

57
lej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIOS TEORICOS DE
INHIBIDORES ENZIMATICOS**

**TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERA QUIMICA
PRESENTA:
ARIADNE GRACIELA GOMEZ GONZALEZ**



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1993



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

	PÁGINA
PREFACIO	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	3
1. Bioquímica de la Enzima Fosfoenolpiruvato Carboxilasa	4
2. Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad	41
CAPÍTULO II. MÉTODOS DE CÁLCULO	69
1. Mecánica Molecular	70
2. Química Cuántica	83
3. Superficies y Volúmenes Moleculares	104
CAPÍTULO III. RESULTADOS	107
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	113
APÉNDICE	155
REFERENCIAS	157

PREFACIO

El estudio de las relaciones que existen entre las propiedades fisicoquímicas moleculares y la reactividad química, la potencia farmacológica y la actividad biológica en general se inició de manera formal y sistemática hace más de treinta años con los primeros trabajos cuantitativos de Hansch y sus colaboradores. En ese entonces, cobraron mucha importancia las propiedades fisicoquímicas (como la lipofilidad) como el camino para encontrar muchísimas relaciones cuantitativas (expresadas matemáticamente) entre dichas propiedades y algún descriptor numérico de la actividad biológica. El avance en la capacidad de predecir la actividad de nuevos compuestos, típicamente fármacos, hizo de este nuevo campo un arma de gran utilidad en la investigación farmacológica, toxicológica y bioquímica. La fisicoquímica, la bioquímica y la farmacología tuvieron un punto de unión muy prometedor.

En la actualidad, la investigación de relaciones cuantitativas estructura-actividad se realiza de forma incluso rutinaria en muchos centros de investigación académicos e industriales. El rápido y espectacular avance en la computación y la visualización gráfica han permitido automatizar las diferentes técnicas que se utilizan, con la facilidad de que ahora es posible "ver" la interacción de compuestos químicos con sus receptores biológicos o con las membranas biológicas que atraviesan, permitiendo una comprensión palpable y profunda de los mecanismos responsables de estos fenómenos. La química teórica, con lo que nos referimos a la química cuántica y la mecánica estadística, ha permitido que se puedan realizar descripciones de todos los detalles estructurales íntimos de los compuestos químicos y de la forma en que interactúan entre sí. Ahora es posible caracterizar con todo lujo de detalles y precisión una gran cantidad de propiedades moleculares intrínsecas que se pueden correlacionar con la actividad biológica y permitir entender y predecir la forma en que las sustancias son capaces de producir un efecto biológico específico.

En esta tesis presentamos los resultados de nuestra investigación sobre las relaciones que existen entre las propiedades conformacionales y electrónicas de una serie de compuestos químicos y su capacidad de inhibir la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa. Esta enzima juega un papel muy importante en el metabolismo de muchas

plantas y bacterias y ha sido objeto de una extensa caracterización bioquímica, donde han participado activamente los miembros del grupo de enzimología del Departamento de Bioquímica Vegetal de esta facultad. La presencia de una serie de inhibidores y activadores de la actividad de dicha enzima fue la idea motora que impulsó a iniciar un estudio formal y cuantitativo de dichos moduladores para poder encontrar una relación entre sus propiedades intrínsecas y su actividad biológica. Esto dará luz sobre el mecanismo de acción de la enzima y la factibilidad de desarrollar mejores inhibidores del crecimiento (herbicidas) en un futuro.

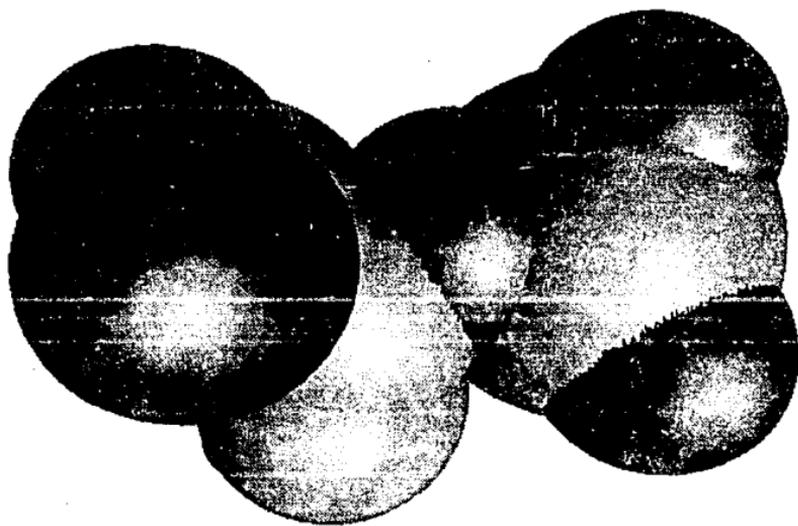
En el primer capítulo presentamos una introducción a dos temas fundamentales: la bioquímica de la fosfoenolpiruvato carboxilasa y las relaciones cuantitativas estructura-actividad. En la primera sección presentamos una síntesis de toda aquella información relevante que se dispone sobre la actividad de la enzima y la forma en que es regulada. En la segunda sección hacemos un recuento histórico de lo que ha sido el desarrollo conceptual y técnico del estudio de la actividad biológica desde un punto de vista fisicoquímico.

En el segundo capítulo presentamos los fundamentos de los métodos de cálculo que empleamos para estudiar a los inhibidores competitivos de la enzima: mecánica molecular, química cuántica y relaciones cuantitativas estructura-actividad (*QSAR*). Sin pretender ser exhaustivos, nos propusimos presentar los aspectos más relevantes de las técnicas utilizadas, con el fin de permitir al lector adentrarse lo suficiente en cada una de ellas como para poder juzgar los resultados que se obtuvieron.

En el tercer capítulo exponemos los resultados que se obtuvieron, explicando la forma en que se obtuvieron y los programas de cálculo utilizados.

Finalmente, en el cuarto capítulo hacemos el análisis y discusión de los resultados que se obtuvieron, para verificar la existencia y calidad de relaciones cuantitativas estructura-actividad, así como la información que proporcionan sobre las interacciones responsables de la unión de los inhibidores al sitio activo y el ambiente químico de éste último. Terminamos con las conclusiones sobre nuestro trabajo y el tipo de técnicas empleadas en este trabajo.

INTRODUCCIÓN



BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA

La fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa o PEPC (ortofosfato:oxaloacetato carboxilasa, según la clasificación internacional de enzimas: EC 4.1.1.31) es una enzima muy extendida en todas las plantas superiores y varios tipos de bacterias, con propiedades diferentes dependiendo de su origen. En este sentido es importante iniciar este capítulo explicando lo que son las plantas C_3 , C_4 y *Crassulaceas*, ya que posteriormente se hará una descripción del papel que juega la PEPC en el metabolismo de estas plantas.

Las plantas C_3 incorporan el CO_2 de la atmósfera en forma de compuestos orgánicos en los cloroplastos mediante el ciclo de Calvin, cuyo primer producto es un compuesto de tres carbonos (de ahí el nombre de C_3): el fosfoglicerato. El CO_2 en el cloroplasto carboxila al azúcar ribulosa-1,5-bisfosfato mediante la acción de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) y se generan dos moléculas de fosfoglicerato. Este compuesto es reducido sucesivamente en presencia de ATP y NADPH₂ (provenientes del transporte de electrones) hasta formar una triosa fosfato. Dos triosas fosfato se utilizan para la síntesis de una molécula de glucosa, y mediante una fase regenerativa de varios pasos cinco triosas fosfato forman tres pentosas fosfato, con lo que se regenera al aceptor de CO_2 : la ribulosa-1,5-bisfosfato. De esta manera, un evento de carboxilación genera una molécula de hexosa y se requieren cinco más para regenerar el aceptor consumido.

Por otro lado, las plantas C_4 poseen un mecanismo adicional de concentración de CO_2 en el sitio de carboxilación ya mencionado, el cual consiste en la carboxilación del PEP con la producción de un compuesto de cuatro carbonos (lo que origina el nombre de C_4): el oxaloacetato. Este compuesto, ya sea reducido a malato o como aspartato (producido mediante transaminación), se transporta a otras células donde puede ser descarboxilado, liberando CO_2 para el funcionamiento del ciclo de Calvin. Esta vía de las plantas C_4 permite concentrar el CO_2 y minimizar la fotorrespiración que promueve la enzima Rubisco. La fotorrespiración (*1a, 1b*) es un proceso que se origina en la capacidad de la Rubisco de promover la reacción de la ribulosa 1,5-

difosfato tanto con CO_2 como con O_2 , dependiendo de cuál de las dos especies esté en mayor concentración relativa (pues compiten por el sitio activo); de hecho, la actividad de oxigenasa de la Rubisco aumenta más rápidamente con la temperatura que la actividad carboxilasa. Cuando la concentración de CO_2 es baja y la de O_2 es relativamente alta, el O_2 desplaza al CO_2 y la ribulosa 1,5-difosfato se oxigena en vez de carboxilarse, dando lugar al fosfoglicolato y al 3-fosfoglicerato en vez de únicamente dos moléculas de 3-fosfoglicerato. El fosfoglicolato, para poder ser asimilado, es posteriormente hidrolizado enzimáticamente y origina glicolato, que es el sustrato oxidado durante la fotorrespiración. Se utilizan dos de estas moléculas para regenerar una molécula de fosfoglicerato y perder una de CO_2 . Este ciclo metabólico, denominado también ciclo C_2 , permite contrarrestar los efectos tóxicos de la oxidación de la ribulosa-1,5-bisfosfato.

Las plantas *Crassulaceas* (llamadas CAM por metabolismo ácido crasuláceo) siguen un mecanismo de asimilación del CO_2 muy similar al de las plantas C_4 , pero como una estrategia para mantener cerrados durante casi todo el día sus estomas y evitar así pérdidas de agua. Estas plantas almacenan el CO_2 durante la noche fijándolo temporalmente como malato, el cual es descarboxilado durante el día para seguir alimentando al ciclo de Calvin.

La PEPC está presente en todas las bacterias y plantas, pero aquella presente en las bacterias y plantas C_3 tiene su función principal en reabastecer de oxaloacetato al ciclo de los ácidos tricarbónicos, regulando así su actividad. En las plantas C_4 y CAM permite además la asimilación fotosintética del CO_2 atmosférico ya mencionada al catalizar la carboxilación del PEP para producir oxaloacetato y fosfato. La principal importancia de comprender la serie de eventos catalíticos que llevan a la carboxilación del PEP por la PEPC radica en el papel central que juega esta enzima en el metabolismo de las plantas C_4 . La reacción mencionada es un componente de la vía fotosintética conocida como ruta de los ácidos C_4 -dicarbónicos o ciclo de Hatch-Slack (1a, 1b, 2). La fijación del CO_2 ocurre gracias a la PEPC presente en las células del mesófilo de las hojas, y el oxaloacetato que se forma es reducido a malato mediante la malato deshidrogenasa ligada a NADP^+ . El malato formado en las células del mesófilo, y que contiene el CO_2 fijado, se transfiere a las células de la vaina vascular. De hecho la difusibilidad del CO_2 en la interfase entre las células del mesófilo y las de la vaina vascular es baja, lo que restringe la entrada y fijación directa del CO_2 atmosférico en las células de la vaina vascular (3). En las células de la vaina vascular,

el malato se descarboxila oxidativamente (se produce NADPH) para dar lugar al piruvato y CO_2 libre. Éste último se fija de nuevo gracias a la acción de la Rubisco, lo cual es idéntico a la fijación del CO_2 que ocurre en las plantas C_3 , con lo que se inicia el ciclo de Calvin que da origen a la glucosa. El piruvato formado por la descarboxilación del malato en las células de la vaina vascular se transfiere de regreso a las células del mesófilo, donde se convierte en PEP con gasto de ATP que se hidroliza en AMP y dos moléculas de fosfato. Esta última reacción regenera el PEP, para de nuevo poder fijar CO_2 en las células del mesófilo. Este ciclo se muestra en la figura 1.1.

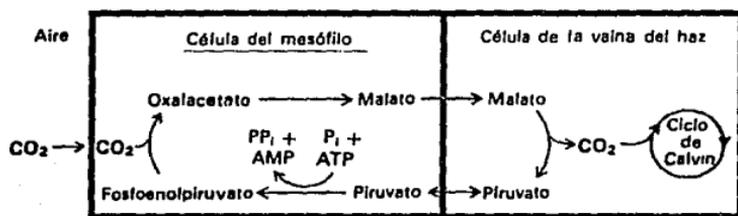


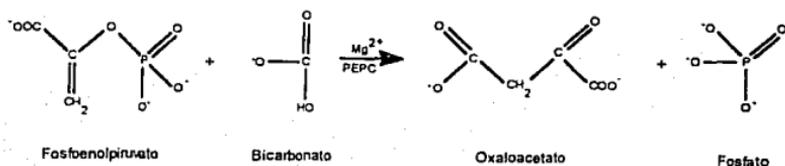
Figura 1.1. Ciclo de Hatch-Slack de fijación del dióxido de carbono.

Como podemos observar, las células del mesófilo de las plantas C_4 llevan a cabo la fijación del CO_2 por el ciclo de Hatch-Slack, pero la biosíntesis de glucosa ocurre por la vía C_3 en las células de la vaina vascular. Otro aspecto importante que debe mencionarse es que el ciclo de Hatch-Slack involucra un mayor gasto de energía para las plantas C_4 , pues por cada molécula de CO_2 fijada por la vía descrita, debe regenerarse una molécula de PEP a expensas de dos enlaces de alta energía del ATP, lo cual, como veremos a continuación, resulta de hecho en su beneficio.

Este tipo de plantas alcanzan velocidades máximas de fotosíntesis a concentraciones más bajas de CO_2 intracelular que las plantas C_3 , y también tienen una eficiencia más alta de carboxilación (ganancia de carbono por unidad de incremento de la concentración de CO_2 a concentraciones subsaturantes, determinado de la pendiente de la respuesta de asimilación contra la concentración de CO_2 intracelular) (3,4). Esta

ruta actúa como una bomba de CO_2 , incrementando los niveles de CO_2 en el sitio de acción de la enzima Rubisco, y por lo tanto disminuyendo la actividad de oxigenasa de esta enzima y la pérdida de energía por fotorrespiración (2-4). Debido a lo anterior, las plantas C_4 tienen velocidades mayores de crecimiento y producen una mayor biomasa, sobre todo bajo ciertas circunstancias ambientales. En una atmósfera de aire normal y con una alta intensidad luminosa, la eficiencia de carboxilación en las plantas C_3 se correlaciona con la cantidad de Rubisco en las hojas. Por otra parte, la eficiencia de carboxilación en las plantas C_4 se relaciona con la velocidad máxima de la PEPC y su alta afinidad por su sustrato de carbono inorgánico (considerando que el HCO_3^- es el sustrato para la PEPC, en las células del mesófilo de las plantas C_4 en presencia de anhídrido carbónico, el HCO_3^- está en rápido equilibrio con una concentración relativamente baja de CO_2), teniéndose una velocidad de carboxilación alta con respecto a la capacidad fotosintética máxima a bajas concentraciones de CO_2 (3,4). Entre las plantas C_4 , hay algunas especies de importancia económica como el maíz, la caña de azúcar y el sorgo. Asimismo, la mayoría de las hierbas nocivas son también plantas C_4 , por lo que la existencia de inhibidores de crecimiento (herbicidas) específicos para éstas últimas sería de gran importancia económica, siendo uno de los blancos para este tipo de compuestos, por supuesto, la PEPC.

Se ha reportado un peso molecular de 400,000 D para la PEPC purificada de maíz y otras plantas C_4 , y se ha descubierto que la enzima se compone de cuatro subunidades con pesos moleculares iguales (2,5-8). Como ya mencionamos, la PEPC cataliza la β -carboxilación irreversible del PEP para producir oxaloacetato y fosfato:



$$\Delta G_0 = -7.2 \text{ Kcal/mol}$$

Figura 1.2. Reacción de β -carboxilación del PEP catalizada por la PEPC.

Esta reacción involucra al PEP y al HCO_3^- (2,5,9a), y es altamente exérgica, requiriendo de un catión divalente como único cofactor, preferentemente Mg^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} (2,5,6,9b), aunque también se realiza, a velocidad reducida, con Cd^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} o Zn^{2+} (10,11).

Según O'Leary y colaboradores, la dependencia de V_{max}/K_m (ver Apéndice) para el PEP con el pH indica que sólo la forma completamente ionizada del PEP es la que se une a la enzima y que un grupo de la enzima con un pK_a cercano a 7.5 debe estar desprotonado para que la enzima esté activa (5,12). Muchos autores aceptan que la forma preferida de sustrato para la PEPC es el complejo de PEP con Mg^{2+} (13). Estudios de modificación química (1,14) y de resonancia paramagnética electrónica (15) indican que el catión divalente no es esencial para la unión del PEP a la enzima, pero su presencia incrementa la afinidad por el sustrato, lo que puede indicar la formación de un puente triple enzima-sustrato-metal o un cambio conformacional en la enzima. La presencia del catión podría incrementar el carácter positivo del átomo de fósforo del fosfato del PEP, aumentando su susceptibilidad a un ataque nucleofílico por parte del HCO_3^- . Por su parte, Miziorko *et al* (16) observaron que los cationes Mg^{2+} y Mn^{2+} actuaban disminuyendo la K_m del PEP, al igual que el PEP disminuía la K_m del catión, lo que también sugiere la formación de un complejo enzima-metal-sustrato. Miller *et al* sugirieron (15) un esquema representativo del complejo formado entre la enzima, el PEP y el Mn^{2+} , como se observa en la figura 1.3.

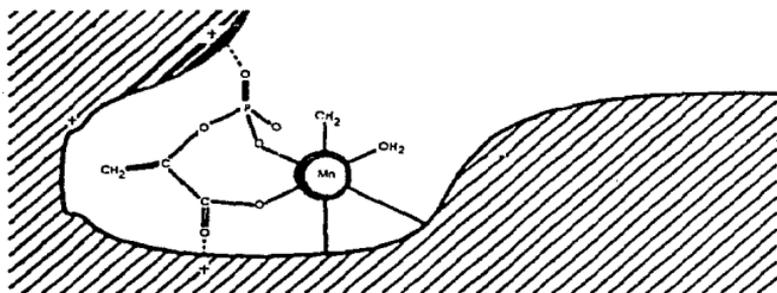


Figura 1.3. Esquema propuesto por Miller y colaboradores del complejo formado por el Mn^{2+} , el PEP y el sitio activo de la PEPC (15).

En este esquema se observa que el catión divalente actúa como puente entre la enzima y el PEP, involucrando el o los grupos ionizables del sitio activo.

González *et al* (7) han descubierto que, el Mg^{2+} , a pH de 7, interactúa con los grupos carboxilo y fosfato del PEP; a un pH de 8, es más importante la interacción con el grupo fosfato, mientras que para el HCO_3^- muestra que sólo esta especie, y no el CO_2 , se une a la enzima (17). Por otro lado, Maruyama y colaboradores (18), basados en el comportamiento de la K_m para el PEP y el Mg^{2+} frente al pH, sugieren que existe al menos un grupo disociable en la enzima con un pK_a de 7.3, presumiblemente un grupo imidazol, que está involucrado en la unión del Mg^{2+} y el PEP.

La PEPC de las plantas C_4 es una enzima típicamente alostérica en su comportamiento, ya que su actividad es regulada por una variedad de activadores e inhibidores. Entre los inhibidores alostéricos se puede mencionar al malato, maleato, aspartato, oxaloacetato y otros ácidos dicarboxílicos (5,6,19,20). La PEPC es la única carboxilasa conocida que emplea al bicarbonato como sustrato sin requerir de biotina como cofactor. Esto último se propuso inicialmente al verificarse la insensibilidad de la enzima a la acción de la avidina, por lo que la biotina no sería un grupo conjugado a la enzima o prostético (16,18). Por este motivo, ha sido de especial interés dilucidar el mecanismo de reacción de esta enzima, ya que en él radica la respuesta a cómo el bicarbonato (que es un electrófilo débil) es capaz de llevar a cabo el ataque nucleofílico y lograr que se forme el enlace carbono-carbono.

En los últimos años se ha obtenido mucha información con respecto al mecanismo de reacción y a la estructura del sitio activo de la PEPC, la cual ha provenido básicamente de estudios de modificación química y del empleo de análogos del PEP como inhibidores y sustratos. Los estudios de modificación química y de cinética de la enzima han demostrado que residuos de cisteína, lisina, histidina y arginina son esenciales para la función catalítica (2,7,14,21,22). Sin embargo, se conoce poco acerca del ambiente químico y las funciones precisas de estos residuos en el sitio activo de la enzima.

MECANISMO DE REACCIÓN DE LA PEP CARBOXILASA.

El HCO_3^- se puede acercar al átomo C-3 desde el lado del plano en el cual los tres sustituyentes (fosfato, carboxilo y carbono vinílico) aparecen en una secuencia a favor o en contra de las manecillas del reloj. Estos dos lados del plano del esqueleto carbonado se designan *re* y *si* respectivamente, como se observa en la figura 1.4. Se sabe que la adición del HCO_3^- se lleva a cabo por la cara C_2si , C_3si del doble enlace carbono-carbono del PEP, según estudios con fosfo[3- ^3H]enolpiruvato marcado específicamente (5,23,24) y con fluoro-fosfoenolpiruvato (25).

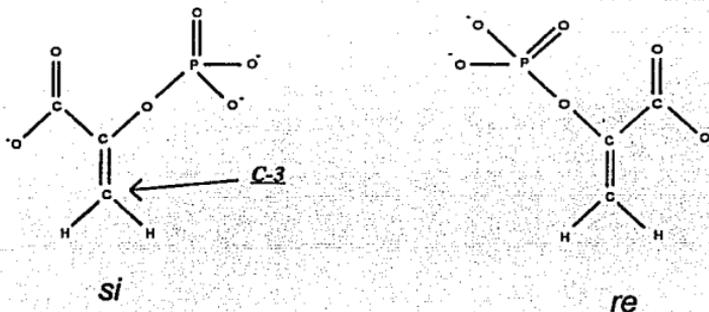


Figura 1.4. Caras *si* y *re* del PEP.

En 1966, Maruyama y colaboradores (18) observaron que el ^{18}O se incorporaba en los productos fosfato y oxaloacetato en una proporción de 1:2 cuando se utilizaba $\text{HC}^{18}\text{O}_3^-$ como sustrato de la enzima, es decir, que uno de los átomos de ^{18}O se incorpora al ortofosfato por cada dos átomos de ^{18}O que se incorporan al oxaloacetato. Con esta información, propusieron un mecanismo concertado cíclico de reacción con un solo estado de transición que era apoyado por estudios de resonancia magnética (15), y que se muestra en la figura 1.5.

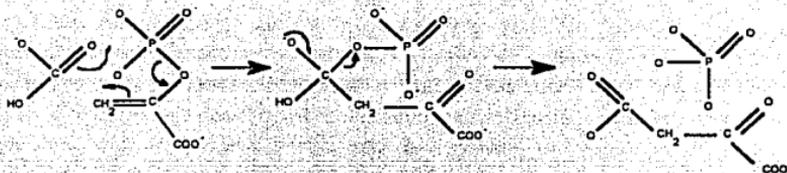


Figura 1.5. Mecanismo de reacción concertado propuesto por Maruyama *et al* (modificado de (15)).

