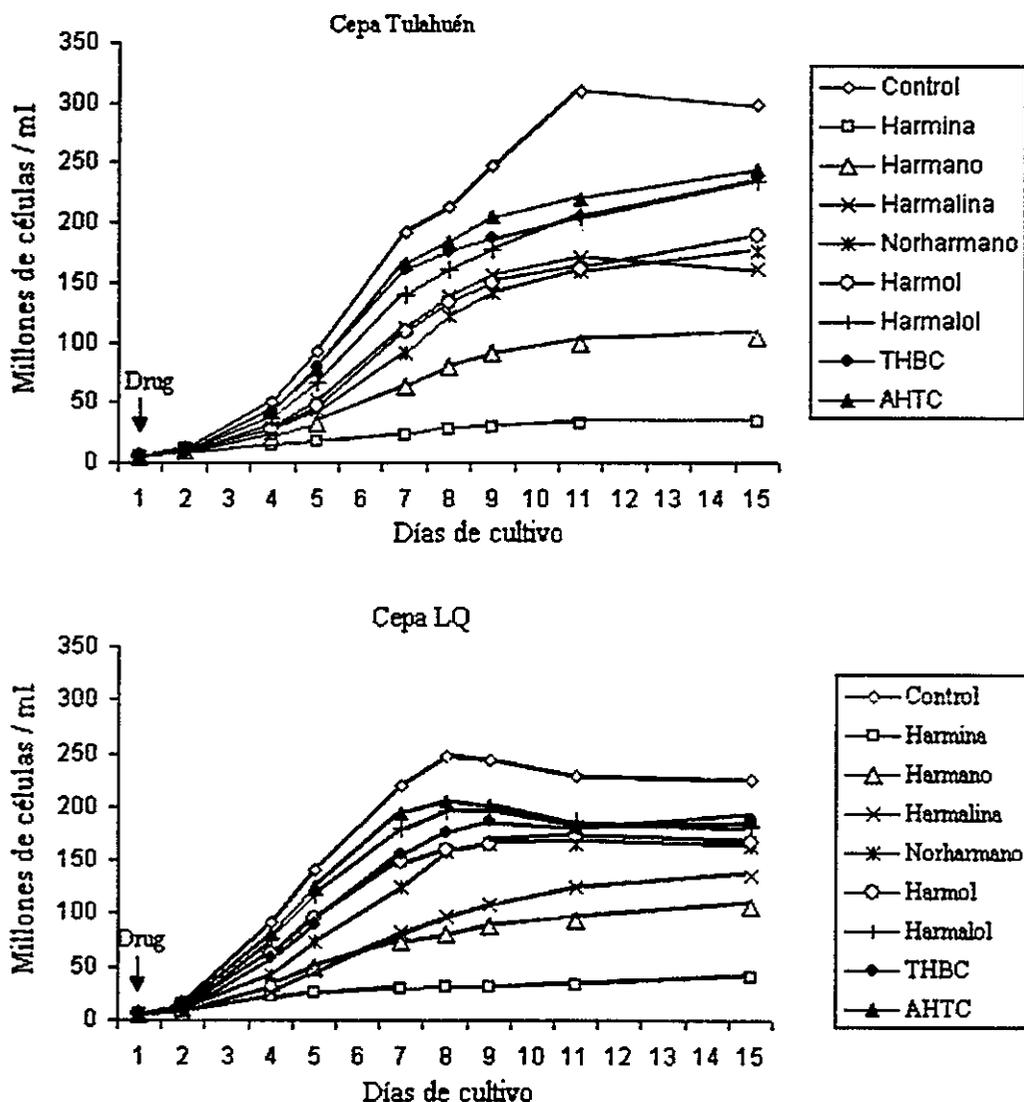


Figura 5.1: Efectos de varias β -carbolicinas en el crecimiento de epimastigotes de cepas Tulahuén y LQ de *Trypanosoma cruzi*. Las drogas se agregaron en concentraciones finales $100 \mu\text{M}$. Los valores que se muestran representan los promedios de tres o más experimentos independientes con una variación menor al 10% entre ellos. Las poblaciones iniciales de epimastigotes en cultivo fueron 5.6×10^6 células/ml en la cepa Tulahuén y 6.0×10^6 células/ml en la cepa LQ.

La actividad tripanomicida del nifurtimox se basa en la generación de radicales libres.²¹ La cepa Tulahuén es más sensible al nifurtimox que la cepa LQ, presumiblemente debido a que la cepa Tulahuén tiene concentraciones de glutatión y tripanotión menores que la cepa LQ. Se sabe que el glutatión¹⁶ y el tripanotión son dos factores importantes en el mecanismo de defensa celular contra los radicales libres.^{22,23}

La Tabla 5.1 muestra las concentraciones de harmina y harmano necesarias para inhibir en un 50% (Cl₅₀) o 95% (Cl₉₅) el crecimiento del cultivo de los epimastigotes. Dado que la cepa LQ, relativamente insensible al nifurtimox, presenta una mayor susceptibilidad hacia las β -carbolinas, parece ser que la generación de radicales libres no es un factor importante en el modo de acción de estos alcaloides.

Tabla 5.1: Efecto de harmina y harmano en el crecimiento de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* de cepas Tulahuén y LQ

Compuesto	Cepa Tulahuén		Cepa LQ	
	Cl ₅₀	Cl ₉₅	Cl ₅₀	Cl ₉₅
Harina	19.69*	124.00*	17.99*	105.64*
Harmano	40.04**	368.71**	25.68***	206.44***

Cl₅₀ corresponde a concentraciones micromolares que inhiben el crecimiento de cultivo en un 50%. Cl₉₅ corresponde a concentraciones micromolares que inhiben el crecimiento de cultivo en un 95%. *P<0.006; **P<0.07; ***P<0.008 con respecto a los cultivos de control.

5.3.2 Efecto de β -carbolinas en la respiración de epimastigotes de *T. cruzi*

La Tabla 5.2 muestra el efecto de algunas β -carbolinas en la respiración de epimastigotes de *T. cruzi* pertenecientes a las cepas Tulahuén y LQ. La inhibición de la respiración (concentración de droga 1 Mm) varía desde un 17% a un 77% en las cepas Tulahuén y desde un 12% a un 61% en las cepas LQ. Estos resultados sugieren que la

inhibición de la cadena respiratoria podría estar jugando un papel importante en el mecanismo de acción de las β -carbolinas. Sin embargo, la respuesta de las cepas Tulahuén y LQ frente al consumo de oxígeno no es la misma. Mientras que la cepa Tulahuén muestra una fuerte correlación entre la actividad tripanosomicida y la inhibición de la respiración (los mejores compuestos tripanosomicidas son también los mejores inhibidores, y viceversa), la cepa LQ no muestra una correlación clara. Cabe notar que la inhibición de la respiración parece ser el mecanismo principal de la acción de la mayoría de las β -carbolinas estudiadas en la cepa Tulahuén. Sin embargo en la cepa LQ la inhibición del consumo de oxígeno da cuenta sólo parcialmente de la actividad tripanosomicida de estos compuestos.

Tabla 5.2: Efecto de alcaloides β -carbolínicos en el consumo de oxígeno de epimastigotes de *T. cruzi* de las cepas Tulahuén y LQ

Compuesto	% inhibición de consumo de oxígeno	
	Cepa Tulahuén	Cepa LQ
Harina	77.0	61.0
Harmano	50.5	42.0
Norharmano	44.0	29.5
Harmol	41.0	61.0
Harmalina	28.0	23.0
Harmalol	19.5	16.0
THBC	17.5	16.0
AHTC	21.0	12.5

Todas las β -carbolinas fueron agregadas a una concentración final de 1mM. La respiración control fue 25.0 nmol O/min/mg de proteína para la cepa Tulahuén y 27.4 nmol O/min/mg de proteína para la cepa LQ. Los valores informados representan los promedios de tres o más experimentos independientes con una variación de no más del 15% entre ellos.

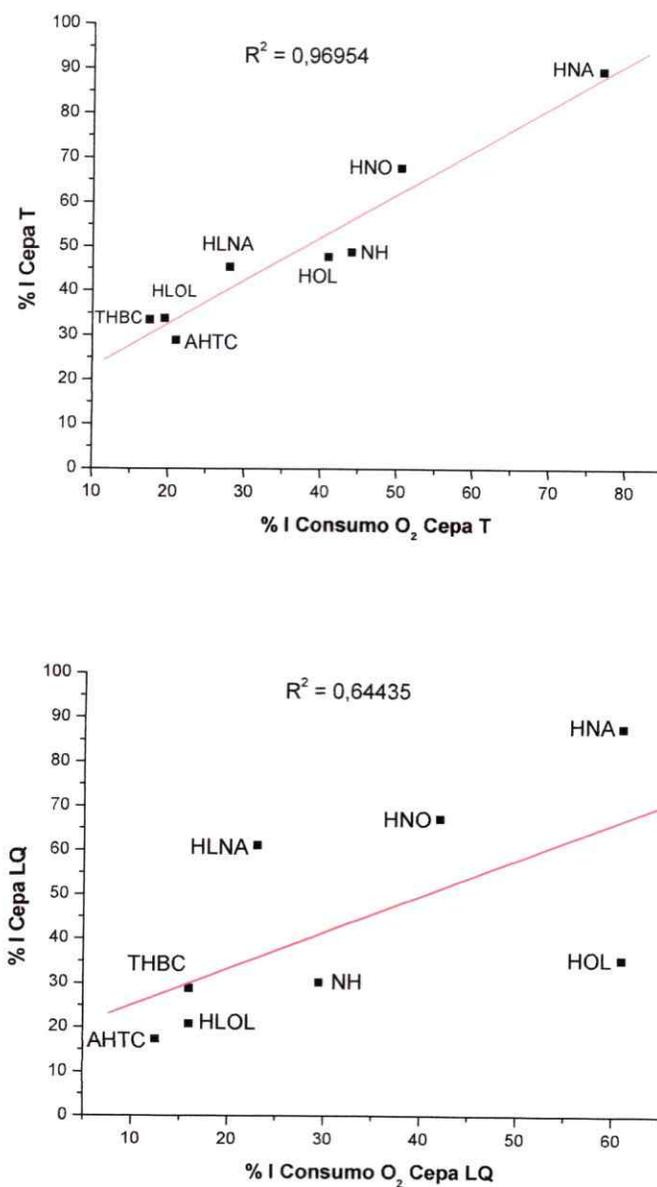


Figura 5.2: Correlación entre la inhibición del consumo de oxígeno y la inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* para las cepas Tulahuén y LQ.

La Tabla 5.3 muestra un estudio de la toxicidad de las drogas hacia epimastigotes de la cepa Tulahuén, determinadas a través de una observación microscópica durante un periodo de 40 h, a dos concentraciones de droga. Se

pueden observar diferencias importantes en las susceptibilidades de estos parásitos hacia estos compuestos químicos. Estos resultados están de acuerdo con aquellos obtenidos para la inhibición del crecimiento de los cultivos de epimastigotes (Figura 5.1). Norharmano resultó ser el alcaloide más tóxico frente a *T. cruzi*, seguido por harmina y harmano. Estos tres compuestos producen lisis de la mayoría de las células después de 40 h, a concentraciones de 1mM. Harmol y harmalina son menos tóxicos, produciendo deformación y/o inmovilización de los epimastigotes. Harmalol y AHTC mostraron toxicidad baja o nula hacia los parásitos. Los resultados obtenidos en los experimentos resumidos en la Figura 5.1 indican que en etapas tempranas de los períodos de incubación de los cultivos de epimastigotes, norharmano es el mejor inhibidor, pero aparentemente se gatillan estrategias de detoxificación en los parásitos para contrarrestar la toxicidad de este alcaloide.

Tabla 5.3: Toxicidad de algunos alcaloides β -carbolínicos hacia epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tuluahuén

Compuesto	0.1 mM			1mM		
	1h	20h	40h	1h	20h	40h
Control	0	0	0	0	0	0
Norharmano	+	++	+++	++	+++	++++
Harmina	+	+	++	++	+++	++++
Harmano	0	+	+	++	+++	+++
Harmol	0	+	+	+	++	+++
Harmalina	0	+	+	+	+	++
Harmalol	0	0	0	0	+	++
AHTC	0	0	0	0	0	0

Los grados de toxicidad, expresados como 0, +, ++, +++, +++++, representan disminución en la motilidad, cambio en forma y lisis de células evaluadas microscópicamente ($\times 400$ magnificación) después de 1, 20 y 40h a dos concentraciones de drogas. Los datos mostrados representan los resultados de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten ser más específicos en las descripciones de relaciones estructura-actividad.⁸ Como fuera observado por otros autores, la insaturación del anillo piridínico aumenta la actividad tripanosomicida. Las 1,2,3,4- β -carbolinas tienen actividades bastante bajas, mientras que las 1,2-dihidro- β -carbolinas son mejores inhibidores del crecimiento. Un anillo piridoindol completamente insaturado parece ser una condición necesaria para una actividad tripanosomicida óptima en esta familia de compuestos. Esto podría asociarse con la planaridad de estas moléculas, con su conducta redox o con su distribución de densidad electrónica, por mencionar tres posibles consideraciones estructurales. Un grupo metilo en C-1 aumenta la actividad, posiblemente por un aumento de la lipofilia de la molécula o por una interacción específica con un residuo hidrofóbico en un sitio activo. La sustitución en el C-7 con un grupo metoxilo también aumenta la actividad (comparar harmina con harmano en la Figura 5.1 y Tabla 5.1), pero si el sustituyente en esta posición es un grupo hidroxilo, la actividad tiende a disminuir (comparar harmina y harmol en la Figura 5.1 y Tabla 5.3). Esto se explicaría considerando la presencia de un centro hidrofóbico cercano a un sitio donde las β -carbolinas ejercen su acción, en el cual un grupo metoxilo se ajustaría mejor que un grupo hidroxilo, o simplemente por una disminución de la lipofilia.

Los mecanismos de acción de β -carbolinas como agentes tripanosomicidas no son conocidos. Se ha informado que estos alcaloides forman asociaciones intermoleculares con los grupos prostéticos de flavoenzimas, FAD y FRN,^{24,25} y que son capaces de interferir en la síntesis de DNA en células cancerígenas.^{26,27} Si la generación de radicales libres no es un mecanismo importante en la acción tripanosomicida de β -carbolinas, podría ser posible que las asociaciones con las flavoenzimas de los parásitos, pertenecientes o no a la cadena respiratoria, y/o la alteración de la síntesis

del DNA del parásito, fueran responsables de la actividad tripanosomicida de estos compuestos.

5.3.3 Relación entre la actividad inhibitoria de β -carbolinas sobre el crecimiento de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* con otros parámetros fisicoquímicos y con los descriptores de estructura electrónica

Con el objeto de comprender los posibles modos de acción de las β -carbolinas, se realizó un análisis entre la actividad inhibitoria de β -carbolinas sobre el crecimiento de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* de las cepas Tulahuén y LQ con los siguientes parámetros: pK_a (datos tomados de la Tabla 1.1), lipofilia (datos tomados de la Tabla 1.2, constantes de equilibrio de la asociación riboflavina- β -carbolina y FAD- β -carbolina (Tablas 3.1 y 3.2), reducción y oxidación de β -carbolinas en medio acuoso (a pH 7) y en DMSO (Tablas 4.2, 4.3, 4.4 y 4.5) y con los descriptores de estructura electrónica potencial químico electrónico, dureza, electrofilia, carga crítica, y transferencia de carga hacia $LFH1^+$ ($\Delta N1$). Puesto que a pH fisiológico las formas neutras y protonadas de las β -carbolinas se encuentran en equilibrio, y que ambas podrían ser responsables de la actividad biológica, donde fue posible las dos formas se consideraron formas se consideraron (Oxidación y reducción en DMSO y descriptores de estructura electrónica).

5.3.3.1 Cepa Tulahuén

La Figura 5.3 muestra que la actividad inhibitoria del crecimiento de los cultivos de epimastigotes se relaciona con la unión a flavinas (riboflavina y FAD): al aumentar la unión a las flavinas, aumenta la actividad inhibitoria. Este resultado sugiere que, parte

de la actividad inhibitoria, se debería a la interacción de β -carbolinas tanto con flavoenzimas como con flavinas libres.

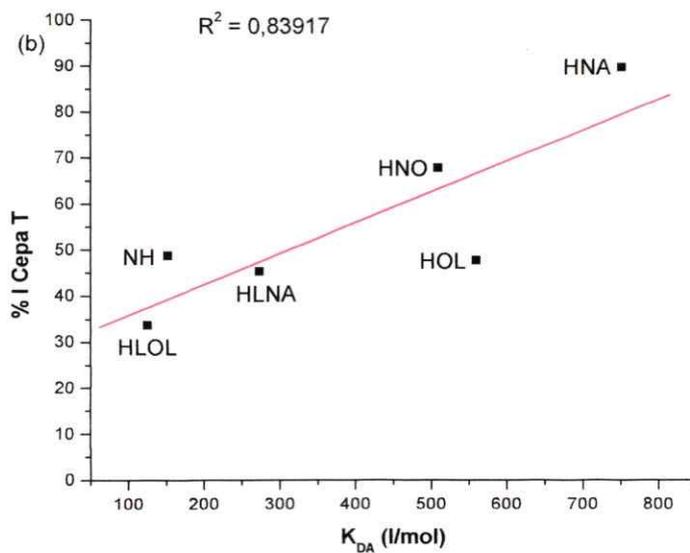
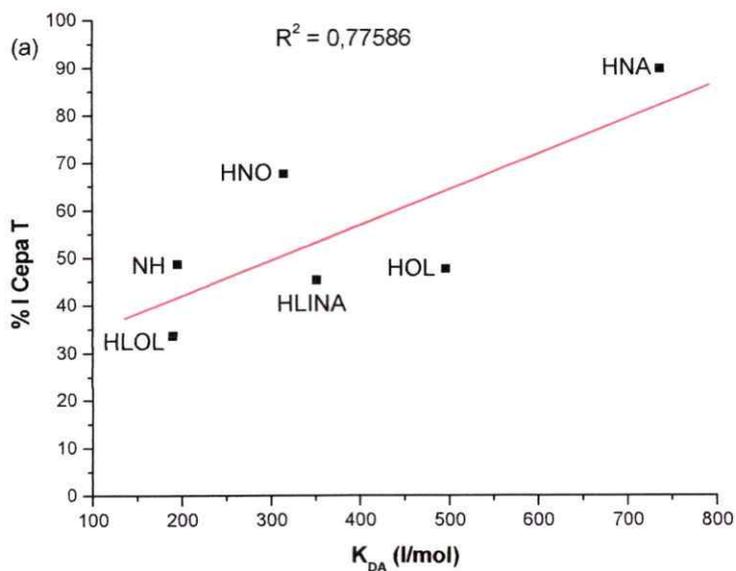


Figura 5.3: Relación entre la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* y las constantes de asociación (K_{DA}) riboflavina- β -carbolina (a) y FAD- β -carbolina para la cepa Tulahuén.

La única correlación que se encontró entre los descriptores de estructura electrónica y la actividad inhibitoria para las β -carbolinas neutras se muestra en la Figura 5.4:

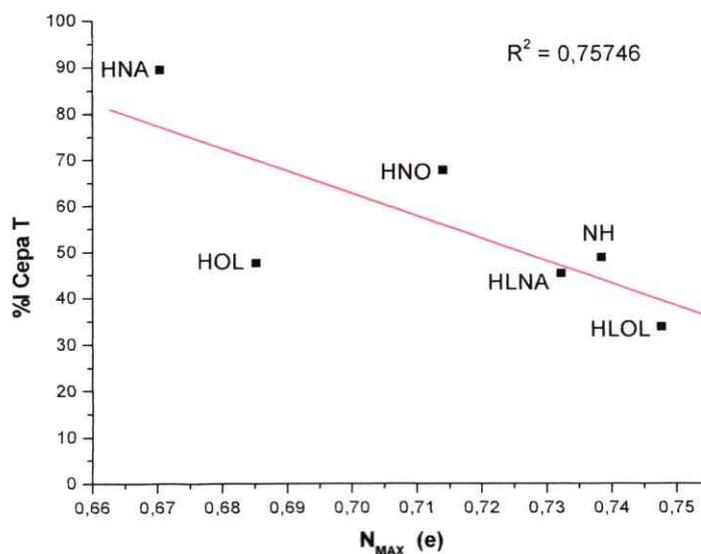


Figura 5.4: Relación entre la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* y la carga crítica (N_{MAX}) de β -carbolinas neutras.

La tendencia encontrada indicaría que, mientras mayor es la cantidad de carga que la molécula necesita del medio en el que se encuentra para estabilizarse, menor es la actividad inhibitoria. Visto de otra manera, el medio en el cual las β -carbolinas neutras están ejerciendo su actividad no es buen dador de carga frente a éstas, por lo tanto, mientras menos carga necesiten para estabilizarse, mayor es la actividad.

Respecto de las β -carbolinas protonadas, se encontraron correlaciones con la electrofilia y la carga crítica según se muestra en la Figura 5.5.

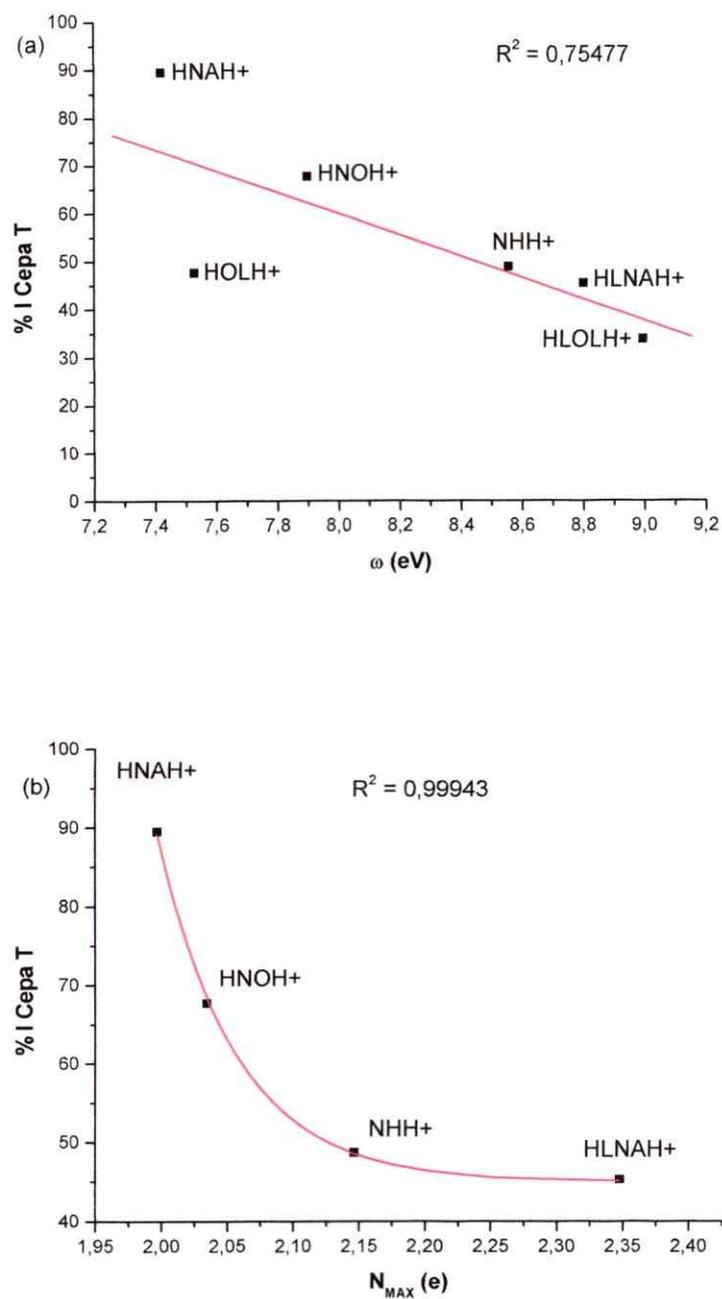


Figura 5.5: Relación entre la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*, la electrofilia (a) y la carga crítica (b).

Mientras mayor es el carácter electrofílico de las β -carbolinas protonadas, menor es la actividad inhibitoria. Este resultado sugeriría que estos alcaloides podrían estar interactuando con sitios biológicos más electrofílicos, donde la nucleofilia de estos compuestos favorezca la acción inhibitoria. De manera similar a las β -carbolinas neutras, el aumento de la carga crítica desfavorece la actividad inhibitoria de las β -carbolinas protonadas. Esta relación sólo se encontró en los alcaloides totalmente aromáticos que, sin embargo, son los que presentan mayor actividad; al incluir las dihidro y las tetrahidro- β -carbolinas la relación se pierde ya que los compuestos se separan dependiendo de la insaturación.