Este mecanismo concertado para la carboxilación del PEP se caracteriza por un único paso en donde tienen lugar todos los cambios en los enlaces. En el estado de transición para este paso, el átomo de carbono del HCO_3^- sufre un cambio significativo en su enlace, formándose un nuevo enlace carbono-carbono y rompiéndose un enlace carbono-oxígeno.

Aunque este esquema explica el destino del marcado isotópico, no revela, según comenta O'Leary (12), cómo el átomo de carbono del bicarbonato, que es un electrófilo débil, sufre un ataque nucleofílico. Para resolver esta cuestión, se propuso (2,5,12) un mecanismo en dos pasos que también explicaba el marcado isotópico, como se observa en la figura 1.6.

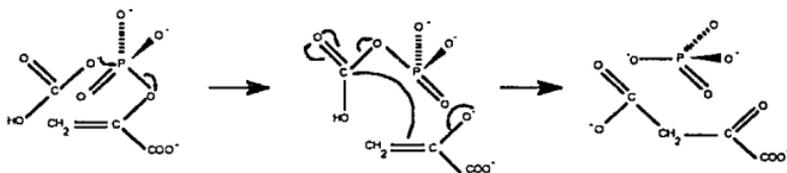


Figura 1.6. Mecanismo de reacción en dos pasos propuesto por O'Leary *et al* (modificado de (15)).

Durante el primer paso, el PEP actúa como donador de fosfato al bicarbonato, formándose un intermediario de carboxifosfato y el enolato del piruvato (que

presumiblemente permanece unido a la enzima adyacente al carboxifosfato). En el segundo paso, este enolato del piruvato ataca al átomo de carbono del carboxifosfato dando lugar a los productos: oxaloacetato y fosfato. Este mecanismo constituye una vía clara para utilizar la energía del enolfosfato para catalizar la formación del enlace carbono-carbono y, al mismo tiempo, provee el camino para activar al átomo de carbono del HCO_3^- para el ataque nucleofílico. La primera evidencia experimental en favor del mecanismo de dos pasos vino de estudios de efecto isotópico (donde se miden las diferencias en velocidad de reacción de sustratos marcados y no marcados con isótopos (26)) realizados por O'Leary y colaboradores (12), quienes explican que el efecto isotópico tan pequeño que observaron es inconsistente con el mecanismo concertado propuesto por Maruyama. Hansen y Knowles (23) contribuyeron con más datos al observar que la carboxilación del [(S)- ^{16}O , ^{17}O] tiosfosfoenolpiruvato en H_2^{18}O catalizada por la PEPC tiene lugar con una inversión de la configuración en el fósforo, lo cual solamente es consistente con el mecanismo de dos pasos, que involucra la transferencia del grupo fosfato del PEP al HCO_3^- seguido de la expulsión del fosfato inorgánico. También se tiene evidencia experimental en favor de este mecanismo por las observaciones de que la PEPC muestra una inhibición sinérgica por el oxalato y el carbamil fosfato, que son análogos estructurales del intermediario carboxifosfato-enolato (10,17).

Es interesante aquí la pregunta de por qué la enzima no utiliza el CO_2 como sustrato, siguiendo un mecanismo similar al de otras enzimas que carboxilan al PEP. Hansen y Knowles (23) especularon que el empleo de HCO_3^- como sustrato es ventajoso ya que está presente en altas concentraciones en soluciones acuosas a pH neutro, y se facilita por su activación acoplada a la ruptura de un enlace de alta energía. Con otras enzimas no hay tal acoplamiento y la reacción se tiene que llevar a cabo por ataque directo en el CO_2 , que es un buen electrófilo, pero es mucho menos abundante.

Recientemente se publicaron varios trabajos en donde se muestran estudios del mecanismo cinético de la PEPC. Se reporta que la PEPC tiene un mecanismo de reacción secuencial al azar (es decir, sin un orden estricto) que tiene un alto grado de sinergismo en la unión del PEP al complejo enzima- Mg^{2+} (10). El orden preferido de adición de los reactivos es Mg^{2+} (también el Mn^{2+} se puede unir a la enzima en ausencia de PEP), PEP y HCO_3^- . Se presentan valores para los distintos parámetros cinéticos: $K_{i\text{Mg}} = 2.3 \pm 0.4 \text{ mM}$ (constante de disociación del metal de la enzima),

$K_{PEP} = 3.6 \pm 0.6$ mM, $K_{iPEP} = 0.2 \pm 0.07$ mM (constante de disociación del PEP del complejo enzima- Mg^{2+} -PEP) y $K_{bicarbonato} = 0.18 \pm 0.04$ mM.

Se realizaron experimentos de doble inhibición para examinar la topología del sitio activo y la naturaleza de sus interacciones con los intermediarios propuestos, carboxifosfato y el enolato del piruvato (10). Se empleó al oxalato para simular al enolato del piruvato, y para simular al carboxifosfato se utilizaron carbamifosfato, fosfonoacetamida, acetilfosfato, fosfonoacetato o fosfonoformato, cuyas estructuras se muestran en la figura 1.7.

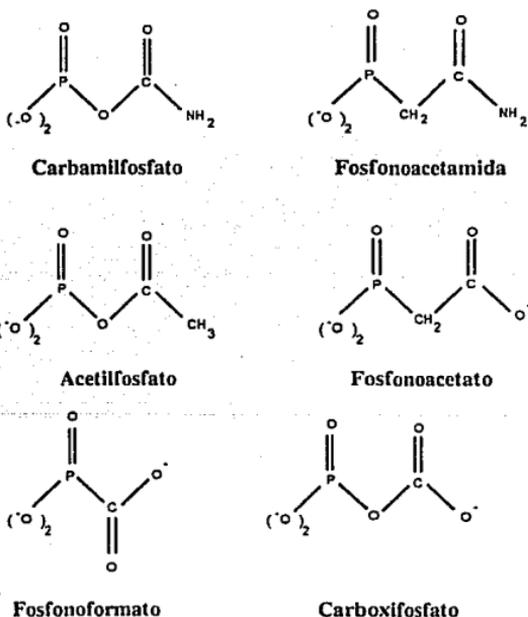


Figura 1.7. Inhibidores de la PEPC análogos del carboxifosfato.

Se observó una inhibición altamente sinérgica de la PEPC en presencia de oxalato y carbamilsulfato, y de oxalato y fosfonoacetamida. En ambos casos los suplentes del carboxifosfato son neutros en el extremo carbonílico y son donadores de hidrógeno potenciales. El acetilsulfato presenta una inhibición sinérgica más débil, quizá porque no posee la habilidad de unirse por puente de hidrógeno por su grupo metilo. Los otros dos inhibidores tienen un grupo carboxilo en su extremo carbonílico. El fosfonoacetato presenta una inhibición sinérgica muy débil. Se obtuvo una relación antisinérgica entre el oxalato y el fosfonoformato.

Estos resultados sugieren que la carga negativa en el extremo carbonílico del suplente del carboxifosfato es desfavorable. Por ende, el carboxifosfato se une más fuertemente sólo cuando su grupo carboxilo está protonado, como puede ser inmediatamente después de la fosforilación del bicarbonato por el PEP. Además, la presencia de un grupo apto para enlazarse por puente de hidrógeno en el extremo carbonílico del inhibidor parece producir una interacción favorable, como lo evidencia la alta inhibición sinérgica del carbamilsulfato o la fosfonoacetamida. Todos estos resultados son consistentes con la participación de una base en el sitio activo que se pueda unir por puente de hidrógeno a los hidrógenos de la amida de estos inhibidores. Este mecanismo se ilustra en la figura 1.8.

En este mecanismo se puede ver que el ión metálico se coordina con el oxígeno del puente del PEP, actuando como un ácido de Lewis, estabilizando el enolato del PEP y catalizando la transferencia del fosfato. Se tiene evidencia en favor de la coordinación del metal con dicho oxígeno por los estudios de inhibición con análogos al PEP en los cuales dicho oxígeno ha sido reemplazado por grupos metilénicos o azufre, resultando ser inhibidores muy débiles (ver más adelante).

La formación del CO_2 y el fosfato como intermediarios se explica más adelante. Este último mecanismo requiere la participación de al menos un catalizador ácido-base (X en la figura 1.8). Este grupo actúa como un aceptor de protones en la descomposición del carboxifosfato a CO_2 y PO_4^{3-} . Subsecuentemente, este mismo grupo podría donar un protón al PO_4^{3-} para formar HPO_4^{2-} . En la figura 1.8 se muestra alternativamente a otros grupos catalíticos participando en la remoción y donación de protones. Este grupo X podría ser una histidina.

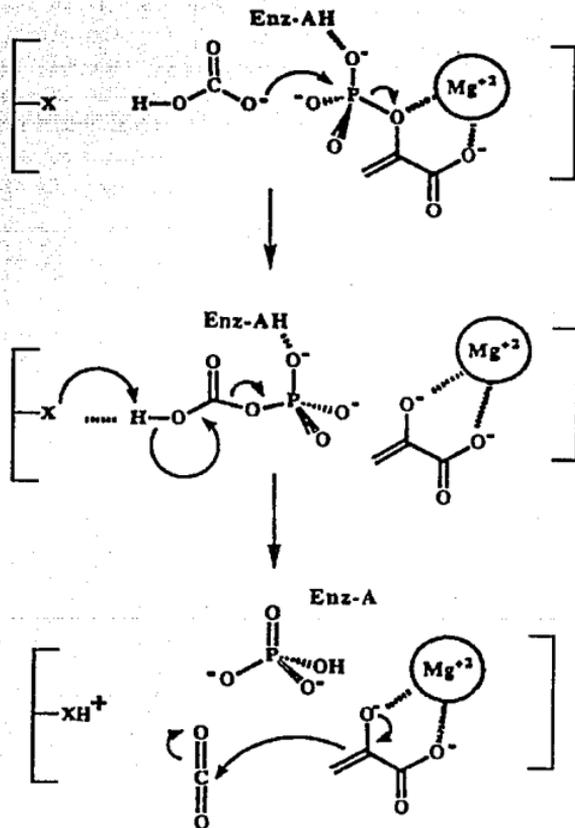


Figura 1.8. Posible mecanismo de acción de la PEPC propuesto por Janc *et al* (10).

Estudios con bicarbonato marcado con ^{18}O produjeron fosfato con múltiples marcas de ^{18}O (25), a diferencia de los resultados de Maruyama *et al* (18) ya descritos. Además, el ^{18}O también aparece en el Z- y E-fluoro-fosfoenolpiruvato residual. Esta evidencia, junto con el efecto isotópico observado para la carboxilación del fluoro-fosfoenolpiruvato, es consistente con el mecanismo en donde la carboxilación del PEP procede vía un ataque del enolato del piruvato sobre el CO_2 en vez del carboxifosfato. En este mecanismo, la fosforilación del bicarbonato para dar carboxifosfato y la posterior carboxilación de éste último son pasos reversibles. Sin embargo, existe un paso irreversible que precede la partición entre la carboxilación para dar oxaloacetato y la liberación del CO_2 , que resulta en la hidrólisis del PEP.

Se postula que el carboxifosfato se colapsa reversiblemente en el sitio activo de la PEPC para producir CO_2 y fosfato. En la figura 1.9 se muestra un mecanismo que explica el patrón de marcado isotópico observado con el fluoro-fosfoenolpiruvato. Este mecanismo requiere que tanto el fosfato como el bicarbonato puedan rotar en el sitio activo para justificar el intercambio posicional isotópico observado y que el intermediario carboxifosfato (que debe formarse para que se incorpore el ^{18}O en el fosfato) se colapse reversiblemente en CO_2 y fosfato durante la catálisis.

La observación de un nivel relativamente alto de incorporación de ^{18}O en el fluoro-fosfoenolpiruvato residual durante la reacción requiere que los pasos que involucran la transferencia del fosfato y la descarboxilación del carboxifosfato a CO_2 y fosfato sean reversibles y que el fluoro-fosfoenolpiruvato se libere lo suficientemente rápido de la enzima en relación con la velocidad de reacción directa. Se supone que ocurre un cambio conformacional irreversible tras la formación del CO_2 en el sitio activo, lo que permite que el CO_2 se mueva a una posición donde pueda reaccionar con el enolato. El sitio activo permanece cerrado sólo durante un tiempo finito después de este cambio conformacional, y si la carboxilación no ha tenido lugar cuando el sitio activo se abre, el CO_2 se pierde y la reacción neta es la hidrólisis.

Este mecanismo se puede modelar de manera simple como se muestra en la figura 1.10. La k_1 incluye la adición del sustrato a la enzima, transferencia del fosfato del fluoro-fosfoenolpiruvato al bicarbonato, y la posterior descarboxilación a CO_2 y fosfato. En la reacción inversa, la k_2 incluye la liberación del sustrato así como la reversión de los pasos químicos.

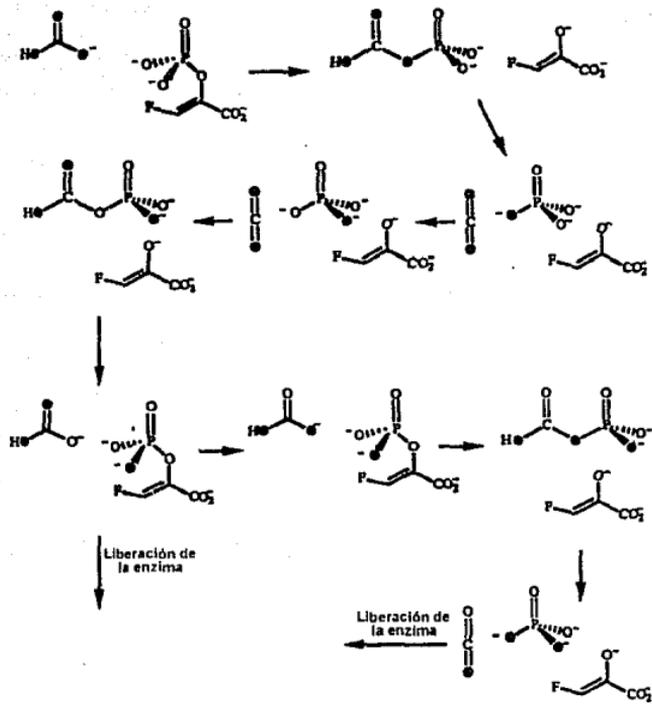


Figura 1.9. Mecanismo de reacción para el F-PEP propuesto por Janc *et al* (25), que permite explicar el marcado isotópico.

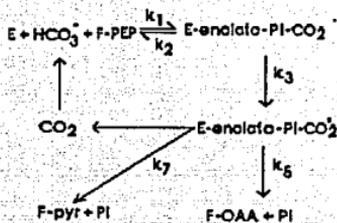


Figura 1.10. Modelo cinético del mecanismo de reacción de la PEPC propuesto por Janc *et al* (25).

Otros estudios indicaron que el formato es un sustrato alternativo al bicarbonato para la reacción con el PEP catalizada por la PEPC, formándose formilfosfato y piruvato (27). Al parecer, esto es indicación de que el primer paso en la reacción sería la formación del formilfosfato y el enolato del piruvato. El hecho de que el formilfosfato no pueda ser atacado por el enolato del piruvato para producir 2,4-oxobutirato, a pesar de que se esperaría que el formilfosfato fuera más electrofílico que el carboxifosfato, es consistente con la descarboxilación del carboxifosfato para formar CO_2 como un paso obligatorio previo al ataque por parte del enolato del piruvato en la carboxilación normal.

Se puede concluir finalmente que la PEPC, que emplea al HCO_3^- como sustrato, invariablemente lo deshidrata para formar CO_2 en el sitio activo antes de la reacción. Esta enzima ha evolucionado para usar el bicarbonato, presumiblemente por su mayor afinidad por este sustrato comparado con el CO_2 , constituyendo una ventaja selectiva para la supervivencia en un ambiente de baja concentración de CO_2 .

Finalmente, Aussenhaus y O'Leary (11) reportaron que el PEP es hidrolizado por la PEPC en presencia de Mg^{2+} , a una velocidad de aproximadamente el 5% de la velocidad total de la reacción, produciéndose piruvato y fosfato. El grado de hidrólisis depende del pH y del catión metálico empleado. La velocidad de la reacción depende de la concentración de HCO_3^- , lo que sugiere que la hidrólisis y la carboxilación del PEP siguen un mecanismo en común, divirgiendo ambos en o después de la formación

del carboxifosfato. Estos autores discutieron la factibilidad de varios mecanismos para la hidrólisis del PEP:

- (1) El enolato se puede protonar por la enzima para dar el piruvato. No es factible ya que los intermediarios unidos a la enzima están protegidos del disolvente, y es más probable que esta protonación ocurra después de que el enolato se disocie de la enzima.
- (2) El enolato se puede disociar de la enzima y ser protonado. Esto es factible, ya que se ha observado al enol libre en la hidrólisis del metil-fosfoenolpiruvato.
- (3) El carboxifosfato se puede disociar de la enzima y entonces ser hidrolizado en solución.
- (4) El carboxifosfato se puede descomponer en la enzima para formar CO_2 y PO_4^{3-} , como ya vimos antes. La disociación del CO_2 o del PO_4^{3-} de la enzima podría iniciar la secuencia de eventos que llevan a la formación del piruvato.

La hidrólisis del PEP se llevó a cabo a velocidades decrecientes en el orden siguiente de cationes utilizados: $\text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$. Las constantes de estabilidad de los complejos bidentados del oxalato con los metales anteriores decrecen en el mismo orden. Estos resultados sugieren que el catión metálico en el sitio activo se une al oxígeno del enolato intermediario, formando un complejo bidentado y estabilizándolo. Mientras más estable sea dicho enolato, menos reactivo será para la carboxilación y mayor será la hidrólisis, ya que habrá tiempo suficiente para que el carboxifosfato o el CO_2 se disocien de la enzima.

SITIO ACTIVO Y SITIOS ALOSTÉRICOS DE LA PEP CARBOXILASA.

Son necesarios y no se han publicado todavía estudios de difracción de rayos X para poder elucidar la estructura terciaria de la PEPC y relacionar la estructura con sus propiedades cinéticas. La localización exacta de los aminoácidos que participan en la catálisis y/o unión del sustrato sólo se logrará después de aislar y secuenciar los péptidos que contienen los residuos esenciales para la actividad. La identificación de las regiones involucradas en las regiones regulatorias (ver más adelante) requiere aún más trabajo, incluyendo el empleo de reactivos análogos de los moduladores y mutagénesis dirigida en la enzima (2). De cualquier manera, la estructura del sitio activo se ha estudiado mediante el empleo de los inhibidores competitivos ya descritos que tienen analogía estructural con el PEP, de la protección por los sustratos o

efectores frente a la inactivación con reactivos específicos, y mediante la respuesta cinética de la enzima frente al pH.

Los estudios con la variedad de análogos del PEP ya descritos sugieren que el sitio activo de la PEPC está sorprendentemente libre de residuos de aminoácidos electrofílicos o nucleofílicos que puedan reaccionar con un nucleófilo o electrófilo unido a la enzima.

Stiborová y Leblová (21) realizaron estudios sobre la dependencia de la actividad enzimática con el pH, y reportaron la presencia de dos residuos de aminoácidos presentes en el sitio activo: uno con un pK_a de 8.5 y que participa en la unión del PEP a la superficie de la enzima, y otro con un pK_a de 8.52 que participa en la unión del Mg^{2+} a la enzima. Estos pK_a revelan que los grupos presentes en el sitio activo de la enzima son grupos sulfhidrilo (-SH) de residuos de cisteína.

Iglesias *et al* (2,14,22) reportaron que el dietilpirocarbonato (que es capaz de carboxilar específicamente residuos de histidina) y el fenilglioxal (que puede modificar residuos de arginina al reaccionar con grupos guanidino) inactivan a la PEPC por formación de residuos de histidina y arginina modificados. La actividad se puede recuperar por tratamiento con hidroxilamina cuando se ha inactivado con dietilpirocarbonato, pues elimina grupos etoxiformilo principalmente de residuos modificados de histidina. El malato y el oxaloacetato impiden la inactivación por fenilglioxal, pero la glucosa-6-fosfato no tiene efecto protector. La curva de inactivación por fenilglioxal contra pH mostró que está involucrado un residuo con un pK_a de 6.9. El PEP en presencia de Mg^{2+} protege a la enzima de la inactivación con cada agente, lo que sugiere que las modificaciones químicas se realizan en o cerca del sitio de unión del sustrato. Al parecer dos residuos de arginina y dos residuos de histidina son los responsables de la unión del sustrato y de las inactivaciones observadas. En particular los residuos de arginina constituyen grupos cargados positivamente que pueden participar en la unión de sustratos aniónicos, como grupos fosfato y carboxílicos, como podría ser el caso del PEP. Como vemos, los estudios de modificación química indican que residuos de histidina, cisteína, arginina y lisina son esenciales para la actividad catalítica y están involucrados en la unión del PEP. Andreo *et al* (5) proponen un modelo esquemático para la distribución hipotética de estos aminoácidos en el sitio activo de la PEPC, como se observa en la figura 1.11.

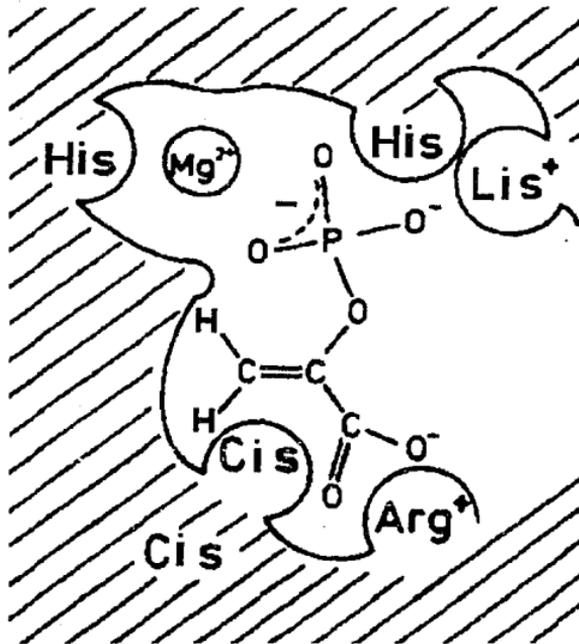


Figura 1.11. Modelo del sitio activo de la PEPC propuesto por Andreo *et al* (5).

Aquí observamos a los residuos cargados positivamente, lisina y arginina, interactuando con los grupos fosfato y carboxilato del sustrato. Es probable que los grupos imidazólicos participen en la unión del Mg²⁺ y también podrían unir al grupo fosfato a través de interacciones electrostáticas entre los átomos de fósforo y nitrógeno. Esto podría explicar la protección parcial que aporta el catión divalente contra la inactivación por dietilpircarbonato y el decremento en la afinidad por el PEP y el Mg²⁺ cuando las histidinas se protonan. Como se mencionó al principio, el catión interactúa con el grupo fosfato del PEP, pero es de notar que la posición del metal no corresponde con aquella propuesta por Miller (15) que presentamos al inicio del

capítulo. Se postula que una cisteína se localiza cerca de la región de unión del grupo melilénico según los datos que demuestran la alquilación por los análogos Z-fosfoenol-3-bromopiruvato y bromopiruvato. Se ha demostrado también que la enzima se puede inactivar por una oxidación ditiólica vecinal, por lo que se incluye otra cisteína cercana. El bicarbonato no se incluye en la figura ya que su sitio de unión a la proteína no se conoce.