Por último, también se encontró que la actividad inhibitoria del crecimiento de cultivos de epimastigotes se relaciona con la actividad antioxidante no dependiente de enzimas de las β -carbolinas, según se observa en la Figura 5.6:

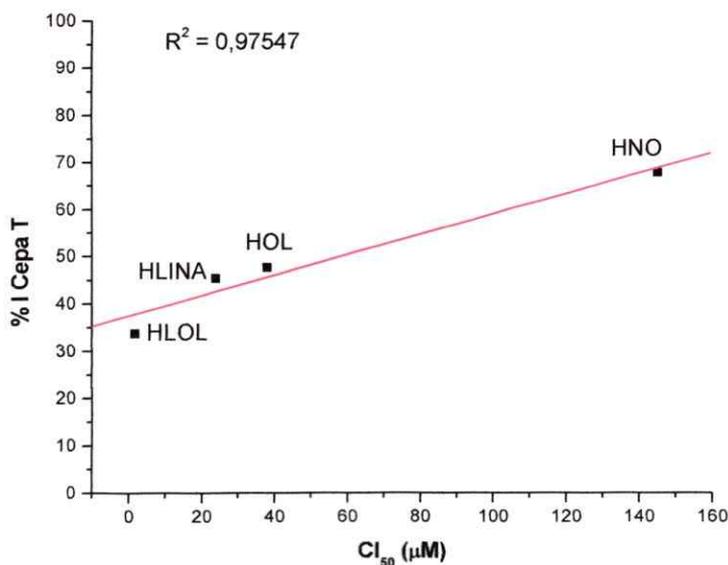


Figura 5.6: Relación entre la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* y la actividad antioxidante no dependiente de enzimas (CI₅₀).

La actividad inhibitoria disminuye con la capacidad antioxidante de estos compuestos. Esta relación es comprensible si se considera que los agentes antioxidantes protegen los sistemas biológicos de las alteraciones en los sistemas redox que puedan generar radicales libres, y por lo tanto contrarrestan el daño que distintos agentes puedan causar a estos organismos.

5.3.3.2 Ceba LQ

La Figura 5.7 muestra que la actividad inhibitoria de las β -carbolinas depende de la lipofilia de estos compuestos. Si aumenta la lipofilia aumenta la actividad. Esta tendencia podría relacionarse con el transporte de las β -carbolinas a través de las membranas de los distintos organelos de los epimastigotes, el que se ve favorecido para compuestos más lipofílicos, y también con las características de los sitios activos donde estos compuestos ejercen su acción, en los cuales podrían existir residuos hidrofóbicos, cuya interacción con sustituyentes como OH (que disminuyen la lipofilia) se desfavorece.

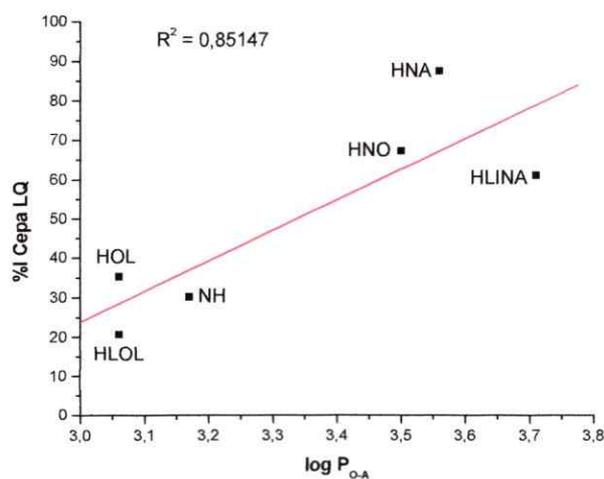


Figura 5.7: Relación entre la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* y la lipofilia ($\log P_{O-A}$) de β -carbolinas.

Al igual que en la cepa Tulahuén, la actividad inhibitoria del crecimiento de epimastigotes para la cepa LQ se relaciona con la constante de asociación β -carbolina-flavina, como se observa en la Figura 5.8.

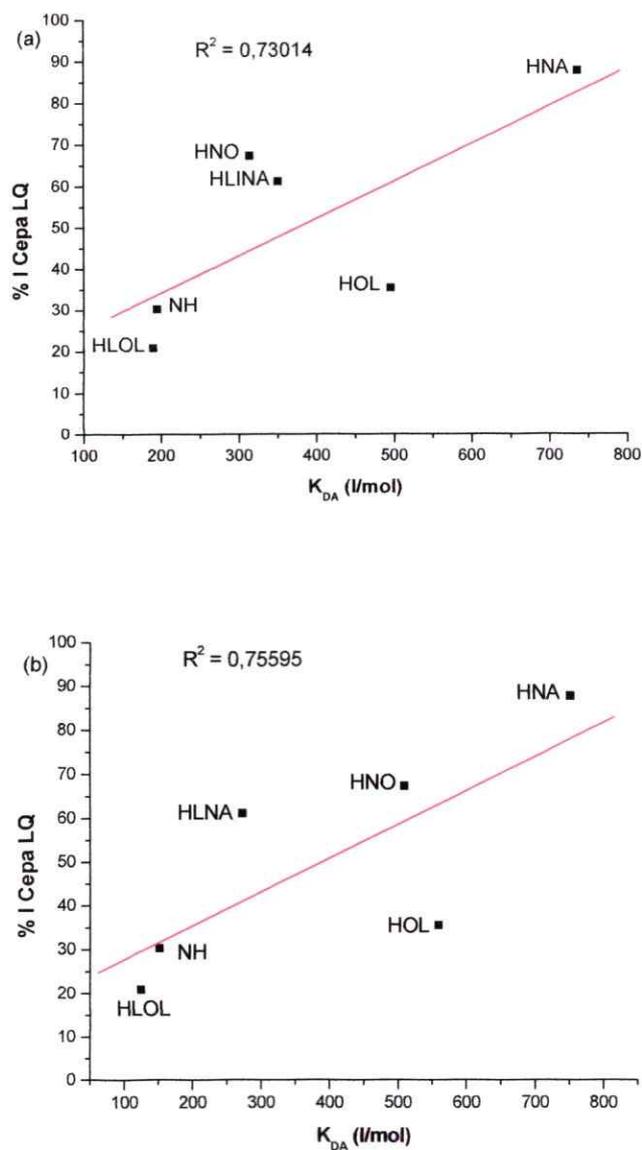


Figura 5.8: Relación entre la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* y las constantes de asociación (K_{DA}) riboflavina- β -carbolina (a) y FAD- β -carbolina para la cepa LQ.

Al aumentar la unión a las flavinas aumenta la actividad. Sin embargo la correlación es más pobre que en la cepa Tulahuén, de lo que se desprendería que la asociación con flavinas es menos importante en la cepa LQ.

La Figura 5.9 muestra la relación entre la actividad inhibitoria de los clorhidratos de β -carbolinas totalmente aromáticas y el potencial de reducción en DMSO (proceso S3). Mientras más positivo es el potencial de reducción, mayor es la actividad inhibitoria de estos compuestos, lo que sugeriría que una parte de la actividad inhibitoria se relacionaría con la reducción de estos alcaloides.

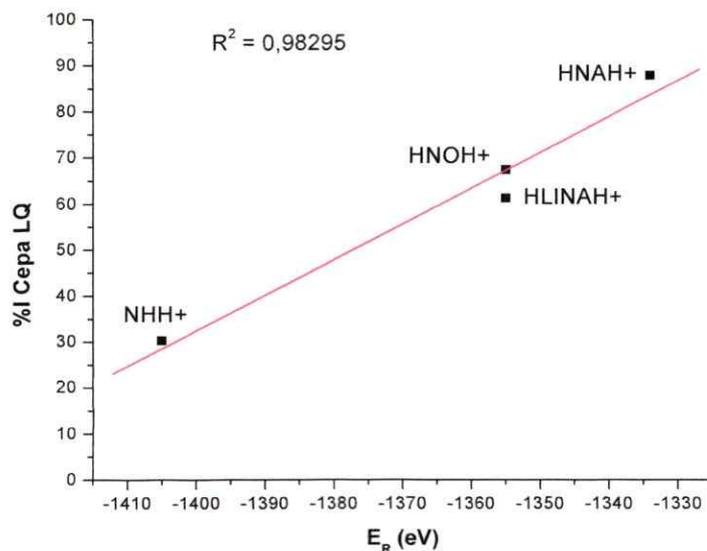


Figura 5.9: Relación entre la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* y el potencial de reducción en DMSO de β -carbolinas protonadas.

5.3.4 Relación entre la actividad inhibitoria de β -carbolinas sobre la respiración de epimastigotes de *T. cruzi* con otros parámetros fisicoquímicos y con los descriptores de estructura electrónica

La relación entre la inhibición de la respiración de epimastigotes de *T. cruzi* y otros parámetros fisicoquímicos se realizó a través de un análisis idéntico al descrito en la sección 5.3.3.

5.3.4.1 Cepa Tulahuén

La Figura 5.10 muestra la relación entre la inhibición del consumo de oxígeno y la unión de β -carbolinas a flavinas. Al igual que para la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes, al aumentar la unión a flavinas, aumenta la inhibición del consumo de oxígeno.

La Figura 5.11 muestra las correlaciones entre la inhibición del consumo de oxígeno y los descriptores de estructura electrónica dureza química y carga crítica de las β -carbolinas neutras, mientras que la Figura 5.12 muestra las correlaciones entre la inhibición de la respiración, la electrofilia y la carga crítica de los alcaloides protonados.

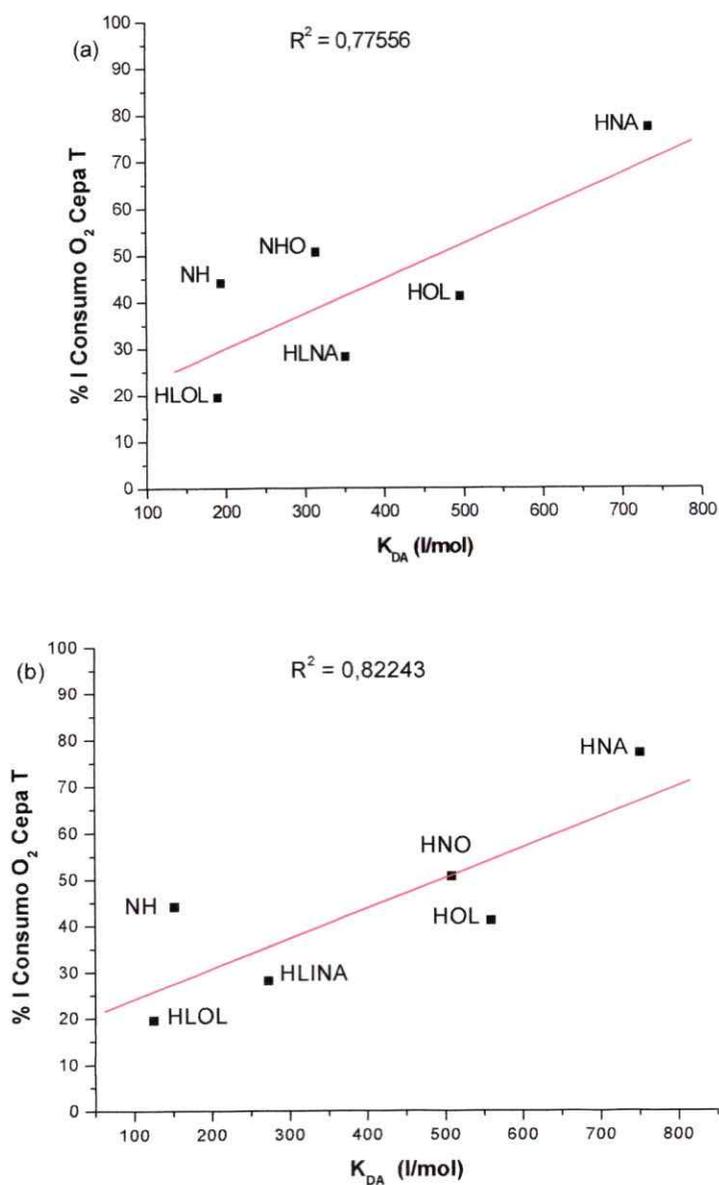


Figura 5.10: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de *T. cruzi* y las constantes de asociación (K_{DA}) riboflavina- β -carbolina (a) y FAD- β -carbolina para la cepa Tuluhuén.

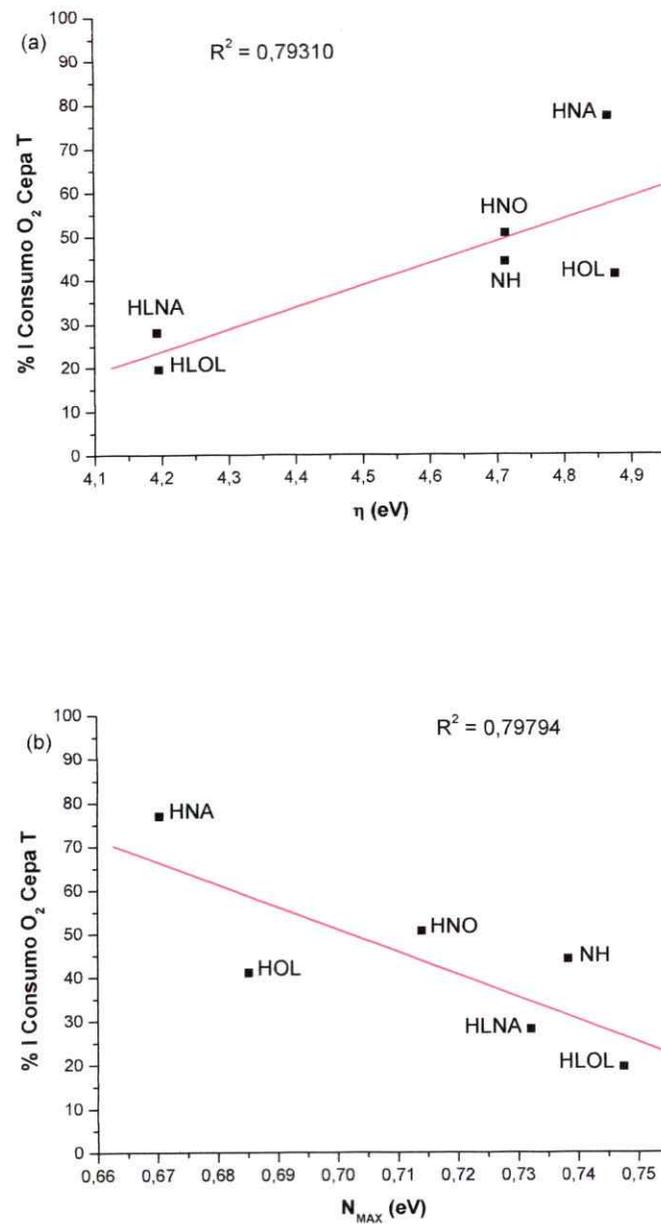


Figura 5.11: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de *T. cruzi*, la dureza química (a) y la carga crítica (b) de β -carbolinas neutras.

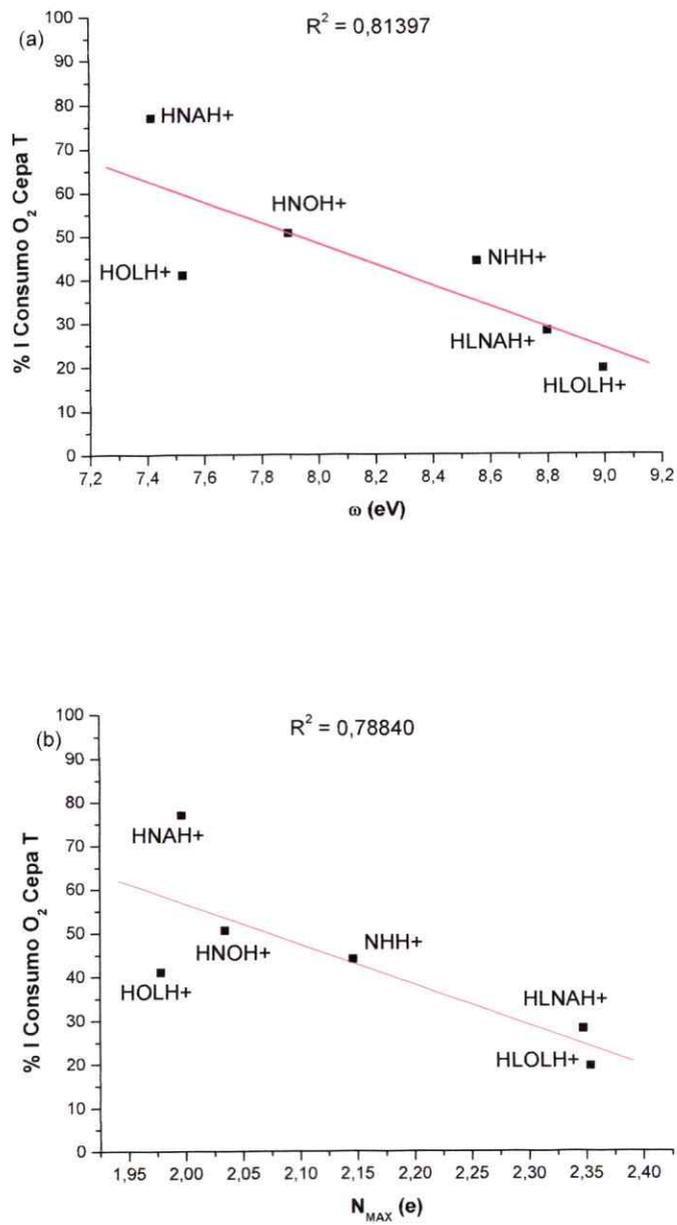


Figura 5.12: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de *T. cruzi*, la electrofilia (a) y la carga crítica (b) de β -carbólinas protonadas.

En la Figura 5.11a, la tendencia indica que, a mayor dureza química mayor es la inhibición de la respiración. Este resultado podría sugerir que, en los procesos de respiración de los epimastigotes, las β -carbolinas neutras estarían involucradas en procesos duros en el sentido del principio HSAB (ácidos y bases duras y blandas) de Pearson,²⁸ como lo serían la interacción con protones provenientes de moléculas biológicas, de agua o la interacción con iones. De la Figura 5.11b se observa que, al igual que en la inhibición del crecimiento de cultivos, el aumento en la carga crítica desfavorece la inhibición del consumo de oxígeno.

Por otro lado, las tendencias de la Figura 5.12 (muy similares a las observadas en la inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de esta misma cepa), sugieren que las β -carbolinas protonadas también estarían interactuando con sitios biológicos más electrofílicos. El aumento de la carga crítica también desfavorece la inhibición del consumo de oxígeno de las β -carbolinas protonadas.

5.3.4.2 Cepa LQ

Al igual que en todos los casos anteriores, la inhibición del consumo de oxígeno aumenta si la asociación β -carbolina-flavina es mayor. Sin embargo, en la cepa LQ la correlación entre la actividad inhibitoria y K_{DA} es notablemente mejor, en especial cuando la asociación es con FAD, como puede apreciarse en la Figura 5.13. Podría ser entonces que la interacción entre las β -carbolinas y las flavoenzimas de la cadena respiratoria sean las principales responsables de la inhibición del consumo de oxígeno.

La correlación con descriptores como la electrofilia y la carga crítica (Figuras 5.14 y 5.15) apoyan esta observación (comparar por ejemplo con las Figuras 3.8 y 3.10), dándole a las β -carbolinas un carácter nucleofílico frente al sistema isaloxazínico de las flavinas. Además tanto para los compuestos neutros como protonados las

correlaciones son notablemente buenas, lo que podría indicar fuertes interacciones entre las β -carbolinas y otros electrófilos de la cadena respiratoria.

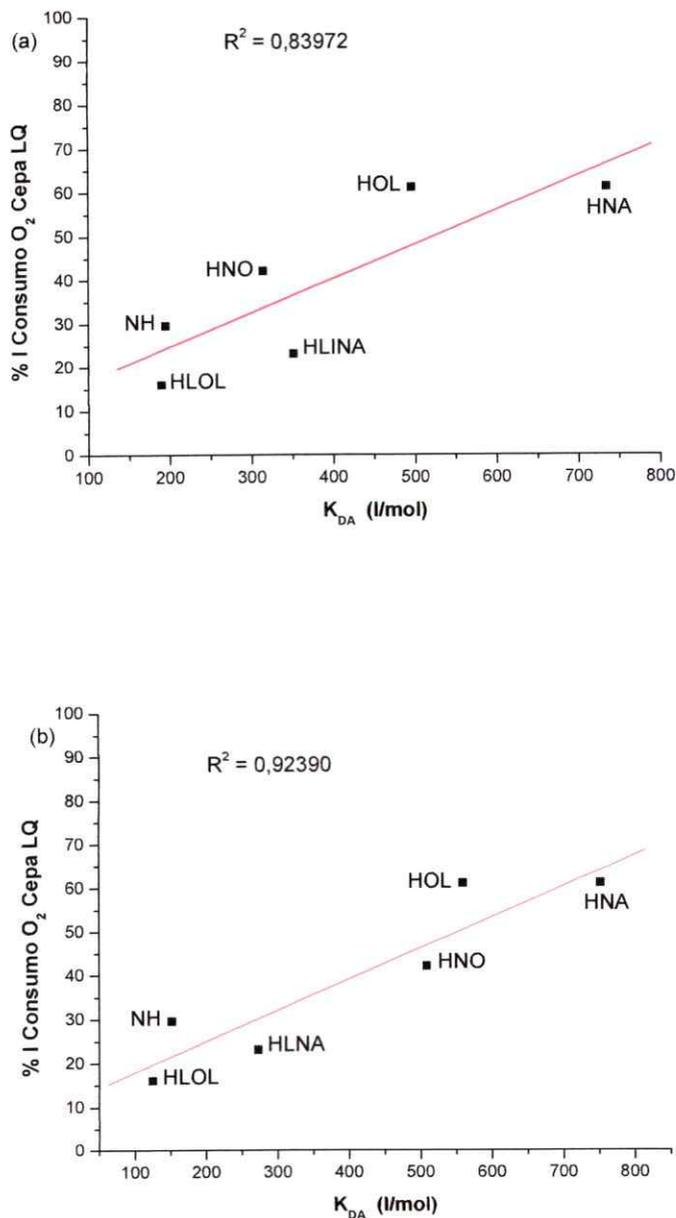


Figura 5.13: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de *T. cruzi* y las constantes de asociación (K_{DA}) riboflavina- β -carbolina (a) y FAD- β -carbolina para la cepa LQ.

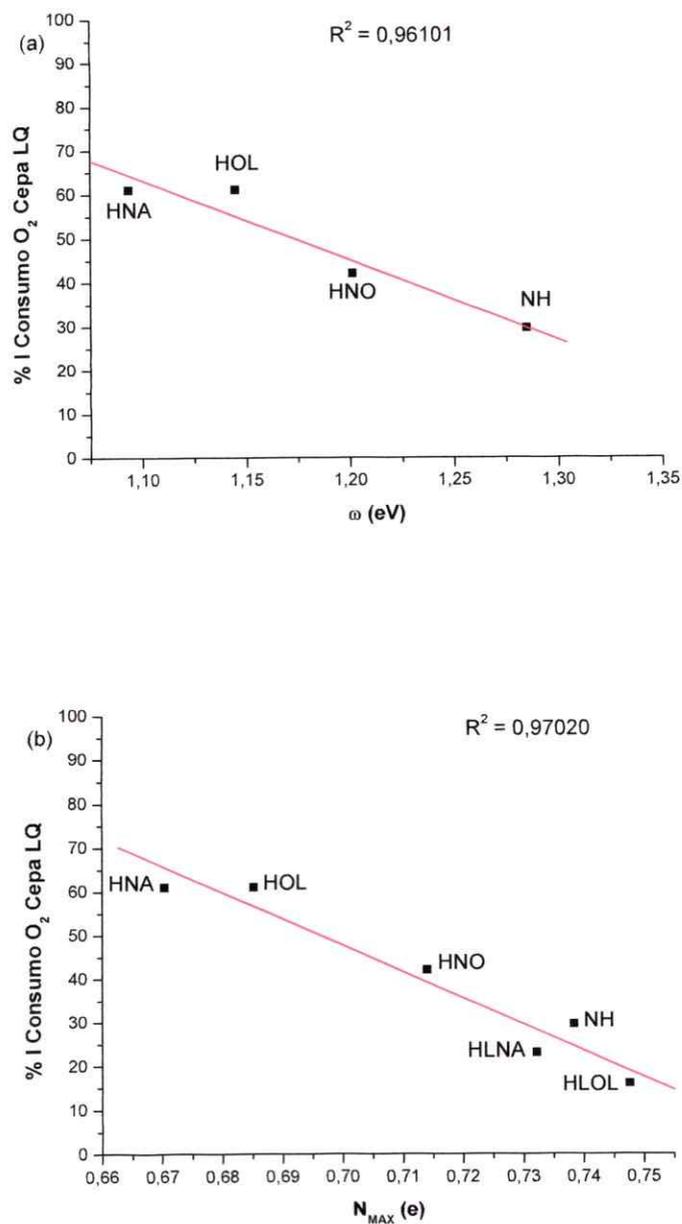


Figura 5.14: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de *T. cruzi*, la electrofilia (a) y la carga crítica (b) de β -carbolicinas neutras en la cepa LQ.