No se sabe con certeza si la enzima posee sitios reguladores espacialmente diferentes, si bien existen evidencias que parecen apuntar en dicho sentido, particularmente con los estudios de reactivos análogos, como mencionaremos en la sección de activadores e inhibidores alostéricos de la PEPC. Se sabe, por ejemplo (28), que las modificaciones de residuos de arginina y lisina con reactivos específicos hacen que la PEPC pierda su sensibilidad a la activación por la glucosa-6-fosfato, pero no para la activación con glicina, lo que al parecer es indicación de que estos dos compuestos se unen a sitios distintos en la enzima, uno de los cuales (el de la glucosa-6-fosfato) posee al menos un residuo de arginina y uno de lisina. Cuando la enzima sufre proteólisis limitada con tripsina, la inhibición de la enzima con malato desaparece gradualmente, mientras que la activación por glucosa-6-fosfato y glicina se incrementa. Se deduce entonces que la regulación de la enzima por el malato ocurre en un sitio diferente a aquél de la glucosa-6-fosfato y/o la glicina. La aparente existencia de múltiples sitios de regulación sugiere que existe un mecanismo complejo de regulación de la PEPC.

INHIBIDORES COMPETITIVOS DE LA PEP CARBOXILASA.

El empleo de análogos al sustrato es una herramienta útil para el estudio de la naturaleza de los grupos involucrados en la unión del sustrato, de la topografía y tamaño del sitio activo y de la eficiencia de la carboxilación. De la misma manera, se pueden utilizar sustratos alternos para obtener información del mecanismo cinético y químico y, eventualmente, para determinar la estereoselectividad y estereoespecificidad de la enzima (3,4,17). Los estudios con análogos al PEP en la PEPC de plantas C_4 son particularmente importantes ya que también pueden ayudar en el diseño de inhibidores eficientes que eventualmente se puedan utilizar como herbicidas. La principal dificultad consiste en poder desarrollar un compuesto químico que inhiba selectivamente a la PEPC sin alterar la actividad de otras enzimas que utilizan al PEP.

El sitio activo de la PEPC se puede dividir en seis regiones (17), como se muestra en la figura 1.12. Se pueden utilizar variaciones estructurales sistemáticas en las diferentes regiones de los compuestos ligantes para identificar las distintas interacciones específicas entre la enzima y el inhibidor (o sustrato).

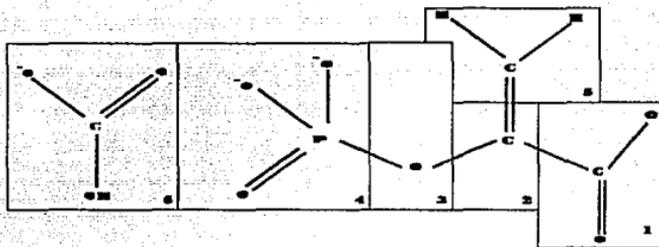


Figura 1.12. Regiones del sitio activo de la PEPC según un mapa del sustrato propuesto por O'Leary (17).

Los inhibidores competitivos conocidos que poseen una analogía estructural con el PEP, y que han sido utilizados para estudiar el sitio activo de la PEPC. El nombre, estructura química y constante de inhibición (K_i , en μM , definida en el Apéndice 1) de estos compuestos (4,5,17,29,30) se muestran en las siguientes páginas, en orden decreciente de su capacidad de inhibición, en las figuras 1.13 a la 1.29.

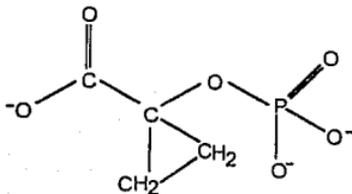


Figura 1.13. Fosfato del ácido 1-hidroxíciclopropanoico ($7 \mu\text{M}$)

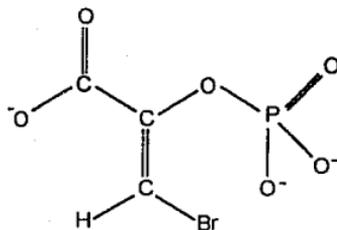


Figura 1.14. Z-bromo-fosfoenolpiruvato ($7 \mu\text{M}$)

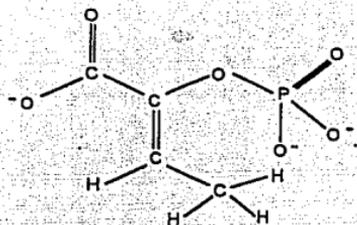


Figura 1.15. Z-metil-fosfoenolpiruvato
(17 μM)

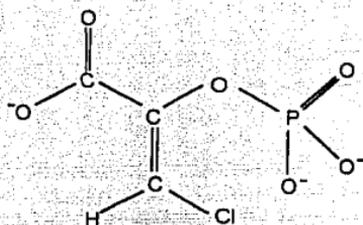


Figura 1.16. Z-cloro-fosfoenolpiruvato
(64 μM)

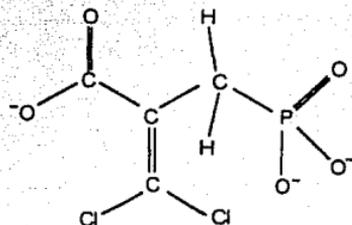


Figura 1.17. 3,3-dicloro-2-dihidroxisopropil-metil-2-propenoato
(80 μM)

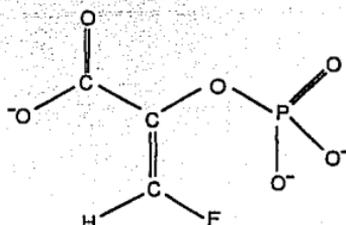


Figura 1.18. Z-fluoro-fosfoenolpiruvato
(85 μM)

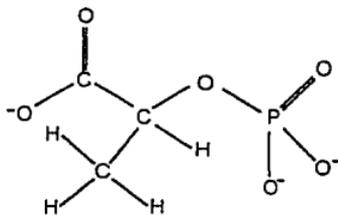


Figura 1.19. L-2-fosfolactato (100 μM)

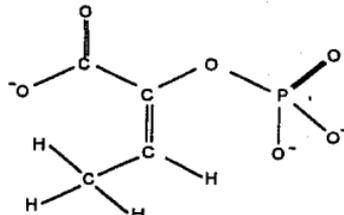


Figura 1.20. E-metil-fosfoenolpiruvato
(110 μM)

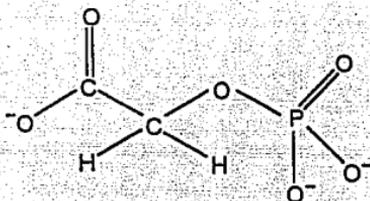


Figura 1.21. Fosfoglicolato (200 μM)

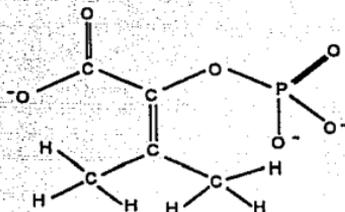


Figura 1.22. Dimetil-fosfoenolpiruvato (380 μM)

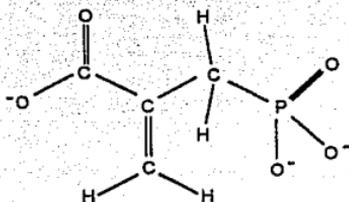


Figura 1.23. Fosfoenolpiruvato fosfonato (400 μM)

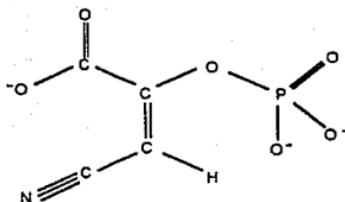


Figura 1.24. *E*-ciano-fosfoenolpiruvato (1360 μM)

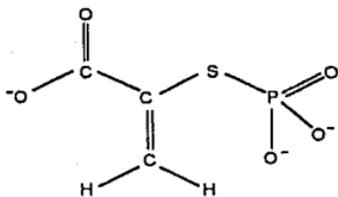


Figura 1.25. Fosfoenoltiopiruvato (2000 μM)

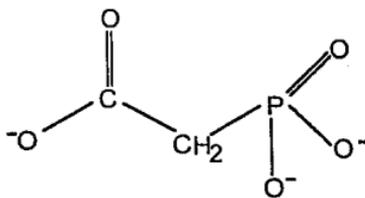


Figura 1.26. Fosfonoacetato (2000 μM)

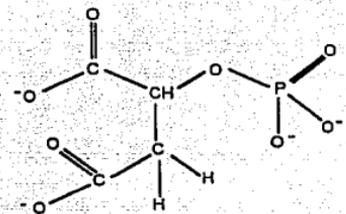


Figura 1.27. Fosfomalato (2700 μM)

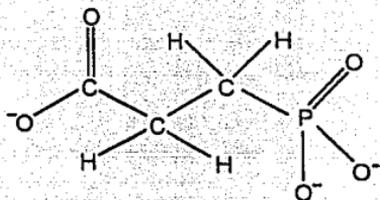


Figura 1.28. Fosfonopropionato (10000 μM)

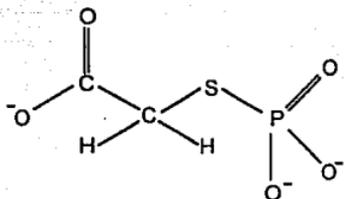


Figura 1.29. Fosfotiglicolato (16000 μM)

González y Andreo (2,4) han explicado que la conclusión general a la que se llega con los estudios que se han realizado hasta ahora con los diferentes inhibidores de la PEPC es que tanto el grupo fosfato como el grupo carboxilato son muy importantes para la unión al sitio activo. Mencionan que existe un incremento de uno o dos órdenes de magnitud en las constantes de disociación cuando alguno de estos dos grupos está ausente. En este sentido, se ha reportado que carboxilatos y fosfatos simples se unen débilmente a la enzima (5,16,17), posiblemente al ocupar los sitios 1 o 4 ya descritos. Una unión eficiente no se logra a menos que tanto el sitio 1 como el sitio 4 estén ocupados. Conviene mencionar que no se han explorado posibles variaciones estructurales en el sitio 4 con análogos al PEP.

El análisis de la inhibición competitiva por porciones de la molécula de L-fosfolactato (como L-lactato, metilfosfato y fosfito, que también son inhibidores competitivos) indica que en el mecanismo de inhibición es más importante la interacción del grupo fosforilo y, en menor grado, la del carboxilo y el puente de oxígeno C-O-P del fosfolactato con el complejo enzima-metal (16). Asimismo, estos

resultados constituyen una evidencia indirecta de la coordinación del fosfato por el catión divalente unido a la enzima.

El ángulo de enlace en el átomo C-2 (120°) parece tener un efecto muy importante en la unión a la enzima (4). O'Leary (17) sugiere aquí comparar el fosfoglicolato y el fosfolactato con el fosfoenol-3-fluoropiruvato, el fosfoenol-3-bromopiruvato y el 1-HCP (ver adelante). Ella sugiere que se da un incremento en la unión a la enzima conforme el ángulo de enlace en el átomo C-2 aumenta de cerca de 109° a aproximadamente 120° (ella menciona, sin explicar cómo lo determina, que el 1-HCP tiene un ángulo de enlace C-C-O predicho de 120°).

O'Leary y colaboradores (31) sintetizaron y caracterizaron cinéticamente al fosfato del ácido 1-hidroxíciclopropanoico (1-HCP), que ha resultado ser hasta el momento el inhibidor competitivo más potente de la PEPC. Estos autores consideran que la estructura geométrica y electrónica del 1-HCP se parece más a la del PEP que a la de otros inhibidores como el fosfolactato o fosfoglicolato, particularmente en los ángulos de enlace alrededor del átomo C-2. Consideran también que la densidad electrónica en el anillo de ciclopropano es similar a aquella del doble enlace carbono-carbono del PEP, incrementando la similitud estructural entre el 1-HCP y el PEP.

El oxígeno del puente C-O-P es también muy importante (4). El PEP y los mejores inhibidores tienen un átomo de oxígeno en el sitio 3 ya descrito. La sustitución de un grupo $-\text{CH}_2-$ por este oxígeno (como en el fosfoenolpiruvato fosfonato y el fosfonopropionato) se traduce en un decremento de la fuerza de unión en varios órdenes de magnitud. No se tienen estimaciones exactas, pues las constantes de inhibición reportadas para estos compuestos son sólo aproximaciones. Se desconoce el mecanismo del efecto de la sustitución por un carbono. O'Leary (17) menciona que es posible que en el sustrato natural se presente un puente de hidrógeno entre el oxígeno del sitio 3 y algún grupo en la enzima; señala que también es posible que pequeñas diferencias en las longitudes o ángulos de enlace entre el carbono y el oxígeno puedan ser responsables de esta diferencia. Aquí conviene señalar que el fosfoenolpiruvato (con un azufre reemplazando al oxígeno) es un sustrato para la PEPC (23,29), ya que se produce tiopiruvato en presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} y HCO_3^- . De hecho, Sikkema y O'Leary (29) reportan también que el fosfotiglicolato es un inhibidor muy débil de la PEPC ($K_i = 16,000 \mu\text{M}$), y explican que las causas de que este compuesto se una con una fuerza 100 veces menor que el fosfoglicolato (un inhibidor potente), pueden radicar

en cambios en la geometría, en la estructura electrónica o en la coordinación del azufre al metal. Por otro lado, Jenkins y colaboradores (3,32) reportaron la síntesis del compuesto 3,3,-dicloro-2-(dihidroxifosfinoilmetil)-2-propenoato, que resultó ser un inhibidor competitivo potente y altamente selectivo de la PEPC. Dada la estructura química de este compuesto, consideran que la enzima tiene una tolerancia estérica considerable en la región cerca del átomo C-3. Concluyen también que las propiedades de electronegatividad de los átomos de cloro sustituyentes en el átomo C-3, junto con la sustitución del grupo fosfato por un grupo fosfometilo, proveen a este compuesto de propiedades muy particulares: la pérdida de afinidad a la enzima debido a la sustitución del grupo metileno por el oxígeno del éster de fosfato (como se mencionó para los casos anteriores) se compensa por la presencia de otros grupos que favorecen una adecuada interacción con la enzima.

No se sabe bien si se pueden acomodar grupos grandes en el sitio 5 (17). Como se sabe, el fosfoenol-3-bromopiruvato, el fosfoenol-3-cloropiruvato y el fosfoenol-3-fluoropiruvato se unen bien al sitio activo, pero el fosfomalato no puede hacerlo con igual facilidad. Sin embargo, un hecho importante es que cualquier sustitución de los hidrógenos del grupo metilénico en el átomo C-3 modifica la actividad del compuesto. Por ejemplo, la sustitución de cualquiera de estos hidrógenos por un grupo más grande (CH₃, Br, Cl) o más electronegativo (F, Cl, Br) se traduce en un incremento significativo de la fuerza de unión al sitio activo (4,17,29,30,32-35). Sin embargo, no es claro cuál es la influencia de la configuración en el átomo C-3 (si el sustituyente está en posición *cis* o *trans* con respecto al fosfato) sobre la fuerza de unión y la actividad de sustrato de los análogos (36), aunque al parecer las sustituciones en *trans* son responsables del impedimento estérico y las sustituciones en *cis* producen una mayor afinidad (2).

En este sentido, los estudios de Izui y colaboradores (37) con la enzima proveniente de la bacteria *E. coli*, revelaron que al parecer existe un sitio hidrofóbico cerca del sitio de unión del doble enlace que es lo suficientemente grande como para permitir la interacción de análogos al PEP con grupos alquílicos en posición *cis* mayores que un metilo, tales como grupos etilo, propilo e isopropilo, pero no tan grande como para que penetren grupos amilo. No son del todo comparables estos resultados con aquéllos para la PEPC de las plantas, pues las constantes de inhibición que estos autores reportan para varios compuestos que también inhiben a la enzima de las plantas son significativamente diferentes, lo que probablemente significa que existen

diferencias estructurales importantes entre los sitios activos de las enzimas de las bacterias y las plantas.

Con respecto a los compuestos Z-metil-fosfoenolpiruvato, E-metil-fosfoenolpiruvato y dimetil-fosfoenolpiruvato, González y Andreo (2,34,36,38) reportaron que los tres son inhibidores competitivos de la PEPC y además sustratos, ya que al parecer la enzima es capaz de desfosforilarlos pero no de carboxilarlos, existiendo cierta estereoselectividad por parte de la enzima, puesto que los parámetros cinéticos para los tres compuestos son diferentes entre sí. Se requieren HCO_3^- y un catión divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}) para la desfosforilación. Para la reacción con los dos isómeros del metil-fosfoenolpiruvato, los productos que se obtienen son en ambos casos α -cetobutirato y fosfato inorgánico, como resultado de la adición de un protón del agua junto con la hidrólisis del carboxifosfato formado. De hecho, proponen que la desfosforilación de estos análogos ocurre mediante un mecanismo similar al que sufre el PEP, donde el paso limitante de la velocidad sería la formación del carboxifosfato y el enolato del 2-oxobutirato (cuya protonación tiene lugar al azar en solución y no mediado por la enzima) a partir del sustrato. Fujita y colaboradores (34,39) suponen que el Z-metil-fosfoenolpiruvato no puede ser carboxilado debido a un impedimento estérico por su grupo metilo que impide la adecuada unión del enolato a la enzima. Se puede concluir que el primer paso de la reacción es poco específico en cuanto a sus requerimientos estructurales, pero el segundo paso sí es altamente específico. La existencia de grupos grandes (como CH_3 o Br) en cualquier posición en el átomo C-3 impide la carboxilación del enolato, pues incluso un compuesto con un grupo sustituyente más pequeño, el 1-carboxialenil-fosfato, sufre hidrólisis, como veremos más adelante (4).

Díaz *et al* (35) y González y Andreo (40) por separado, reportaron que el Z-fluoro-fosfoenolpiruvato es un buen sustrato para la PEPC, la cual lo transforma en una mezcla de 3-fluoropiruvato (85%) y 3-fluorooxaloacetato (15%), sin que la enzima se inactive en modo alguno. Los autores consideran que la enzima lleva a cabo la desfosforilación del compuesto, y posteriormente se da una competencia entre la carboxilación (como ocurre con el PEP) y la hidrólisis, tal vez porque la protonación del intermediario enolato compite con la carboxilación, o bien porque el enolato intermediario se libera a la solución (41). Al parecer, esto constituye una evidencia adicional de que son factores estéricos y la distribución electrónica en torno al átomo C-3 los que determinan que el segundo paso (carboxilación) de la reacción se lleve a

cabo. Sólo conviene enfatizar que el flúor es un elemento que tiene un tamaño muy similar al hidrógeno, pero con características electrónicas muy diferentes (42). En la figura 1.30 se muestra el mecanismo de carboxilación y desfosforilación del Z-fluoro-fosfoenolpiruvato, siendo claro que cuando se presenta hidrólisis del carboxifosfato intermediario, se libera en solución 3-fluoroenolpiruvato, el cual se cetoniza.

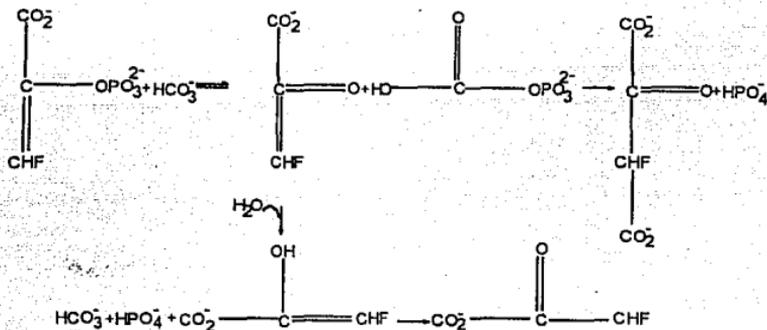


Figura 1.30. Mecanismos de carboxilación y desfosforilación del Z-fluoro-fosfoenolpiruvato propuestos por González y Andreo (40).

Janc *et al* (25) encontraron que la PEPC actúa sobre los dos isómeros (*E* y *Z*) del fluoro-fosfoenolpiruvato, los cuales sufren carboxilación para formar 3-fluorooxaloacetato e hidrólisis para formar 3-fluoropiruvato. La carboxilación constituye el 3% de la reacción observada con el isómero *Z* y el 86% de la reacción con el isómero *E*.

Liu *et al* (30) reportaron la síntesis y caracterización del Z-3-cloro-fosfoenolpiruvato, que resultó ser un potente inhibidor de la PEPC con respecto al PEP y un sustrato de la misma. El compuesto se convierte a una mezcla 3:1 de cloropiruvato y clorooxaloacetato. La incubación de la enzima con este compuesto se

traduce en una inactivación parcial de la misma, probablemente mediada por el compuesto cloropiruvato formado.

Se ha reportado (41) que el 1-carboxialenil-fosfato es también un sustrato para la PEPC en presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} y de HCO_3^- , ya que es hidrolizado por la enzima, pero no es carboxilado. Al parecer, después de la desfosforilación, el alenolato que se forma se protona, formando el 2-oxo-3-butenoato, el cual inactiva gradualmente a la enzima por reacción con uno o más grupos sulfhidrilo que no pertenecen al sitio activo, como se muestra en la figura 1.31.

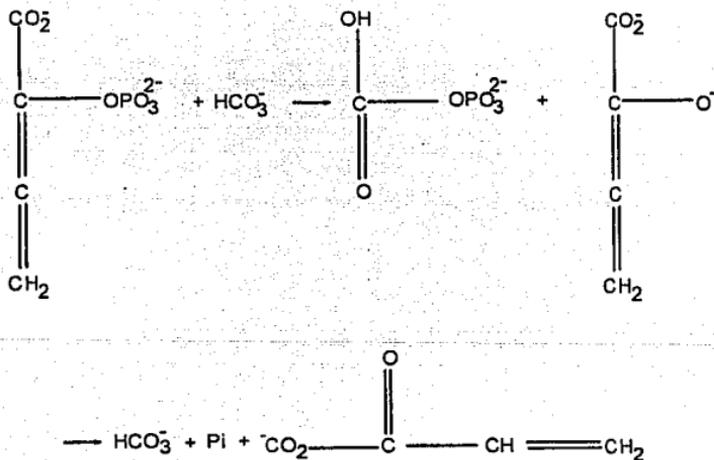


Figura 1.31. Mecanismo de hidrólisis del 1-carboxialenil-fosfato propuesto por Wirshing y O'Leary (41).