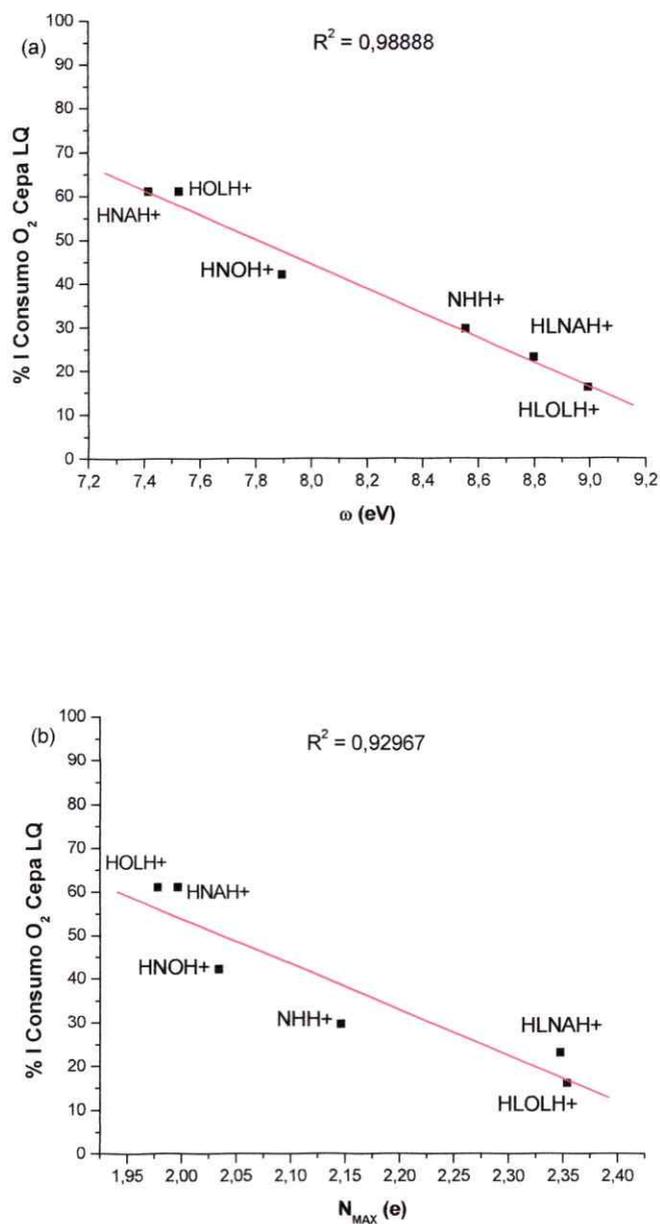


Figura 5.15: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de *T. cruzi*, la electrofilia (a) y la carga crítica (b) de β -carbólinas protonadas en la cepa LQ.

La Figura 5.16, donde se observa que, al aumentar la dureza de las β -carbolinas neutras aumenta la inhibición de la respiración, sugiere una vez más que estos alcaloides también estarían participando de procesos duros en el sentido de Pearson.

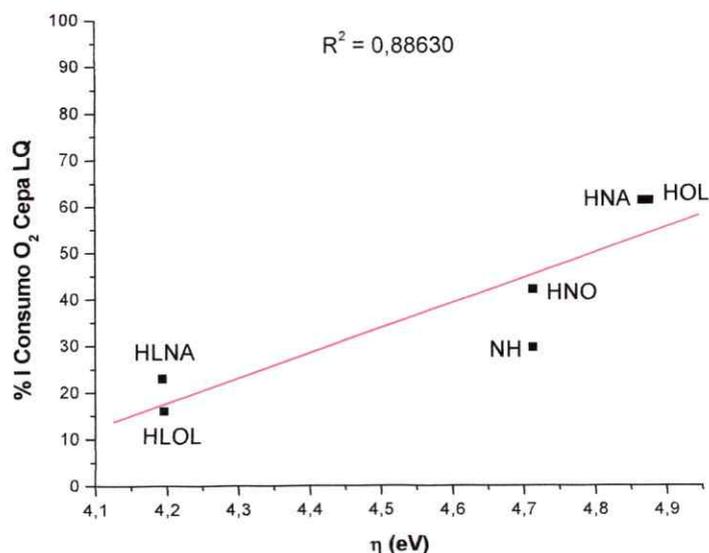


Figura 5.16: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de *T. cruzi* y la dureza química de β -carbolinas neutras en la cepa LQ.

Por último, la Figura 5.17 muestra la relación entre la inhibición de la respiración y los descriptores potencial químico electrónico y transferencia de carga (desde las β -carbolinas hacia **LFH1+**, $\Delta N1$), de los alcaloides protonados. Mientras mayores son los valores del potencial químico electrónico y de la transferencia de carga, mayor es la inhibición de la respiración. Ambos descriptores estarían asociados a la formación de complejos de carga, entre β -carbolinas protonadas y moléculas biológicas que se comporten como electrófilos frente a estos compuestos (ver secciones 2.4.2, 3.6.3.3 y 3.6.3.4 en las cuales se analiza la formación de complejos de transferencia de carga y los descriptores a los cuales se encuentran asociados).

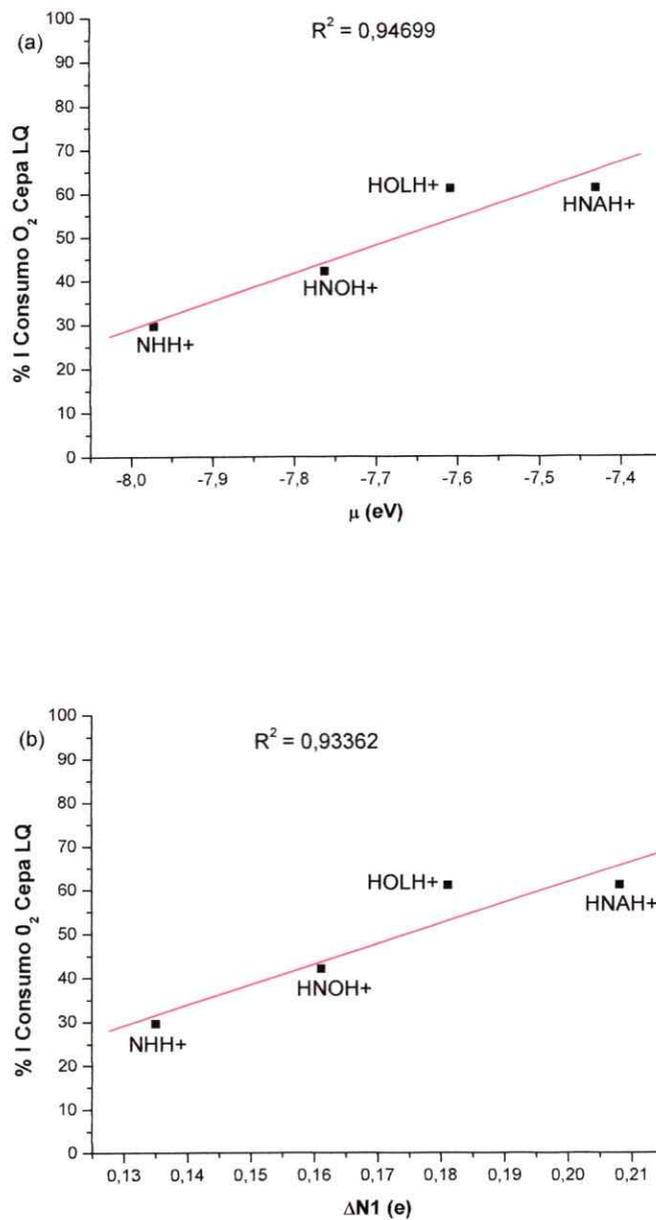


Figura 5.17: Relación entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de *T. cruzi*, el potencial químico electrónico (a) y la transferencia de carga hacia LFH1+ (b) de β -carbolinas protonadas en la cepa LQ.

La Figura 5.2 muestra las correlaciones entre la inhibición del consumo de oxígeno de epimastigotes de *T. cruzi*, y la inhibición del crecimiento de cultivos de estas mismas células. Como se mencionara en esa sección, se observa que existe una excelente correlación entre ambas actividades en la cepa Tulahuén, mientras que la correlación es muy pobre en la cepa LQ. Al observar los resultados del análisis de la inhibición del consumo de oxígeno en ambas cepas, se desprende que, en la cepa Tulahuén son varios los parámetros que tienen en común la inhibición del crecimiento de cultivos y la inhibición de la respiración: las correlaciones con las constantes de asociación a riboflavina y a FAD, con la carga crítica de β -carbolinas neutras y protonadas y la electrofilia de las β -carbolinas protonadas. Sin embargo en la cepa LQ existen menos parámetros en común: sólo las correlaciones con las constantes de asociación a riboflavina y a FAD. Se podría concluir entonces que, en la cepa Tulahuén, el efecto inhibitor de las β -carbolinas en la respiración de los epimastigotes, sería el principal modo de acción. Mientras que en la cepa LQ la inhibición de la respiración es un modo de acción menor, siendo otro(s) el(los) modo(s) de acción de estos compuestos.

Referencias

- ¹ Tracy, J. B.; Webster, L. T. en *The Pharmacological basis of therapeutics* (1996) Hardman, J. G.; Limbird, E.; Molinoff, P. B.; Ruddon, R. W.; Goodman, A., Gilman, A., Editores, Nueva York: McGraw-Hill, 987.
- ² WHO Expert Committee. En *WHO Technical Report Series 811* (1991) Geneva, 1.
- ³ Filardi, L. S.; Brener, Z. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1987**, *81*, 755.
- ⁴ Gustafsson, L. L.; Beerman, B.; Abdi, Y. A. en *Handbook of drugs for tropical parasitic infections* (1987) Taylor, Francis, Editores, Londres, 83.
- ⁵ Morello, A.; Aldunate, J.; Repetto, Y. en *Biology of parasitism* (1994) Ehrlich, R.; Nieto, A., Editores, Trilce, Montevideo, 33.
- ⁶ Chiari, E.; Oliveira, A.; Raslan, D.; Mesquita, A.; Tavares, K. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1991**, *85*, 372.
- ⁷ Sepúlveda-Boza S.; Cassels, B. K. *Planta Med.* **1996**, *62*, 98.
- ⁸ Cavin, J.; Krassner, S.; Rodríguez E. J. *Ethnopharmacol.* **1987**, *19*, 89.
- ⁹ Hopp, K. H., Cunningham, L. V.; Bromel M. C.; Schermeister, L. J.; Wahba Khalil S. K. *Lloydia* **1976**, *39*, 375.
- ¹⁰ Kondo, K.; Shigemori, H.; Kikuchi, Y.; Ishibashi, M.; Sasaki, T., Kobayashi, J. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2480.
- ¹¹ Airaksinen, M. M.; Kari, I. *Med. Biol.* **1981**, *59*, 21.
- ¹² Fernández de Arriba, A.; Lizcano, J. M.; Balsa, M. D.; Unzeta, M. J. *Pharm. Pharmacol.* **1994**, *46*, 809.
- ¹³ Torreilles, J.; Guerin, M. C.; Previero, A. *Biochimie* **1985**, *67*, 929.
- ¹⁴ Agarwal, A.; Agarwal, S. K.; Singh, S.N.; Fatma, N.; Chatterjee, R. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 225.
- ¹⁵ Quetin-Leclercq, J.; Coucke, P.; Delaude, C.; Warin, R.; Bassleer, R.; Angenot, L. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1697.
- ¹⁶ Moncada, C.; Repetto, Y.; Aldunate, J.; Letelier, M. E.; Morello, A. *Comp. Biochem. Physiol.* **1989**, *103 C*, 87.
- ¹⁷ Aldunate, J.; Ferreira, J.; Letelier, M. E.; Repetto, Y.; Morello, A. *FEBS Lett.* **1986**, *195*, 8295.
- ¹⁸ Aldunate, J.; Traipe, L.; Spencer, P., Morello, A.; Repetto, Y. *Comp. Biochem. Physiol.* **1992**, *103 C*, 97.

-
- ¹⁹ Ferreira, J.; Coloma, L., Fones, E., Letelier, M. E.; Repetto, Y.; Morello, A.; Aldunate, J. *FEBS Lett.* **1988**, 234, 485.
- ²⁰ Letelier, M. E.; Rodríguez, E.; Wallace, A.; Lorca, M.; Repetto, Y.; Morello, A.; Aldunate, J. *J. Exp. Parasitol.* **1990**, 71, 357.
- ²¹ Docampo, R., Stoppani A. O. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1979**, 191, 317.
- ²² Maya, J. D.; Repetto, Y.; Agosin M.; Ojeda, J. M., Téllez, R.; Gaule, C.; Morello, A. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, 86, 101.
- ²³ Repetto, Y.; Opazo, E.; Maya, J. D.; Agosin M.; Morello, A. *Comp. Biochem. Physiol.* **1996**, 115 B, 281.
- ²⁴ Codoñer, A.; Monzó, I. S.; Tomás, F.; Valero, R. *Spectrochim. Acta* **1986**, 42 A, 765.
- ²⁵ Codoñer, A.; Monzó, I. S.; Ortiz, C.; Olba, A. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1989**, 107.
- ²⁶ Beljansky, M.; Beljansky, M. S. *Cell Biol.* **1982**, 50, 79.
- ²⁷ Leteurtre, F.; Madalengoitia, J.; Orr, A.; Cuzi, T. J.; Lehnert, E.; Macdonald, T.; Pommier, Y. *Cancer Res.* **1992**, 52, 4478.
- ²⁸ Parr, R.G.; Yang, W. (1989) en *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*; Oxford University Press: New York.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES GENERALES

Del análisis de las características físico-químicas de las β -carbolinas y su relación con la actividad biológica desarrollado en el marco de esta Tesis se obtuvieron las siguientes conclusiones:

6.1 Reactividad global y local del sistema 1-metilnicotinamida-lumiflavina

- El sistema lumiflavina-1-metilnicotinamida es un buen modelo para representar la reacción de transferencia de hidruro en el sistema FAD-NAD(P)H. La reactividad del sistema FAD-NAD(P)H se puede comprender como una interacción entre especies blandas, controlada por los orbitales de frontera y bien enmarcada en el principio de HSAB. Descriptores de estructura electrónica globales como el potencial químico electrónico y la electrofilia describen apropiadamente la reactividad, indicando correctamente la dirección del flujo de electrones y el carácter electrofílico y nucleofílico (este último considerado en una escala relativa) de las distintas especies involucradas.
- El análisis de electrofilia local predice que la protonación del anillo isaloxazínico en N-1 activa el sitio N-5 hacia el ataque nucleofílico, mientras que la protonación en N-5 de la isaloxazina activa el sitio C-4a hacia el ataque nucleofílico, tal como fuera propuesto por Massey y Hemmerich (Massey, V.; Hemmerich, P. *Biochem. Soc. Trans.* **1980**, *8*, 246).
- La regioespecificidad de la transferencia de hidruro estaría modulada por propiedades de regiones extendidas dentro de la molécula, las que incluirían

más de un centro atómico. Los sitios reactivos de las moléculas que participan en la interacción están ubicados en regiones de diferentes moléculas, con formas y tamaños similares y que presentan valores muy similares de blandura grupal, de acuerdo a principio HSAB local.

6.2 Descriptores de estructura electrónica de las β -carbolinas

- En el núcleo piridoindólico la dureza química y la blandura química dependen de la aromaticidad del sistema, mientras que el potencial químico electrónico depende del grado de insaturación de estos compuestos. La carga crítica, N_{MAX} , y la electrofilia presentan una tendencia menos clara ya que dependen tanto del potencial químico electrónico como de la dureza química, observándose que las dihidro- β -carbolinas son las más electrofílicas y las que presentan mayor valor de N_{MAX} , mientras que las tetrahidro- β -carbolinas son las menos electrofílicas y de menor N_{MAX} .
- El análisis de los descriptores de reactividad en el sistema lumiflavina- β -carbolina sugiere que éstos alcaloides se comportan como nucleófilos frente al núcleo isaloxazínico, y que tendrían gran afinidad por la isaloxazina protonada en N-1, debido a la similitud de sus blanduras.
- Un grupo metilo en C-1 y un hidroxilo o metoxilo en C-7 aumentan el potencial químico y la dureza, mientras que disminuyen la electrofilia, la blandura y la carga crítica en el siguiente orden: 7-MeO > 1-CH₃ > 7-OH. El efecto de cada uno de los sustituyentes parece ser aditivo.

6.3 β -Carbolinas y formación de complejos de transferencia de carga con flavinas

- La formación de complejos de transferencia de carga se correlaciona con los siguientes descriptores de estructura electrónica de las β -carbolinas: potencial químico electrónico, electrofilia, carga crítica y transferencia de carga. El aumento del potencial químico y de la transferencia de carga, y la disminución de la electrofilia y de la carga crítica favorecen la formación de complejos de transferencia de carga β -carbolina-flavina.

6.4 β -Carbolinas y actividad IMAO-A

- La actividad IMAO-A de las β -carbolinas se correlaciona con la formación de complejos de transferencia de carga entre flavinas y β -carbolinas: mientras más estable es el complejo de transferencia de carga, mayor es la actividad IMAO-A.
- La actividad IMAO-A muestra una fuerte dependencia del potencial químico electrónico, de la electrofilia y de la transferencia de carga de las β -carbolinas: bajos valores del potencial químico electrónico y de la electrofilia, y el aumento del valor de la transferencia de carga favorecen la actividad IMAO-A de las β -carbolinas.

6.5 Reducción de β -carbolinas en ambiente acuoso

- A pH 7 las dihidro- β -carbolinas y las β -carbolinas totalmente aromáticas se reducen irreversiblemente, en un rango de potenciales muy negativos, lo que sugiere que la actividad biológica de estos compuestos difícilmente se

relacione con la interferencia redox de los procesos biológicos a través de la reducción de ellas.

- A pH 7 la reducción de estos alcaloides se correlaciona con la electrofilia y la carga crítica: mientras mayores son los valores de electrofilia y de carga crítica de las β -carbolinas, menos negativos son los potenciales de reducción de estos compuestos.

6.6 Oxidación de β -carbolinas en ambiente acuoso

- A pH 7 todas las β -carbolinas se oxidan irreversiblemente. El valor de los potenciales a los cuales ocurre esta oxidación sugiere que a pH fisiológico las β -carbolinas podrían interferir los procesos redox de algunos sistemas biológicos a través de la oxidación de ellas.
- A pH 7 la oxidación de los alcaloides β -carbolínicos se correlaciona con el potencial químico electrónico: mientras mayor es el potencial químico electrónico, menor (menos positivo) es el potencial de oxidación.

6.7 Reducción de β -carbolinas en DMSO

- Todas las β -carbolinas, como clorhidrato o como base libre, se reducen en DMSO irreversiblemente. Mientras que los clorhidratos se reducen a potenciales muy negativos, incompatibles con los potenciales de procesos biológicos, las bases libres se reducen a potenciales menos negativos, lo que permite sugerir que podrían interactuar con sitios biológicos caracterizados por ambientes apróticos y cuyas constantes dieléctricas sean similares a la del DMSO.

- En medio aprótico (DMSO) la reducción de las β -carbolinas se correlaciona con el potencial químico electrónico, con la electrofilia y con la carga crítica: bajos valores del potencial químico electrónico y altos valores de electrofilia y de carga crítica favorecen la reducción de estos alcaloides.

6.8 Oxidación de β -carbolinas en DMSO

- Sólo las bases libres de algunas β -carbolinas se oxidan irreversiblemente en DMSO. Los alcaloides con un grado menor de insaturación podrían interactuar con sitios biológicos caracterizados por ambientes apróticos y cuyas constantes dieléctricas sean similares a la del DMSO.

6.9 Generación electroquímica de un radical libre de la 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina

- La 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina se oxida en medio aprótico generando un radical libre de vida muy corta, detectable por EPR en presencia de un atrapador de radicales libres.

6.10 Actividad antioxidante de β -carbolinas

- La actividad antioxidante de algunas β -carbolinas, determinada por otros autores, se correlaciona con el potencial de oxidación de estos compuestos, con el potencial químico electrónico, con la blandura química y con la carga crítica: bajos potenciales de oxidación y valores altos de potencial químico electrónico, de blandura y de carga crítica favorecen la actividad antioxidante de estos alcaloides.

- La detección de un radical libre producto de oxidación de una β -carbolina, la correlación encontrada entre los potenciales redox de las β -carbolinas, determinados en esta tesis, y la actividad antioxidante, determinada por otros autores, permite sugerir que las β -carbolinas podrían actuar como atrapadoras de radicales libres a través de la oxidación de éstas.

6.11 Efecto de alcaloides β -carbolínicos en el crecimiento de cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

- Todas las β -carbolinas cuyo efecto se estudió en esta tesis son inhibitoras activas del crecimiento de cultivos de epimastigotes de las cepas Tulahuén y LQ, sin embargo sólo harmina tiene una actividad significativa en ambas cepas a las concentraciones estudiadas.
- La inhibición de la respiración parece ser el mecanismo principal de la acción tripanosomicida de las β -carbolinas en la cepa Tulahuén, mientras que en la cepa LQ la inhibición del consumo de oxígeno da cuenta solo parcialmente de la actividad tripanosomicida de estos alcaloides.

6.12 Actividad inhibitoria de β -carbolinas sobre el crecimiento de cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y su relación con otros parámetros fisicoquímicos y con los descriptores de estructura electrónica

- En la cepa Tulahuén tanto la inhibición del crecimiento de los cultivos como la inhibición del consumo de oxígeno de los epimastigotes se correlacionan con la asociación β -carbolina-flavina, la electrofilia y la carga crítica: complejos de transferencia de carga β -carbolina-flavina estables y valores bajos de electrofilia y de carga crítica favorecen la actividad tripanosomicida y la

inhibición del consumo de oxígeno. Además, el aumento de la dureza química de las β -carbolinas favorece la inhibición de la respiración en la cepa Tulahuén.

- La inhibición del crecimiento de cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en la cepa LQ se correlaciona con la lipofilia de las β -carbolinas y con la unión de éstas a flavinas: complejos de transferencia de carga β -carbolina-flavina estables y el aumento de la lipofilia favorecen la actividad tripanosomicida.
- La inhibición del consumo de oxígeno en la cepa LQ se correlaciona con la asociación β -carbolina-flavina, la electrofilia, la carga crítica y la dureza química: complejos de transferencia de carga β -carbolina-flavina estables, el aumento de la dureza química y valores bajos de electrofilia y de carga crítica favorecen la inhibición del consumo de oxígeno de los epimastigotes.

APÉNDICE I. MÉTODOS MECANO-CUÁNTICOS

En este apéndice se hará un breve resumen de la metodología mecano cuántica,^{1,2} así como de sus principales ventajas e inconvenientes. Se expondrán las técnicas más utilizadas, que son aquellas basadas en la teoría de orbitales moleculares. De modo general no existe un método cuántico que permita resolver o pueda ser aplicable a todo el abanico de problemas químicos.

A grandes rasgos, es posible hacer una clasificación de los métodos cuánticos en tres clases:

- Ab initio
- Funcionales de la densidad
- Semiempíricos

Muchas de las características de los dos primeros métodos son similares, siendo la principal diferencia la forma de tratar los términos que aparecen en las diferentes ecuaciones. Los métodos *ab initio* calculan todos los términos usando técnicas numéricas y/o analíticas con una precisión limitada solo por el programa o el computador; mientras que los métodos semiempíricos utilizan parámetros experimentales u otros criterios para asignar o descartar ciertos términos en las fórmulas.

A 1.1 Métodos *ab initio*

Los métodos *ab initio*^{3,4} buscan la solución de la ecuación de Schrödinger con el mínimo de aproximaciones posibles, sin el uso de datos semiempíricos. Lo que los distingue del resto de los métodos de cálculo es que son potencialmente exactos. Es posible, además, mejorar un resultado elevando de modo adecuado el nivel de cálculo, cosa que no sucede en los métodos semiempíricos, cuyas mejoras dependen de las aproximaciones usadas y datos experimentales usados por el autor del programa. Los métodos *ab initio* son capaces, en principio, de describir cualquier estado de una molécula, aunque en la práctica la potencia del computador sigue constituyendo un límite. Además, todos los programas deberían dar la misma respuesta a un problema dado, siempre y cuando sea capaz de realizar dicho cálculo. La

principal desventaja de este tipo de métodos sigue siendo la gran cantidad de tiempo calculado que requieren.