Como vemos, de nuevo se propuso un mecanismo parecido al del Z-metil-fosfoenolpiruvato, en el que el primer paso de la reacción es la formación del carboxifosfato y el enolato unidos a la enzima, para luego continuar con la hidrólisis

del carboxifosfato intermediario. De nuevo se mencionó que no se conocen las propiedades estructurales que controlan la desviación hacia hidrólisis o carboxilación. Se eliminaron los argumentos estéricos simples con base en que tanto el *Z*-fluoro-fosfoenolpiruvato como el 1-carboxialenil fosfato sufren hidrólisis principalmente, a pesar de que ambos análogos tienen sustituyentes muy pequeños. Se consideró difícil formular un argumento electrónico, debido a que los compuestos con sustituyentes que son parecidos en su distribución electrónica al PEP (como el metil-fosfoenolpiruvato) son hidrolizados igual que los compuestos con sustituyentes muy electronegativos (como el fluoro-fosfoenolpiruvato). De hecho, los únicos compuestos que presentan carboxilación preferentemente son el propio PEP y el *E*-fluoro-fosfoenolpiruvato.

Una excepción dentro de los anteriores análogos al PEP con sustituyentes en el átomo C-3, y que son buenos inhibidores, la constituye el *E*-3-ciano-fosfoenolpiruvato, ya que su constante de disociación es de 1.36 mM en presencia de Mg^{2+} (42), si bien en presencia de Mn^{2+} es mucho más efectivo. La enzima no parece inactivarse en presencia de este compuesto. Esto quizá se pueda relacionar con la observación de que el isómero *E* del metil-fosfoenolpiruvato es un inhibidor mucho más débil que el isómero *Z*, como reportan González y Andreo (36). En este sentido, ya vimos que estos autores mencionan que se sabe que la PEPC es capaz de desfosforilar estos dos compuestos, pero no de carboxilarlos. Argumentan que estos resultados indican que se pueden acomodar grupos relativamente grandes en el sitio de unión del átomo C-3 en la enzima, y que la configuración de éste átomo no es importante para la catálisis del primer paso de la reacción enzimática; sin embargo, la configuración y la presencia de metilos en el átomo C-3 sí impide (estéricamente) que ocurra el segundo paso de la reacción; esto sería un indicio de que el átomo C-3 es el sitio de ataque del grupo carboxifosfato para producir la carboxilación del enolato. Sin embargo, es de destacar que la PEPC no actúa sobre el *E*-3-ciano-fosfoenolpiruvato en forma alguna, y si acaso lleva a cabo una transferencia inicial del fosfato, ésta debe ser reversible. Wirshing y O'Leary, los autores de este estudio, mencionan que el hecho de que compuestos que tienen sustituyentes en el átomo C-3 (halógeno, metilo, ciano) se unen a la enzima indica que existe un cierto grado de tolerancia espacial en el sitio activo; sin embargo, el que a su vez estos compuestos sean en el mejor de los casos sustratos muy pobres de la enzima indica que esta tolerancia espacial es limitada.

O'Leary (17) señala que no se ha encontrado hasta el momento un análogo al estado de transición del PEP en la enzima que pueda ocupar el sitio 6. Se tenía la

intención de utilizar al fosfomolato para esto, pero no se une bien a la enzima. La PEPC presenta una inhibición sinérgica por el oxalato y el carbamilsulfato; al parecer, el oxalato ocupa los sitios 1, 2 y 3 y el carbamilsulfato ocupa los sitios 4 y 6. Se sabe que el sulfito inhibe a la PEPC al competir con el HCO_3^- en el sitio activo (5).

El caso del fosfoenol-3-bromopiruvato merece discutirse un poco más. Según los estudios iniciales de O'Leary y Díaz (5,17,33), este compuesto es un excelente inhibidor competitivo de la PEPC siempre y cuando ésta no se preincuba con el inhibidor en presencia de Mn^{2+} y HCO_3^- , pues si esto se realiza, la inactivación es completa. La enzima se puede proteger de la inactivación si se añade fosfolactato (un inhibidor competitivo), lo que sería un indicador de que el fosfoenol-3-bromopiruvato forma un complejo en el sitio activo previo a la inactivación de la enzima. Al parecer se puede concluir que el fosfoenol-3-bromopiruvato es un inactivador irreversible de la enzima con base en el mecanismo de reacción, debido probablemente a la conversión enzimática a 3-bromooxalacetato, que alquila la enzima, como se observa en la figura 1.32

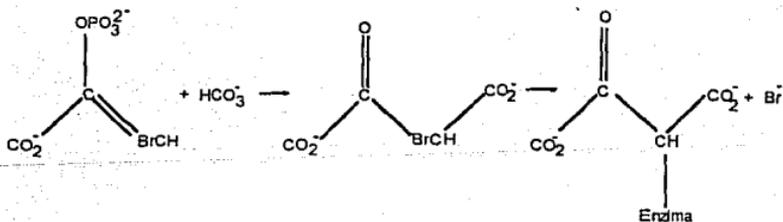


Figura 1.32 Mecanismo de inactivación por alquilación de la PEPC por el Z-bromo-fosfoenolpiruvato propuesto por O'Leary (5).

Aquí se observa que la enzima forma primero un complejo no covalente con el fosfoenol-3-bromopiruvato. Posteriormente, la enzima cataliza una carboxilación lenta de este compuesto mediante el HCO_3^- para formar 3-bromooxaloacetato. Este último debiera ser un compuesto alquilante muy reactivo, a diferencia del fosfoenol-3-

bromopiruvato que no es reactivo, y su reacción con la enzima ocurriría antes de que pudiera disociarse del sitio activo; de esta forma, se puede concluir que el fosfoenol-3-bromopiruvato es un sustrato "suicida" para la enzima.

Años más tarde, estos investigadores (35) publicaron un artículo donde añaden información y modifican su punto de vista. Ahora mencionan que la enzima se puede proteger de la inactivación no sólo por el fosfolactato, sino también por epoximalato. Señalan que también se puede impedir la inactivación de la enzima por la presencia de la enzima lactato deshidrogenasa (que cataliza la reducción del piruvato a lactato) y NADH, y durante este tratamiento se forma 3-bromolactato. Con base en lo anterior, concluyen que la PEPC cataliza la conversión del fosfoenol-3-bromopiruvato a bromopiruvato mediante el intermediario usual carboxifosfato-enolato, y que el bromopiruvato es la especie responsable de la inactivación de la enzima (ver más adelante).

No se conocen los factores que controlan la desviación del intermediario enólico hacia la hidrólisis, pero todos los sustratos hasta ahora conocidos, particularmente los sustituidos en el átomo C-3 (excepto el propio PEP y el *E*-fluro-PEP), sufren principalmente de hidrólisis. Dada la variedad de sustratos para los cuales ocurre esta reacción anormal, es probable que factores tanto estéricos como electrónicos controlen este fenómeno (35).

Finalmente, es importante destacar que la mayoría de los inhibidores competitivos de la PEPC se unen con mayor fuerza a la enzima (por un factor de 10) en presencia de Mn^{2+} que en presencia de Mg^{2+} (2,5,16,30-35,42); la excepción podría ser el fosfoenol-3-bromopiruvato, tomando en cuenta los primeros estudios de O'Leary y su grupo de trabajo. También se reporta (36) que el *E*-metil-fosfoenolpiruvato es menos eficiente como inhibidor competitivo en presencia de este catión.

ACTIVADORES E INHIBIDORES ALOSTÉRICOS DE LA PEPC.

Jenkins y colaboradores (4,43) reportaron la síntesis del análogo metil-2-dihidroxi-fosfinoilmetil-2-propenoato, cuya estructura química se muestra en la figura 1.33.

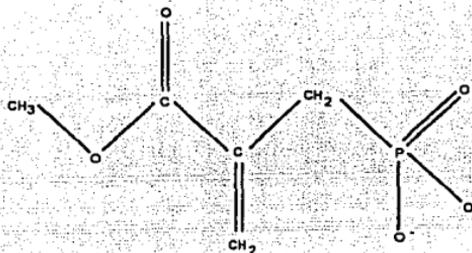


Figura 1.33. Estructura química del metil-2-dihidroxi-fosfinoilmetil-2-propenoato.

Este compuesto actúa como activador (en presencia de Mg^{2+} con una $K_a = 320 \mu M$, y en presencia de Mn^{2+} más efectivamente con una $K_a = 130 \mu M$) de la PEPC en las plantas C_4 , algo de hecho raro por tratarse de un compuesto no fisiológico. Estos investigadores sugirieron que dicho compuesto interactúa con un sitio alostérico en la enzima induciendo un cambio conformacional. Proponen que la enzima posee sitios de unión al PEP tanto catalíticos (activos) como reguladores (alostéricos) estructuralmente similares, y que este compuesto se une preferentemente al sitio regulador. Hay que resaltar que esto puede relacionarse con el hecho de que el inhibidor podría no unirse muy bien al sitio activo debido a su naturaleza dianiónica, en contraposición a la naturaleza trianiónica del PEP. Es de destacar, sin embargo, que este activador no tiene ninguna similitud estructural con los metabolitos fisiológicos que se sabe son activadores de la enzima: glucosa-6-fosfato (2,5,6), glicina (5,6,20) y 3-fosfoglicerato (44).

También se ha encontrado (36) que el análogo *E*-metil-fosfoenolpiruvato actúa como activador en presencia de Mn^{2+} , lo que podría indicar su interacción con otro sitio en la enzima similar estructuralmente al sitio activo.

Dos análogos del intermediario de reacción propuesto (carboxifosfato), acetilfosfato y carbamilfosfato, que supuestamente debieran unirse al sitio de unión del HCO_3^- en la enzima provocando su inhibición, resulta que también activan a la PEPC (46). El carbamilfosfato, sin embargo, también actúa como inhibidor ($K_i = 700 \mu M$) a altas concentraciones combinado con bajas concentraciones de PEP, siendo hidrolizado

por la enzima con un mecanismo de reacción relacionado con aquél de otros inhibidores ya descritos, y requiriendo de los mismos cationes que el PEP para ejercer su acción. Esto implica que este compuesto podría actuar como un isómero del PEP (es el único compuesto no relacionado con el PEP que se sabe que actúa como sustrato para la PEPC), interactuando con el sitio activo por medio de su grupo fosfato (aunque también podría deberse a que posee el oxígeno del puente C-O-P y un ángulo de enlace en el átomo de carbono parecido al ángulo de enlace del átomo C-2 en el PEP). Es de destacar que la constante de inhibición de este compuesto es dos órdenes de magnitud más grande que las de otros análogos al PEP (como el Z-fosfoenol-3-bromopiruvato) y un orden de magnitud más grande que las del fosfolactato y fosfoglicolato; esta diferencia podría explicarse por la falta del grupo carboxílico. De hecho, al parecer los residuos de histidina involucrados en la unión al PEP parecen no participar en la unión del carbamilsfosfato; estos residuos podrían interactuar con un grupo del PEP diferente del fosfato (como el grupo carboxílico). Finalmente, dado que el carbamilsfosfato actúa como sustrato y activador de la enzima, todo puede ser también un indicio de que existe una gran similitud entre el sitio activo y el sitio alostérico activador.

Se ha reportado (45) que el fenilfosfato, también un análogo estructural del PEP, es un activador de la PEPC. Se menciona igualmente, tras estudios cinéticos, que existe un sitio regulador específico para el PEP libre, al cual los iones Mg^{2+} no pueden unirse, y que permite que por acción del PEP (a concentraciones subsaturantes del sustrato) la enzima se active.

Todos estos resultados, en cierta medida inesperados, indican que en la PEPC existe un sitio activador que está relacionado estructuralmente con el sitio activo y donde se unen muchos ésteres de fosfato, como glucosa-6-fosfato, fructosa 1,6-bisfosfato, 3-fosfoglicerato, acetilfosfato y carbamilsfosfato (46), así como el propio PEP (45). La presencia de fosfatos en todos los activadores de la PEPC puede ser un indicio de que es ésta estructura la responsable de sus efectos. El estudio de análogos al PEP que sean activadores puede ser, por lo tanto, útil para identificar y caracterizar el sitio regulador para el PEP (45).

Esto se puede relacionar con el hecho de que la PEPC presenta cooperatividad homotrópica positiva para la unión del PEP, y al parecer esto es resultado de la

existencia de varios sitios catalíticos y/o la existencia de uno o más sitios reguladores alostéricos diferentes al sitio activo y que pueden unir al PEP (45).

Lowe y Slack (47) describieron que el oxaloacetato actúa como inhibidor no competitivo de la PEPC en concentraciones fisiológicas. Explican que esta inhibición podría funcionar *in vivo* para prevenir la acumulación de oxaloacetato cuando la disponibilidad de PEP para la reacción de carboxilación excede aquella del NADPH para la reducción del oxaloacetato. También Huber y Edwards han reportado (48) que el aspartato y el malato actúan como un inhibidor no competitivo de la PEPC y dicho efecto depende de la presencia de Mg^{2+} . Proponen que estos dos compuestos pueden permitir el balance en las velocidades de los ciclos de Calvin y C_4 al inhibir a éste último cuando las concentraciones de los ácidos de dicho ciclo son muy altas.

Dentro de esta reseña histórica conviene mencionar que Wirshing y O'Leary (49) sintetizaron y caracterizaron enzimáticamente al compuesto Z-3-(fluorometil)-fosfoenolpiruvato, cuya estructura química se muestra en la figura 1.34. Encontraron que este compuesto es capaz de inactivar a la PEPC, siendo al parecer el 2-oxo-3-butenolato la especie responsable de este fenómeno. Dado que inhibidores competitivos, como el fosfolactato, no impiden que ocurra esta inactivación, es probable que ésta no se lleve a cabo en el sitio activo. No se encontraron evidencias de que el compuesto sea sustrato de la enzima.

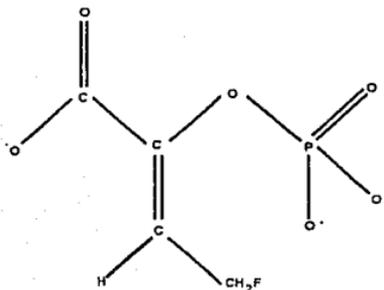


Figura 1.34. Estructura química del Z-3-fluorometil-fosfoenolpiruvato

O'Leary (17) describe también que el malato es un inhibidor ($K_i = 10,000 \mu\text{M}$) no competitivo de la PEPC del maíz. Igualmente el epoximalato es un excelente inhibidor no competitivo ($K_i = 40 \mu\text{M}$). Las estructuras de estos compuestos se muestran en la figura 1.35.

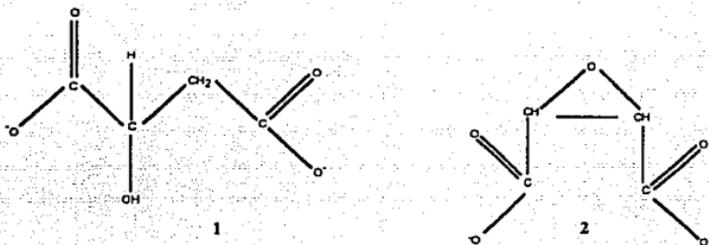


Figura 1.35. Estructuras químicas de dos inhibidores no competitivos: (1) Malato y (2) Epoximalato.

Según este último autor, existe un "sitio para malato" al que tanto el malato como el epoximalato se pueden unir. Esto lo concluye a partir de estudios con el 3-bromopiruvato, el cual es un inhibidor irreversible de la enzima. Si se incubaba la enzima con este compuesto en presencia de Mn^{2+} , se presenta una inactivación gradual de la enzima. El fosfolactato (inhibidor competitivo) no protege a la enzima contra esta inactivación, pero el malato y el epoximalato sí reducen significativamente la velocidad de inactivación. La falta de protección del fosfolactato y la protección por malato y epoximalato sugieren que el 3-bromopiruvato reacciona en el "sitio para malato", al parecer de manera no covalente.

Con respecto a lo anterior, González *et al* (2,7) difieren en sus estudios, ya que reportaron que el 3-bromopiruvato es un inhibidor competitivo reversible de la PEPC ($K_i = 2300 \mu\text{M}$), y que es capaz de inactivar completa e irreversiblemente a la enzima si se le incubaba con ésta, al parecer por una unión inicial con un grupo sulfhidrido de la enzima para formar un complejo reversible enzima-bromopiruvato, para luego alquilar

a la enzima. Mencionan igualmente que la inactivación se puede prevenir mediante el sustrato PEP, con y sin Mg^{2+} , con el inhibidor competitivo fosfoglicolato, y con malato (a pH de 7, pero no de 8, donde actúa como inhibidor no competitivo (2)). La glucosa-6-fosfato no tiene efecto protector. El Mg^{2+} puede incrementar la inactivación (a pH de 7), al disminuir la constante de disociación del complejo formado entre el bromopiruvato y la enzima. Reportan también que estudios de inactivación en función del pH revelan que dos grupos con un pK_a cercano a 7.5 son importantes para la unión de este compuesto a la enzima, siendo probable que se trate de grupos imidazólicos. Finalmente explican que el 3-bromopiruvato modifica residuos de cisteína en el sitio activo de la enzima, pues la enzima inactivada tiene menos grupos sulfhidrilo que la enzima nativa. Al parecer, la inactivación se inicia con la formación rápida de un complejo no covalente entre el inhibidor y un grupo catiónico en el sitio activo de la enzima, seguido de la alquilación lenta de la proteína.

COMENTARIOS ADICIONALES.

A lo largo de la presente introducción al tema de nuestra tesis, hemos hecho hincapié en la existencia de una serie de compuestos químicos análogos estructurales al PEP, sustrato principal de la PEPC. Como se ha mencionado, todos estos compuestos, algunos inhibidores y otros activadores, han sido caracterizados (en particular los inhibidores competitivos) en cuanto a su actividad biológica moduladora de la actividad de la PEPC, lo que ha revelado, de hecho, que el asunto de sus mecanismos de acción por medio de la interacción con sitios específicos en la enzima es bastante complejo. Al parecer, con excepción de los inhibidores competitivos que se sabe se unen al sitio activo, no se puede clasificar claramente a los inhibidores (no competitivos) y activadores en grupos con base en el lugar en el que interactúan en la enzima. Esto impide buscar regularidades y tendencias en sus propiedades moleculares intrínsecas que expliquen su actividad y/o den información confiable del sitio de unión con el que interactúan. Otra cuestión importante que surge es el explicar qué factores estructurales son los que determinan que un compuesto análogo al PEP tenga actividad activadora o inhibitoria en o fuera del sitio activo. Al final de nuestra tesis incluimos algunos comentarios en este sentido.

El presente trabajo es el resultado de una primera aproximación al problema de identificar las propiedades intrínsecas de los inhibidores competitivos que sean las

responsables de sus distintos grados de actividad como resultado de la forma y fuerza de unión al sitio activo, por el cual compiten con el PEP. Para poder realizar este estudio, es preciso adentrarse en los conceptos, metodologías y tendencias de investigación de lo que se conoce como *relaciones cuantitativas estructura-actividad*, que es nuestro siguiente tema.

RELACIONES CUANTITATIVAS ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

GENERALIDADES

Para el comienzo de la década de los sesentas, los científicos ya habían encontrado varios parámetros relevantes para las relaciones entre las propiedades físicas y las propiedades biológicas de las moléculas. Primero se detectó la importancia de la hidrofobicidad, medida a través del coeficiente de partición, en la potencia de muchos fármacos. Posteriormente se puso de manifiesto que otras propiedades fisicoquímicas también estaban relacionadas con la actividad de compuestos químicos, como es el caso del pK_a , el potencial de óxido-reducción, la formación de complejos con metales, parámetros cromatográficos (R_f), intensidades y frecuencias de absorción en espectros de infrarrojo y ultravioleta, potenciales polarográficos de media onda, densidades electrónicas, momento dipolar, polarizabilidad electrónica, actividad superficial, desplazamientos químicos en espectros de resonancia magnética nuclear, índices de conectividad y topológicos, etc. Se puede decir que el único obstáculo inmediato era el definir los parámetros significativos de la estructura química en términos numéricos. Se logró otro avance significativo en el estudio de los factores electrónicos con la formulación de Hammett de sus constantes numéricas (σ) para medir el efecto electrónico de los sustituyentes. Su idea la desarrolló brillantemente Taft, quien definió constantes σ alifáticas y constantes E_s estéricas y demostró cómo σ puede ser factorizada en componentes inductivas y de resonancia. Posteriormente se han desarrollado otros métodos que han permitido un análisis topológico (conectividad de la unión entre los átomos), topográfico (relación espacial entre porciones moleculares) y subestructural de los compuestos químicos con actividad biológica.

Para iniciar este tema se hace preciso distinguir entre la *actividad intrínseca* de un compuesto, que se refiere a su actividad una vez que llega a su sitio de acción (que se presume se debe a la interacción entre una porción estructural primordial del compuesto con un sitio receptor), y su *potencia*, que típicamente en farmacología se refiere al resultado fisiológico global final de su acción (50). Para el caso de compuestos que tengan un mecanismo de acción que involucre una interacción estereoespecífica con un receptor, su actividad intrínseca está regida por una

combinación de factores topológicos y/o topográficos (que incluye sus conformaciones moleculares) y su estructura electrónica (como es el caso de la distribución de carga y otras cantidades asociadas o derivadas de ella); por otro lado, su potencia estará regida por una combinación de su capacidad de llegar al sitio de acción (en general regulado por la lipofilicidad, para compuestos que tienen que atravesar barreras lipídicas) y su actividad intrínseca. Para el caso de compuestos que tengan un mecanismo de acción que no involucre interacciones con receptores, la actividad intrínseca se rige en general por una propiedad fisicoquímica específica, y la potencia se rige por una combinación de su actividad intrínseca y su capacidad para llegar al sitio de acción (la lipofilicidad puede regular ambas actividades biológicas para estos casos).

Los métodos empleados en el estudio de relaciones cuantitativas estructura-actividad o *QSAR* (siglas en inglés de *Quantitative Structure-Activity Relationships*) se caracterizan por tener dos premisas con respecto a la relación entre la estructura química y la actividad biológica de un compuesto (51). La primera consiste en que uno puede obtener una medida cuantitativa de la estructura de aquellas propiedades locales o globales de significado para la actividad biológica del compuesto. Las propiedades son típica y usualmente fisicoquímicas (como el pK_a o el coeficiente de partición) o subestructurales (como la presencia o ausencia de ciertos grupos químicos). La otra premisa es que uno puede describir estadísticamente la relación entre la propiedad biológica en estudio y las propiedades moleculares calculadas a partir de la estructura. En otras palabras, las dos características de los métodos de *QSAR* son:

- (1) Contienen un método para representar la estructura química de un compuesto con una serie de descriptores numéricos de las propiedades relevantes para la actividad biológica.
- (2) Permiten establecer una relación cuantitativa entre estos descriptores y las propiedades biológicas de los compuestos.

Como podemos observar, la contribución del *QSAR* no radica tanto en reconocer que existe una relación entre las propiedades fisicoquímicas y las biológicas de las moléculas, sino más bien en cómo descubrir, cuantificar y evaluar las posibles relaciones.

El método de *QSAR* más popular es el método extratermodinámico de Hansch, o de relaciones lineales de energía libre (50-61). Esta aproximación se fundamenta en la hipótesis de que el efecto de los sustituyentes en las constantes de velocidad o de

equilibrio químicos se pueden describir por medio de términos relacionados con la energía libre que expliquen contribuciones por factores hidrofóbicos, electrostáticos, estéricos (repulsión) y de dispersión. Esto se podría sucesivamente relacionar con la fuerza de interacción entre un compuesto y su receptor (u otras biomoléculas) como una combinación aditiva de los efectos de los sustituyentes.