La ecuación de Schrödinger independiente del tiempo para una molécula poliatómica viene dada por:

$$\hat{H}\Psi(q_i, q_\alpha) = E\Psi(q_i, q_\alpha)$$

donde

$$\hat{H} = \left(-\frac{\hbar^2}{2} \sum_{\alpha} \frac{1}{m_{\alpha}} \nabla_{\alpha}^2 - \frac{\hbar^2}{2m} \sum_i \nabla_i^2 + \hat{V}(q_i, q_{\alpha}) \right) \quad (1)$$

Siendo el término correspondiente a la energía potencial:

$$\hat{V}(q_i, q_{\alpha}) = \sum_{\alpha} \sum_{\beta} \frac{Z_{\alpha} Z_{\beta} e^2}{r_{\alpha\beta}} - \sum_{\alpha} \sum_i \frac{Z_{\alpha} e^2}{r_{\alpha i}} + \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{e^2}{r_{ij}} \quad (2)$$

Se introduce entonces la aproximación de Born-Oppenheimer, en la que se supone a los núcleos como masas puntuales e infinitamente pesadas, y dado que los electrones se mueven mucho más rápidos que éstos, los núcleos se consideran estáticos. En el hamiltoniano del sistema, esto se traduce en la separación de las funciones de onda nuclear y la electrónica:

$$\hat{H}_{el} \Psi_{el} = \left(-\frac{\hbar^2}{2m} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_{\alpha} \sum_i \frac{Z_{\alpha} e^2}{r_{i\alpha}} + \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{e^2}{r_{ij}} \right) \Psi_{el} = E_{el} \Psi_{el} \quad (3)$$

Siendo ahora Ψ_{el} así como E_{el} dependientes de las coordenadas de los núcleos, pero de modo paramétrico.

Aún habiendo despreciado el movimiento de los núcleos (aproximación que en la mayoría de los casos proporciona buenos resultados), la ecuación de valores propios (3) no se puede resolver exactamente de modo analítico, ya que la presencia del

término de interacción electrón-electrón en la energía potencial hace imposible llevar a cabo una separación de variables de modo que Ψ se pudiera expresar como un producto de funciones de onda para cada uno de los electrones.

La solución a este problema la proporcionó D. Hartree y fue posteriormente modificada por J. Slater y V. Hock de modo que se cumpliera del principio de exclusión de Pauli. Inicialmente esta metodología se aplicó para la resolución de átomos poli electrónicos, en donde también aparece el término de repulsión electrónica; al no existir el término de repulsión nuclear, la ecuación (3) representaría al hamiltoniano completo. La idea básica es que cada electrón se mueve bajo la influencia de un campo creado por los núcleos y el resto de los electrones.

Para un átomo con una configuración electrónica dada, se genera la función de onda como un producto de los Orbitales Moleculares (OA) hidrogenoides (Φ_i), pero teniendo en cuenta las cargas nucleares efectivas por el efecto de apantallamiento que sufren los electrones de las capas más externas por parte de los electrones de las capas internas. Entonces se intenta resolver a la ecuación (3) congelando todos los orbitales atómicos excepto uno que se optimizará de modo que minimice la energía, obteniendo de este modo un orbital mejorado. Este procedimiento se repite para todos y cada uno de los orbitales de la configuración obteniendo un primer conjunto de orbitales mejorados. El ciclo se repite hasta que los orbitales y las energías obtenidas no difieran de modo significativo del conjunto anterior. Este conjunto de soluciones se denomina autoconsistente (SCF) y se aceptan como una solución al problema.

La mejora introducida por Fock y Slater, radica en la introducción del spin en la función de onda del átomo, de modo que fuera antisimétrica respecto al intercambio de dos electrones. Encontraron que la función de onda completa para un sistema polieletrónico se puede escribir como un determinante en el que se incluyen los orbitales hidrogenoides sobre los que se van a realizar las modificaciones en cada paso del SCF junto con las componentes de spin:

$$\Psi(1, \dots, 2n) = \frac{1}{\sqrt{(2n)!}} \begin{vmatrix} \Phi_1(1)\alpha(1) & \dots & \Phi_1(1)\beta(1) & \dots & \dots & \dots & \Phi_n(1)\alpha(1) & \dots & \Phi_n(1)\beta(1) \\ \Phi_1(2)\alpha(2) & \dots & \Phi_1(2)\beta(2) & \dots & \dots & \dots & \Phi_n(2)\alpha(2) & \dots & \Phi_n(2)\beta(2) \\ \dots & \dots \\ \Phi_1(2n)\alpha(2n) & \dots & \Phi_1(2n)\beta(2n) & \dots & \dots & \dots & \Phi_n(2n)\alpha(2n) & \dots & \Phi_n(2n)\beta(2n) \end{vmatrix} \quad (4)$$

Este sistema se aplica también a moléculas donde, bajo la aproximación del Orbital Molecular (OM), la función de onda Ψ_{OM} del sistema se construye a partir de la combinación lineal de los distintos orbitales atómicos (CLOA), o funciones de onda base (centradas en los núcleos y con propiedades de simetría en los orbitales atómicos):

$$\Psi_{OM} = \sum_k c_k \phi_k \quad (5)$$

Los coeficientes de esta expansión para los distintos estados del sistema con sus correspondientes energías, se obtienen al resolver la ecuación de Roothaan, resultante de aplicar el método variacional lineal a Ψ_{OM} :

$$\sum_{j=1}^n (F_{ij} - \epsilon_i S_{ij}) c_j = 0 \quad i = 1, \dots, n \quad (6)$$

donde F_{ij} es la integral $\langle \phi_i | F | \phi_j \rangle$ correspondiente al operador de Fock que, referido a un electrón determinado, está formado por el operador de la energía cinética de dicho electrón, el operador energía potencial para las atracciones entre el electrón y los núcleos, el operador de Coulomb correspondiente a la energía potencial de repulsión generada por el resto de los electrones; mientras S_{ij} corresponde a la integral de solapamiento entre los orbitales i, j .

La ventaja de este método reside en la simplificación del cálculo SCF, ya que ahora las funciones son fijas y no varían en el proceso iterativo, siendo los coeficientes lo único que se va optimizando.

Entre los distintos tipos de bases que se pueden usar, las que mejores resultados dan son las formadas por factores exponenciales u orbitales tipo Slater (STO):

$$\phi_k = r^n e^{-\alpha r} Y_{lm}(\theta, \phi) \quad (7)$$

El problema de estas funciones reside en que son poco apropiadas para el cálculo integral ya que consumen mucho tiempo de CPU. El segundo tipo de orbitales son los representados por gaussianas (GTO), introducidos por Boys, que no representan tan bien los orbitales atómicos como los STO, pero tienen la ventaja de que todas las

integrales de los cálculos pueden evaluarse analíticamente sin necesidad de realizar una integración numérica. Generalmente, se opta por usar una combinación lineal de funciones gaussianas para obtener las funciones de base. En este caso las funciones obtenidas se llaman gaussianas contraídas (ϕ_k) y a las funciones que se emplean para hacer la combinación lineal se denominan gaussianas primitivas (χ_i):

$$\Psi_{OM} = \sum_k c_k \phi_k = \sum_k c_k \sum_i d_{ki} \chi_i \quad (8)$$

Mientras más funciones base se usan mejores resultados se obtienen, pero obviamente el tiempo necesario para el cálculo será mayor. Este criterio permite clasificar los distintos tipos funciones base existentes en los programas de cálculo.

A 1.1.1 Base Mínima

En este caso se usan únicamente las funciones necesarias para distribuir los electrones de los átomos que forman las moléculas. Por ejemplo, el grupo [B,C,N,O,F,Ne] usaría cinco gaussianas ϕ_k correspondientes a los orbitales 1s 2s 2p_x 2p_y 2p_z. Nótese como en el caso de los orbitales p se añaden los tres aunque no estén ocupados. La experiencia, sin embargo, aconseja expandir esta base para algunos casos. La base mínima comúnmente utilizada es la STO-3G, en la que cada orbital atómico se representa mediante una combinación lineal de 3 gaussianas primitivas (χ_i), que se eligen de modo que simulen un orbital de Slater.

La ventaja de este tipo de base es que los cálculos son rápidos, pero los resultados no son muy precisos, sobre todo en lo que se refiere a vibraciones y ángulos de enlace.

A 1.1.2 Conjunto de funciones de base de partición de la capa de valencia

Conocidas también por su nombre de Split-Valence, en estos conjuntos se duplica el número de gaussianas contraídas que representan orbitales de valencia. En el caso de los elementos del segundo período, el número de gaussianas contraídas es 9 1s 2s 2s' 2p_x 2p_y 2p_z 2p_x' 2p_y' 2p_z'. Un ejemplo es el conjunto 3-21G en el que se usan

tres funciones gaussianas para describir el core (1s), 2 para los conjuntos 2s y 2p, y una para los 2s` 2p`.

A 1.1.3 Conjuntos de bases extendidos

- **Conjunto de base Doble Z**

Se duplica el número de gaussianas contraídas de todos los orbitales (no sólo los de valencia). Así los elementos del segundo periodo estarán representados por 10 ϕ_k : 1s 1s` 2s 2s` 2p_x 2p_y 2p_z 2p_x` 2p_y` 2p_z`.

- **Conjunto de funciones de base con polarización**

Consiste en introducir funciones gaussianas contraídas de mayor número cuántico angular a las necesarias (generalmente en la capa de valencia), de modo que el efecto resultante sea una expansión del volumen donde está situado el electrón. Se indica con un asterisco cuando se añaden funciones de tipo d para todos excepto para el hidrógeno; y se utilizan dos asteriscos cuando se utilizan, además, funciones de tipo p para los átomos de hidrógeno. Ejemplos son los conjuntos 6-31G* y 6-31G**. Dichas funciones continúan estando centradas en los núcleos, pero obtenemos funciones más flexibles para describir sistemas polares, etc.

- **Conjunto de funciones de base difusas**

En este caso se añaden más funciones de tipo sp al conjunto de número principal cuántico mayor, con lo cual se aumenta la electronegatividad en el átomo. Este tipo de funciones se emplea para describir sistemas cargados negativamente. Se emplea un signo (+) cuando se introduce un juego de funciones difusas consistente en un orbital del tipo sp para todos excepto el átomo de hidrógeno, o dos signos (++) en el caso de introducir dos juegos sp para todos los átomos. Un ejemplo es el conjunto 6-31++G**.

Respecto al tipo de función de onda SCF, existen casos -como los de capa abierta- en los que el uso de una función de onda correspondiente a un estado singlete no resulta adecuado, por no ser capaz de describir al sistema, y en los cuales habría que realizar una combinación lineal de determinantes de Slater con todas las posibles combinaciones de electrones desapareados. Sin embargo, para los estados

energéticos más bajos de sistemas radicalarios una aproximación monodeterminantal continúa siendo adecuada.

Los tipos de funciones de onda SCF son:

- Restricted Hartree-Fock (RHF) o de capa cerrada, todos los orbitales están doblemente ocupados. Cada par de spin-orbitales tiene la misma función espacial:

$$\Psi_{RHF} = \left| \phi_1^2 \phi_2^2 \phi_3^2 \phi_4^2 \dots \phi_n^2 \right| \quad (9)$$

- Unrestricted Hartree-Fock (UHF) o de capa abierta: los orbitales están ocupados por un sólo electrón. Este tipo de funciones permiten obtener generalmente mejores valores de energía, pero las funciones de onda que se obtienen no siempre son funciones propias del operador de spin, por lo que no son estados electrónicos puros (se describe una mezcla de estados electrónicos). En este caso los pares spin-orbital no tienen necesariamente la misma parte espacial.

$$\Psi_{UHF} = \left| \phi_1^\alpha \phi_1^\beta \phi_2^\alpha \phi_2^\beta \phi_3^\alpha \phi_3^\beta \dots \phi_n^\alpha \right| \quad (10)$$

- Restricted Open Hartree-Fock (ROHF) o de capa abierta de spin alto: algunos de los orbitales están doblemente ocupados, y algunos sólo por un electrón, pero siempre con el mismo spin.

$$\Psi_{ROHF} = \left| \phi_1^2 \phi_2^2 \dots \phi_m^2 \phi_{m+1}^\alpha \dots \phi_n^\alpha \right| \quad (11)$$

El tipo de función de onda que se utilice y que describa mejor el sistema dependerá del problema que se esté analizando. La Figura A1.1 esquematiza esta clasificación en función del spin.

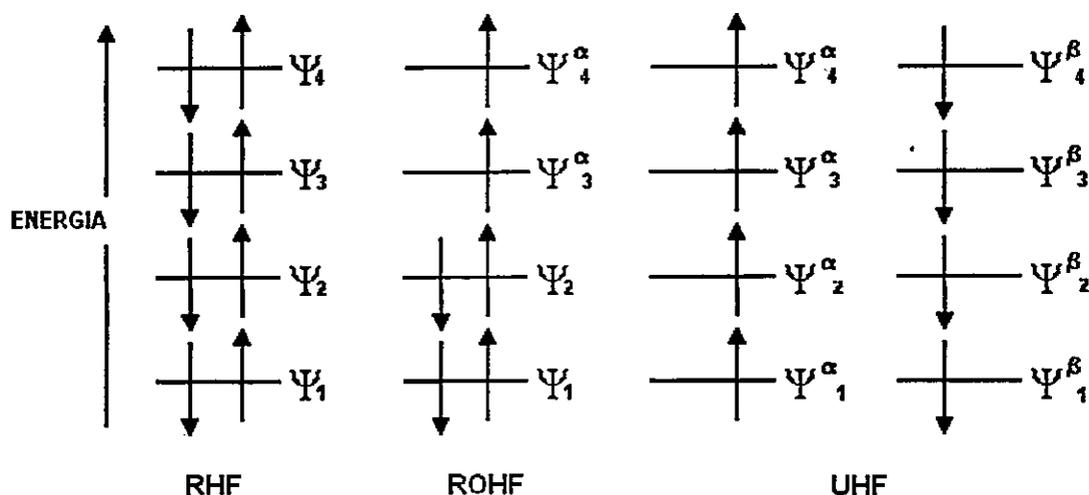


Figura A I.1 Representación de las distintas funciones de onda, en función al tratamiento que se da al spin electrónico

Los cálculos SCF, aunque permiten una descripción sencilla de las moléculas, solo ofrecen soluciones relativamente precisas para estructuras próximas al equilibrio, y no siempre. Mientras que las distancias de enlace para estados fundamentales son bastante aceptables (el error cometido es inferior al 1%), pocas propiedades más pueden calcularse con un error por debajo del 10% (frecuencias de vibración, distribuciones de carga o momentos dipolares). Una función de onda SCF Hartree-Fock tiene en cuenta las interacciones entre los electrones de forma promediada, debiéndose considerar las interacciones instantáneas entre los electrones, ya que en realidad los electrones se repelen unos con otros. Debido a esta interacción se habla de hueco de Coulomb como la región que rodea a un electrón en un átomo, en la que la probabilidad de encontrar un electrón distinto de éste es bastante pequeña.

El mejoramiento de un cálculo SCF puede realizarse de dos modos. Si la descripción SCF del sistema es cualitativamente correcta se pueden aplicar métodos perturbativos tales como los métodos Möller-Plesset de orden n (MP n). Si el tratamiento SCF no es aceptable para el problema en análisis, será necesario introducir en la función de onda del sistema más de un determinante de Slater. A este tipo de métodos

pertenecen el de interacción de configuraciones (CI) o los multiconfiguracionales (MCSCF).

Obviamente cabe mencionar que si un cálculo SCF no resuelve un problema particular, los métodos semiempíricos tampoco serán adecuados dado que son métodos SCF parametrizados.

A 1.2 Métodos DFT

Un tratamiento alternativo al SCF es la **Teoría de Funcionales de Densidad** (DFT).^{5,6} En ésta, se reescribe el hamiltoniano electrónico de la ecuación de Schrödinger en función de la densidad electrónica, $\rho(r)$, evitando así el cálculo de la función de onda electrónica. Además, una vez conocida la expresión exacta de $\rho(r)$, se puede obtener la posición de los núcleos, e incluso a partir del gradiente en dichos puntos, $|\nabla\rho(r)|$, podrían obtenerse las cargas.

Para un sistema formado por N electrones, la densidad electrónica se define como:

$$\rho(r) = N \int \dots \int |\Psi|^2 ds_1 dx_2 \dots dx_n \quad (12)$$

$$\int \rho(r) dr = N \quad (13)$$

Donde $\Psi(x_1, \dots, x_N)$ correspondería a la función de onda electrónica de la molécula.

Hohenberg y Kohn⁷ demostraron que existe una relación directa de isomorfismo entre la densidad electrónica $\rho(r)$ y el potencial externo, de modo que uno determina al otro. Esto permite expresar la energía en función de la densidad:

$$E(\rho) = V_{ne}(\rho) + T(\rho) + V_{ee}(\rho) \quad (14)$$

$$E(\rho) = \int v(r)\rho dr + T(\rho) + V_{ee}(\rho) \quad (15)$$

Donde $T(\rho)$ es la energía cinética, $V_{ne}(\rho)$ es la energía de interacción núcleo-electrón y $V_{ee}(\rho)$ es la energía de interacción electrón-electrón que contiene la interacción coulombica $J(\rho)$:

$$J(\rho) = \frac{1}{2} \iint \frac{1}{r_{12}} \rho(r_1)\rho(r_2) dr_1 dr_2 \quad (16)$$

Los dos términos, T y V_{ee} son una función universal de la densidad, ρ , y al no depender del potencial externo, $v(r)$, son idénticos para los dos sistemas.

El segundo teorema de Hohenberg y Kohn permite introducir el principio variacional, aunque se restrinja a estados fundamentales: cualquier densidad aproximada ρ determina su propio hamiltoniano y su propia función de onda Ψ :

$$\langle \check{\Psi} | \hat{H} | \check{\Psi} \rangle = E(\check{\rho}) = \int v(r) \check{\rho}(r) dr + T(\check{\rho}) + V_{ee}(\check{\rho}) \geq E(\rho) \quad (17)$$

La importancia de este teorema radica en su practicidad, i.e., si se posee una buena representación de la función densidad, es posible minimizarla para obtener los mejores orbitales y la mejor energía.

Kohn y Sham⁸ introdujeron la idea de considerar la función de onda determinantal para N electrones no-interaccionantes en N orbitales (ϕ_i). Para dicho sistema la energía cinética y la densidad electrónica viene dada exactamente por:

$$T_s(\rho) = \sum_i^N \langle \phi_i | -\frac{1}{2} \nabla^2 | \phi_i \rangle \quad (18)$$

$$\rho(r) = \sum_i |\phi_i(r)|^2 \quad (19)$$

Siendo la energía del sistema:

$$E(\rho) = T_s(\rho) + \int v_s(r) \rho(r) dr \quad (20)$$

Si se considera la interacción entre los electrones la energía puede expresarse como:

$$E(\rho) = \int v(r) \rho(r) dr + T_s(\rho) + J(\rho) + [T(\rho) - T_s(\rho)] + [V_{ee}(\rho) - J(\rho)] \quad (21)$$

Al definir entonces la energía de intercambio y correlación, E_{xc} , en los siguientes términos:

$$E_{xc}(\rho) = [T(\rho) - T_s(\rho)] + [V_{ee}(\rho) - J(\rho)] \quad (22)$$

Donde

$$v_{xc}(\rho) = \frac{\partial}{\partial \rho(r)} E_{xc}(\rho) \quad (23)$$

El problema de N electrones que interactúan se transforma en uno en el que éstos no interactúan, cuya ecuación de valores propios es:

$$\left[-\frac{1}{2} \nabla^2 + v(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r-r'|} dr' + v_{xc}(r) \right] \phi_i = \varepsilon_i \phi_i \quad (24)$$

Dado que $\rho(r)$ queda determinada por la ecuación (21), lo único que resta es obtener la expresión de $E_{xc}(\rho)$.

En la parte concerniente a los algoritmos utilizados en el cálculo, las ecuaciones de Kohn y Sham son similares a las de SCF, de modo que se expresan los orbitales ϕ_i en forma de expansión lineal de gaussianas, reduciendo la ecuación de Schrödinger a un determinante secular:

$$\phi_i = \sum_{\alpha} c_{i\alpha} \eta_{\alpha} \quad (25)$$

$$\sum_{\beta} c_{i\beta} \langle \eta_{\alpha} | -\frac{1}{2} \nabla^2 + v(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r-r'|} dr' + v_{xc}(r) - \varepsilon_i | \eta_{\beta} \rangle = 0 \quad (26)$$

Es necesario recordar que el potencial de intercambio HF no es ni local ni multiplicativo, mientras que en DFT, si la energía de intercambio-correlación se expresa en términos de ρ y $\nabla\rho$, entonces dicho potencial de correlación es local y multiplicativo.

Otro aspecto interesante es que el procedimiento **SCF** se puede hacer sólo en el caso que la función de onda sea **RHF** o **UHF**. El método ROHF no es apropiado dado

que la teoría DFT es formalmente exacta, y debe ser capaz de predecir el exceso de densidad β -spin en algunos núcleos. Además, dado que la función de onda DFT no observa el spin, no se puede calcular la cantidad $\langle \psi | S^2 | \psi \rangle$, que proporciona una medida de la contaminación debida al spin en los cálculos SCF no restringidos.

Actualmente el problema de estos métodos reside en la dependencia exacta de Exc respecto a la densidad, siendo la más utilizada la aproximación B3LYP. Ésta se caracteriza por ser una modificación de la expresión de Exc que se obtiene para un gas de electrones uniforme (Local Density Aproximación), introduciendo el gradiente de la densidad (Becke) como corrección al intercambio electrónico (rompiendo así la homogeneidad del modelo LDA), y términos de correlación (Lee-Yang-Parr) obtenidos en las aproximaciones para la energía de correlación del helio.

Desde este punto de vista, la DFT puede ser sólo una teoría semiempírica, ya que es posible que nunca se encuentre la expresión exacta para el funcional de intercambio y correlación; sin embargo, como los parámetros introducidos no dependen del sistema molecular, genera resultados muy satisfactorios. Cabe destacar que, al contrario de los métodos basados en la teoría de Hartree-Fock, no hay manera de mejorar sistemáticamente la calidad de las energías DFT, ya que se producen modificaciones en el Hamiltoniano, en lugar de aproximar la función de onda como se hace en los cálculos *ab initio*.

A 1.3 Métodos Semilempíricos

Este tipo de métodos^{2,3,9} busca reducir el tiempo necesario para realizar el cálculo *ab initio*, del cual cerca del 70% de la CPU se destina al cálculo de integrales de interacción electrónica del tipo:

$$\iint f_r^*(i) f_s(i) \frac{1}{r_{ij}} f_t^*(j) f_u(j) dv_i dv_j \equiv (rs|tu) \quad (27)$$

Uno de los tratamientos que se utiliza se basa en reemplazar la mayoría de estas integrales por parámetros experimentales (como pueden ser potenciales de ionización, calores de formación, etc.), y en utilizar varias expresiones aproximadas que emplean dichos parámetros para evaluar las integrales, donde se resuelven iterativamente las ecuaciones de Roothaan según métodos autoconsistentes SCF.

Prácticamente todos los métodos semiempíricos son métodos de aproximación de valencia, es decir, se toma en cuenta únicamente los electrones de valencia y las capas de orbitales atómicos de valencia. La influencia de los electrones del core se incluye en los parámetros empíricos. El hamiltoniano del electrón de valencia, para un sistema de n electrones de valencia, tiene la forma:

$$\hat{H}_{val} = \sum_{i=1}^n \left(-\frac{1}{2} \nabla_i^2 + V_i \right) + \sum_{i=1}^n \sum_{j \neq i} \frac{1}{r_{ij}} \quad (28)$$

donde V_i es la energía potencial del electrón de valencia i en el campo de los núcleos y electrones de capas internas, y la cantidad entre paréntesis es el \hat{H}_{core} .

Cuando se expresa cada OM como una combinación lineal de OA, las integrales de Coulomb y de intercambio que aparecen en la resolución de las integrales de la ecuación de Roothaan se transforman en combinaciones lineales de repulsión de dos electrones ($rs|tu$) para los orbitales atómicos.

Los diferentes métodos semiempíricos difieren en los procedimientos de parametrización, así como en el carácter y número de integrales cuyo cálculo es despreciado.

El método CNDO (Complete Neglect Differential Overlap)¹⁰ emplea una base mínima de orbitales atómicos de valencia de Slater con exponentes orbitales fijos para cada átomo. Dicho método se basa en la aproximación ZDO (Zero Differential Overlap), la cual desprecia el solapamiento producido entre los distintos orbitales de un mismo átomo:

$$S_{rs} = \int f_r(\mathbf{1}) f_s(\mathbf{1}) d\mathbf{v}_1 = 0 \quad r \neq s \quad (29)$$

Teniendo en cuenta la ecuación anterior, las integrales de repulsión electrónica se pueden expresar como:

$$(rs|tu) = \delta_{rs} \delta_{tu} (rr|tt) = \delta_{rs} \delta_{tu} \gamma_{rr} \quad (30)$$

Así pues, el método ignora muchas, pero no todas las integrales de este tipo, aunque solo se aplica a integrales mono y bicéntricas, despreciando las de tres y

cuatro centros. Usualmente dichas integrales, γ_{rs} , se tratan como parámetros empíricos en lugar de evaluarlas.

Por otro lado, las integrales del hamiltoniano del core se pueden aproximar usando datos experimentales como pueden ser potenciales de ionización atómica y afinidades electrónicas, o tomando algunos de ellos como parámetros ajustables de modo que los resultados se ajusten a los proporcionados por los métodos *ab initio* de base mínima.

$$\beta_{rs}^{core} = \langle f_r(i) | \hat{H}_{core}(i) | f_s(i) \rangle \quad (31)$$

$$\alpha_r^{core} = \langle f_r(i) | \hat{H}_{core}(i) | f_r(i) \rangle \quad (32)$$

En el método INDO¹¹, que se supone una mejora respecto del método CNDO, no se desprecia el solapamiento diferencial entre los OA de un mismo átomo en las integrales de repulsión electrónica -como en el caso anterior- de un centro, pero sí en las de dos centros. Este método proporciona mejores resultados que el anterior, sobretodo cuando es importante la distribución del spin electrónico (como puede ser en el cálculos de espectros ESR). En lo que se refiere a resultados, ambos dan generalmente ángulos y longitudes de enlace molecular precisos, pero energías de disociación inexactas.

A finales de los sesenta, aparecieron dos nuevas aproximaciones: la teoría PNDO (Partial Neglect Differential Overlap) por Dewar y Klopman,¹² y el MINDO/1 (primera versión del INDO modificado) por Dewar y Baird.^{13,14} Ambas coinciden en la elección de los parámetros, de modo que los calores de formación calculados se ajusten lo más posible a datos experimentales. Por otro lado el hecho de aplicar esta condición de contorno tiene como consecuencia una pérdida de precisión en el cálculo de geometrías moleculares, así como la sobreestimación en la estabilidad de pequeños ciclos y mala descripción de los enlaces de hidrógeno.

El método MNDO, basado en la aproximación NDDO (Neglect of Diatomic Differential Overlap), no emplea parametrización para las integrales de resonancia β_{rs} (ecuación 31), y aunque el número de integrales de interacción interelectrónica aumenta de modo considerable (los tiempos de CPU son 1.5 veces más largos que los requeridos por el método MNDO/3), el número de parámetros se ve reducido considerablemente y ofrece por norma general mejores resultados.

Dentro de ésta misma aproximación (NNDO), se encuentran los métodos AM1 (Austin Model 1, desarrollado por Dewar)¹⁵ y PM3 (desarrollado por Stewart),¹⁶ cuya principal diferencia consiste en la manera de parametrizar, y que introduce mejoras notables en la descripción de enlaces por hidrógeno, energías de activación, etc., respecto al método MNDO, aproximándose más a los resultados *ab initio*.

En general dado que los métodos semiempíricos intentan reproducir los resultados de los cálculos OM-SCF *ab initio* con menor esfuerzo, los resultados también tendrán lo bueno y lo malo de las funciones SCF: buenas geometrías, pero energías de enlace deficientes. No obstante la elección adecuada de los parámetros puede dar lugar a la obtención de resultados mejores que los obtenidos vía SCF *ab initio*, ya que a través de estos parámetros puede compensarse, en cierta manera, la falta de correlación electrónica.

Referencias

- ¹Hanna, M. (1985) en *Mecánica Cuántica para Químicos*; Fondo Educativo internacional: México.
- ² Smith, W. (1996) en *Introduction to Theoretical Organic Chemistry and Molecular Modeling*; VHC Publishers: New York.
- ³ Levine, I. N. (1991) en *Quantum Chemistry*, 5th Edition, Prentice Hall.
- ⁴ Sakurai, J. (1994) en *Modern Quantum Chemistry*; Addison-Wesley: USA.
- ⁵ Seminario, J.; Politzer, P. (1995) en *Modern Density Functional Theory. A Tool for Chemistry*; Elsevier: Netherlands.
- ⁶ Handy, N. (1997) en *Density Functional Theory*; European Summerschool in Quantum Chemistry.
- ⁷ Hohenberg, P.; Khon, W. *Phys. Rev.* **1964**, *136*, B864.
- ⁸ Kohn, W.; Sham, L. J. *Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133.
- ⁹ Hinchliffe, A. (1989) en *Computational Quantum Chemistry*; Wiley & Sons: Chichester.
- ¹⁰ Pople, J.; Snatry, D.; Segal, G. *J. Chem. Phys.* **1965**, *43*, 129.
- ¹¹ Pople, J.; Beveridge, D.; Dobosh, P. *J. Chem. Phys.* **1967**, *47*, 2026.
- ¹² Dewar, M.; Klopman, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 3089.
- ¹³ Baird, N.; Dewar, M. *J. Chem. Phys.* **1969**, *50*, 1262.
- ¹⁴ Baird, N.; Dewar, M.; Sustmann, R. *J. Chem. Phys.* **1969**, *50*, 1275.
- ¹⁵ Dewar, M.; Bingham, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1285.
- ¹⁶ Stewart, J. J. *Comp. Chem.* **1989**, *10*, 210.

APÉNDICE II. LA FUNCIÓN DE FUKUI

La función de Fukui electrónica, $f(r)$, fue introducida por Parr y Yang como una generalización del concepto de orbitales atómicos frontera (OA) de Fukui.¹ Se puede interpretar como el cambio de la densidad electrónica $\rho(r)$ en cada punto r cuando varía el número total de electrones, N , o como la sensibilidad del potencial químico de un sistema (μ) frente a una perturbación externa (en el potencial externo $v(r)$) en un punto particular r :¹

$$f(r) = \left(\frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right)_v = \left(\frac{\partial \mu}{\partial v(r)} \right)_N \quad (1)$$

Parr y Yang² supusieron que los sitios de mayor reactividad en una molécula eran aquellos donde se observaba el mayor cambio inicial en el potencial químico electrónico, por lo cual concluyeron que valores altos de $f(r)$ en un sitio r indicaba una reactividad alta en ese sitio, haciendo de $f(r)$ un valioso índice de reactividad.

Debido a la discontinuidad de la derivada de $\rho(r)$ con respecto al número de electrones N , se han asociado diferentes índices de reactividad a la ecuación (1), las que pueden expresarse como:¹

$$f^+(r) \approx \rho_{N+1}(r) - \rho_N(r) \quad (2)$$

para un ataque nucleofílico, y

$$f^-(r) \approx \rho_N(r) - \rho_{N-1}(r) \quad (3)$$

para un ataque electrofílico, donde $\rho_{N+1}(r)$, $\rho_N(r)$, $\rho_{N-1}(r)$, son, en el caso en el cual el sistema de N electrones tiene carga cero, la densidad electrónica del anión molecular, del sistema neutro y del catión molecular respectivamente.

Para un ataque radicalario se introdujo la función f^0 , la cual es el promedio de f^+ y f^- :¹

$$f^0(r) = \frac{f^+(r) + f^-(r)}{2} \quad (4)$$

Yang y Mortier³ propusieron una forma condensada para estas tres funciones, basada en el análisis de población de Mulliken, las que tomarían la siguiente forma:

$$f_k^+ \approx q_k(N+1) - q_k(N) \quad (5)$$

$$f_k^- \approx q_k(N) - q_k(N-1) \quad (6)$$

$$f_k^0 = \frac{q_k(N+1) - q_k(N-1)}{2} \quad (7)$$

donde $q_k(N+1)$, $q_k(N)$ y $q_k(N-1)$ representan las poblaciones electrónicas en el átomo k en el anión molecular, en el sistema neutro y en el catión molecular respectivamente.

A II.1 Construcción de la Función de Fukui en función de los coeficientes de los orbitales atómicos. (Contreras, R.; Fuentealba, P.; Galván, M.; Pérez, P. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *304*, 405).

Dentro de la teoría de Kohn-Sham (KS), Senet⁴ reportó una definición exacta de la función de Fukui:

$$f_s^\alpha(r) = \left| \phi_f^\alpha(r) \right|^2 \quad (8)$$

donde $\alpha = -$ ($\Delta N < 0$, ataques electrofílicos) y donde $\alpha = +$ ($\Delta N > 0$, ataques nucleofílicos). El subíndice f en la ecuación (8) indica si se está considerando el orbital molecular HOMO o LUMO. En la ecuación (8) el potencial de KS se mantiene constante. Esta condición implica que, además del potencial externo, la repulsión electrónica (i.e., el potencial de Hartree) y el potencial de intercambio y correlación, se mantienen fijos en el proceso de derivatización de la densidad electrónica respecto del número de partículas.

Considérese la densidad electrónica $\rho(r)$ para un sistema molecular arbitrario que contiene N electrones, bajo un potencial externo fijo $v(r)$:

$$\rho(r) = \sum_i n(i) |\phi_i(r)|^2 \quad (9)$$

donde $n(i)$ es el número de ocupación del i -ésimo OM $\phi_i(r)$, que obedece a la condición de normalización:

$$\sum_i n(i) = N \quad (10)$$

Es posible aislar un OM de frontera particular, $\phi^\alpha(r)$, de la ecuación (9) y describir la densidad electrónica molecular como sigue:

$$\rho(r) = n(\alpha) |\phi^\alpha(r)|^2 + \sum_{i \neq \alpha} n(i) |\phi_i(r)|^2 \quad (11)$$

Haciendo la derivada con respecto a N , a potencial externo constante, se puede escribir la siguiente expresión para la función de Fukui:

$$f(r) = |\phi^\alpha(r)|^2 \left[\frac{\partial n(\alpha)}{\partial N} \right]_{v(r)} + n(\alpha) \left[\frac{\partial |\phi^\alpha(r)|^2}{\partial N} \right]_{v(r)} + \sum_{i \neq \alpha} \left[\frac{\partial n(i)}{\partial N} \right]_{v(r)} |\phi_i(r)|^2 + \sum_{i \neq \alpha} \left[\frac{\partial |\phi_i(r)|^2}{\partial N} \right]_{v(r)} \quad (12)$$

Cuando se remueve o se adiciona un electrón del o al estado basal de un sistema molecular, los orbitales moleculares de frontera sufrirán los principales cambios en su estructura electrónica (i.e., el número de ocupación y la forma). Este argumento fue introducido por Fukui⁵ como la *aproximación de orbital rígido* (FOA), y permite despreciar el tercer término de la ecuación (12) debido a que la variación en el número de ocupación $dn(i)$, inducido por el cambio del número total de electrones en el sistema dN , no tiene contribución a la función $f(r)$, dentro del régimen FOA. Por otra parte, el cuarto término puede ser analizado en el contexto del FOA como sigue: se introducirá el factor forma en la densidad electrónica $\sigma(r)$ ⁶ de la siguiente manera:

$$\rho(r) = N\sigma(r) \quad (13)$$

Tomando la derivada respecto a N se obtiene:

$$\left[\frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right]_{v(r)} = \sigma(r) + N \left[\frac{\partial \sigma(r)}{\partial N} \right]_{v(r)} \quad (14)$$

y reordenando se obtiene:

$$\left[\frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right]_{v(r)} = \frac{1}{N} \left[f(r) - \frac{\partial(r)}{N} \right] \quad (15)$$

Si se asume que, de acuerdo a la aproximación FOA, todos los OM tienen la misma forma, entonces la ecuación de Fukui puede ser escrita como $f(r) = \rho(r)/N$, y por lo tanto:

$$\left[\frac{\partial \sigma(r)}{\partial N} \right]_{v(r)} = 0 \quad (16)$$

En otras palabras, la aproximación FOA hace que el cuarto término de la ecuación (12) desaparezca también, y en estas circunstancias, la función Senet-Fukui se aproxima a la función de Fukui definida en el contexto PPY/DFT con restricciones solamente en el potencial externo:

$$f^\alpha(r) \approx f_s^\alpha(r) + n(\alpha) \left| \frac{\partial f_s^\alpha(r)}{\partial N} \right|_{v(r)} \quad (17)$$

Sin embargo, la derivada que aparece en el segundo término de la ecuación (17), representa variaciones de segundo orden en la densidad electrónica (y por lo tanto variaciones de tercer orden en la energía electrónica). Se espera que este segundo término haga una contribución baja a $f^\alpha(r)$, y podría ser despreciada para dejar la relación aproximada,

$$f^\alpha(r) \approx f_s^\alpha(r) = \left| \phi_f^\alpha(r) \right|^2 \quad (18)$$

La ecuación (18) es el punto de partida para desarrollar un esquema simple de cálculo de la función de Fukui, la cual involucra cálculos con geometría fija de la estructura electrónica, sin cálculos adicionales que involucren especies iónicas de

diferente multiplicidad de spin. Se expanden los FMO denominados α en la ecuación (18) en términos de las funciones bases atómicas para obtener:

$$f^\alpha(\mathbf{r}) = \sum_{\mu} \sum_{\nu} c_{\mu\alpha} c_{\nu\alpha}^* \chi_{\mu}(\mathbf{r}) \chi_{\nu}^*(\mathbf{r}) \quad (19)$$

La ecuación (19) puede ser integrada a través del espacio de coordenadas para dejar la condición de normalización correcta para $f^\alpha(\mathbf{r})$,

$$\int d\mathbf{r} f^\alpha(\mathbf{r}) = \sum_{\mu} \sum_{\nu} c_{\mu\alpha} c_{\nu\alpha} S_{\mu\nu} = \sum_{\mu} \left| c_{\mu\alpha} \right|^2 + \sum_{\nu \neq \mu} c_{\mu\alpha} c_{\nu\alpha} S_{\mu\nu} = 1 \quad (20)$$

Donde el conjunto de bases se ha considerado real y normalizado, pero no necesariamente ortogonal. $S_{\mu\nu}$ es la integral de solapamiento entre las funciones base $\chi_{\mu}(\mathbf{r})$ y $\chi_{\nu}(\mathbf{r})$. La ecuación (20) permite la definición de un componente orbital de la función de Fukui, a saber,

$$f^\alpha(\mathbf{r}) = \left| c_{\mu\alpha} \right|^2 + c_{\mu\alpha} \sum_{\nu \neq \mu} c_{\nu\alpha} S_{\mu\nu} \quad (21)$$

A partir de la ecuación (21), se define la función de Fukui atómica o condensada al sitio k como sigue:

$$f_k^\alpha = \sum_{\mu \in k} f_{\mu}^\alpha \quad (22)$$

La función f_k^α conserva la condición de normalización:

$$\sum_k f_k^\alpha = \sum_k \sum_{\mu \in k} \left| c_{\mu\alpha} \right|^2 + \sum_{\nu \neq \mu} c_{\mu\alpha} c_{\nu\alpha} S_{\mu\nu} = 1 \quad (23)$$

La ecuación (22) entrega directamente la función de Fukui electrofílica ($\alpha = -$) y nucleofílica ($\alpha = +$), las que incluyen en cada caso los coeficientes del HOMO y LUMO, respectivamente. Para el caso de un ataque radicalario, simplemente se toma el promedio

$$f_k^0 = \frac{1}{2} [f_k^+ + f_k^-] \quad (24)$$

Referencias

¹ Geerlings, P.; De Prof., F.; Langenaeker, W. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1793.

² Parr, R. G.; Yang, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4049.

³ Yang, W.; Mortier, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5708.

⁴ Senet, P. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 2516.

⁵ Fukui, K. (1973) en *Theory of Orientation and Stereoselection*, Springer, Berlin.

⁶ Parr, R. G.; Yang, W. (1989) en *Density Functional Theory of Atoms and Molecules, The International Series of Monographs on Chemistry*, Breslow, R.; Goodenough, J. B.; Halpern, J.; Rowlinson, J. S. (Eds.), Oxford Science Publications, Oxford.

APÉNDICE III. VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE β -CARBOLINAS EN DMSO

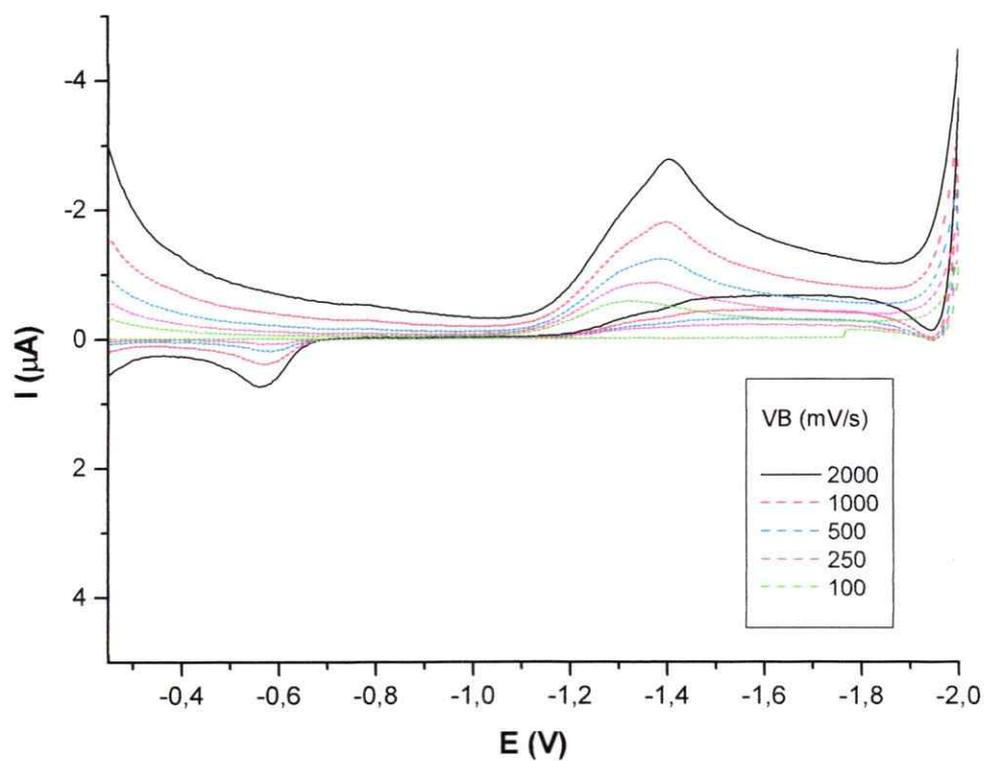


Figura A III.1: Voltamograma cíclico en medio aprótico de norharmano HCl. VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido catódico.

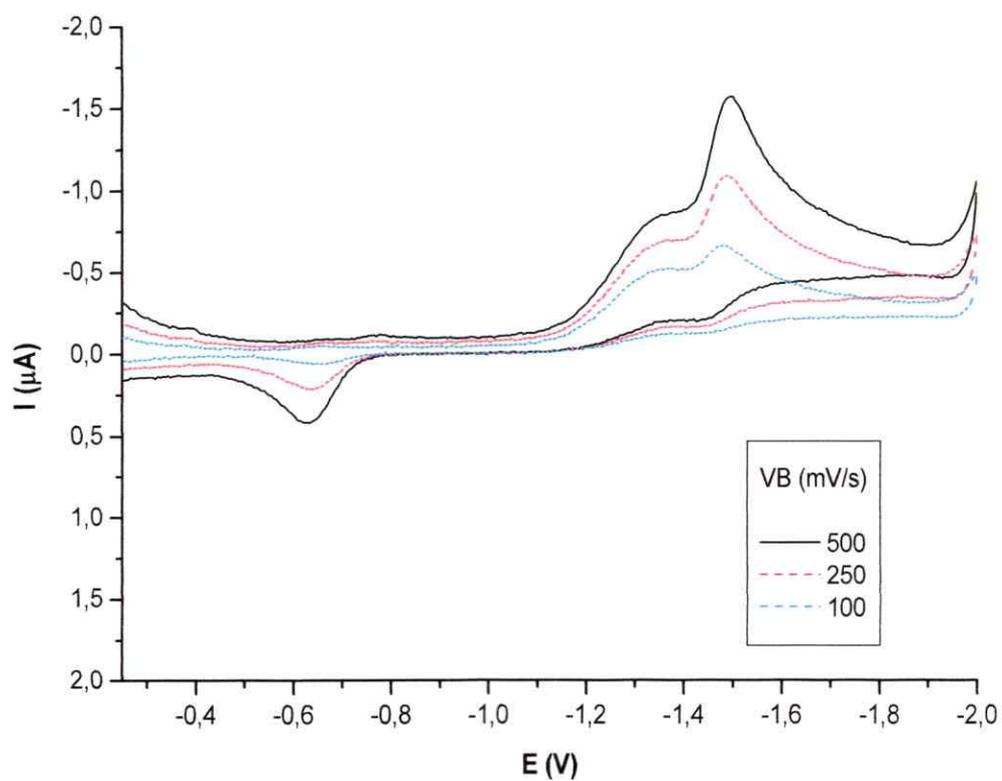


Figura A III.2: Voltamograma cíclico en medio aprótico de harmano HCl. VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido catódico.

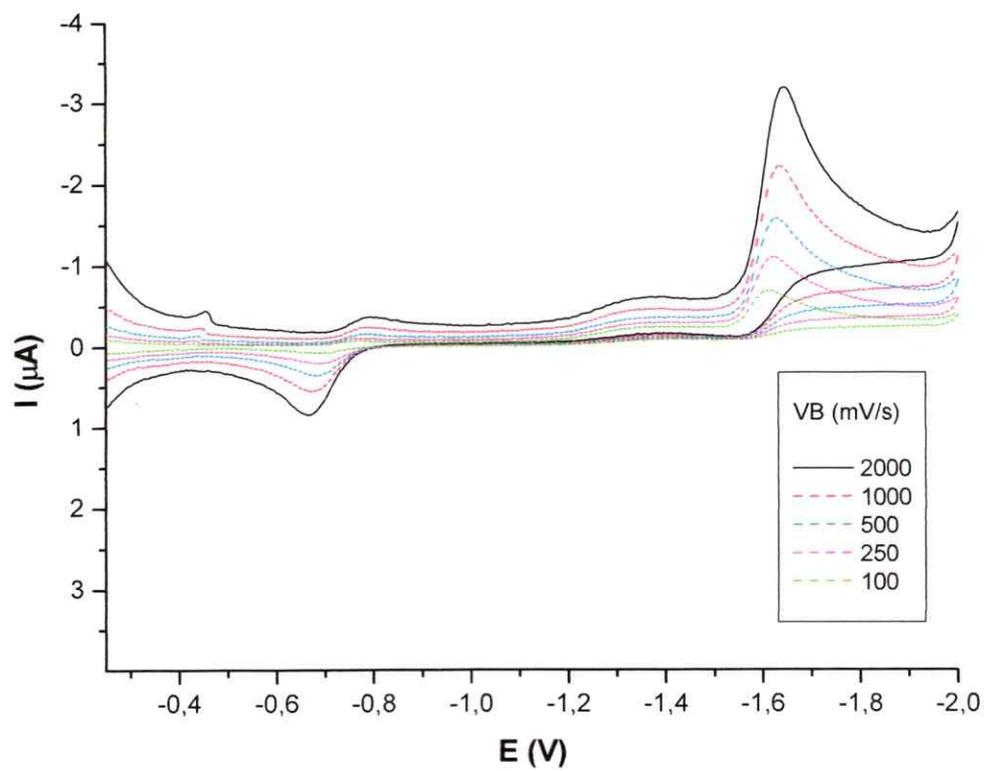


Figura A III.3: Voltamograma cíclico en medio aprótico de harmol HCl. VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido catódico.

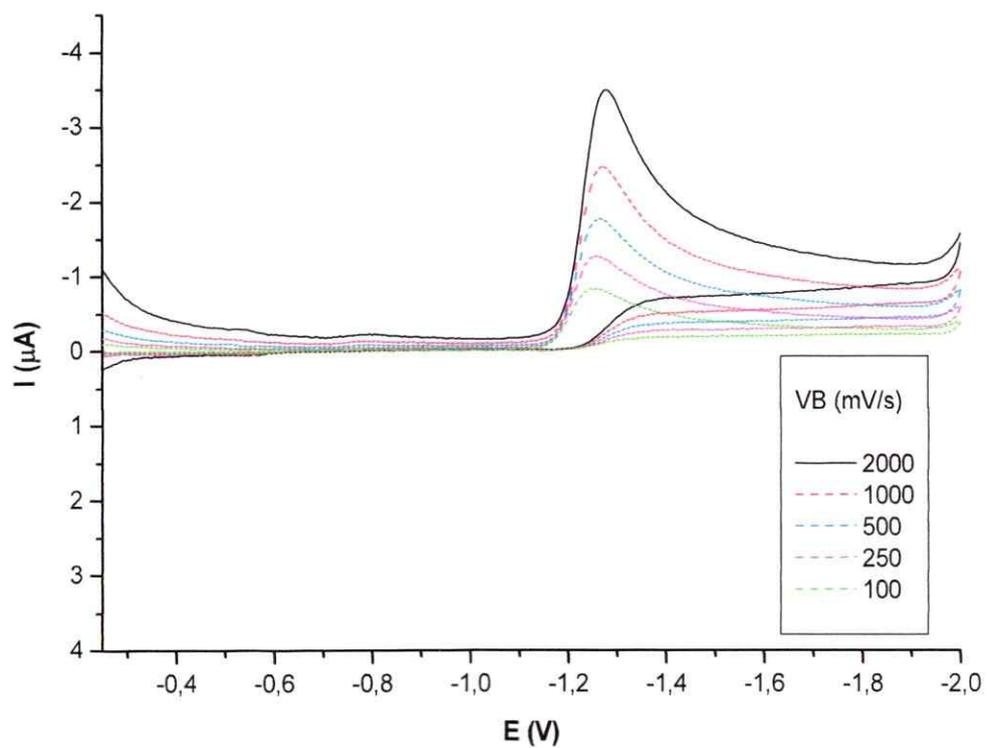


Figura A III.4: Voltamograma cíclico en medio aprótico de harmalol HCl. VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido catódico.