Se supone que el efecto de los sustituyentes en estas interacciones no covalentes (sin formación de enlaces) es proporcional a la combinación aditiva de los valores de las constantes de Hammett (σ), Taft (E_s), Hansch (π), y refractividad molar (MR) de los sustituyentes. La constante σ de Hammett de un sustituyente es el logaritmo del efecto de dicho sustituyente en la constante de disociación del ácido benzoico, y es una medida de los efectos electrónicos. La constante E_s de Taft se obtiene experimentalmente de las velocidades relativas de hidrólisis de ésteres. Para sustituyentes esféricamente simétricos es proporcional al radio del sustituyente, constituyendo así una medida de los factores estéricos. La constante π de Hansch representa el efecto del sustituyente en el logaritmo del coeficiente de partición P octanol/agua, y por tanto mide los efectos hidrofóbicos. La refractividad molar se obtiene del índice de refracción, y parametriza las interacciones de dispersión (debida a la polarizabilidad de los átomos). La proporcionalidad descrita se expresa matemáticamente por medio de la ecuación de Hansch:

$$\log(1/C) = a + b\pi + cE_s + dMR + e\sigma$$

El término $\log(1/C)$ se refiere a la potencia relativa del compuesto análogo, donde C es la concentración requerida para producir una respuesta biológica estándar. Los valores de los coeficientes a , b , c , d y e se obtienen por un análisis de regresión múltiple. El empleo apropiado de métodos estadísticos para demostrar la existencia de relaciones entre propiedades fisicoquímicas y actividad biológica es muy importante, pues permite aceptar o rechazar relaciones aparentes, detectar errores y comparar entre sí relaciones de propiedades físicas con la actividad. Aun más, el hecho de tratarse de regresión múltiple significa que se considera la posibilidad de que sea más de una propiedad física la responsable de la actividad biológica. El método estadístico de regresión múltiple provee una medida de (1) si cada coeficiente es significativamente diferente de cero; (2) el valor del parámetro r^2 , que es la fracción de la variación en las observaciones que explica la ecuación; (3) el valor de s , que es la desviación estándar

de los valores de $\log(1/C)$ observados de aquéllos calculados; y (4) la prueba F , que es una medida de la probabilidad (p) de que la correlación encontrada se deba al azar. Para la parte estadística del análisis de *QSAR*, se examinan las posibles ecuaciones de los datos para encontrar aquéllas que contengan únicamente términos estadísticamente significativos que tengan sentido físico y que no "sobreajusten" los datos. En este respecto son muy importantes las observaciones de Klopman (62) en el sentido de que las correlaciones multiparamétricas donde existe un número muy alto de variables independientes con respecto al número de observaciones (compuestos) pueden dar como resultado modelos que reproduzcan bien las tendencias del grupo de datos analizados, pero que carezcan de valor estadístico (aún cuando tengan un valor aceptable del coeficiente de correlación) debido al alto número de grados de libertad, por lo que la correlación puede deberse únicamente al azar. Además, se presenta el problema de la colinealidad de las variables, por lo que el número efectivo de variables independientes es menor; si la ecuación del modelo final tiene variables muy correlacionadas, es probable que no se haya logrado obtener una correlación única. Un criterio que se puede seguir cuando se tiene un alto número de parámetros con respecto a las observaciones, es que el valor de la prueba F que se obtiene para el modelo obtenido debe ser considerablemente mayor que el valor correspondiente a otro modelo obtenido cuando se han redistribuido al azar los valores de las variables dependientes entre las distintas observaciones.

Una de las primeras observaciones en *QSAR* fue que la relación entre la actividad y el $\log P$ no es necesariamente lineal. Se han encontrado muchas ecuaciones parabólicas para $\log P$ o π , es decir, que contienen términos cuadráticos, lo que lleva a la existencia de valores óptimos del $\log P$ ($\log P_0$) para la actividad:

$$\log(1/C) = a + b_1\pi + b_2\pi^2 + cE_s + dMR + e\sigma$$

Un hecho importante con respecto a la existencia de un $\log P$ óptimo (57,59,63) para una cierta actividad farmacológica es que ésta última puede depender de factores farmacocinéticos (como absorción y distribución) en sistemas *in vivo*, o de la presencia de lípidos ajenos, el pH y el pK_a en el caso de sistemas *in vitro*. Esto puede deberse igualmente al hecho de que al aumentar el $\log P$ llega un momento en que la afinidad de un compuesto por la fase lipídica (como una membrana biológica) es tal que de

hecho impide que salga de ésta una vez que la penetra, reduciendo la concentración del compuesto en la fase acuosa subsiguiente e impidiendo que llegue a su sitio de acción.

Hay que mencionar que también se han presentado casos donde existe una dependencia parabólica para interacciones ligante-receptor *in vitro* para π y MR , que se puede entender en términos del tamaño limitado de sitios hidrofóbicos o polares de unión, o de un incremento en el impedimento estérico para la unión.

El empleo actual de este método incluye la posibilidad de que la actividad biológica dependa no necesariamente del $\log P$ o MR global, sino de π o MR en un sitio específico de la molécula. El empleo de tales descriptores específicos de sitio concuerda muy bien con el análisis de ensayos bien caracterizados de unión a receptores para mapear dichos sitios de unión, así como con el tratamiento de estereoisómeros (que implica distinguir sustituyentes con la misma relación estereoquímica que el bióforo de aquéllos con la relación opuesta). Aquí es importante mencionar que en los sitios receptores pueden existir regiones aniónicas, catiónicas, ácidas, básicas o neutras, las cuales, junto con la forma física del sitio receptor, determinan el tipo de interacciones y los requerimientos espaciales de los ligantes (53).

Existe una gran cantidad de estudios de correlaciones estructura-actividad donde se emplea el método de Hansch (59,64-70) para actividades farmacológicas *in vivo* y actividades bioquímicas *in vitro*.

Casi simultáneamente con el surgimiento del método de Hansch fue publicado el método de Free-Wilson. En este procedimiento las moléculas no se describen en términos de propiedades fisicoquímicas, sino más bien mediante un conjunto de indicadores o variables que denotan exclusivamente la presencia o ausencia de ciertos grupos químicos. La premisa que antecede a este método es que al añadir un sustituyente dado en una posición en particular en la molécula, se obtiene siempre un efecto cuantitativamente similar en la actividad biológica del resto de la molécula. Esto es equivalente a decir que la actividad biológica es la suma de las contribuciones a la misma por parte de cada sustituyente en la molécula. Este enfoque se puede describir matemáticamente mediante la ecuación siguiente:

$$\log(1/C) = x + \sum_{ij}^{mn} a_{ij} G_{ij}$$

En esta ecuación, i es el número de la posición del sustituyente, j es el número de sustituyentes en dicha posición particular, m es el número total de posiciones para sustitución y n es el número de sustituyentes. El valor del término a_{ij} indica la presencia (1, j) o ausencia (0, j) del sustituyente ij . Los valores de contribución de grupo G_{ij} se obtienen por análisis de regresión múltiple.

Este método sólo puede ser utilizado para series de compuestos con múltiples sitios de sustitución y sólo si cada sustituyente que se presente en cualquier posición está presente en dicha posición en cuando menos dos compuestos de la serie. En algunos casos, las contribuciones de grupo se han correlacionado con las propiedades fisicoquímicas de los sustituyentes. El método tiene la ventaja de que no se requieren propiedades fisicoquímicas de los compuestos y tiene la desventaja de que no se pueden hacer predicciones con base en dichas propiedades. No puede ser ajustado a un conjunto de datos si existe un valor óptimo para alguna propiedad global, ya que entonces la premisa de que los sustituyentes en cada posición contribuyen de manera independiente no puede sostenerse.

Existen ecuaciones híbridas de Hansch/Free-Wilson, donde se añaden a la ecuación de Hansch variables indicadoras que describen la presencia o ausencia de ciertos grupos (incluso aceptores de enlaces de hidrógeno) en la molécula. Estas variables indicadoras cuantifican aquel efecto de los sustituyentes sobre la actividad biológica que no puede atribuirse a las propiedades fisicoquímicas consideradas. En aquellos casos en los cuales la medición biológica es la unión a un receptor, los coeficientes de las variables indicadoras miden el acoplamiento al receptor sin las complicaciones debidas a las diferencias en la unión debido a variaciones en las propiedades fisicoquímicas, ya que se han eliminado estadísticamente.

Una característica fundamental de los métodos de QSAR descritos es que son relativamente rápidos y fáciles de usar. Los recursos y el tiempo de cómputo y personal son al menos uno y probablemente dos órdenes de magnitud menores que aquéllos que se requieren para análisis de estructura-actividad mediante métodos

químico-cuánticos, conformacionales o de modelado molecular gráfico. Por estas razones, los métodos de QSAR se emplean con facilidad en la química farmacéutica, la toxicología y la bioquímica, mientras que los otros métodos no se utilizan tanto.

VARIABLES FISICOQUIMICAS DEL MODELO DE HANSCH

Los tres factores físicos más importantes que afectan la actividad biológica son el tamaño y forma molecular, la disociación, la distribución de carga y la solubilidad. Una molécula puede ser muy grande para ser absorbida, transportada o translocada apropiadamente. En el caso de unión a receptores, dicha interacción depende críticamente de la arquitectura tanto del ligante como del sitio receptor. Se ha postulado (53) que para que un sustrato se combine efectivamente con su enzima (receptor), además de tener la conformación apropiada, deben existir la estereocompatibilidad apropiada y una adaptación mutua en lo que concierne a forma y distribución de carga. Para el caso de fármacos liposolubles, éstos generalmente atraviesan las membranas celulares al disolverse en ellas y pasan a la fase acuosa intracelular. Muchos fármacos son electrolitos orgánicos débiles, presentes en dos formas en equilibrio y de las cuales sólo la forma no disociada es liposoluble. Por lo tanto, los compuestos solubles en agua que se disocian por completo o que tienen formas no ionizadas no liposolubles, se absorben muy pobremente. De hecho todas las características estructurales moleculares (distancias interatómicas, conformación geométrica y estereoquímica, rigidez y flexibilidad, distribución de carga, etc.) son factores que influyen en la actividad biológica, por lo que se hace necesario un esquema que permita separar las contribuciones de cada uno de ellos.

El trabajo de Hammett y sus sucesores (56) se inició cuando consideraron la posibilidad de obtener conclusiones acerca de los requerimientos electrónicos y estéricos de una reacción dada a partir del análisis de las perturbaciones que sufre un centro de reacción como resultado de la presencia de distintos sustituyentes. Hammett fue el primero en demostrar que es posible predecir los valores de pK_a de los ácidos benzoicos sustituidos como función de la capacidad de los distintos sustituyentes unidos al anillo benzenoico de donar o atraer electrones del grupo carboxilo. Fue capaz de extender estos resultados a otras reacciones y otras series de compuestos al utilizar las mismas constantes de sustituyentes que había obtenido de la serie de ácidos benzoicos. En 1935 se propuso la definición de la *constante de Hammett* σ :

$$\sigma = \log K_X - \log K_H$$

donde K_H es la constante de disociación del ácido benzoico en agua a 25°C y K_X es la constante de disociación para el derivado *meta*- o *para*-sustituído en las mismas condiciones experimentales. Valores positivos de σ indican que el sustituyente es *electroatrayente* en el anillo aromático (como un grupo nitro) y valores negativos de σ indican que el sustituyente es *electrodonador* (como un grupo metoxi). La tan famosa ecuación de Hammett se expresa como:

$$\log k_X = \rho\sigma + \log k_H$$

donde k puede ser una constante de velocidad o de equilibrio para un centro de reacción normalmente aislado de interacciones por resonancia con el anillo aromático. La pendiente ρ es una medida de la sensibilidad de tal reacción al efecto electrónico de X comparado con el efecto del sustituyente en la disociación de ácidos benzoicos donde, por definición, $\rho = 1.0$ en las condiciones ya descritas. La ecuación de Hammett establece que el efecto electrónico de los sustituyentes en la disociación de los ácidos benzoicos se puede emplear como un modelo del efecto de los sustituyentes en otros centros de reacción unidos a sistemas aromáticos. Dicha ecuación no es válida para sustituyentes en posición *orto* que ejercen un efecto estérico en el centro de reacción. Se considera asimismo que las constantes σ de distintos sustituyentes son aditivas.

Las constantes σ son dependientes de la posición, pues la σ para un sustituyente en posición *meta* (σ_m) es diferente de aquella para uno en posición *para* (σ_p). Asimismo se han determinado varias constantes σ secundarias para reacciones distintas a la disociación de ácidos benzoicos, así como para otros disolventes. Existe una considerable variación en las σ determinadas en sistemas distintos, por la influencia del ambiente químico de cada sistema.

Cuando los efectos electrónicos de un sustituyente en un sistema de reacción son análogos a su efecto en el ácido benzoico, se encuentran excelentes correlaciones con las constantes σ simples de Hammett, pero hay varias instancias donde la ecuación de Hammett falla. Cuando los centros de sustitución y de reacción están en contacto (como con un sustituyente en *orto*), los efectos estéricos provocan desviaciones. La principal causa de variación ocurre cuando los sustituyentes se hallan directamente

conjugados con el centro de reacción, pues dichas interacciones pueden facilitar o impedir grandemente la formación del estado de transición. Se han definido constantes σ^- que son de mayor magnitud que las σ normales debido a que se calcularon con base en sistemas con grupos que tienen pares libres conjugados por resonancia que facilitan que los sustituyentes puedan atraer con mayor facilidad los electrones del sistema aromático, como es el caso de fenoles o anilinas sustituidas. Tales interacciones por resonancia no son importantes para sustituyentes no conjugados (como aquéllos en posición *meta*), y para ellos su σ^- es aproximadamente igual a σ . Se definió también el parámetro σ^+ con una magnitud menor que la σ estándar debido a que se calculan en sistemas donde existe una carga positiva deslocalizada entre el sustituyente y el centro de reacción, lo que facilita la donación de electrones por parte del sustituyente. Para este caso se tiene que la σ^+ es aproximadamente igual a σ_p para sustituyentes electroatrayentes. Finalmente podemos mencionar la creación de la constante σ^0 para sistemas donde el centro de reacción y los sustituyentes están aislados de interacciones por resonancia, como es el caso de los ácidos fenilacéticos sustituidos.

Taft contribuyó de forma importante al definir la *constante inductiva (polar) σ^** :

$$\sigma^* = \frac{1}{2.48} \left[\log\left(\frac{k_X}{k_H}\right)_B - \log\left(\frac{k_X}{k_H}\right)_A \right]$$

En esta ecuación, k_X es la constante de velocidad para la hidrólisis de ésteres del tipo $X\text{-CH}_2\text{COOR}$ y k_H es la constante de velocidad de hidrólisis para la molécula donde $X=H$. *B* se refiere a la hidrólisis en condiciones básicas mientras que *A* se refiere a la hidrólisis en condiciones ácidas. La premisa subyacente en esta ecuación es que la velocidad de hidrólisis básica depende de los efectos inductivos y estéricos de *X*, mientras que la hidrólisis ácida sólo es influida por los efectos estéricos de *X* para llegar al estado de transición. Por lo tanto, la resta indicada en la ecuación deja solo al efecto polar de *X*. El principal problema con esto es que los estados de transición para ambos tipos de hidrólisis son obviamente diferentes en cuanto a la presencia de cargas y la forma en que están solvatados.

Se puede estudiar el efecto inductivo de los sustituyentes como el resultado de dos acciones: el efecto mediado a través de los enlaces químicos (efecto inductivo estático) y el efecto electrostático a través del espacio (efecto inductivo de campo); sin embargo, no ha sido posible encontrar la manera adecuada de separar ambos efectos.

Por otro lado, se han hecho estudios para separar el efecto inductivo (polar) de la componente de resonancia en los efectos electrónicos de los sustituyentes. Una posibilidad la constituyó la propuesta de Taft de considerar que la σ se podía ver como la suma de los efectos inductivos polares y de resonancia ($\sigma = \sigma_I + \sigma_R$), por lo que al conocerse σ_I , se podría calcular el efecto de resonancia como $\sigma_R = \sigma_P - \sigma_I$ ya que σ_P tiene una componente de resonancia mucho mayor que σ_m . Posteriormente se han definido constantes polares (ρ) y de resonancia (ρ') y otras variantes de ellas.

La repulsión por fuerzas estéricas es aquella que mantiene distancias apropiadas de contacto entre átomos vecinos. Se logró describir por primera vez con éxito el efecto estérico de los sustituyentes mediante la definición de la *constante de Taft* (E_s) (71):

$$E_s = \log\left(\frac{k_X}{k_H}\right)_A$$

donde k se refiere a la constante de velocidad de la hidrólisis ácida (A) para ésteres del tipo $X-CH_2COOR$. El tamaño del grupo X afecta la obtención del estado de transición por parte del agua. Esta definición, como ya vimos, asume que el efecto electrónico de los sustituyentes X se puede despreciar. Por lo tanto, $E_s = 0$ cuando $X = H$, es decir, cuando el grupo unido al éster es un metilo. La constante E_s es negativa para grupos que dificultan la hidrólisis. Se han introducido constantes de Taft corregidas con base en el número de hidrógenos presentes en el carbono α al éster ya que presumiblemente afectan la velocidad de hidrólisis mediante hiperconjugación.

Al parecer se ha encontrado una correlación entre E_s y el radio de van der Waals del sustituyente. Con base en esto, posteriormente se definió el parámetro estérico de Charton (v_X) sin tomar en cuenta ningún sistema de reacción:

$$v_X = r_{vX} - r_{vH}$$

donde r_{vX} es el radio mínimo de van der Waals para el sustituyente simétrico X y r_{vH} es el radio de van der Waals del hidrógeno.

El principal problema con la definición de los parámetros estéricos es que describen efectos en sistemas de reacción orgánicos que son mucho más simples que los

efectos que pueden haber en la interacción de compuestos químicos con receptores macromoleculares, por lo que la racionalización de los efectos estéricos en sistemas bioquímicos con estos descriptores es limitada. Se han hecho intentos por resolver esto mediante el cálculo de los requerimientos estéricos de un sustituyente con base en dimensiones espaciales definidas (radios de van der Waals, distancias y ángulos de enlace estándares, etc.).

El concepto de interacciones hidrofóbicas se fundamenta en la idea de que la presencia de estructuras apolares en el agua provoca que moléculas de ésta última rodeen laxamente a dichos solutos. Cuando los solutos recubiertos de estos cúmulos de agua se particionan a un disolvente no polar, se eliminan las moléculas de agua unidas débilmente. El incremento en la entropía resultante se ha considerado como la fuerza motora principal para el ΔG de procesos de transferencia de una fase acuosa a una no polar. Esta misma consideración se puede hacer para el caso de la interacción de un ligante con un receptor rodeado de moléculas de agua más o menos ordenadas (y por lo tanto en un estado de energía mayor que en solución libre), donde se liberan moléculas de agua con un cambio de energía proporcional a la energía de estabilización del complejo ligante-receptor formado.

Se ha utilizado siempre al $\log P$ como la medida natural de la hidrofobicidad de una molécula entera, pero se sabe que de hecho sólo ciertos sustituyentes en una molécula interactúan hidrofóbicamente con un biosistema dado. Se ha definido la *constante de Hansch* (π) para caracterizar la hidrofobicidad de los sustituyentes (59,60,61,72):

$$\pi_X = \log P_X - \log P_H$$

donde P_X es el coeficiente de partición del compuesto sustituido y P_H es el coeficiente de partición del compuesto padre. Un valor positivo para π indica que, relativo a H , el sustituyente favorece la permanencia en la fase orgánica, y un valor negativo de π indica que tiene un carácter hidrofílico con respecto a H .

Una contribución importante de Hansch y Fujita (51,52) es la de reconocer que el coeficiente de partición es una propiedad constitutiva aditiva, es decir, que puede ser calculada a partir de los valores de compuestos relacionados a partir de los valores π de

los sustituyentes involucrados o mediante el método de fragmentos desarrollado por ellos (72,56).

Aún existe confusión con respecto al papel que las fuerzas de van der Waals (incluyendo efectos estéricos y de atracción por dispersión) y las fuerzas hidrofóbicas tienen en las interacciones de compuestos orgánicos con enzimas (73). Todo parece indicar que estas fuerzas juegan un papel crucial en los procesos tempranos de reconocimiento ligante-receptor, antes de que intervengan los factores estereoelectrónicos. Al parecer, las fuerzas hidrofóbicas son de 10 a 100 veces más fuertes que las fuerzas de van der Waals que operan en ausencia de cualquier estructura inducida por una superficie en el agua. La magnitud de la interacción atractiva es pues función del grado de hidrofobicidad de la superficie. Por lo tanto, parece razonable que el $\log P$ (o π) y la *refractividad molar* MR permitan evaluar superficies puramente polares o hidrofóbicas. En este sentido, se afirma que los efectos electrónicos de los sustituyentes son aquéllos que modela la constante σ cuando es ortogonal (independiente) a π , y cuando MR también es ortogonal, representa los impedimentos estéricos y fuerzas de tipo van der Waals. En la interpretación del efecto hidrofóbico en interacciones ligante-proteína, se supone que éste es equivalente a la energía libre de desolvatación de un lado de una cadena (alifática, típicamente) y de una cantidad equivalente en la superficie de la proteína, por lo que se puede aproximar como equivalente a la cantidad de agua involucrada en la hidratación hidrofóbica de dicha cadena.

Un estudio inicial por Pauling y Pressman (56,74) sobre las interacciones de haptenos con anticuerpos macromoleculares sugiere que las fuerzas de dispersión tienen un rol clave y que éstas se pueden modelar por la refractividad molar de los sustituyentes. Destacaron que MR se relaciona con las fuerzas de dispersión de London entre moléculas neutras, las cuales son el resultado de la polarización de cada molécula en el campo eléctrico rápidamente cambiante que surge de las distribuciones instantáneas de los electrones y núcleos de otra molécula. Se describe esta relación mediante las siguientes ecuaciones:

$$E = \frac{-3\alpha_a\alpha_b}{2r^6} \cdot \frac{I_a I_b}{I_a + I_b}$$

$$MR = \frac{4\pi N\alpha}{3}$$

En la primera ecuación, E es la energía de cohesión entre dos átomos a y b , cuyas polarizabilidades están representadas por α , r es la distancia entre a y b e I es el potencial de ionización. En la segunda ecuación se muestra la relación entre MR y α y, por lo tanto, la relación entre MR y E ; N es el número de Avogadro.

Experimentalmente, MR se obtiene mediante la ecuación de Lorentz-Lorentz:

$$MR = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{MW}{d}$$

donde n es el índice de refracción, d es la densidad y MW es el peso molecular del compuesto. Dado que MR es una propiedad aditiva de las moléculas, se pueden obtener valores para fragmentos o sustituyentes.

No es tan simple la relación entre MR y E , ya que no es posible medir el potencial de ionización para los ligantes debido a que en general no se conoce la forma en que se unen a las macromoléculas y, de hecho, no es posible conocer el potencial de ionización para un sitio receptor desconocido; igualmente no se puede aproximar adecuadamente la distancia r . Pauling y Pressman propusieron que todos estos parámetros se tomaran como constantes y que el $\log K$ (donde K es la constante de unión) debiera de estar relacionado de forma aproximadamente lineal con MR .