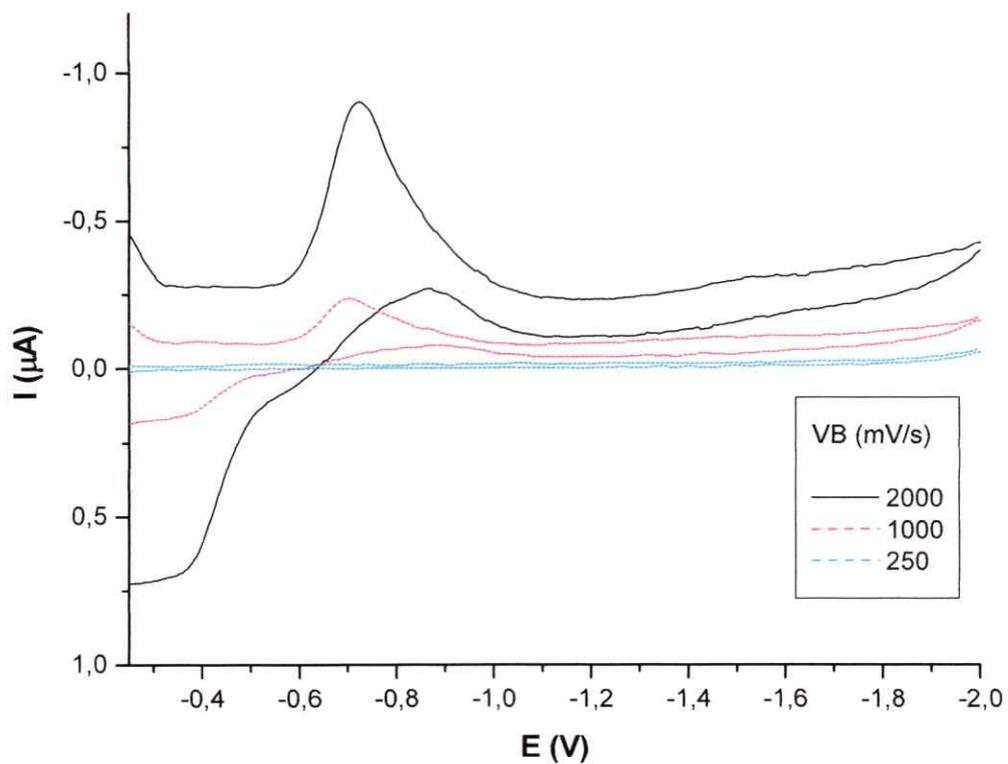


Figura A III.5: Voltamograma cíclico en medio aprótico de norharmano. VB , velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido catódico.

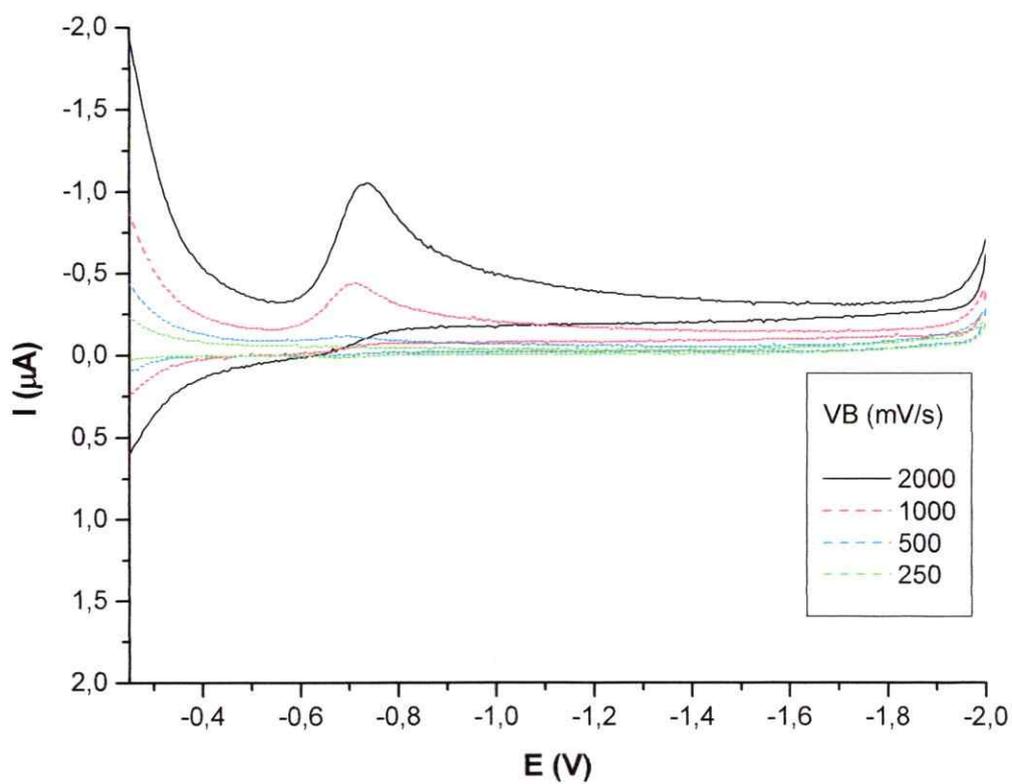


Figura A III.6: Voltamograma cíclico en medio aprótico de harmano (b). VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido catódico.

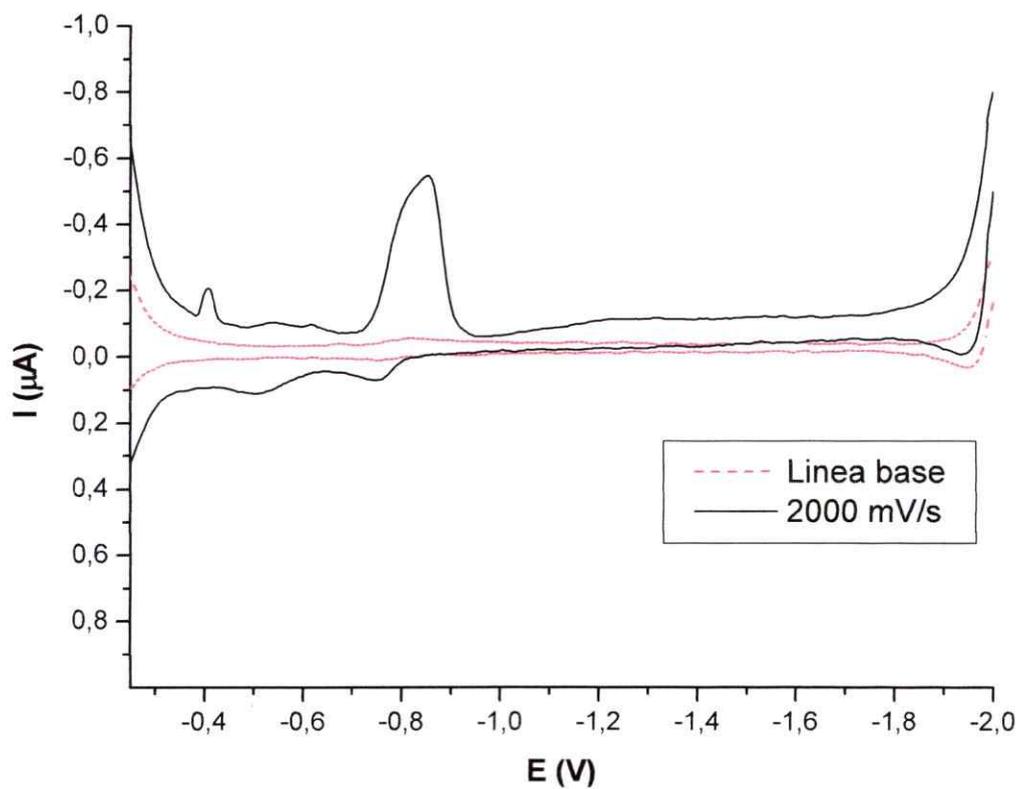


Figura A III.7: Voltamograma cíclico en medio aprótico de THBC. VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido catódico.

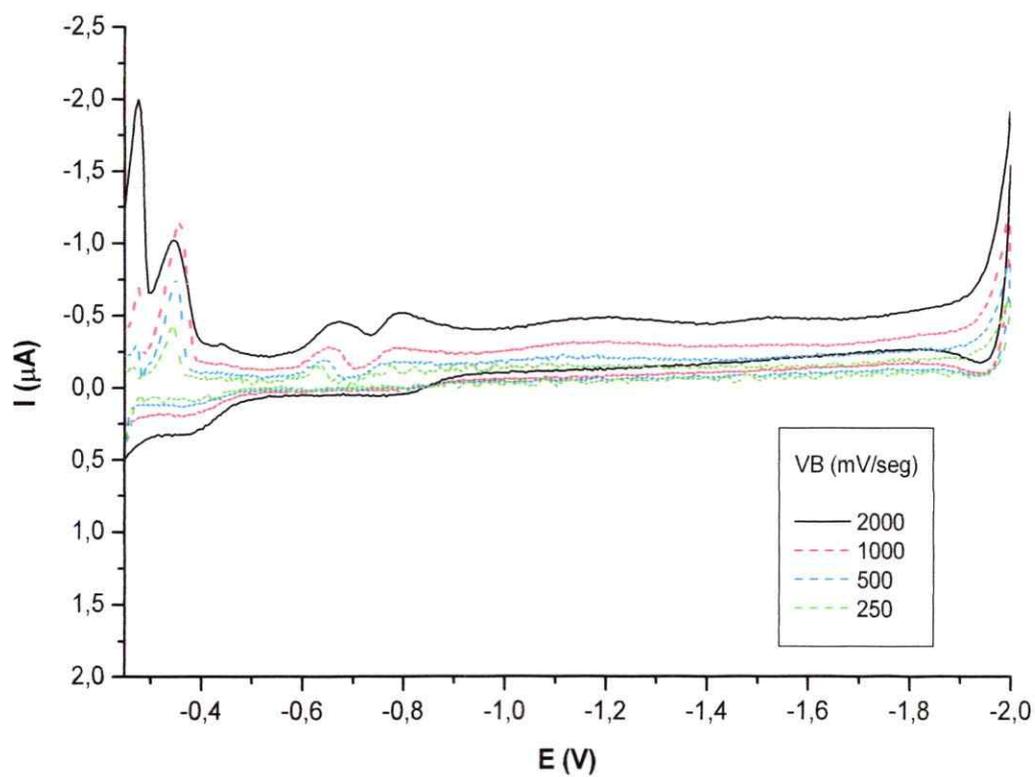


Figura A III.8: Voltamograma cíclico en medio aprótico de AHTC. VB, velocidad de barrido. Barrido inicial realizado en el sentido catódico.

APÉNDICE IV. PUBLICACIONES GENERADAS POR ESTA TESIS

Este trabajo de Tesis generó las siguientes publicaciones:

1. Rivas, P.; B. K. Cassels, B. K.; Morello A.; Repetto, Y., " Effects of some β -carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes", *Comp. Biochem. Physiol. C* **1999**, *122*, 27-31.
2. Rivas, P.; Zapata-Torres, G.; Melin J.; Contreras, R., "Probing the hydride transfer process in the lumiflavine-1-methylnicotinamide model system using group softness", *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 4189-4196.

Los siguientes manuscritos se encuentran en preparación:

- Rivas, P.; Cassels, B. K.; Olea-Azar, C.; Squella, A., "Electrochemical studies on the oxidation and reduction of some simple β -carboline alkaloids in aqueous and aprotic media".
- Rivas, P.; Cassels, B. K.; Contreras, R.; Zapata-Torres, G., "Theoretical studies on the electronic aspects of the inhibition of Monoaminoxidase A by β -carboline alkaloids".

También se generaron las siguientes presentaciones a Congresos:

1. P. Rivas, F. Faini, B. K. Cassels, A. Morello y Y. Repetto, "Estudio de β -carbolinas como posibles antichagásicos", II Congreso de Plantas Medicinales, San Bernardo, Chile, 1995.
2. P. Rivas, B. K. Cassels, A. Morello y Y. Repetto, "Actividad tripanosomicida de β -carbolinas", XXII Congreso Latinoamericano de Química y XXI Jornadas Chilenas de Química, Concepción, 1996.

3. P. Rivas, B. K. Cassels, Y. Repetto y A. Morello, "Efecto de β -carbolinas sobre la respiración de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*", XXII Jornadas Chilenas de Química, Puyehue, 1997.
4. P. Rivas, B. K. Cassels, S. Bollo, J. C. Sturm, L. J. Núñez y A. Squella, "Estudio electroquímico de β -carbolinas", XXII Jornadas Chilenas de Química, Puyehue, 1997.
5. P. Rivas, B. K. Cassels, L. J. Núñez y A. Squella, " β -Carbolinas antioxidantes: Posible mecanismo de acción", XXII Jornadas Chilenas de Química, Puyehue, 1997.
6. P. Rivas, R. Contreras y G. Zapata-Torres, "Estudio teórico de la interacción Nicotinamida-Isoaloxazina en base a descriptores de estructura electrónica", XXIV Jornadas Chilenas de Química, Temuco, 2001.
7. P. Rivas, B. K. Cassels, R. Contreras y G. Zapata-Torres, "Estudio teórico de β -Carbolinas: Determinación de descriptores de estructura electrónica", XXIV Jornadas Chilenas de Química, Temuco, 2001.
8. P. Rivas, B. K. Cassels y G. Zapata-Torres, "Estudio de la interacción β -carbolina-isoaloxazina sobre la base de descriptores de estructura electrónica", XXV Jornadas Chilenas de Química, Antofagasta, Enero, 2004.

Effects of some β -carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes

Pilar Rivas ^{a,*}, Bruce K. Cassels ^a, Antonio Morello ^b, Yolanda Repetto ^b

^a Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Chile, P.O. Box 70086, Santiago 7, Chile

^b Program of Clinical Molecular Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Chile, P.O. Box 70086, Santiago 7, Chile

Received 12 February 1998; received in revised form 25 May 1998; accepted 1 June 1998

Abstract

Several β -carboline (9H-pyrido-[3,4-b]-indole) alkaloids were evaluated for in vitro trypanosomicidal activity against *Trypanosoma cruzi* epimastigotes belonging to two different strains (Tulahuén and LQ) showing different sensitivity to nifurtimox. Important differences were observed in the susceptibility of the parasites to these natural substances, with the relatively nifurtimox-resistant LQ strain showing greater sensitivity to the β -carbolines. Respiratory chain inhibition appears to be a possible determinant of the trypanosomicidal activity of these compounds. © 1999 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: β -Carboline alkaloids; Harmine; Harmane; Harmaline; *Trypanosoma cruzi*; Tulahuén strain; LQ strain; Trypanosomicidal effect; Trypanosomicidal drugs; Parasiticidal drugs

1. Introduction

Chagas' disease (American Trypanosomiasis) is a serious health problem in Latin American countries, where over 20 million people are already infected with *Trypanosoma cruzi*, the protozoan parasite that causes this disease. Mortality indices range from 8 to 12% depending on the age and on the physiological state of the patient [25,26].

Two nitroheterocyclic drugs, nifurtimox and benznidazole, have been used to treat this disease, but the serious side effects produced in 40–70% of the patients force half of them to stop treatment. Furthermore, important differences in susceptibility to these drugs have been detected among the many different parasite strains isolated [13,14,21,26]. Nifurtimox is no longer being used in some countries because of its toxicity and

its ineffectiveness in chronic stages of Chagas' disease. Due to the inadequacy of the available chemotherapeutic regimens, hundreds of chemical compounds—both natural and synthetic—have been tested as antichagasic agents, but the potential or actual toxicity and the low water solubility of many of these have curtailed their use [7,23].

Among the compounds tested, some β -carboline alkaloids proved to be active against epimastigotes of *Trypanosoma* species in vitro [6,15]. The results obtained by the authors suggested that unsaturation of the pyridine ring and substitution at C7 (Fig. 1) increase trypanosomicidal activity [6].

β -Carboline alkaloids are widespread in nature. They have been isolated from fungi, plant species belonging to several families, marine organisms and mammalian (including human) fluids and tissues [4,11,16]. The pharmacological activity of these alkaloids is also very diverse: they have been shown to inhibit different enzymes and to interact with neurotransmitter systems such as opiate, GABA, muscarinic cholinergic, sero-

* Corresponding author. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Casilla 653, Santiago, Chile. Tel.: + 5 62 6787253; fax: + 5 62 2713888; e-mail: privas@pinklab.ciencias.uchile.cl

tonin and dopamine receptors [24]. As chemotherapeutic agents, some β -carbolines have been reported to be cytotoxic to cancer cells and parasiticidal against other microorganisms different from *Trypanosoma* spp. [1,24,27].

The endogenous occurrence of some β -carbolines in man suggests the presence of biosynthetic and metabolic pathways for these compounds, such that the human body should be able to deal with them to reduce their toxic effects. This fact and the chemotherapeutic activity of these alkaloids have prompted us to continue testing β -carbolines in different strains of *T. cruzi*, attempting to gain some insight regarding the mode of action of these alkaloids. Besides, considering that therapeutic regimens for Chagas' disease may be of long duration (90–120 days) [14], it seems interesting to determine whether the effects of the compounds persist in the cultures or if the parasites develop strategies to avoid the toxic effects of the alkaloids. This information could be helpful in the search of lead compounds for the design of new drugs with low toxicity and high efficacy for the treatment of Chagas' disease.

This paper reports results obtained when treating cultures of *T. cruzi* epimastigotes belonging to two Chilean strains: Tulahuén (high sensitivity to nifurtimox) and LQ (low sensitivity to nifurtimox) [20], with several β -carbolines (see Fig. 1) over 14-day periods.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Tryptose, fetal calf serum, yeast extract and tryptone were obtained from Difco. Harmine hydrochloride, harmane hydrochloride, harmaline, harmol hydrochloride, harmalol hydrochloride, norharmane hydrochloride

and 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline (THBC) were purchased from Aldrich. Harmane-1,2,3,4-tetrahydro-3-carboxylic acid (AHTC), hemin and all other chemicals were purchased from Sigma.

2.2. Parasites

T. cruzi epimastigotes (Tulahuén and LQ strains) from our collection were grown at 28°C in Diamond's monophasic medium as reported earlier [2], with blood replaced by 4 μ M hemin. Fetal calf serum was added to a final concentration of 4%.

2.3. Inhibition of culture growth

Drugs were added in DMSO solutions, to reach the final concentrations in the culture medium indicated in the tables and figures. No effect on cell growth or oxygen consumption attributable to DMSO was observed at the concentration used. *T. cruzi* epimastigote growth was followed by nephelometry using culture flasks with a side arm [3,12]. The I_{50} and I_{95-100} data were calculated by interpolation of culture growth inhibition curves at different drug concentrations on the 7th day of culture (exponential phase).

2.4. Oxygen uptake

Respiration measurements were carried out polarographically with a Clark N° 5331 electrode (Yellow Spring Instruments) in a Gilson 5/6 oxygraph [17]. The chamber volume was 2 ml and the temperature was set at 28°C. The amount of parasites used for the assays was equivalent to 1 mg of protein in the Tulahuén strain and 0.5 mg in the LQ strain. The parasites were resuspended in 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.107 M sodium chloride.

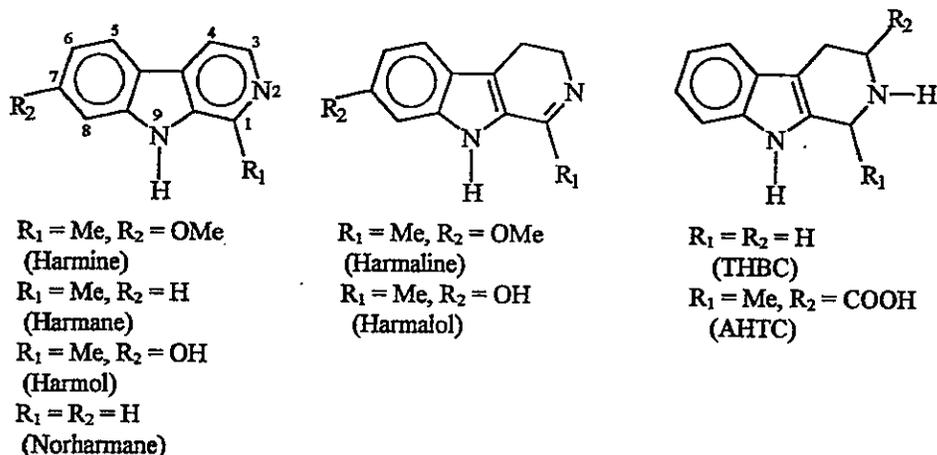


Fig. 1. Chemical structures of the β -carbolines studied.

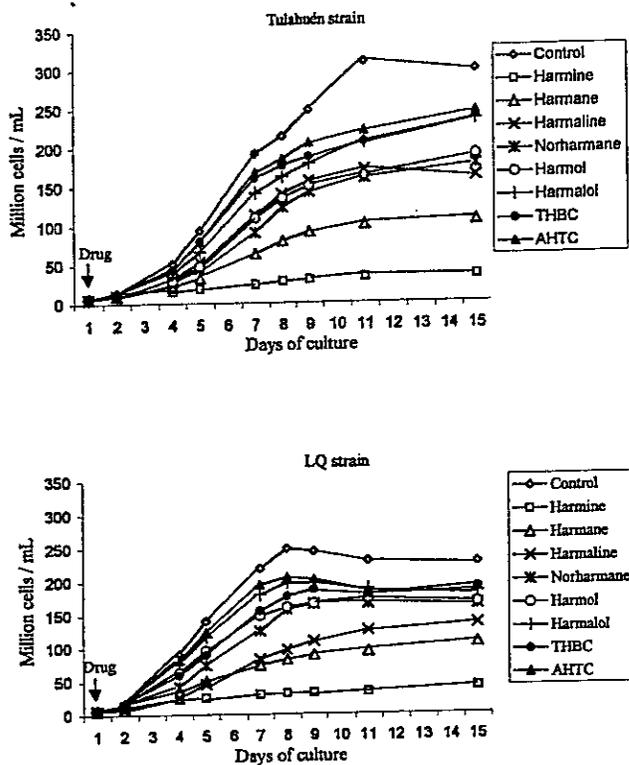


Fig. 2. Effect of several β -carbolines on the growth of epimastigotes of the Tulahuén and LQ strains of *Trypanosoma cruzi*. Drugs were added at 100 μ M final concentration. Values shown represent the averages of three or more independent experiments with no more than 10% variation among them. Initial populations of epimastigotes in culture, 5.6×10^6 cells/ml in the Tulahuén strain and 6.0×10^6 cells/ml in the LQ strain.

2.5. Drug toxicity

To perform toxicity determinations, drugs were added to parasite suspensions (10^6 – 10^7 cells/ml) at 0.1 and 1 mM concentrations in water or DMSO. After 1, 20 and 40 h at 28°C, the parasites were observed for changes in motility and shape [17].

3. Results and discussion

Fig. 2 shows the effect of some β -carbolines on the growth of epimastigotes of the Tulahuén and LQ strains of *T. cruzi*. The Tulahuén strain reaches its stationary phase of growth after 9–11 days of culture, while the LQ strain does so after 7–9 days of culture. Although all compounds are active growth inhibitors, only harmine has significant activity at concentrations of 100 μ M. Harmine inhibits growth of the Tulahuén strain by 90% by day 10, and by 88% by day 7 in the LQ strain. Harmane shows an inhibition of 68% by day 10 in the Tulahuén strain and of 67% by day 7 in the LQ strain. Harmaline, norharmane and harmol display very similar and moderate activities in the Tulahuén

Table 1

Effect of harmine and harmane on culture growth of Tulahuén and LQ epimastigotes of *T. cruzi*

Compound	Tulahuén strain		LQ strain	
	I ₅₀	I ₉₅	I ₅₀	I ₉₅
Harmine	19.69*	124.00*	17.99*	105.64*
Harmane	40.04**	368.71**	26.58***	206.44***

I₅₀ figures represent the micromolar concentrations inhibiting culture growth by 50%.

I₉₅ figures correspond to the micromolar concentration inhibiting culture growth by 95%.

* $P < 0.006$; ** $P < 0.07$; *** $P < 0.008$ with respect to control cultures.

strain with inhibition of cultures by 45–47% after 10 days. Lower activities in the Tulahuén strain—between 29–34% of inhibition by day 10 are characteristic of harmalol, THBC and AHTC. In the LQ strain harmaline inhibits growth of cultures by 61% after 7 days of culture and norharmane, harmol, harmalol, THBC and AHTC are less active against epimastigotes inhibiting their growth by 17–30% by day 7.

The trypanosomicidal activity of nifurtimox is based on the generation of free radicals [10]. The Tulahuén strain is more strongly inhibited than the LQ strain by this drug, presumably due to the lower concentration in the former of glutathione and trypanothione, two important factors in cellular defense mechanisms against free radicals [19,20,22]. Table 1 shows the concentrations of harmine and harmane needed to inhibit 50% (I₅₀) or 95% (I₉₅) of culture growth. Since a greater susceptibility to β -carbolines can be observed for the relatively nifurtimox-insensitive LQ strain, the generation of free radicals may not be an important factor in the mode of action of these alkaloids.