Se acepta que un coeficiente positivo para MR en una ecuación de correlación sugiere una unión al receptor mediada por fuerzas de dispersión. Dicha unión podría producir un cambio conformacional subsiguiente en el sitio receptor que, de favorecer la unión, daría un coeficiente positivo para MR y, si no, un coeficiente negativo.

Otra posible interpretación del papel de MR en este tipo de correlaciones consiste en suponer que lo que esta constante modela es la interacción de grupos sustituyentes de un ligante (polares o apolares) con regiones polares del sitio receptor en procesos en los que el agua de solvatación, tanto del ligante como del receptor, no

se elimina por completo. Esta conclusión se ha obtenido con base en muchos estudios de correlaciones estructura-actividad donde se ha podido conocer la estructura del sitio receptor por medio de estudios cristalográficos de rayos X.

APORTACIONES Y LIMITACIONES DEL QSAR

El principal objetivo de establecer relaciones cuantitativas estructura-actividad radica en predecir la actividad biológica de nuevos compuestos antes de que éstos sean siquiera sintetizados. Esto convierte al QSAR en un arma muy potente de la farmacia y la bioquímica, pues hace innecesario pasar por las a menudo difíciles etapas de síntesis de nuevos compuestos químicos, los cuales muchas veces resulta que no poseen las propiedades biológicas que se desean y se convierten en una pérdida de tiempo y recursos. Basta recordar aquí que se ha estimado que se consigue encontrar un fármaco útil de entre 200,000 compuestos nuevos. Ahora se busca sintetizar sólo aquellos compuestos cuya actividad biológica (y por lo tanto, utilidad) ya ha sido estimada previamente.

Un logro importante del QSAR, ligado al punto anterior, está en el diseño de mejores series de compuestos químicos para incrementar la posibilidad de que los análogos estudiados revelen alguna correlación estructura-actividad (51,52). Esta planeación resulta en una alta probabilidad de encontrar una combinación de propiedades que permitan optimizar la actividad. Los análogos deben variar sustancialmente en cada una de las propiedades propuestas como importantes para la determinación de la actividad. La variación en cada propiedad debe ser independiente de la variación de otras propiedades. Aquí es muy importante tomar en cuenta que al diseñar una serie es importante minimizar la colinealidad de los parámetros elegidos (se mide a través de la matriz de correlación cuadrática), maximizar la variancia de los datos que se explican y mapear el espacio de sustituyentes con el menor número de compuestos químicos. Por supuesto, no deben perderse de vista las dificultades involucradas en la síntesis de compuestos químicos, con el fin de no disminuir la eficiencia en la investigación. Estas estrategias y criterios para el diseño de series de compuestos también pueden aplicarse para probar hipótesis fundamentadas en propiedades conformacionales, químico-cuánticas o subestructurales.

Uno de los conceptos importantes en química farmacéutica es que ciertos pares de sustituyentes pueden ser bioequivalentes o *bioisotéricos* (51-53), ya que los compuestos que los poseen tienen el mismo tipo (e incluso el mismo grado) de efecto biológico. Durante muchos años el bioisoterismo fue una idea cualitativa e intuitiva, pero las parametrizaciones de *QSAR* de los sustituyentes permiten cuantificar ahora dicha similitud.

Se considera frecuentemente que las moléculas que interactúan con receptores (como fármacos e inhibidores enzimáticos) consisten de dos partes: un bioforo (o farmacóforo al hablar de fármacos) que interactúa directamente con el receptor, y regiones accesorias que se pueden modificar estructuralmente sin destruir la interacción esencial con el receptor (tales modificaciones, sin embargo, sí modifican la fuerza de dicha interacción). Por lo tanto, si las sustituciones ocurren en regiones accesorias de la molécula o si al menos todos los análogos se unen en una orientación comparable, es posible derivar un *QSAR* de la interacción molécula-receptor. Este *QSAR* permitiría describir en términos cuantitativos las fuerzas involucradas en dicha interacción y proveer, de manera indirecta, información sobre la topología del receptor. Esto se relaciona con la teoría (53) de que en la superficie de las enzimas existen sitios de una cierta conformación, espaciamiento y afinidad química (sitios activos), tales que cualquier molécula que tenga una forma que sea la imagen complementaria del sitio receptor en la enzima y que tenga los grupos químicos adecuados, puede interactuar con la enzima. Así por ejemplo, se acepta que los parámetros hidrofóbicos convencionales dan información acerca de las regiones polares e hidrofóbicas de la superficie de las proteínas (73); se encuentra que los átomos de carbono son hidrofóbicos, mientras que los átomos de oxígeno y nitrógeno son hidrofílicos. Al parecer, una contribución positiva de la refractividad molar se correlaciona con la presencia de grupos de polaridad intermedia, como es el caso de átomos de carbono unidos a grupos electroatrayentes (lo que reduce su hidrofobicidad), o bien puede indicar que los sustituyentes permiten una mejor ubicación del ligando en el receptor; por otro lado, una contribución negativa es señal de impedimento estérico, ya sea directo o a través de un cambio conformacional en el receptor (75).

La combinación de cálculos de *QSAR* con análisis de difracción de rayos X de biorreceptores ha resultado ser muy útil (69,73). La estructura cristalina detallada del sitio de unión propuesto revela qué regiones son hidrofóbicas, cuáles están ionizadas, y cuáles están abiertas. Un *QSAR* exitoso, por otro lado, puede sugerir en qué posiciones

de la molécula un aumento de la hidrofobicidad incrementa la unión, cómo los cambios en la fuerza de puentes de hidrógeno potenciales afectan la unión, etc. Con el empleo de las modernas y sofisticadas gráficas por computadora es posible integrar ambos tipos de información. Para ciertas series de compuestos, puede ser necesario integrar las consideraciones conformacionales y/o los cálculos de energía potencial en la simulación del acercamiento del compuesto al receptor. Esta aproximación combinada resulta ser la manera más adecuada de corregir la frecuente deficiencia del *QSAR* para tomar en cuenta la forma tridimensional de las moléculas. La visión de la interacción molécula-receptor puede ser de utilidad para decidir qué parámetros electrónicos son importantes.

Otra aportación del *QSAR* consiste en la factibilidad de desarrollar modelos cuantitativos y predictivos de los diferentes procesos farmacocinéticos (como son absorción, distribución, biotransformación y eliminación), que tradicionalmente se ha pensado que son menos sensibles a la influencia de la estructura molecular que las interacciones con un receptor (51).

A pesar de todo, puede ocurrir que una ecuación de *QSAR* no logre predecir adecuadamente la actividad de un análogo nuevo (51). Una falla sería puede presentarse cuando la propiedades físicas sobre las cuales se fundamentó la predicción no son las que verdaderamente determinan la actividad. Sin embargo, los problemas de predicción pueden también deberse al menos a tres situaciones prevenibles:

- (1) La predicción se basó en una serie de compuestos mal diseñada o en una ecuación inválida o ambigua.
- (2) Se realizó una extrapolación por fuera de los intervalos de las propiedades físicas representadas por los sustituyentes originalmente estudiados.
- (3) Las condiciones de las pruebas biológicas eran diferentes.

El *QSAR* presenta sin duda varias limitaciones, en general debidas a la falta de un procedimiento absoluto para describir las moléculas, pues en realidad no es sencillo transformar una estructura tridimensional en un conjunto de números que describan la afinidad potencial por un receptor y la habilidad para desencadenar un evento bioquímico, así como la afinidad por los diferentes sistemas de transporte activo y pasivo que un compuesto (típicamente un fármaco) debe atravesar. El origen de esta dificultad radica en la falta de un entendimiento fundamental de cómo describir cuantitativamente los efectos de los sustituyentes en las interacciones intermoleculares no covalentes.

En realidad, el *QSAR* sólo es capaz de proveer de información indirecta acerca de aspectos tridimensionales de las interacciones con receptores. Aunque existen consideraciones tridimensionales implícitas en el empleo de E_s y en la factorización de π y MR , no existen descriptores diseñados específicamente para describir la variación en conformación, flexibilidad conformacional y otros aspectos tridimensionales. Esto constituye una limitante, pues muchos fármacos y sus receptores son objetos tridimensionales con una distribución espacial de sus propiedades químicas, y la interacción entre ellos involucra una cierta complementariedad que puede incluir una mutua adaptación conformacional en el momento de la interacción.

De hecho, la propia parametrización del efecto de los sustituyentes en la hidrofobicidad, que pareciera ser relativamente simple, resulta estar caracterizada por una larga lista de reglas empíricas, términos de interacción y ajustes especiales, que llega a dificultar el proceso de selección de descriptores adecuados para la hidrofobicidad.

La descripción numérica de los efectos electrónicos de los sustituyentes conlleva serios problemas (*SI*). Los sustituyentes pueden modificar tanto el grado de ionización de la molécula (alterando la cantidad de especie interactuante disponible para el receptor) como la distribución de la carga (alterando la fuerza de unión al receptor). Esto dificulta analizar estos distintos efectos competitivos para interpretar adecuadamente los datos. Un segundo problema con las propiedades electrónicas de las moléculas es que generalmente no se conocen los detalles de la química de la interacción con el receptor y, por lo tanto, no está definido el tipo de parámetro necesario para modelar esta interacción. En principio, los cálculos químico-cuánticos pueden ser aquí de utilidad, siempre y cuando se conozca qué átomos están involucrados y la naturaleza de la interacción.

Finalmente, se tienen problemas con la medición precisa de las propiedades biológicas de interés (*SI*). Dado que el método de *QSAR* depende críticamente de la cuantificación de la respuesta biológica, cualquier deficiencia en este sentido se refleja en el *QSAR*. Obviamente, se estaría trabajando en vano si se trata de mapear un receptor por medio de compuestos químicos que se unen de formas diferentes al receptor o que se unen a receptores diferentes. Un segundo problema surge si la respuesta biológica medida es el resultado complejo de varios procesos. Por ejemplo, muchas interacciones fármaco-receptor involucran la unión del fármaco y luego

cambios conformacionales en el fármaco y el receptor para activar alguna respuesta. El efecto de los sustituyentes podría estar en uno o ambos procesos: si no se miden independientemente, cualquier *QSAR* sería ambiguo en este punto. El problema es que uno puede no saber que se están llevando a cabo varios procesos y, por lo tanto, puede interpretar un *QSAR* de forma incorrecta.

ENFOQUES RECIENTES EN *QSAR*

Se han implementado diferentes métodos matemáticos para su aplicación en problemas de *QSAR* (50,51,54,76-85). En la actualidad se utilizan rutinariamente métodos como el análisis de cúmulos, de componentes principales, factorial, de discriminante y de regresión no lineal, así como técnicas de reconocimiento de patrones y redes neuronales. Estos métodos amplían el campo de investigación para explorar (1) respuestas biológicas del tipo activo/inactivo, (2) la relación entre o la independencia de propiedades físicas y biológicas, (3) la relación entre moléculas determinada por sus propiedades fisicoquímicas o subestructurales y (4) relaciones no lineales no parabólicas entre la actividad y una propiedad molecular. Por ejemplo, el *análisis de cúmulos* es una técnica matemática de clasificación que busca conjuntos similares de datos; la similitud se define en términos de la "distancia" entre puntos que representan los objetos (como los compuestos) en un espacio de variables multidimensional. El *análisis de discriminantes*, a su vez, busca una ecuación lineal que pueda ser utilizada para ubicar un dato en cualquiera de dos clases (como activo e inactivo); en términos geométricos, esto significa definir un hiperplano que bisecte óptimamente un espacio de datos multidimensional, donde cada compuesto químico se representa por un punto cuyas coordenadas son los valores de sus descriptores moleculares. Por su parte, el *análisis de componentes principales* permite una reducción de los datos: de las n variables originales (correlacionadas entre sí) se construyen por medio de una transformación lineal n variables nuevas (llamadas componentes) no correlacionadas; el primer componente principal se construye de tal manera que explique la mayor cantidad posible de la variación en los datos y el segundo componente principal se obtiene de tal forma que no esté correlacionado con el primero y que explique la mayor parte posible de la variancia no explicada por éste, y así sucesivamente con los siguientes componentes. Generalmente los primeros dos o tres componentes explican la mayor parte de la variancia, por lo que los restantes no son significativos; de esta forma, el conjunto inicial n -dimensional se reduce a un espacio de dos o tres dimensiones. El

estudio de la contribución de las variables originales en los componentes principales permite interpretar a éstos últimos como propiedades subyacentes que estaban ocultas en los datos originales y que se pueden aproximar por una o más variables. En el caso de *reconocimiento de patrones*, se dispone de métodos para identificar, tabular y analizar los fragmentos estructurales dentro de un grupo de moléculas, con el fin de clasificarlos como activos o inactivos; se procede a un análisis estadístico de la distribución de dichos fragmentos en las moléculas con base en una distribución binomial. Se considera que un fragmento es irrelevante para la actividad si su distribución es homogénea entre las moléculas activas e inactivas; cualquier discrepancia con este comportamiento se toma en cuenta para asignar relevancia a la actividad para dicho fragmento. En todos estos métodos es importante que se cumplan dos condiciones para que los resultados sean significativos y no se deban al azar: el número de compuestos estudiados debe ser al menos tres veces mayor que el número de descriptores moleculares considerados, y el número de compuestos en la categoría (activos o inactivos) menos poblada debe exceder igualmente al número de descriptores moleculares.

Por otro lado, el desarrollo de las computadoras ha permitido un rápido avance en varios rubros (51,69,86,87):

- (1) Modelado molecular, que permite la generación, manipulación, representación y comparación de la estructura tridimensional de las moléculas y sus propiedades fisicoquímicas. También se aplica para modelar la unión ligante-receptor, lo que permite explicar los términos del *QSAR* por medio de las interacciones identificadas en la visualización gráfica de la geometría de la unión.
- (2) Diseño de fármacos por medio de computadoras, en donde se han automatizado las técnicas de *QSAR* (como la de Hansch) y otros enfoques como el análisis conformacional y la química cuántica, aunados a programas matemáticos para el análisis exhaustivo de los datos generados.
- (3) Química computacional, que permite el modelado cuantitativo del comportamiento químico de las moléculas con base en los formalismos de la química teórica. Aquí es muy importante mencionar el análisis conformacional (que permite calcular la energía relativa asociada con cada conformación de las moléculas), que se puede realizar con técnicas de *mecánica molecular* y/o de *mecánica cuántica*.

El análisis conformacional busca encontrar las conformaciones de una molécula que tienen baja energía, ya que son las que más probablemente se adopten. Existen dos formas de buscar los estados moleculares termodinámicamente estables. Una consiste

en variar sistemáticamente cada uno de los grados de libertad (distancia de enlace, ángulos de enlace, rotaciones torsionales) y calcular la energía conformacional correspondiente; esto permite localizar de forma aproximada todos los estados estables para unos cuantos grados de libertad. Otra consiste en minimizar la energía como función de todos los grados de libertad, lo que permite localizar mínimos de forma precisa pero no necesariamente localiza todos los estados estables. Lo más adecuado parece ser una combinación de ambos métodos. En todo caso, lo que en realidad se busca es la conformación activa, es decir, aquella conformación de la molécula que es crítica para que se exprese su actividad biológica. En este rubro, la elección de un método químico-cuántico en virtud de su precisión pasa a segundo plano, pues lo importante es conocer si la conformación preferida por una molécula aislada es la que participa en la interacción con su receptor. Las diferencias en energía entre mínimos conformacionales son generalmente de sólo algunas kilocalorías y pueden ser más que compensadas por la energía de interacción entre el ligante y el receptor (54). Por lo tanto, puede ser más importante delinear la naturaleza y magnitud de las barreras conformacionales que conocer al detalle las configuraciones de los mínimos de energía.

También se ha utilizado la información obtenida experimentalmente de la estructura cristalina de los compuestos químicos (80) para inferir una conformación de baja energía. Sin embargo, el problema radica en resolver si la posición de los átomos permanece igual en solución (acuosa o lipídica). Se ha obtenido una mayor información al respecto con estudios de resonancia magnética nuclear y de microondas de las barreras rotacionales. En este sentido, se pueden emplear métodos químico-cuánticos para el cálculo de las barreras rotacionales (88), mediante minimizaciones de energía para conformaciones con cambios sucesivos en algún ángulo de rotación o dihedral, a fin de obtener gráficas de calor de formación contra el valor de dicho ángulo.

La química cuántica goza ya de alta estima en la investigación de los conformeros estables a través del cálculo de las propiedades electrónicas de las moléculas (50,89). Existen muchas propiedades que son dependientes de la conformación molecular, como son la densidad de carga atómica, los niveles de energía de los orbitales moleculares, el momento dipolar, etc. Las estimaciones más realistas de estas propiedades se asocian con los conformeros de baja energía. Sin embargo, hay que recordar que en general todos los métodos hasta ahora mencionados consideran a las moléculas en estudio aisladas y libres de interacciones con el disolvente (u otras

moléculas que pudieran estar presentes en las biofases) que, como se sabe, introducen modificaciones considerables en la conformación y en la reactividad de las moléculas aisladas. En este sentido, el análisis conformacional que se puede realizar de la forma ya descrita constituye en realidad sólo una primera aproximación al problema.

Otra propiedad importante que ha cobrado auge es el campo de energía potencial electrostática molecular que se genera en torno a una conformación particular de una molécula en virtud de la distribución de carga, y que se emplea para mapear los sitios receptores y/o comparar moléculas entre sí. Esto se debe a que la unión entre un ligante y su receptor involucra interacciones no covalentes de largo alcance (a distancias mayores que aquéllas de enlace), por lo que su afinidad no se debe sólo a su complementariedad conformacional, sino también a la complementariedad en el campo total generado por la densidad de carga en el ligante. Se han utilizado medidas numéricas de la similitud y diferencias entre campos de potencial en análisis de QSAR.

Dentro del campo de la química computacional podemos incluir el estudio combinado de la conformación y el tamaño de las moléculas, por medio de términos como el volumen de van der Waals y la superficie de acceso al disolvente. El modelado gráfico de estas propiedades es de gran valor para obtener información visual acerca de la complementariedad estérica de ligantes con sus sitios receptores. Por otro lado, el empleo de computadoras permite comparar y encontrar similitudes y diferencias en la forma molecular de compuestos químicos mediante los mismos procedimientos gráficos; también se han desarrollado métodos numéricos para minimizar las distancias entre pares específicos de átomos, para maximizar los volúmenes de traslape estérico, etc., por técnicas de superposición de las moléculas en sus distintas conformaciones.

Se ha desarrollado también el concepto de potencial de lipofiliidad molecular o *MLP* (90,91) con el fin de extender la representación "unidimensional" de la lipofiliidad del coeficiente de partición a una propiedad que tome en cuenta las propiedades estereoquímicas y conformacionales de las moléculas, algo de particular importancia al hablar, por ejemplo, de interacciones intermoleculares con receptores. El *MLP* considera que la lipofiliidad es una propiedad distribuida en todo el espacio que rodea las distintas partes de las moléculas, lo que permite identificar regiones lipofílicas e hidrofílicas. El *MLP* se ha definido como:

$$MLP = \frac{\log P}{1 + d_i} = \frac{\sum_{i=1}^n f_i}{1 + d_i}$$

donde se considera que el $\log P$ se puede expresar como la suma de n fragmentos hidrofóbicos independientes, y se pretende describir la influencia (potencial de lipofiliidad) de una molécula en un disolvente como la suma de los efectos de cada fragmento i sobre cada punto M del espacio a una distancia d_i . Para valorar y comparar el campo de lipofiliidad de varios compuestos en una misma escala se define una función de probabilidad PL :

$$PL = \frac{10^{MLP}}{1 + 10^{MLP}}$$

que implica que el valor de PL en cualquier punto del espacio que rodea a una molécula en un disolvente de baja polaridad es la probabilidad de que exista ahí una molécula de disolvente lipofílico.

Los cálculos de energías intermoleculares para buscar interacciones moleculares estables constituyen el estado del arte en la química computacional (51,89). Se podría calcular la constante de unión de un ligante a un receptor macromolecular, si bien los procesos de solvatación/desolvatación involucrados y el alto número de grados geométricos de libertad existentes hacen difícil la tarea.

Finalmente, existen varias investigaciones (89,92,93,94) donde se busca una reinterpretación de las constantes de Hammett, Taft y Hansch en términos de variables de estructura electrónica calculadas por métodos químico-cuánticos (ya sea métodos semiempíricos como MNDO o métodos *ab initio*). En este sentido, se han encontrado correlaciones lineales de σ con densidades y/o energías de localización de electrones π . Igualmente se han tratado de describir los efectos de los sustituyentes en términos de la energía de transferencia de carga entre el sustituyente y el anillo benzenico y de la carga en el sustituyente. También se ha dicho que estas constantes dependen de la estructura de los aniones formados en la disociación de los ácidos benzoicos (cargas netas y energía del *HOMO*). Se ha encontrado que las constantes clásicas de Hammett

σ_m y σ_p se pueden interpretar en términos de la variación de la densidades de carga σ y π en los átomos de carbono *meta* y *para*, así como la densidad de carga en los átomos de hidrógeno. Las constantes de Hansch se han obtenido con base en el cálculo de densidades de carga atómicas, al relacionarlas con las fuerzas electrostáticas involucradas en la solubilidad en disolventes polares

LA QUIMICA CUÁNTICA EN QSAR

Los métodos químico-cuánticos se emplean con cierta facilidad en la actualidad debido al desarrollo de computadoras más rápidas y de métodos de cálculo de orbitales moleculares más precisos (50,54,89). Inicialmente se realizaron trabajos empleando el método simple de Hückel de orbitales moleculares, que se limita a tratar a los electrones π , por lo que su uso se restringe a moléculas planares. Posteriormente se desarrolló una amplia variedad de métodos semiempíricos iterativos de orbitales moleculares para todos los electrones de valencia, que abarca desde el método de Hückel extendido de Hoffman, pasando por los métodos de Pople (como el CNDO), hasta los métodos de MNDO y AM1. El advenimiento de las supercomputadoras ha hecho posible incorporar cálculos a primeros principios (*ab initio*) al estudio de moléculas de interés biológico, con el correspondiente incremento en precisión de los resultados obtenidos para las geometrías de equilibrio, barreras de rotación y variables de estructura electrónica.

Las correlaciones estructura-actividad que se basan en cálculos de orbitales moleculares toman en cuenta los distintos parámetros que describen la estructura electrónica de las moléculas, como es el caso de cargas atómicas netas, órdenes de enlace, densidades electrónicas y orbitales de frontera, superdeslocalizabilidades, energías y formas del orbital molecular ocupado de más alta energía (*HOMO*) y del orbital molecular desocupado de menor energía (*LUMO*) y momento dipolar. Todos estos índices pueden ser utilizados en análisis de regresión multiparamétricos, incluso en conjunción con otras propiedades fisicoquímicas. Se considera en general que los errores propios de estos métodos, así como no tomar en cuenta los efectos de solvatación, entre otros, son paralelos entre moléculas estrechamente relacionadas estructuralmente, por lo que las tendencias y diferencias entre dichos índices siguen teniendo significado.