Table 2

Effect of β -carboline alkaloids on oxygen uptake by *T. cruzi* epimastigotes of the Tulahuén and LQ strains

Compound	% Inhibition of oxygen uptake	
	Tulahuén strain	LQ strain
Harmine	77.0	61.0
Harmane	50.5	42.0
Norharmane	44.0	29.5
Harmol	41.0	61.0
Harmaline	28.0	23.0
Harmalol	19.5	16.0
THBC	17.5	16.0
AHTC	21.0	12.5

β -carbolines were added at 1 mM final concentrations. Control respirations were 25.0 nmol O/min/mg of protein for the Tulahuén strain and 27.4 nmol O/min/mg of protein for the LQ strain. Values shown represent the averages of three or more independent experiments with no more than 15% variation among them.

Table 3
Toxicity of some β -carboline alkaloids towards *T. cruzi* epimastigotes of the Tulahuén strain

Compound	0.1 mM			1 mM		
	1 h	20 h	40 h	1 h	20 h	40 h
Control	0	0	0	0	0	0
Norharmane	+	++	+++	++	+++	++++
Harmine	+	+	++	++	+++	++++
Harmane	0	+	+	++	+++	+++
Harmol	0	+	+	+	++	+++
Harmaline	0	+	+	+	+	++
Harmalol	0	0	0	0	+	++
AHTC	0	0	0	0	0	0

Toxicity ratings expressed as 0,+,++,+++,++++, represent decrease in motility, change in shape and lysis of cells evaluated microscopically ($\times 400$ magnification) after incubation for 1, 20 and 40 h at two drug concentrations.

Data shown represent the results of three independent experiments.

Table 2 shows the effect of some β -carbolines upon the respiration of *T. cruzi* epimastigotes belonging to the Tulahuén and LQ strains. Inhibition of respiration with 1 mM drug concentrations ranges from 17 to 77% in the Tulahuén strain and from 12 to 61% in the LQ strain. These results suggest that inhibition of the respiratory chain may play an important role in the mechanism of action of β -carbolines. Nevertheless, the response of the Tulahuén and LQ strains regarding inhibition of oxygen uptake is not the same. While the Tulahuén strain shows a strong correlation between trypanosomicidal activity and inhibition of respiration (the best trypanosomicidal compounds are also the best inhibitors, and conversely), the LQ strain does not show a clear relationship. Furthermore, inhibition of respiration seems to be the principal mechanism of action of the majority of the β -carbolines studied in the Tulahuén strain, but in the LQ strain it accounts only partially for trypanosomicidal activity.

Table 3 shows the toxicity of the drugs tested in these studies towards epimastigotes of the Tulahuén strain, as determined by microscopic observation during a 40-h period, at two drug concentrations. Important differences can be seen in the susceptibility of the parasites to the chemicals. These results are in agreement with those obtained from inhibition of culture growth (Fig. 2). Norharmane was the most toxic alkaloid to *T. cruzi*, followed by harmine and harmane. These three compounds produced lysis of most cells after 40 h, at 1 mM concentrations. Harmol and harmaline are less toxic, producing deformation and/or immobilization of the epimastigotes. Harmalol and AHTC displayed little or no toxicity to the parasites. The results obtained from the experiments summarized in Fig. 2 indicate that very early in the incubation periods of epimastigote cultures, norharmane is the best inhibitor, but apparently effec-

tive detoxification strategies are soon triggered in the parasites to overcome the toxicity of this alkaloid.

Our results allow us to be somewhat more specific than other authors [6] in the description of structure-activity relationships. As observed by these earlier authors, unsaturation of the pyridine ring increases trypanosomicidal activity. 1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolines have quite low activities, while 1,2-dihydro- β -carbolines are better growth inhibitors. A fully unsaturated pyridoindole ring system seems to be a necessary condition for optimal trypanosomicidal activity in this family of compounds. This could be associated with planarity of the molecule, with its redox behavior or with its electron density distribution, to mention three possible structural desiderata. A methyl group at C1 enhances activity, possibly through an increment in the overall lipophilicity of the molecule or by specific interaction with a hydrophobic site in a macromolecular target. Substitution at C7 with a methoxy group also enhances the activity (compare harmine with harmane in Fig. 2 and Table 1), but if the substituent at this position is a hydroxy group, the activity tends to decrease (compare harmine and harmol in Fig. 2 and Table 3). This could be explained by the presence of a hydrophobic center close to a site where β -carbolines exert their action, into which a methoxy group could fit better than a hydroxy group, or by decreased lipophilicity.

The mechanisms of action of β -carbolines as trypanosomicidal agents are not known. It has been reported that these alkaloids form intermolecular associations with the prosthetic groups of flavoenzymes, FAD and FRN [8,9], and that they are also able to interfere with DNA synthesis in cancer cells [5,18]. If the generation of free radicals does not appear to be an important mechanism of action of trypanosomicidal β -carbolines, it seems possible that associations with flavoenzymes of the parasites, belonging or not to the respiratory chain, and/or alterations of parasite DNA synthesis, may be responsible for the trypanosomicidal activity of these compounds.

Acknowledgements

This research was supported by FONDECYT-Chile (Grants N° 2950013 and 1961095), DID-Universidad de Chile, and SIDA, Sweden.

References

- [1] Agarwal A, Agarwal SK, Singh SM, Fatma N, Chatterjee RK. In vivo potent antifilarial β -carbolines. *Bioorg Med Chem Lett* 1996;6:225–8.

- [2] Aldunate J, Ferreira J, Letelier ME, Repetto Y, Morello A. *t*-Butyl-4-hydroxyanisole, a novel respiratory chain inhibitor. Effects on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. FEBS Lett 1986;195:295–7.
- [3] Aldunate J, Traipe L, Spencer P, Morello A, Repetto Y. Effects of hydroquinones on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Comp Biochem Physiol 1992;103C:97–100.
- [4] Airaksinen M, Kari I. β -Carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body. Part I: Occurrence, origin and metabolism. Med Biol 1981;59:21–34.
- [5] Beljansky M, Beljansky MS. Selective inhibition of in vitro synthesis of cancer DNA by alkaloids of β -carbolines class. Exp Cell Biol 1982;50:79–87.
- [6] Cavin J, Krassner S, Rodríguez E. Plant-derived alkaloids active against *Trypanosoma cruzi*. J Ethnopharmacol 1987;19:89–94.
- [7] Chiari E, Oliveira A, Raslan D, Mesquita A, Tavares K. Screening in vitro of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Trans R Soc Med Hyg 1991;85:372–4.
- [8] Codoñer A, Monzó I, Tomás F, Valero R. Spectroscopic study of intermolecular complexes between FAD and some β -carboline derivatives. Spectrochim Acta 1986;42A:765–9.
- [9] Codoñer A, Monzó I, Ortiz C, Olba A. Spectroscopic study of molecular associations between riboflavin and some β -carboline derivatives. J Chem Soc Perkin Trans II 1989;1989:107–11.
- [10] Docampo R, Stoppani AOM. Generation of superoxide anion hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. Arch Biochem Biophys 1979;191:317–21.
- [11] Fernández de Arriba A, Lizcano JM, Balsa MD, Unzeta M. Inhibition of monoamino oxidase from bovine retina by β -carbolines. J Pharm Pharmacol 1994;46:809–13.
- [12] Ferreira J, Coloma L, Fones E, Letelier ME, Repetto Y, Morello A, Aldunate J. Effects of *t*-butyl-4-hydroxyanisole and other phenolic antioxidants on tumoral cells and *Trypanosoma* parasites. FEBS Lett 1988;234:485–8.
- [13] Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 1987;81:755–9.
- [14] Gustafsson LL, Beerman B, Abdi YA. Nifurtimox. In: Taylor, Francis, editors. Handbook of drugs for tropical parasitic infections. London: 83–85; 1987.
- [15] Hopp KH, Cunningham LV, Bromel MC, Schermeister LJ, Wahba Khalil SK. In vitro antitrypanosomal activity of certain alkaloids against *Trypanosoma lewisi*. Lloydia 1976;39:375–7.
- [16] Kondo K, Shigemori H, Kikuchi Y, Ishibashi M, Sasaki T, Kobayashi J. Ircinal A and B from the okinawan marine sponge *Ircinia* sp.: Plausible biogenetic precursors of manzamine alkaloids. J Org Chem 1992;57:2480–3.
- [17] Letelier ME, Rodriguez E, Wallace A, Lorca M, Repetto Y, Morello A, Aldunate J. *Trypanosoma cruzi*: A possible control of transfusion induced Chagas' disease by phenolic antioxidants. J Exp Parasitol 1990;71:357–63.
- [18] Leteurre F, Madalengoitia J, Orr A, Cuzi T, Lehnert E, Macdonald T, Pommier Y. Rational design and molecular effects of a new topoisomerase II inhibitor, azatoxin. Cancer Res 1992;52:4478–83.
- [19] Maya JD, Repetto Y, Agosin M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule C, Morello A. Effects of nifurtimox and benzimidazole upon glutathione and trypanothione in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1997;86:101–6.
- [20] Moncada C, Repetto Y, Aldunate J, Letelier ME, Morello A. Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. Comp Biochem Physiol 1989;103C:87–91.
- [21] Morello A, Aldunate J, Repetto Y. Present status of Chagas' disease chemotherapy at the molecular level. In: Ehrlich R, Nieto A, editors. Biology of parasitism. Trilce, Montevideo, 33–39;1994.
- [22] Repetto Y, Opazo E, Maya JD, Agosin M, Morello A. Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*. Effect of drugs. Comp Biochem Physiol 1996;115B(2):281–5.
- [23] Sepúlveda-Boza S, Cassels BK. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. Planta Med 1996;62:98–105.
- [24] Torreilles J, Guérin MC, Previero A. Des structures simples aux potentialités pharmacologiques élevées: les β -carbolines. Origines, synthèses, propriétés biologiques. Biochimie 1985;67:929–47.
- [25] Tracy JW, Webster LT Jr. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infection. In: Hardman JG, Limbird E, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman, A, Gilman, A, editors. The pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill, 987–1008;1996.
- [26] WHO Expert Committee. In: WHO Technical Report Series 811. Control of Chagas' Disease; Geneva, 1991; pp. 1–36.
- [27] Wright CW, Bray DH, O'Neill MJ, Warhurst DC, Phillipson JD, Quetin-Leclercq JL, Angenot L. Antiamoebic and antiplasmodial activities of alkaloids isolated from *Strychnos usambaren-sis*. Planta Med 1991;57:337–40.

Probing the hydride transfer process in the lumiflavine–1-methylnicotinamide model system using group softness

Pilar Rivas,^{a,b,*} Gerald Zapata-Torres,^b Junia Melin^a and Renato Contreras^a

^aDepartamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Casilla 653, Ñuñoa, Santiago, Chile

^bMillennium Institute for Advanced Studies in Cell Biology and Biotechnology, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile

Received 20 January 2004; revised 17 March 2004; accepted 17 March 2004

Abstract—The hydride transfer process between the isoalloxazine moiety of flavins and the nicotinamide moiety of NAD(P)H has been explored by using density functional theory based reactivity index in the 1-methylnicotinamide–lumiflavine model system. Based on crystallographic data available, we have found that the group softness index helps to locate and orientate reactive regions in these interacting molecules while the electrophilicity index successfully describes the reactivity pattern of this system.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Flavins (riboflavin, FMN, FAD) are cofactors of a wide-spread family of enzymes, the flavoenzymes, which are involved in a large number of biological functions. Dehydrogenation of a variety of substrates, mediation of one- and two-electron transfer, activation of molecular oxygen as well as photobiochemical processes are only a few examples of the versatility of flavoproteins.^{1–4} A relevant aspect of the biological activity of these enzymes is that despite their versatility, their reactivity is restricted to the common structural feature of flavin cofactors, represented by the 7,8-dimethylisoalloxazine system (see LF in Fig. 1). The ribitol, pyrophosphate or ribose moieties of the different side chains attached at nitrogen 10 of the isoalloxazine ring are not directly involved in the catalytic process but in anchoring the cofactor to the protein, as it has been revealed by structural studies.^{5–7} It is apparent that the reactivity of flavins might be modulated by the different oxidation and protonation states that the isoalloxazine moiety can undergo, and by the protein environment of the flavin-binding site.^{4,8–10} Also, the use of artificial flavins as active site probes has provided important

mechanistic information related to the tuning of the isoalloxazine reactivity by the apoprotein.^{11–13}

Based on the experimental evidence available, Massey and Hemmerich¹¹ proposed that flavoproteins could be classified into five major divisions according to their reactivity. The regiospecificity and the spectral properties of two of these main groups suggest common structural features which could determine the type of reaction catalysed, providing some clues about flavoprotein catalysis. Enzymes

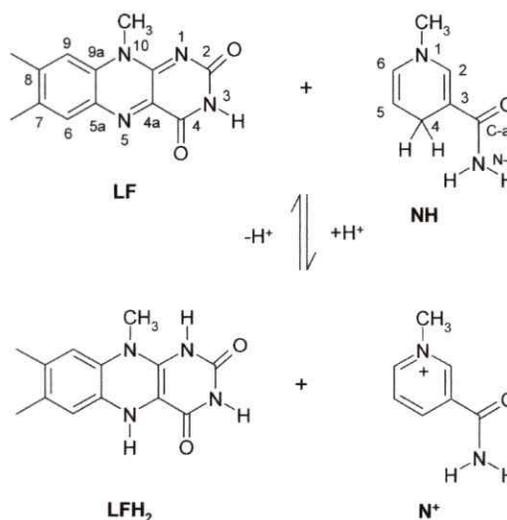


Figure 1. Hydride transfer reaction between lumiflavine (LF) and 1-methylnicotinamide (NH).

Keywords: Hydride transfer; Flavins; Density functional theory; Chemical softness; Electrophilicity.

Abbreviations: LF, oxidised lumiflavine; NH, reduced 1-methylnicotinamide; N⁺, oxidised 1-methylnicotinamide; LFH1⁺, oxidised lumiflavine protonated at N-1; LFH5⁺, oxidised lumiflavine protonated at N-5; LFH₂, reduced lumiflavine; DFT, density functional theory; HOMO, highest occupied molecular orbital; LUMO, lowest unoccupied molecular orbital; HSAB, hard–soft acid–base.

* Corresponding author. Tel.: +56-678-7433; fax: +56-271-3888; e-mail address: pirivas@abello.dic.uchile.cl

of the dehydrogenases/oxidases class would be characterised by a 'red' semiquinone radical and hydrogen bonding to the apoprotein through the N-1 site of the isoalloxazine system, which leads to the activation of N-5 towards nucleophilic attack. The electron transferases class would be characterised by a 'blue' semiquinone radical, a planar structure for the reduced form, and hydrogen bonding to the apoprotein through N-5 of isoalloxazine, leading to the activation of C-4a towards nucleophilic attack (see Fig. 1). This general classification has received further support from experimental and theoretical studies.^{14,15}

NAD(P)H and NAD(P)⁺ are recurrent electron donors and acceptors, respectively, involved in two-electron transfer processes in flavoenzyme catalysis.^{1,16} As in the case of isoalloxazine in flavins, reactivity in the NAD(P)H/NAD(P)⁺ couples is restricted to the nicotinamide ring (see NH in Fig. 1). In these enzymes a direct transfer of a hydride equivalent takes place between the C-4 atom of nicotinamide and the N-5 position of isoalloxazine as shown diagrammatically in Figure 1. This overall mechanism is supported by crystallographic data, available for several enzymes, which show the nicotinamide ring stacked almost parallel to the central ring of the flavin, at a distance of approximately 3.5 Å as shown in Figure 2a.^{5,6,17} This hydride transfer reaction can occur directly at the active site of an enzyme, as in flavin reductases,¹⁸ or at an allosteric site where isoalloxazine, reduced or oxidised by the nicotinamide cofactor, is an intermediate of the catalysis.^{1,11,19} Although the stereochemical course of the reaction is known, different electronic mechanisms have been proposed to account for the hydride transfer in the isoalloxazine–nicotinamide system, leading to controversy.^{16,20,21} Besides, not only N-5 but also N-1 and C-4a of the isoalloxazine ring have been proposed as candidates for receiving the hydride ion from nicotinamide, the steric

hindrance at these positions being the only argument exposed to explain the selectivity of this reaction.^{7,14}

Semiempirical and ab initio theoretical studies on isoalloxazine have provided a good description of the geometry and the electronic properties of this molecule.^{15,22–24} All these studies predict a planar structure for the oxidised form (LF in Fig. 1), either protonated or not, and a bent structure for the reduced heterocycle (LFH₂ in Fig. 1). Theoretical transition-state studies on the hydride transfer in glutathione reductase, revealed an optimal arrangement for the frontier orbital interaction, with maximal overlap between the participating orbitals, where the largest contribution to the LUMO corresponds to the coefficients of N-5 of isoalloxazine.²⁵ Further investigations on the transition-state structures for hydride transfer in several enzymes have concluded that the frontier orbital interaction HOMO–LUMO controls the direct hydride transfer.^{26–29} These studies on the structure of the transition state also suggest that a minimal molecular model can describe this chemical interconversion step in enzyme catalysis, and that the geometrical arrangement in the model complex is independent of the level of theory used to perform calculations.^{21,26–32} Molecular orbital investigations at the extended Hückel level, carried out in order to explore the regional properties of the isoalloxazine–nicotinamide system, have shown that, during the hydride transfer, there is a region on the nicotinamide moiety from where electrons may be donated to another region able to accept them on the isoalloxazine ring. It has also been proposed that a charge transfer molecular complex is formed before hydride transfer occurs.³³

The aim of this contribution is to provide new insights on the hydride transfer reaction occurring in the FAD/NAD(P) complex of flavoenzymes. In this work we explore the local

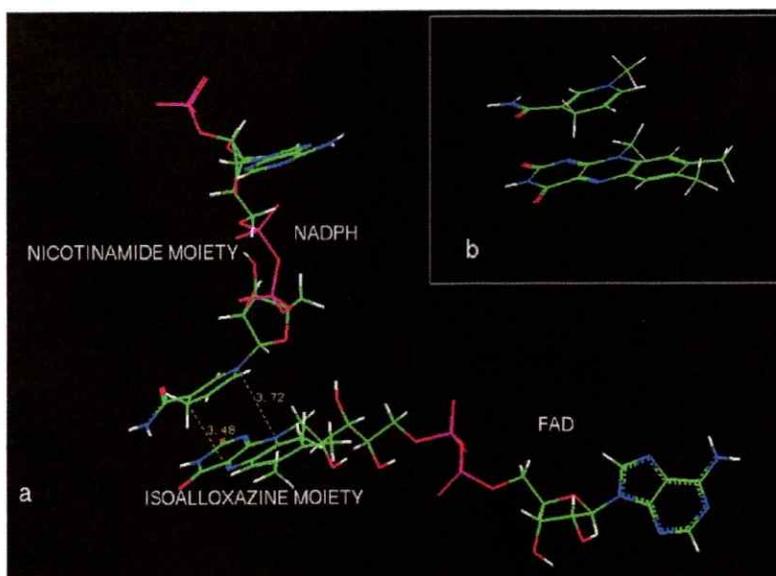


Figure 2. (a) Conformation of the FAD/NADP complex obtained from the crystal structure of glutathione reductase (1GET.pdb). For the sake of simplicity, the apoprotein is not shown. (b) Lumiflavin and 1-methylnicotinamide as a theoretical model used to represent the conformation of the FAD/NADP complex shown in (a).

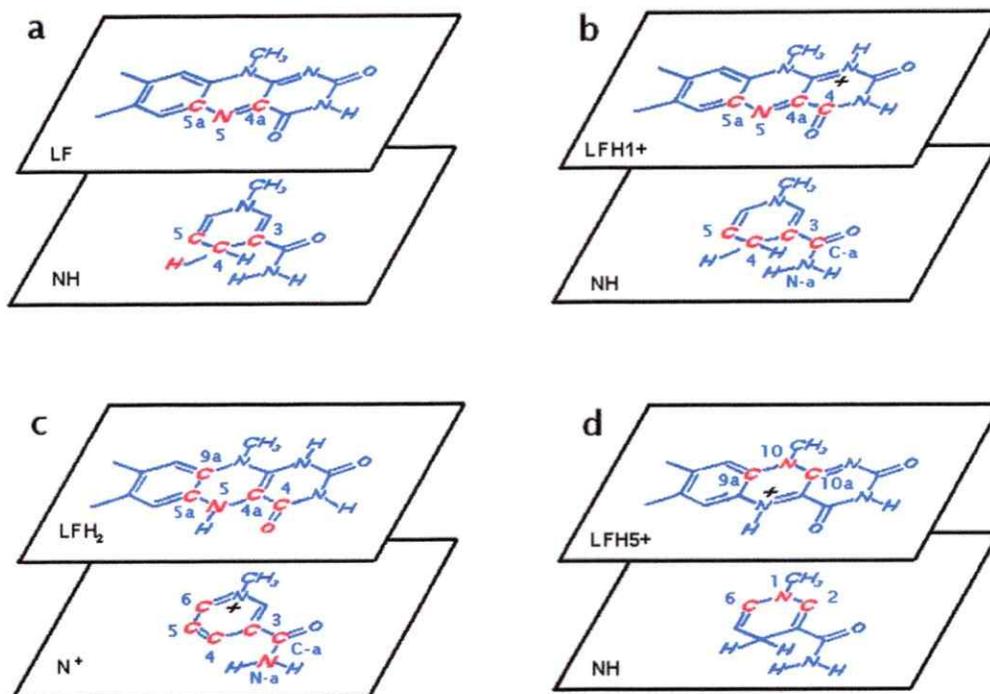


Figure 3. Molecular regions of lumiflavine and 1-methylnicotinamide with similar values of group softnesses. LF–NH system (a); LFH¹⁺–NH system (b); LFH₂–N⁺ system (c); LFH⁵⁺–NH system (d).

and global reactivities of the isoalloxazine and nicotinamide moieties of FAD and NAD(P), by using the conceptual part of density functional theory (DFT)³⁴ which describes both reactivity and selectivity in terms of static response functions. The geometry of the FAD/NAD(P) complex was taken from the crystal structure of glutathione reductase (1GET.pdb)⁶ as shown in Figure 2a. Lumiflavine (7,8,10-trimethylisoalloxazine, **LF**) and 1-methylnicotinamide (**NH**) were chosen as simplified models to represent the system under study (see Fig. 2b). The more likely protonated structures of oxidised lumiflavine, according to Massey and Hemmerich's proposal (at N-1 and at N-5), have also been considered (see Fig. 3b and d). The group softness, extended to more than one atom, s_G , was used to locate reactive regions in interacting molecules.³⁵

1.1. The model

DFT provides a useful description of the ground states of molecular systems. Concepts like electronic chemical potential (μ), absolute hardness (η), chemical softness (S) and electrophilicity (ω) are well defined quantities that conveniently describe a complete picture of reactivity.^{36–38} An excellent review describing the usefulness of DFT based reactivity indexes recently appeared.³⁹ The electronic chemical potential μ is the natural descriptor of the direction of charge transfer during a chemical interaction.³⁴ η has been associated with the resistance of the system to exchange electronic charge with the environment. A further approximation based on Koopmans theorem allows μ and η to be calculated in terms of the one electron energies of the frontier molecular orbitals HOMO and LUMO according to

Eqs. 1 and 2:³⁴

$$\mu \approx (\varepsilon_L + \varepsilon_H)/2 \quad (1)$$

$$\eta \approx \varepsilon_L - \varepsilon_H \quad (2)$$

where ε_L and ε_H are the energies of the LUMO and HOMO levels, respectively.

Another pertinent quantity is the chemical softness, S , related to the electronic polarizability of the system, whose operational expression using a finite difference approximation is:³⁴

$$S \approx 1/(\varepsilon_L - \varepsilon_H) \quad (3)$$

Recently, it has been proposed that the global electrophilic power of a ligand may be described by the electrophilicity index, ω , a quantity measuring the stabilisation energy when the system acquires an amount of electronic charge from the environment. This index has been defined by the following quantitative relationship:³⁴

$$\omega = \mu^2/2\eta \quad (4)$$

Besides the global reactivity indices, there is a set of local descriptors of reactivity that have been related to the selectivity of molecules towards specific reactions in some organic systems.^{40,41} The Fukui function $f(\mathbf{r})$ is one of the most used descriptors of local reactivity.³⁴ A high value of this local index is associated with high reactivity at that point in the molecular region. Operational formulae to evaluate this index condensed to atoms have been presented.^{42–44} Two regional reactivity indices, the regional softness s_k and the regional electrophilicity ω_k , condensed to

atom k , have been derived through the Fukui function:³⁴

$$s_k^\pm = f_k^\pm S \quad (5)$$

$$\omega_k = f_k^+ \omega \quad (6)$$

Where f_k is the Fukui function at site k in the direction of increasing (+) and decreasing (-) number of electrons. These indices are associated with nucleophilic and electrophilic attacks at site k , respectively. Note that according to Eqs. 5 and 6 the local softness and the local electrophilicity are distributed following the Fukui function.