Existe una gran cantidad de investigaciones en sistemas biológicos *in vivo* e *in vitro* muy variados donde se han empleado métodos químico-cuánticos (únicamente o en conjunción con otras técnicas) para el estudio de relaciones estructura-actividad (85,88,95-100). En estos estudios se ha logrado poner de manifiesto al analizar las densidades electrónicas, por ejemplo, que la fuerza de unión entre una enzima y sus inhibidores puede deberse a interacciones dipolo-dipolo como resultado de una transferencia de carga intramolecular en los inhibidores en función de los grupos sustituyentes, o bien a la presencia de cargas netas y densidades electrónicas en algunos orbitales moleculares (como el *HOMO* y el *LUMO*) para átomos aislados o grupos de átomos.

Los estudios que se realizan para mapear la topografía de un receptor buscan principalmente definir la localización tridimensional y la naturaleza química de las distintas regiones estructurales que lo conforman, sin embargo no siempre son suficientes para dilucidar el tipo de interacciones involucradas. En aquellos estudios donde se encuentra una correlación entre la actividad y la energía del *LUMO*, es posible hacer uso del principio de interacción entre el *LUMO* del ligante y el *HOMO* del receptor (L_1-H_r), como evento importante en la formación del complejo ligante-receptor. Esto es indicación de que la estabilización de estos complejos está mediada por procesos de transferencia de carga, donde el *LUMO* del ligante actúa como aceptor de electrones (100). Si una porción grande de la energía de estabilización ΔW del complejo ligante-receptor proviene de interacciones de transferencia de carga en donde el ligante actúa como aceptor de electrones, ΔW se puede expresar aproximadamente por la ecuación de Mulliken:

$$\Delta W = Q - \kappa / (\epsilon_a - \epsilon_d - \lambda)$$

donde Q es la energía de interacción entre el ligante y el receptor exclusiva de transferencia de carga, $\epsilon_a - \epsilon_d$ es la diferencia de energía entre los orbitales moleculares del donador (sitio receptor) Φ_d y del aceptor Φ_a , y λ es un término que depende del grado de traslape entre Φ_d y Φ_a . Existen contribuciones significativas por transferencia de carga a ΔW sólo cuando Φ_d y Φ_a exhiben propiedades complementarias en la región de traslape con respecto a la simetría local y la distribución de densidad. Si esto no ocurriese, el término κ de la ecuación anterior se volvería despreciable. Si la distribución de densidad en regiones críticas del bióforo permanece esencialmente

constante para una serie dada de compuestos análogos, se esperaría que los valores de Q , κ y l no cambiaran mucho. Por consiguiente, la estabilidad del complejo ligante-receptor dependería primariamente de la energía (ϵ_a) del orbital molecular F_a , por lo que se esperaría que una reducción en la energía de este orbital aceptor estabilizaría el complejo ligante-receptor. Esta estabilidad se incrementaría si F_a es un orbital molecular desocupado de baja energía y F_d es un orbital molecular ocupado de alta energía.

Siguiendo el razonamiento anterior, también se han hecho estudios (101) para comparar las densidades electrónicas del *LUMO* de compuestos análogos ligantes a un receptor con el fin de determinar la forma común de dicho orbital molecular y con ello inferir la forma del *HOMO* del receptor; esto permite en principio proponer el tipo de estructura química (como puede ser un residuo de aminoácido) con la que interactúan los ligantes.

El potencial electrostático molecular *MEP* representa la energía de interacción entre la distribución de carga en una molécula y una unidad de carga positiva de prueba en un punto del espacio, sin tomar en cuenta reordenamientos de dicha distribución de carga (97,102-110). Este *MEP* se puede definir en términos de la densidad electrónica $\rho(r)$, donde r es una posición en el espacio:

$$V(r) = \sum_{i=1}^N \frac{Z_i}{|r - R_i|} - \int \frac{\rho(r')}{|r - r'|} dr'$$

donde N es el número de átomos en la molécula, Z_i es la carga nuclear del átomo i y R_i es su posición. El primer término en esta ecuación representa la contribución positiva del potencial de las cargas positivas de los núcleos atómicos en la molécula. El segundo término es la contribución negativa del potencial debido a los electrones alrededor de la molécula, que "apantallan" la interacción nuclear. La función de densidad electrónica $\rho(r)$ se obtiene de cálculos *ab initio* de orbitales moleculares para mayor precisión, tras lo que se obtiene la forma en que la carga electrónica está distribuida espacialmente en los átomos de las moléculas. En general se procede sucesivamente a proyectar el *MEP* (por encima de cierto valor escogido) en las superficies de van der Waals de las moléculas en estudio para compararlas, o bien se

realizan proyecciones bidimensionales de contornos isoenergéticos del *MEP* en planos de interés para comparar el potencial generado a distintas distancias entre diferentes moléculas. El objetivo es racionalizar conjuntamente los factores estéricos (volúmenes o superficies) con los electrónicos (potenciales de interacción) para dilucidar los aspectos que pudieran ser importantes en las interacciones ligante-receptor, ya que se supone que moléculas con el mismo tipo de actividad deben tener mapas de contornos del *MEP* similares en forma y magnitud, ya sea en toda su estructura o sólo en los bioóforos. La dirección del gradiente del campo de potencial generado por la molécula en cada punto del espacio proporciona la dirección de la fuerza aplicada por la distribución de carga molecular en cargas puntuales en los alrededores ($E = -\nabla\psi$), por lo que también es posible inferir la orientación de una molécula relativa a los grupos polares presentes en un receptor con base en el alineamiento de las regiones donde el potencial es más negativo.

Un área importante dentro de la química computacional ha sido el desarrollo de la descripción de la hidrofobicidad en términos del volumen y/o la superficie de van der Waals (111-115), ya que éstos pueden ser descriptores adecuados del tamaño y forma molecular, factores muy importantes en las interacciones de compuestos químicos con sitios receptores. Se ha descrito que la hidrofobicidad de moléculas apolares se puede correlacionar con su volumen, y se ha demostrado que el logaritmo del coeficiente de partición se puede factorizar en dos componentes intrínsecas: el volumen molecular y un efecto polar. Dado que la energía dominante para el comportamiento hidrofóbico de los solutos en agua radica en el cúmulo de moléculas de agua que rodean la superficie del soluto, se puede pensar que la hidrofobicidad de las moléculas depende de su área superficial. Se ha demostrado que existe una buena correlación del $\log P$ con la superficie y el volumen de van der Waals para moléculas apolares. Para moléculas polares, la relación entre el volumen de van der Waals y el $\log P$ no sigue un comportamiento lineal debido a que existen interacciones soluto-disolvente y soluto-soluto importantes. Incluso se ha propuesto un método para calcular el $\log P$ con base en la superficie de acceso al disolvente, definida por Lee y Richards (116) como el área trazada por el centro de una molécula de disolvente (que se asume que es una esfera) al deslizarse sobre la superficie de van der Waals de la molécula de soluto; se hace asimismo una corrección por efectos hidrofílicos para moléculas polares. Es importante destacar que existe otra definición de la superficie de acceso al disolvente propuesta por Richards (73,113), donde se le considera como aquella que recorre una esfera de disolvente (de 1.4 Å de diámetro para el caso del agua) al moverse sobre los

átomos de la superficie de van der Waals de alguna molécula (como una proteína), considerando sólo los puntos en donde hacen contacto físico, es decir, aquellas porciones que le son accesibles al contacto físico. Se obtiene así una superficie continua que posee intersticios que son muy pequeños para que penetre la esfera de disolvente y que no está desplazada de la superficie de van der Waals.

Finalmente, conviene mencionar el tipo de esfuerzos que se realizan para poder incluir el efecto del disolvente en el estudio de la conformación y la interacción de moléculas de interés biológico (100). La primera aproximación que se puede seguir es la del *modelo del continuo*, donde se considera que la molécula de soluto está encerrada en una cavidad de un medio continuo de una cierta constante dieléctrica. La energía de solvatación se considera entonces como la suma de términos electrostáticos, de dispersión y de cavidad. En otra aproximación denominada *modelo de super-molécula*, los cálculos químico-cuánticos se realizan para un complejo intermolecular formado por la molécula de soluto y unas cuantas moléculas de disolvente fijas en los sitios más favorables de solvatación (el resto del disolvente se puede contabilizar con un modelo del continuo). La generalización de este modelo radica en calcular la superficie total de energía potencial para la interacción de una molécula de soluto con una o más moléculas de disolvente. Finalmente, es posible utilizar la superficie soluto-disolvente calculada previamente para un estudio mecánico-estadístico de la solución para determinar la organización estructural de muchas moléculas de disolvente en torno a la molécula de soluto para una temperatura dada.

COMENTARIOS ADICIONALES

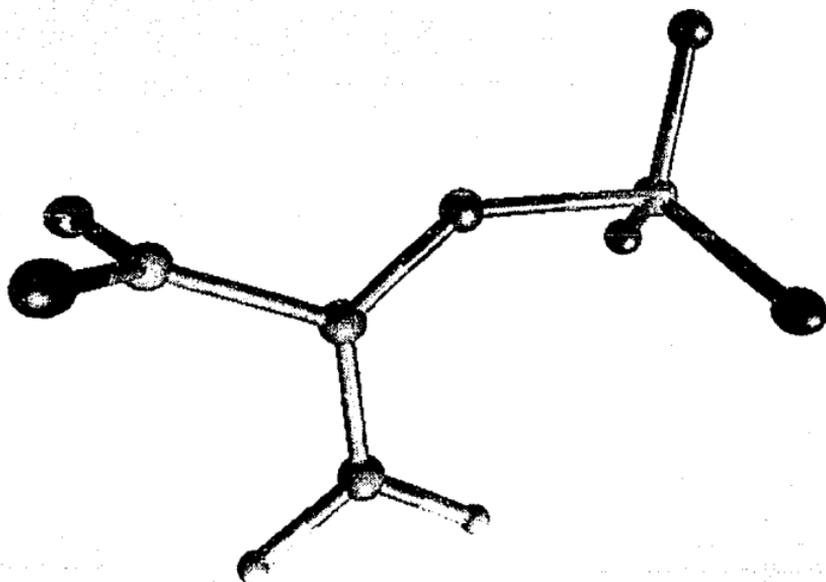
Hasta ahora hemos presentado una visión bastante amplia de todas las posibles aproximaciones que se emplean en la búsqueda de correlaciones entre la estructura química de un compuesto y su actividad biológica. Como mencionamos al final de la sección anterior, nuestro trabajo de tesis involucra un estudio de los inhibidores competitivos de la PEPC, para el cual hemos utilizado algunas de las técnicas ya descritas, y que involucran tanto el enfoque clásico de Hansch, como el enfoque actual de la química cuántica.

En primer lugar, adoptamos el enfoque de Hansch mediante la búsqueda de correlaciones empleando parámetros hidrofóbicos, electrónicos, estéricos y de

dispersión. Subsecuentemente se emplearon técnicas de mecánica molecular y química cuántica para obtener un gran número de parámetros geométricos y electrónicos. Finalmente, procedimos con técnicas computacionales para calcular las superficies de van der Waals y de acceso al disolvente de las moléculas que nos interesan.

En un principio, lo que investigamos fue la existencia de una correlación cuantitativa entre las constantes de inhibición y parámetros moleculares que describieran bien las distintas modificaciones estructurales de dichos compuestos. De hallarse dicha correlación, nos permitiría describir por separado los factores que intervienen en la unión de estos inhibidores con el sitio activo y, con ciertas restricciones, la topología aproximada de éste último.

MÉTODOS DE CÁLCULO



MECÁNICA MOLECULAR

GENERALIDADES.

Es muy importante estudiar la conformación de las moléculas que nos interesan por la relevancia que pueden tener los parámetros estructurales (distancias interatómicas, distorsiones angulares, energías relativas, barreras rotacionales, etc.) en la actividad biológica. Sin embargo, es claro que sería muy útil poder obtener información acerca de las fuerzas no-enlazantes que participan en la unión de los inhibidores enzimáticos con la enzima, para lo cual se hace necesario contar con un modelo apropiado de la estructura tridimensional del sitio activo.

Para el caso de sistemas moleculares de cierto tamaño, los métodos computacionales de la química cuántica, que se describirán en la siguiente sección, dejan de ser prácticos en términos de la infraestructura y tiempo de cómputo con los que se cuenta normalmente. Si no consideramos el tipo de cálculos *ab initio* y pensamos únicamente en los métodos semiempíricos, éstos se pueden extender a sistemas algo mayores. En estos métodos generalmente se desprecian de manera sistemática las integrales de dos electrones sobre las funciones de base, lo que permite que sean más rápidos que los métodos *ab initio* por uno o dos órdenes de magnitud para moléculas pequeñas, y por mucho más para sistemas más grandes. Sin embargo, para el caso de moléculas mayores con muchos grados de libertad, incluso estos métodos semiempíricos no son aplicables. Aún falta mucho camino por recorrer para poder obtener una solución apropiada de la ecuación de Schroedinger para sistemas de tamaño y complejidad arbitraria.

Para el estudio rápido de la conformación de moléculas orgánicas grandes se emplean los métodos de mecánica molecular (117-121), que son métodos semiclásicos o empíricos que se basan en utilizar campos de fuerza pre-parametrizados en vez de funciones de onda y orbitales moleculares. La primera consideración que se toma en cuenta en estos métodos es la separación de Born-Oppenheimer del movimiento de los electrones y los núcleos. En este caso los electrones no se consideran de forma explícita, sino que proveen únicamente un potencial efectivo que experimentan los

núcleos. Los métodos de mecánica molecular tratan las interacciones entre los núcleos y el potencial efectivo generado por los electrones de acuerdo con las leyes de la mecánica clásica. La segunda consideración que existe es que los datos conformacionales experimentales que se tienen para moléculas pequeñas se pueden extrapolar a sistemas más grandes. Las ventajas de estos métodos radican en su simplicidad conceptual, en su rapidez y eficiencia, así como en la posibilidad de conjuntarlos con gráficas moleculares para visualizar, por ejemplo, la interacción de moléculas grandes. Por otro lado, existen varias desventajas asociadas con los métodos de mecánica molecular. En primer lugar, los procedimientos de minimización de la energía no garantizan que se localicen los mínimos globales (los resultados que se obtienen pueden corresponder a un mínimo local). En segundo lugar, el método es esencialmente empírico pues los parámetros que posee se obtienen de muchos estudios con geometrías de referencia. Esto se traduce en que los resultados que se obtienen sólo son confiables para sistemas químicos que guardan cierto parecido con aquéllos de donde se obtuvieron los parámetros empleados. En tercer lugar, es evidente que no se pueden investigar efectos electrónicos.

De estas técnicas es posible obtener diversas propiedades como el calor de formación, energías conformacionales, barreras de rotación, etc., así como simular espectros de infrarrojo y de Raman. Igualmente es factible emplear los mismos potenciales de interacción para cálculos de *dinámica molecular*, es decir, para investigar la interacción entre varias partículas en procesos dependientes del tiempo (resolviendo las ecuaciones clásicas de movimiento para todas las moléculas en cada paso de tiempo). Por ejemplo tenemos las simulaciones de fluidos y de rearrreglos estructurales en proteínas debido a las interacciones con el disolvente.

EL CAMPO DE FUERZAS.

El primer paso crucial para implementar un método de mecánica molecular computacional es el desarrollo de un campo de fuerza, es decir, la descripción de todas las interacciones dentro del sistema en estudio, pues de ello depende la calidad de los resultados que se obtengan. Los parámetros apropiados se obtienen usualmente de datos espectroscópicos (infrarrojo, Raman, RMN, microondas) y en ocasiones de cálculos *ab initio* de sistemas modelo. Es muy importante, pues, recordar siempre que las funciones de energía potencial que se emplean en cálculos de campo de fuerzas son

empíricas, y que se escogen en virtud de ser fáciles de manejar numéricamente y de ser transportables adecuadamente de un sistema a otro. En general, las interacciones intramoleculares que se consideran se representan por funciones que incluyen una fuerza de restauración, de tal forma que tienda a dar valores a los parámetros estructurales (distancias y ángulos) que los acerquen a su valor óptimo. Para poder obtener un estimado de la geometría de equilibrio de las moléculas a partir de dichos campos de fuerzas es necesario minimizar la energía con respecto a las variables estructurales. Como dijimos, los electrones no se tratan explícitamente. En estas técnicas no se calcula la función de onda y la densidad en cada iteración en un procedimiento de campo auto-consistente, ni a partir de la superficie de potencial resultante se obtienen las fuerzas y constantes de fuerza. Aquí se considera una superficie de potencial inicial y no se modifica durante la optimización. El campo de fuerza se calcula considerando todas las interacciones ficticias de dos, tres y cuatro centros (por ejemplo, movimientos torsionales, vibracionales y de acortamiento de enlaces), combinaciones de ellas, y fuerzas de dispersión y electrostáticas. Las estructuras se optimizan entonces de acuerdo a las direcciones determinadas por las fuerzas y constantes de fuerza resultantes en la hipersuperficie de potencial. Las interacciones individuales nunca se re-optimizan durante el proceso.

Las constantes de fuerza se obtienen como las derivadas de orden superior de la expansión del potencial V como una serie de Taylor en torno a la posición de equilibrio:

$$V = V_0 + \sum_i \left(\frac{\partial V}{\partial q_i} \right)_0 q_i + \frac{1}{2} \sum_{i,j} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right)_0 q_i q_j + \dots$$

donde q_i son las coordenadas de desplazamiento y V_0 es el potencial de equilibrio. Las primeras derivadas valen cero cuando $q_i = 0$, y el término V_0 se puede establecer arbitrariamente igual a cero. Se obtiene luego:

$$V' = \frac{1}{2} \sum_{i,j} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right)_0 q_i q_j + \frac{1}{6} \sum_{i,j,k} \left(\frac{\partial^3 V}{\partial q_i \partial q_j \partial q_k} \right)_0 q_i q_j q_k + \dots$$

Las q_i [($r - r_0$), ($\phi - \phi_0$), ($\theta - \theta_0$), etc.] se escogen como desplazamientos de la posición de referencia para los enlaces, ángulos, torsiones, etc. En modelos simples se trunca la expansión después de las segundas derivadas. Sin embargo, la descripción del

sistema se hace más precisa si se conservan los términos de tercero y cuarto orden. También se hace necesario considerar los términos no diagonales ($i \neq j$), así como los términos cruzados como las interacciones acortamiento-vibración. Sin embargo, no todas las constantes de fuerza son independientes entre sí, pero suele hacerse la aproximación de que estas constantes de fuerza se relacionan directamente con los cambios en las longitudes y ángulos de enlace. Estas constantes de fuerza se derivan inductivamente mediante una comparación sistemática de las propiedades moleculares calculadas y observadas.

En este punto se hace ventajoso tratar de separar la distintas fuerzas que actúan sobre los núcleos para que puedan ser evaluadas empíricamente. Se considera que las fuerzas que participan intervienen en el alargamiento, vibración y torsión de los enlaces, en las vibraciones fuera del plano, en la formación de puentes de hidrógeno, en interacciones electrostáticas como las de dipolo-dipolo, en interacciones de dispersión o de van der Waals y en la repulsión estérica. La energía potencial total es la suma de todas estas interacciones:

$$V^{tot} = V(r) + V(\theta) + V(\phi) + V(r, \theta) + \dots$$

Para la fuerza de *alargamiento* de un enlace se puede considerar que los átomos son masas unidas por resortes, y se describe mediante la ley de Hooke para representar la energía necesaria para comprimir o alargar un enlace de su longitud óptima:

$$V(r) = \frac{1}{2} \sum_i k_{ib} (r_i - r_{io})^2$$

en donde k_{ib} es la constante de fuerza armónica para el alargamiento de un enlace particular, r_i es la longitud de enlace y r_{io} es una longitud de enlace de referencia. Tanto k_{ib} como r_{io} son parámetros ajustables en la determinación del campo de fuerza. La ley de Hooke es una buena aproximación sólo para pequeños desplazamientos de las configuraciones de referencia. Para desplazamientos mayores, se deben añadir términos de orden superior a la ecuación anterior para obtener una curva de potencial más realista. La descripción del alargamiento de un enlace según la ley de Hooke y con términos de orden superior se ilustra en la figura 2.1.

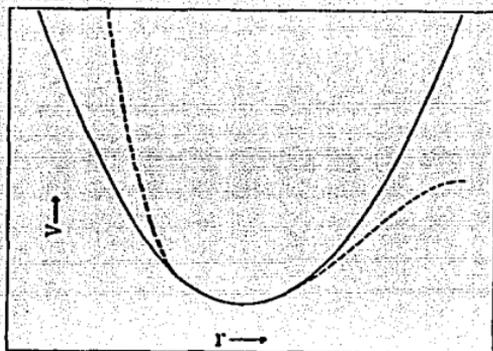


Figura 2.1. Formas de los potenciales para la ley de Hooke simple (—) y corregida con términos de orden superior (- - -).

Alternativamente, el campo de fuerza para el alargamiento de un enlace se puede representar mediante la función de Morse:

$$U_M(r) = D(1 - \exp[-a(r - r_e)])^2$$

donde D y a son parámetros. La forma de la función de Morse se muestra en la figura 2.2.

La energía de *vibración* de un ángulo de cizallamiento se puede representar también en una primera aproximación mediante la ley de Hooke:

$$V(\theta) = \frac{1}{2} \sum_i k_{i\theta} (\theta_i - \theta_{i0})^2$$

donde $k_{i\theta}$ es la constante de fuerza armónica para la vibración del ángulo de enlace, θ_i es el ángulo de enlace y θ_{i0} es el ángulo de enlace de referencia. Como en el caso anterior, $k_{i\theta}$ y θ_{i0} son parámetros ajustables.

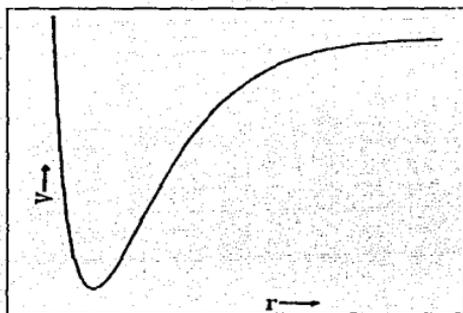


Figura 2.2. Forma del potencial de Morse.