Selectivity studies may be framed on a local HSAB principle,³⁵ stating that the favoured interactions will be those involving sites in the Lewis acid presenting softness values very close to those present in the Lewis base.⁴⁵ In the present study, we looked for active regions in lumiflavine and in 1-methylnicotinamide with similar softness values, which, when mimicking the crystallographic data available, are assumed to be in close contact when catalysis takes place (see Fig. 2b). We considered that these reactive regions should have similar shapes and sizes in each counterpart in order to allow the best possible interaction. Therefore, we focused on regions with the same number of atoms in each molecule, including the reactive sites N-5 and C-4a of isoalloxazine, and C-4 of nicotinamide. This present strategy is in agreement with previous studies on transition states structures in hydride transfer processes, where it was shown that the geometry of the transition-state complex is described by a minimal molecular model where the relative orientation imposed by the active site allows the polarization of the C4–H bond of nicotinamide.^{21,26}

In order to characterise a more extended molecular region, including more than one atomic centre, we use the concept of group softness according to Eq. 7:³⁵

$$s_G = \sum_{k \in G} s_k^\pm \quad (7)$$

with s_k^\pm defined in Eq. 5. The concept of group softness has been introduced previously by Gazquez and Méndez³⁵ and others,⁴⁶ in a different context.

1.2. Computational details

All calculations were carried out using the Gaussian98 program package⁴⁷ at the B3LYP/6-31G level of theory. The geometry of the molecules under study was fully optimized. The minimised structures were in good agreement with earlier studies for oxidised and reduced forms of lumiflavine and 1-methylnicotinamide. The Fukui functions were obtained using an algorithm described elsewhere.^{43,44}

2. Results and discussion

2.1. The regional picture

It has been suggested that short distance interactions of some molecules which display biological activity might proceed through regions within the molecules rather than through the whole molecular framework.^{33,46} In fact, reactivity in flavoproteins seems to be mainly restricted to

the region of the isoalloxazine ring system where N-5 and C-4a are located.^{1–3,11} It has also been shown that Pearson's HSAB principle helps to determine the specificity and/or efficiency of enzymatic catalysis and drug–receptor interactions.^{48,49} These findings led us to explore the regio-specific reactivity of lumiflavine and 1-methylnicotinamide, shown in Figure 2b, in the context of a local HSAB principle.

Table 1. Local reactivity indices of lumiflavine and 1-methylnicotinamide^a

Molecule	Site (k)	$f^+(k)$	$f^-(k)$	$s^+(k)$ (au)	$s^-(k)$ (au)	$\omega(k)$ (eV)
NH	N-1	0.019	0.268		1.636	0.016
	C-2	0.304	0.037		0.226	0.251
	C-3	0.124	0.258		1.575	0.102
	C-4	0.000	0.013		0.079	0.000
	C-5	0.174	0.183		1.117	0.144
	C-6	0.103	0.042		0.256	0.085
	C-a	0.133	0.003		0.018	0.110
	H _t	0.000	0.042		0.256	0.000
N ⁺	C-3	0.075		0.484		0.711
	C-4	0.325		2.099		3.079
	C-5	0.006		0.039		0.057
	C-6	0.243		1.570		2.302
	C-a	0.009		0.058		0.085
	N-a	0.004		0.026		0.038
	LF	N-1	0.026		0.212	
C-4a	0.142		1.159		0.475	
N-5	0.251		2.048		0.839	
C-5a	0.000		0.000		0.000	
LFH1 ⁺	C-4	0.023		0.170		0.251
	C-4a	0.075		0.555		0.820
	N-5	0.273		2.019		2.983
	C-5a	0.013		0.096		0.142
	LFH5 ⁺	C-4a	0.249		2.886	
N-5	0.197		2.283		3.531	
C-9a	0.062		0.719		1.111	
N-10	0.100		1.159		1.793	
C-10a	0.015		0.174		0.269	
LFH ₂	C-4	0.156	0.024		0.190	0.162
	C-4a	0.065	0.114		0.902	0.067
	N-5	0.000	0.257		2.033	0.000
	C-5a	0.049	0.042		0.332	0.051
	C-9a	0.057	0.070		0.554	0.059
	O-4	0.110	0.050		0.396	0.114

^a All quantities evaluated at the fully optimised geometry at the B3LYP/6-31G level of theory.

Table 1 gathers the local properties for lumiflavine and 1-methylnicotinamide in their different oxidation and protonation states, obtained from Eqs. 5 and 6. The analysis of group softness s_G for the LF–NH pair (see Fig. 3a), calculated according to Eq. 7, shows that the regional softness of LF (the electrophile), considering atoms C-4a, N-5 and C-5a, and the corresponding s_G values in NH (the nucleophile), calculated considering the atoms C-3, H_t and C-5 of NH, display similar values. They are distributed as follows:

$$\begin{aligned} s_G^+ \text{LF} &= s^+(\text{C-4a}) + s^+(\text{N-5}) + s^+(\text{C-5a}) \\ &= 1.159 + 2.048 + 0.000 = 3.207 \end{aligned} \quad (8a)$$

$$\begin{aligned} s_G^- \text{NH} &= s^-(\text{C-3}) + s^-(\text{H}_t) + s^-(\text{C-5}) \\ &= 1.575 + 0.256 + 1.117 = 2.948 \end{aligned} \quad (8b)$$

The group softness values of the **LF** and **NH** units match to an extent of 91.9%. The orientation of these molecules is in agreement with the experimental model in Figure 2a. Inclusion of the local softness value at C-4 of **NH** (see Fig. 3a), which breaks the condition of an equal number of atoms in each subunit but does not greatly change the size or the shape of the regions, increases the match to an extent of 94.4%. Other regions in the molecules make no significant contributions to the matching of the regional softness values, even when atoms located far from the active sites are considered.

For the **LFH1⁺–NH** system shown in Figure 3b (oxidised lumiflavine protonated at N-1), we have found that the active regions comprising atoms C-4, C-4a, N-5 and C-5a of **LFH1⁺** (the electrophile), and C-a, C-3, C-4 and C-5 of **NH** (the nucleophile) concentrate the higher s_G values. Thus,

$$s_G^+ \text{LFH1}^+ = s^+(\text{C-4}) + s^+(\text{C-4a}) + s^+(\text{N-5}) \\ + s^+(\text{C-5a}) \\ = 0.170 + 0.555 + 2.019 + 0.096 = 2.840 \quad (9a)$$

$$s_G^- \text{NH} = s^-(\text{C-a}) + s^-(\text{C-3}) + s^-(\text{C-4}) + s^-(\text{C-5}) \\ = 0.018 + 1.575 + 0.079 + 1.117 = 2.789 \quad (9b)$$

For this system, the match in the group softnesses is about 98.2% (see Fig. 3b).

According to crystallographic data,⁵ hydride transfer from **LFH₂** to **N⁺** should involve the same geometrical arrangement as the reverse reaction (see Fig. 1). In the **LFH₂–N⁺** system, shown in Figure 3c, atoms C-4, C-4a, N-5, C-5a, C-9a and O-4 (oxygen attached to C-4) of **LFH₂** (the nucleophile) are superimposed in space on atoms C-a, C-3, C-4, C-5, C-6 and N-a of **N⁺** (the electrophile). The group softness analysis predicts the following distribution:

$$s_G^- \text{LFH}_2 = s^-(\text{C-4}) + s^-(\text{C-4a}) + s^-(\text{N-5}) \\ + s^-(\text{C-5a}) + s^-(\text{C-9a}) + s^-(\text{O-4}) \\ = 0.190 + 0.902 + 2.033 + 0.332 + 0.554 \\ + 0.396 \\ = 4.407 \quad (10a)$$

$$s_G^+ \text{LFH1}^+ = s^+(\text{C-a}) + s^+(\text{C-3}) + s^+(\text{C-4}) + s^+(\text{C-5}) \\ + s^+(\text{C-6}) + s^+(\text{N-a}) \\ = 0.058 + 0.484 + 2.099 + 0.039 + 1.570 \\ + 0.026 \\ = 4.276 \quad (10b)$$

giving a match of 97.0% between both subunits, in the orientation consistent with the crystallographic model (see Fig. 3c).

For the **LFH₅⁺–NH** system (see Fig. 3d), there is some

controversy about the feasibility of the reaction between **NAD(P)H** and the oxidised flavin protonated at N-5. While NMR data have provided evidence that could support the existence of hydrogen bonding between the apoprotein and N-5 of the flavin in Old Yellow Enzyme, the pK_a value of the oxidised flavin counters this hypothesis.⁵⁰ The global softness match in this system, 52.7% (values taken from Table 2), is poor compared to the other systems under study. Group softness matches including the active sites (N-5, C-4a of **LFH₅⁺** and C-4 of **NH**) are even poorer (see Table 1 and Fig. 3d). We could find similar values of s_G , which match to an extent of 96.8%, but located in regions of the molecules that do not include the active centers (atoms C-9a, N-10 and C-10a in the lumiflavine molecule, atoms N-1, C-2, and C-6 in the nicotinamide molecule). This result would suggest that more specific, local descriptors, such as local electrophilicity, might be important determinants of reactivity, as in the case of the **LF–NH**, **LFH₁⁺–NH** and **LFH₂–N⁺** systems, which we will discuss below.

Table 2. Global reactivity indices of lumiflavine and 1-methylnicotinamide^a

Molecule	μ (eV)	η (eV)	S (au)	ω (eV)	ΔN (e)
N ⁺	–8.935	4.213	6.459	9.475	0.819 ^b
NH	–2.712	4.458	6.105	0.825	
LFH ₅ ⁺	–9.175	2.348	11.589	17.926	0.950 ^c
LFH ₁ ⁺	–8.968	3.680	7.395	10.927	0.769 ^c
LF	–4.722	3.334	8.161	3.343	0.258 ^c
LFH ₂	–2.672	3.439	7.912	1.038	

^a All quantities evaluated at the fully optimised geometry at the B3LYP/6-31G level of theory.

^b Charge transfer from LFH₂ to N⁺.

^c Charge transfer from NH to neutral or protonated lumiflavine.

In summary, we have found in the lumiflavine (protonated or not) and in the 1-methylnicotinamide framework regions of atoms which display similar shapes, sizes and group softness values. According to the crystallographic data, the same active regions of FAD and NAD(P) are in close contact during the catalytic process. The above findings lead us to suggest that, when FAD and NAD(P) approach each other at short distances, an orientation of their active regions takes place to reach an optimal interaction, which might be achieved through the recognition of regions of the molecules with similar group softness values, in agreement with the HSAB principle.

2.2. Specific interactions

In the present approach, the comparison of regional softness based on the group softness s_G index, provides relevant clues about the orientation of the interacting partners. However, the complete reactivity picture may be conveniently complemented incorporating other local reactivity descriptors such as the local electrophilicity.

Table 2 summarises the global reactivity indices calculated for lumiflavine and 1-methylnicotinamide, in their oxidised and reduced states. The more likely protonated structures of oxidised lumiflavine (**LFH₁⁺** and **LFH₅⁺**) have also been considered. The electronic chemical potential (μ) of the studied molecules correctly predicts that electron density flows from **NH** to **LF**, **LFH₁⁺** or **LFH₅⁺**, and from **LFH₂**

to N^+ , depending on the direction of the enzyme catalysis. Electrophilicity values suggest the following order: $LFH5^+ > LFH1^+ > N^+ > LF > LFH_2 > NH$. It can be seen that protonation of **LF** increases its electrophilicity, so it is possible that protonation at N-1 or N-5 may be the first step in some catalytic mechanisms where nucleophilic attack is determinant. If we consider that electrophilicity and nucleophilicity lie at opposite ends of a single scale, then the ω values properly indicate that **LF**, $LFH1^+$ and $LFH5^+$ behave as electrophiles with respect to **NH** (which in turn would behave as a nucleophile), whereas N^+ behaves as an electrophile with respect to LFH_2 (see Fig. 1). As stated in Eq. 6, the site of maximum electrophilicity will be the one exhibiting the highest value of the electrophilic Fukui function, that is, the active site of the electrophile.

As mentioned earlier, not only N-5, but also N-1 and C-4a are considered the most likely positions for receiving the hydride ion from nicotinamide in the **LF** molecule. Inspection of the local electrophilicity values in Table 1, shows that N-5 has the highest value (0.840 eV), followed by C-4a and N-1 (0.475 and 0.087 eV, respectively). Thus, our results indicate that N-5 would be the preferential site for nucleophilic attack, beyond the steric hindrance imposed by the enzyme environment, as has been proposed by some authors.⁷ Note that in **NH** the local electrophilicity at C-4 vanishes and that of the H₁ atom is very low (0.000), which is consistent with the nucleophilic behaviour of **NH** with respect to **LF**. Our results are also in good agreement with an enzymatic experiment in which 4-³H(NADH) was used as the reducing substrate, and where hydride transfer to N-5 of isoalloxazine was detected.⁵¹ When hydride transfer occurs between N-5 of LFH_2 and C-4 of N^+ , the highest electrophilicity is found at C-4 of N^+ , in complete agreement with proposed mechanisms.⁵ Note that the nucleophilic behavior of N^+ with respect to LFH_2 , represented by low values of local electrophilicity, is also seen in this system. Local indices of $LFH1^+$ indicate that protonation at N-1 increases the electrophilicity of N-5 almost fourfold with respect to **LF**, while that of C-4a is almost doubled. Protonation at N-5 dramatically increases the electrophilic power at C-4a (10 times) with respect to **LF**, while the same index for N-5 in $LFH5^+$ is slightly higher than in $LFH1^+$.

The global softnesses, calculated using Eq. 3, indicate that the *S* value of **NH** matches the global softnesses of **LF**, $LFH1^+$ and $LFH5^+$ to an extent of 74.8, 82.6 and 52.7%, respectively (values taken from Table 2). The *S* values for LFH_2 and N^+ match by 81.6%. Because in the hydride transfer reaction between oxidised flavins and NAD(P)H it is not clear whether the flavins are protonated or not at N-1 or N-5,^{14,50} but in the reverse reaction—between reduced flavins and NAD(P)⁺—protonation is irrelevant considering the overall mechanism, we could take the last value, 81.6% as a relative enzymatic reference for this reaction. In this context, the reaction between **NH** and $LFH1^+$ should be favoured over **LF** or $LFH5^+$, in accordance with Pearson's HSAB principle.⁵² Global softness values calculated in this work clearly indicate that the reactivity in the lumiflavine–nicotinamide system is a consequence of a soft–soft interaction, where hydride transfer is the promoted covalent bonding characteristic of this type of interactions.⁵³

Finally, a short discussion about the charge transfer pattern during the interaction between **LF** and **NH** is worth making. It has been reported that, at some stage of several catalytic mechanisms, flavins form charge transfer complexes with substrates such as NAD(P)H, or with residues of the active site of some enzymes.^{1,19,54} It has also been proposed that hydride transfer can occur by three different mechanisms: (1) transfer of a hydride ion in a single step; (2) transfer of one electron followed by the transfer of a hydrogen atom or its reverse, and (3) transfer of two electrons and a proton in three steps.^{21,55} An examination of charge transfer values ΔN , between molecules A and B, in Table 2, were evaluated from Pearson's equation $\Delta N = (\mu_A - \mu_B) / (\eta_A + \eta_B)$.⁵⁶ The results show that when hydride transfer occurs between N^+ and LFH_2 , a relatively high value of ΔN (0.819 e) is obtained, thereby suggesting that the first or third mechanism might be operating, both of them involving a two-electron transfer, in agreement with the two electron acceptor nature of oxidised nicotinamide. Hydride transfer between **NH** and protonated lumiflavine also displays high ΔN values (0.769–0.950 e), likewise suggesting the presence of a two-electron transfer process. In contrast, a low value of ΔN for the hydride transfer from **NH** to **LF** (0.258 e) is observed. This result could be related to a one electron process in a first step (i.e. second mechanism), in complete agreement with theoretical transition state studies for the hydride transfer in several enzymes.²¹ Previous theoretical work on transition state structure for the hydride transfer revealed that mechanisms (1) and (2) are prone to occur.^{28,57} Note that if isoalloxazine is protonated mechanisms (1) and (3) are likely to occur, while if isoalloxazine is in its neutral state, then mechanism (2) could be operative. It is noteworthy that ΔN values can be related to the proposed mechanisms for this kind of reactions: small ΔN values may be related to radical mechanisms, while higher ΔN values may be related to two-electron transfer mechanisms. Moreover, it is also apparent that regardless of the direction of the catalysis or whether lumiflavine is protonated or not, there is always a charge transfer process coupled to the hydride transfer between lumiflavine and 1-methylnicotinamide.

Our results support the hypothesis of Massey and Hemmerich,¹¹ in terms that there are common structural features which determine the type of reaction catalysed. The regiospecific reactivity of the isoalloxazine system is such that protonation of N-1 of isoalloxazine leads to the activation of N-5 towards nucleophilic attack, while protonation of N-5 activates C-4a towards nucleophilic attack. However, Massey and Hemmerich restricted their proposal to enzymes that are able to stabilise the 'blue' or 'red' flavin radicals (electron transferases and dehydrogenases/oxidases, respectively). Our findings suggest that Massey and Hemmerich's proposal can be broadened to enzymes whose radical intermediates are very unstable or not formed at all, such as flavoproteins that catalyse transhydrogenation reactions, the first division of their flavoenzyme classification.¹¹ As already mentioned, among the several mechanisms proposed for transhydrogenation reactions of flavoenzymes, besides hydride transfer from different substrates, nucleophilic attack and radical intermediates have been considered.³ In the light of our results it is possible to suggest that, when a dehydrogenation reaction

takes place through a nucleophilic attack, the hydrogen bonding of the oxidised isoalloxazine ring with the apoprotein determines the site of attack (N-5 or C-4a of isoalloxazine).

3. Conclusions

The hydride transfer reaction in the isoalloxazine–nicotinamide system can be understood as an interaction between soft species, controlled by frontier orbitals and nicely framed on the HSAB principle. The reactivity of the studied systems is well described by global descriptors derived from the conceptual part of DFT, such as the electronic chemical potential, electrophilicity and softness.

Regiospecificity of the hydride transfer reaction in the isoalloxazine–nicotinamide system seems to be modulated consistently by properties of extended molecular regions, including more than one atomic centre as proposed earlier.^{33,35} We have found that reactive sites in interacting molecules are located in regions of the different molecular frameworks, with similar shapes and sizes, which display very similar group softnesses. This sort of regional shape similarities empirical rule at the active site would determine the final 3D form of the reactive species. These two factors would play important roles in both, drug and catalysts design.

The HSAB principle seems to be fundamental to understand enzymatic catalysis, not only at the global molecular level, but also when regiospecificity is considered. We have found that group softness, calculated through the Fukui functions, appears as a useful index for the identification of these active molecular regions, interacting at short distances. Nevertheless, other different condensed to atom properties, such as local electrophilicities, may also be determinants of the reactivity and might be complementary between the reacting molecules. The group softness index might be especially helpful to understand stacking interactions between macromolecules and chemical substrates, not only in enzymatic catalysis, but also in DNA intercalation and in drug–receptor interactions.

Acknowledgements

This work was partially supported by FONDECYT-Chile, Grants 2950013 (to P.R.) and 1030548 (to R.C.). The authors thank Mr. Marco Rebolledo for technical advice regarding to the figures in the text.

References and notes

- Ghisla, S.; Massey, V. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *181*, 1–17.
- Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22459–22462.
- Fitzpatrick, P. F. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 299–307.
- Weber, S.; Möbius, K.; Richter, G.; Kay, C. W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3790–3798.
- Karplus, P. A.; Daniels, M. J.; Herriot, J. R. *Science* **1991**, *251*, 60–66.
- Mittl, P. R.; Berry, A.; Scrutton, N. S.; Perham, R. N.; Schulz, G. E. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 1504–1514.
- Tanner, J. J.; Lei, B.; Tu, S. C.; Krause, K. L. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13531–13539.
- Zhou, Z.; Swenson, R. P. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15980–15988.
- Bradley, L. H.; Swenson, R. P. *Biochemistry* **1999**, *38*, 12377–12386.
- Efimov, I.; Cronin, C. N.; McIntire, W. S. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2155–2166.
- Massey, V.; Hemmerich, P. *Biochem. Soc. Trans.* **1980**, *8*, 246–257.
- Ghisla, S.; Massey, V. *Biochem. J.* **1986**, *239*, 1–12.
- Tedeschi, G.; Chen, S.; Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 2512–2516.
- Shinkai, S.; Honda, N.; Ishikawa, Y.; Manabe, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6286–6292.
- Wouters, J.; Durant, F.; Champagne, B.; André, J.-M. *Int. J. Quantum Chem.* **1997**, *64*, 721–733.
- Walsh, C. *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 148–155.
- Lantwin, C. B.; Schlichting, I.; Kabsch, W.; Pai, E. F.; Krauth-Siegel, R. L. *Proteins* **1994**, *18*, 161–173.
- Fieschi, F.; Nivière, V.; Frier, C.; Décout, J.-L.; Fontecave, M. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30392–30400.
- Hubbard, P. A.; Shen, A. L.; Paschke, R.; Kasper, C. B.; Kim, J.-I. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 29163–29170.
- Hemmerich, P.; Nagelschneider, G.; Veeger, C. *FEBS Lett.* **1970**, *8*, 69–83.
- Andrés, J.; Moliner, V.; Safont, V. S.; Aulló, J. M.; Díaz, W.; Tapia, O. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1996**, *371*, 299–312.
- Song, P.-S. *J. Phys. Chem.* **1968**, *72*, 536–542.
- Meyer, M.; Hartwig, H.; Schomburg, D. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1996**, *364*, 139–149.
- Zheng, Y.-J.; Ornstein, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9402–9408.
- Sustmann, R.; Sicking, W.; Schulz, G. E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 1023–1025.
- Tapia, O.; Cárdenas, R.; Andrés, J.; Colonna-Cesari, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4046–4047.
- Andrés, J.; Safont, V. S.; Martins, J. B. L.; Beltrán, A.; Moliner, V. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1995**, *330*, 411–416.
- Andrés, J.; Moliner, V.; Safont, V. S.; Domingo, L. R.; Picher, M. T. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7777–7783.
- Andrés, J.; Moliner, V.; Safont, V. S.; Domingo, L. R.; Picher, M. T.; Krechl, J. *Bioorg. Chem.* **1996**, *24*, 10–18.
- Tapia, O.; Cárdenas, R.; Andrés, J.; Krechl, J.; Campillo, M.; Colonna-Cesari, F. *Int. J. Quantum Chem.* **1991**, *39*, 767–786.
- Andrés, J.; Moliner, V.; Krechl, J.; Silla, E. *Bioorg. Chem.* **1993**, *21*, 260–274.
- Díaz, W.; Aulló, J. M.; Paulino, M.; Tapia, O. *Chem. Phys.* **1996**, *204*, 195–203.
- Park, B.-K.; Doh, S.-T.; Son, G.-S.; Kim, J.-M.; Lee, G.-Y. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **1994**, *15*, 291–293.
- Parr, R. G.; Yang, W. *Density functional theory of atoms and molecules*. Oxford University Press: New York, 1989.
- Gázquez, J. L.; Méndez, F. *J. Phys. Chem. A* **1994**, *98*, 4591–4593.
- Parr, R. G.; Szentpály, L.; Liu, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1922–1924.
- Pérez, P.; Aizman, A.; Contreras, R. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 3964–3966.

38. Domingo, L. R.; Arnó, M.; Contreras, R.; Pérez, P. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 952–961.
39. Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1793–1873.
40. Contreras, R.; Domingo, L. R.; Andrés, J.; Pérez, P.; Tapia, O. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 1367–1375.
41. Pérez, P.; Toro-Labbé, A.; Aizman, A.; Contreras, R. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4747–4752.
42. Yang, W.; Mortier, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5708–5711.
43. Contreras, R.; Fuentealba, P.; Galván, M.; Pérez, P. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *304*, 239–413.
44. Fuentealba, P.; Pérez, P.; Contreras, R. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 2544–2551.
45. Pérez, P.; Simon, Y.; Aizman, A.; Fuentealba, P.; Contreras, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4756–4762.
46. Krishnamurthy, S.; Pal, S. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 7639–7645.
47. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; González, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andrés, J. L.; González, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 98*; Gaussian Inc.; Pittsburgh, PA, 1998.
48. Li, Y.; Evans, J. N. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 4612–4616.
49. Aliste, M. P. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2000**, *507*, 1–10.
50. Fox, K. M.; Karplus, P. A. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 9357–9362.
51. Louie, D.; Kaplan, N. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 5691–5698.
52. Pearson, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533–3539.
53. Chattaraj, P. K. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 511–513.
54. Batie, C. J.; Kamin, H. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 11214–11223.
55. Iribarne, F.; Paulino, M.; Tapia, O. *Theor. Chem. Acc.* **2000**, *103*, 451–462.
56. Pearson, R. G. *Chemical hardness, structure and bonding*, Sen, K. D., Mingos, D. M. P., Eds.; Springer: Berlin, 1993; Vol. 80.
57. Castillo, R.; Andrés, J.; Moliner, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12140–12147.