Se sabe que se requiere más energía para modificar una longitud de enlace que para modificar un ángulo de enlace, por lo que la constante k_{lb} es generalmente mayor que la constante $k_{i\theta}$ por un factor de alrededor de diez. Son comunes distorsiones mayores de los ángulos de enlaces que de las longitudes de enlace, es decir, que es más probable tener una estructura con ángulos distorsionados que con enlaces distorsionados; igualmente se tiene que se requiere mayor energía para acortar un enlace que para alargarlo (por la repulsión internuclear). Debido a todo lo anterior, se hace necesario introducir términos de tercero y cuarto órdenes a V_{θ} :

$$V_{3\theta} = \frac{1}{3!} k_{3\theta} (\theta - \theta_0)^3 \quad \text{y} \quad V_{4\theta} = \frac{1}{4!} k_{4\theta} (\theta - \theta_0)^4$$

La *torsión* de los enlaces es muy importante en la estructura química, particularmente cuando no existen dobles enlaces ni puentes de hidrógeno, y ni los efectos electrostáticos ni las repulsiones estéricas son considerables. El ángulo torsional ϕ (también conocido como ángulo diedro) se define en la figura 2.3. En un subsistema de átomos $W-X-Y-Z$ unidos covalentemente, el ángulo torsional es el ángulo entre los planos $W-X-Y$ y $X-Y-Z$ visto a lo largo del eje $X-Y$. Para el movimiento torsional, el potencial $V(\theta)$ se desarrolla comúnmente como una serie de Fourier:

$$V(\phi) = \frac{1}{2} \sum_i k_{\phi_i} (1 + m_i \cos n_i \phi_i)$$

donde los términos k_{ϕ_i} son parámetros ajustables, y los valores de m y n se determinan por la naturaleza del movimiento torsional. El valor de m se iguala a $+1$ si la conformación alternada es la de menor energía y a -1 si la conformación eclipsada es la de menor energía; n determina la periodicidad del movimiento torsional. En la figura 2.4 se muestra como ejemplo la descripción del movimiento torsional del etano, donde $n = 3$.

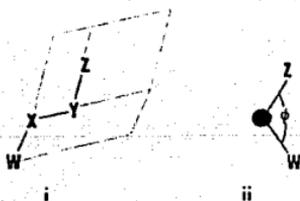


Figura 2.3. Definición del ángulo torsional o diedro ϕ .

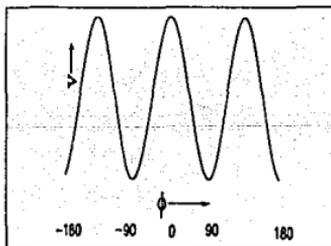


Figura 2.4. Energía potencial del movimiento torsional del etano.

La barrera de potencial asociada con los enlaces axiales ($X-Y$) depende principalmente de la naturaleza de éstos últimos; tal es el caso de la alta diferencia de

energía entre isómeros *cis* y *trans*. El movimiento torsional requiere menos energía que la vibración de ángulos de enlace, por lo que la distorsión de una molécula debida a la rotación en torno a un ángulo dihedral es generalmente más pronunciada que la vibración del ángulo de enlace. Por ejemplo, para el estudio de moléculas muy grandes, como los polipéptidos, se dejan constantes las longitudes y ángulos de enlace y sólo se dejan variar los ángulos diedros.

Se requiere una descripción de la *vibración de un enlace fuera del plano* para el estudio de sistemas insaturados. El ángulo de vibración fuera del plano se ilustra en la figura 2.5. En general se representa por la función:

$$V_x = \frac{1}{2} \sum_i k_{ix} \chi_i^2$$

donde k_x es un parámetro ajustable y el valor de referencia se toma como cero.

Figura 2.5. Vibración fuera del plano en los sistemas insaturados.



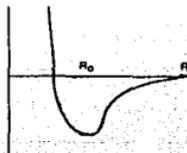
Las *fuerzas de van der Waals* entre átomos no unidos por enlaces químicos son de las más importantes en química estructural ya que crean un potencial (atractivo o repulsivo) conforme cambia la distancia entre los átomos; sin embargo, se explican en el campo de fuerzas por un modelo bastante incierto. Se aplica frecuentemente un potencial de Lennard-Jones o un potencial de Buckingham y se asume que las interacciones son aditivas por parejas separadas por tres o más enlaces:

$$V_L = \epsilon \left[\left(\frac{R_0}{R} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \right] \quad \text{o} \quad V_B = \frac{\epsilon}{1-6/\alpha} \left[\frac{6}{\alpha} \exp(\alpha(1 - \frac{R}{R_0})) - \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \right]$$

donde ϵ es la profundidad del pozo de potencial, R es la distancia entre los átomos en donde la función de potencial se minimiza, α se relaciona con la parte repulsiva de la interacción; el segundo término en cada una de estas expresiones es el término de

atracción por dispersión de London que resulta de la correlación de los electrones. Cuando α tiene un valor de 14-15, el término repulsivo del potencial de Buckingham es similar al potencial 12-6 de Lennard-Jones. La función de potencial de Lennard-Jones tiene dos parámetros ajustables, mientras que el potencial de Buckingham tiene tres. La energía potencial se calcula para todos los pares de átomos en una molécula, excepto aquéllos unidos entre sí o aquéllos unidos a un tercer átomo en común. La forma general del potencial de interacciones no enlazantes se muestra en la figura 2.6.

2.6. Forma general de los potenciales de interacciones no enlazantes.



Una tercera función de potencial, que se emplea en ocasiones, es la ecuación de Hill:

$$V_{nb} = \epsilon \left[-c_1 (r^* / r)^6 + c_2 \exp(-c_3 r / r^*) \right]$$

donde c_1 , c_2 y c_3 se toman frecuentemente como constantes universales, ϵ es un parámetro de energía y r es la distancia interatómica; r^* es la distancia a la cual la función presenta un mínimo y se define como la suma de los radios de van der Waals para dos átomos interactuantes. La función de energía potencial anterior funciona bien con los gases inertes y para interacciones entre moléculas pequeñas, como N_2 . Las funciones de energía potencial para las interacciones no enlazantes se derivan de estudios de interacciones intramoleculares y se asume que pueden reproducir adecuadamente las interacciones intramoleculares. Existe cierta discusión con respecto al valor escogido para ϵ en la ecuación de Hill. Él propuso originalmente que $\epsilon = (\epsilon_k \epsilon_\nu)^{1/2}$, donde ϵ_k es un parámetro atómico para el k -ésimo átomo y se le refiere en ocasiones como la "dureza" del átomo. La forma general del potencial de Hill se muestra en la figura 2.7.



Figura 2.7. Forma de la energía del potencial de Hill para interacciones no enlazantes.

Por otro lado, para las interacciones dipolo-dipolo se emplea frecuentemente una función proporcional a $\mu_i \mu_j / r^3$, donde μ_i es el momento dipolar local de un enlace específico i , y r es la distancia entre los puntos intermedios de los enlaces i y j . Igualmente se han tratado de describir de manera cuantitativa las interacciones dipolo-dipolo inducido.

Las interacciones *electrostáticas* se originan por las transferencias de carga de una parte de la molécula a otra. El término respectivo se considera igual a la suma de las interacciones electrostáticas entre parejas de átomos y se representa generalmente por la función siguiente:

$$V_e = \sum \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

donde las cargas q_i se tratan como parámetros variables. Este término electrostático se incluye en el campo de fuerzas siempre que haya heteroátomos presentes.

La interacción debida a la *formación de puentes de hidrógeno intramoleculares* (V_{hb}) es muy importante en el análisis conformacional de algunos tipos de sistemas macromoleculares, como los biopolímeros. Se considera en general que la formación de estos puentes de hidrógeno es importante en sistemas donde un hidrógeno se une a un oxígeno o nitrógeno con una geometría tal que le permita acercarse a otro oxígeno o nitrógeno, o bien a un halógeno o incluso a los electrones de un doble enlace o un anillo conjugado. Se han propuesto varias representaciones empíricas para este

término, principalmente basadas en incluir distancias fijas de longitudes de enlace de hidrógeno (como se observa en cristales), o bien la energía a partir de datos termodinámicos obtenidos con base en cálculos semiempíricos o incluso cálculos *ab initio* precisos en sistemas pequeños.

Finalmente, es preciso considerar las interacciones *geminales* que contribuyen a la energía estérica. Tal es el caso de la influencia en la repulsión entre átomos cuando se acercan debido a una rotación interna. Otro ejemplo ocurre cuando se comprime un ángulo de enlace, ya que las longitudes de enlace asociadas se incrementan. Un método para incluir estos efectos es el campo de fuerzas de Urey-Bradley, que tiene la forma siguiente:

$$V_{1,3} = \frac{1}{2} \sum_{1,3\text{int.}} F(r - r_0)^2 + \sum_{1,3\text{int.}} F'(r - r_0)$$

Aquí F , F' y r_0 son parámetros ajustables y r es la distancia entre los átomos geminales. De manera alternativa se pueden introducir términos cruzados, como para el caso del acoplamiento entre el alargamiento de un enlace y la vibración del ángulo de enlace:

$$V_{ct} = \sum_{i,j} F_{ij}(r_i - r_{oi})(\theta_j - \theta_{oj})$$

donde F , r_{oi} y θ_{oj} son parámetros ajustables. Este tipo de términos pueden contabilizar, por ejemplo, la interacción entre un alargamiento C-H y una vibración del ángulo de enlace H-C-H.

Se puede asimismo incluir términos que describan acoplamientos entre el movimiento de alargamiento de enlaces, entre la vibración de enlaces, entre la vibración de un enlace y el movimiento torsional, así como entre vibraciones fuera del plano.

MINIMIZACIÓN DE LA ENERGÍA.

La aproximación descrita para construir el campo de fuerzas para un sistema molecular permite calcular la energía de dicho sistema para cualquier arreglo de sus átomos que no varíe muy significativamente de la conformación de referencia. Se hace necesario minimizar la energía del sistema con respecto a los grados de libertad internos para obtener un estimado apropiado de la estructura de equilibrio de la molécula.

Desde el punto de vista computacional, el problema a resolver se puede escribir así:

$$V_{\min} = \text{Min}[V(x)]$$

donde V es el campo de fuerzas total y el vector x representa los parámetros que definen la estructura de la molécula, es decir, ya sea longitudes y ángulos de enlace y ángulos torsionales, o bien las coordenadas cartesianas de cada uno de los átomos.

Para resolver este problema es conveniente definir el vector del gradiente g con los siguientes elementos:

$$g_i = \frac{\partial V(x)}{\partial x_i}$$

y la matriz de las segundas derivadas, la matriz hessiana:

$$G_{ij} = \frac{\partial^2 V(x)}{\partial x_i \partial x_j}$$

El vector del gradiente y la matriz hessiana se pueden evaluar analíticamente o se pueden determinar por métodos de diferencias-finitas. Cuando se resuelve la ecuación de minimización de la energía potencial total y se encuentra la conformación de mínima energía, el vector del gradiente es igual al vector nulo y la matriz hessiana es positivamente definida. Computacionalmente esto se traduce en la alteración sucesiva

de las coordenadas de los átomos del sistema en estudio, calculándose la energía en cada paso, hasta obtener la conformación accesible de menor energía.

QUÍMICA CUÁNTICA

EL MÉTODO VARIACIONAL

La mayoría de los cálculos que se realizan en química cuántica se basan en el *principio variacional* (122,123), el cual establece que para cualquier función ϕ , normalizable y aceptable, se verifica que

$$H_{av} \equiv \int \phi^* \hat{H} \phi d\tau \geq E_0$$

donde E_0 es el *eigenvalor* más bajo de \hat{H} . Esta expresión se puede demostrar fácilmente. Primero desarrollamos ϕ en términos del conjunto de *eigenfunciones* ortonormales de \hat{H} [ψ_i]

$$\phi = \sum_i c_i \psi_i$$

donde sabemos que las funciones ψ_i (linealmente independientes entre sí) son un conjunto completo en el sentido de que cualquier función ϕ puede ser expresada como una combinación lineal de aquéllas. Luego recordamos que si una función se expresa como la combinación lineal de *eigenfunciones* para el operador de energía, el valor promedio de la energía asociado con la función es un promedio ponderado de los *eigenvalores* de la energía. Con base en esto llegamos a la expresión

$$\int \phi^* \hat{H} \phi d\tau = \sum_i c_i^* c_i E_i$$

Dado que el producto $c_i^* c_i$ nunca es negativo, la ecuación anterior es meramente un promedio de los *eigenvalores* E_i . Dicho promedio nunca puede ser menor que el miembro contribuyente menor, por lo que se demuestra el principio variacional. Otra

manera de expresar este principio es decir que el valor promedio de \hat{H} sobre ϕ es una cota superior para el menor *eigenvalor* de \hat{H} .

El *método variacional* se basa en la idea de que al modificar una función para obtener la energía promedio más baja, se tiende a maximizar la "cantidad" de la *eigenfunción* ψ_0 de más baja energía presente en la combinación lineal ya descrita. Por lo tanto, si minimizamos

$$\bar{E} = \frac{\int \phi^* \hat{H} \phi d\tau}{\int \phi^* \phi d\tau}$$

la ϕ resultante debiera tender a parecerse a ψ_0 , ya que hemos "maximizado" la cantidad de ψ_0 en ϕ por este procedimiento. Es importante darse cuenta de que al minimizar \bar{E} , realizamos un proceso que tiene que ver con todos los coeficientes c_i , con el fin de optimizar la función inicial para obtener la menor energía posible. El método cobra suma importancia si también nos percatamos, entonces, de que no es esencialmente necesario conocer la *eigenfunción* o *eigenvalor* exacto para poderlo aplicar. Sin embargo, hay que recalcar que la función que dé el menor valor de \bar{E} puede no ser particularmente buena para describir otras propiedades. De hecho se concluye que para cualquier función de prueba que se conozca que sea especialmente inexacta para alguna región del espacio (como cerca del núcleo), se obtendrán valores promedio posiblemente poco confiables para los operadores que tengan contribuciones mayores en dicha región del espacio.

Ahora supongamos que queremos expresar una función de onda ψ como una combinación lineal de varias funciones conocidas $\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_n$ (que denominamos el *conjunto base* para un cálculo):

$$\psi(c_1, c_2, \dots, c_n) = c_1 \phi_1 + c_2 \phi_2 + \dots + c_n \phi_n$$

La pregunta que surge es, ¿qué valores de c_1, c_2, \dots, c_n dan una ψ que sea la mejor aproximación de la función de onda exacta para un sistema particular? La aproximación usual es la de determinar qué valores de los coeficientes c_i dan la ψ asociada con la mínima energía posible obtenible. Esta técnica se denomina *método*

variacional lineal y constituye el fundamento de los tipos de cálculo más ampliamente utilizados en química cuántica. Los coeficientes c_i se determinan de tal forma que se minimice la expresión

$$\bar{E} = \frac{\int \psi^* \hat{H} \psi d\tau}{\int \psi^* \psi d\tau} = \frac{\int (c_1^* \phi_1^* + c_2^* \phi_2^* + \dots + c_n^* \phi_n^*) \hat{H} (c_1 \phi_1 + c_2 \phi_2 + \dots + c_n \phi_n) d\tau}{\int (c_1^* \phi_1^* + c_2^* \phi_2^* + \dots + c_n^* \phi_n^*) (c_1 \phi_1 + c_2 \phi_2 + \dots + c_n \phi_n) d\tau} = \frac{\alpha}{\beta}$$

Para simplificar la derivación, partamos de la idea de que seguiremos hablando sólo de casos donde las c_i y las ϕ_i son reales, para eliminar la notación de complejos conjugados. En el valor mínimo de \bar{E} se tiene que

$$\frac{\partial \bar{E}}{\partial c_1} = \frac{\partial \bar{E}}{\partial c_2} = \dots = \frac{\partial \bar{E}}{\partial c_n} = 0$$

La derivada parcial de \bar{E} con respecto a c_i es

$$\frac{\partial \bar{E}}{\partial c_i} = \frac{\int \phi_i \hat{H} (c_1 \phi_1 + \dots + c_n \phi_n) d\tau}{\beta} + \frac{\int (c_1 \phi_1 + \dots + c_n \phi_n) \hat{H} \phi_i d\tau}{\beta}$$

$$- \frac{\beta}{\alpha^2} \left[\int \phi_i (c_1 \phi_1 + \dots + c_n \phi_n) d\tau + \int (c_1 \phi_1 + \dots + c_n \phi_n) \phi_i d\tau \right] = 0$$

Si multiplicamos por β , recordando que α/β es igual a \bar{E} y reorganizando se obtiene

$$c_1 \left[\int \phi_1 \hat{H} \phi_1 d\tau - \bar{E} \int \phi_1 \phi_1 d\tau \right] + c_2 \left[\int \phi_1 \hat{H} \phi_2 d\tau - \bar{E} \int \phi_1 \phi_2 d\tau \right] + \dots + c_n \left[\int \phi_1 \hat{H} \phi_n d\tau - \bar{E} \int \phi_1 \phi_n d\tau \right] = 0$$

Procedemos ahora a definir los siguientes términos:

$$\int \phi_i \hat{H} \phi_j d\tau \equiv H_{ij}$$

$$\int \phi_i \phi_j d\tau \equiv S_{ij}$$

La integral S_{ij} se denomina normalmente *integral de traslape* ya que su valor es, en ciertos casos, una indicación del grado en que las dos funciones ϕ_i y ϕ_j ocupan el mismo espacio. Las integrales del tipo H_{ii} se denominan *integrales coulombicas*, y corresponden a la energía promedio en la función ϕ_i debido al campo total del sistema; por otro lado, las integrales del tipo H_{ij} se denominan *integrales de enlace o de resonancia*, y corresponden a la energía debida a la carga de traslape entre las dos funciones ϕ_i y ϕ_j . Si empleamos esta notación abreviada obtenemos ahora

$$c_1(H_{11} - \bar{E}S_{11}) + c_2(H_{12} - \bar{E}S_{12}) + \dots + c_n(H_{nn} - \bar{E}S_{nn}) = 0$$

Si siguiendo un procedimiento similar para cada una de las derivadas $\partial \bar{E} / \partial c_i$ nos da una serie de ecuaciones similares que se denominan *ecuaciones seculares*:

$$c_1(H_{11} - \bar{E}S_{11}) + c_2(H_{12} - \bar{E}S_{12}) + \dots + c_n(H_{nn} - \bar{E}S_{nn}) = 0$$

Por lo tanto, al requerir que $\partial \bar{E} / \partial c_i$ se haga cero para todos los coeficientes se produce un sistema de n ecuaciones lineales homogéneas. Si se escoge un valor para \bar{E} , quedan n incógnitas: los coeficientes c_i . Las integrales H_{ij} y S_{ij} presumiblemente se conocen ya que \hat{H} y las funciones ϕ_i son conocidas. En los cálculos cuántico-cuánticos se observa que existen usualmente soluciones no triviales (las soluciones triviales son aquellas en las que los coeficientes son todos y cada uno igual a cero, por lo que $\psi = 0$, que es una situación sin interés físico alguno) sólo para ciertos valores discretos de \bar{E} . Por lo tanto, para resolver el problema matemático se deben encontrar aquellos valores de \bar{E} para los cuales existen coeficientes no triviales. Posteriormente se sustituyen en las ecuaciones inmediatas anteriores los valores de \bar{E} de interés y se resuelve para los coeficientes (cada valor de \bar{E} tendrá su propio conjunto de coeficientes). Para realizar todo esto se parte de que la condición que deben reunir los coeficientes de un conjunto de ecuaciones lineales homogéneas para que existan soluciones no triviales es que su determinante valga cero. En este caso, los coeficientes son las incógnitas y las integrales H_{ij} y S_{ij} son conocidas, por lo que se obtiene el determinante siguiente denominada *determinante secular*:

$$\begin{vmatrix} H_{11} - \bar{E}S_{11} & H_{12} - \bar{E}S_{12} & \cdots & H_{1n} - \bar{E}S_{1n} \\ H_{21} - \bar{E}S_{21} & H_{22} - \bar{E}S_{22} & \cdots & H_{2n} - \bar{E}S_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ H_{n1} - \bar{E}S_{n1} & H_{n2} - \bar{E}S_{n2} & \cdots & H_{nn} - \bar{E}S_{nn} \end{vmatrix} = 0$$

El desarrollo de este determinante nos da una sola ecuación que contiene la incógnita \bar{E} . Cualquier valor de \bar{E} que satisfaga esta ecuación está asociado con un conjunto no trivial de coeficientes. El valor más bajo de \bar{E} es la energía promedio mínima que se obtiene al variar los coeficientes. Si sustituimos este valor de \bar{E} en las ecuaciones iniciales nos regresa n ecuaciones simultáneas para los n coeficientes, a partir de las cuales podemos conocer el valor de los coeficientes tomando en cuenta además la condición de normalización para ψ :

$$c_1^2 + c_2^2 + \cdots + c_n^2 = 1$$

Hay que hacer notar que el grado en que estarán mezcladas dos funciones de base cualesquiera en la solución final depende del tamaño del elemento fuera de la diagonal del determinante secular. Por ello se considera que las integrales H_{ij} representan los elementos de interacción entre las funciones de base i y j .

De manera general se puede concluir que los pasos a seguir en el método variacional lineal son los siguientes:

- (1) Seleccionar una base de funciones (como por ejemplo orbitales atómicos) que sea capaz de aproximar la solución exacta.
- (2) Construir el determinante secular, incluyendo la evaluación de todas las integrales del tipo H_{ij} y S_{ij} .
- (3) Resolver la ecuación del determinante para encontrar los valores de \bar{E} .
- (4) Sustituir los valores de \bar{E} de interés en las ecuaciones simultáneas y aplicar la condición de normalización para encontrar los valores de los coeficientes.

La manera práctica de resolver el determinante secular consiste inicialmente en expresar las ecuaciones iniciales de dicho determinante en forma matricial:

$$\begin{pmatrix} H_{11} - \bar{E}S_{11} & H_{12} - \bar{E}S_{12} & \cdots & H_{1n} - \bar{E}S_{1n} \\ H_{21} - \bar{E}S_{21} & H_{22} - \bar{E}S_{22} & \cdots & H_{2n} - \bar{E}S_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ H_{n1} - \bar{E}S_{n1} & H_{n2} - \bar{E}S_{n2} & \cdots & H_{nn} - \bar{E}S_{nn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} c_1 \\ c_2 \\ \vdots \\ c_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{pmatrix}$$

Basta reconocer que la primera matriz anterior es la diferencia de dos matrices para poder obtener la siguiente ecuación:

$$\begin{pmatrix} H_{11} & H_{12} & \cdots & H_{1n} \\ H_{21} & H_{22} & \cdots & H_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ H_{n1} & H_{n2} & \cdots & H_{nn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} c_1 \\ c_2 \\ \vdots \\ c_n \end{pmatrix} = E \begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} & \cdots & S_{1n} \\ S_{21} & S_{22} & \cdots & S_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ S_{n1} & S_{n2} & \cdots & S_{nn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} c_1 \\ c_2 \\ \vdots \\ c_n \end{pmatrix}$$

o lo que es lo mismo:

$$Hc_i = E_i S c_i, \quad i = 1, 2, \dots, n$$

donde se introduce el subíndice i para describir el hecho de que existen muchos valores posibles para E y que cada uno de ellos tiene asociado un conjunto característico de coeficientes. Hay que hacer notar que el *eigenvector* c_i es un vector de columna y que cada elemento está siendo multiplicado por un escalar E_i .

En general, existen tantos orbitales moleculares como funciones de base, por lo que la ecuación anterior representa en realidad n ecuaciones matriciales separadas. Para reducir estas ecuaciones a una sola ecuación matricial, reagrupamos los n vectores c_i en una matriz C de $n \times n$, y reordenamos los números E de forma apropiada para lograr las multiplicaciones apropiadas entre los elementos de las matrices:

$$\begin{pmatrix} H_{11} & H_{12} & \dots & H_{1n} \\ H_{21} & H_{22} & \dots & H_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ H_{n1} & H_{n2} & \dots & H_{nn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & \dots & c_{1n} \\ c_{21} & c_{22} & \dots & c_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{n1} & c_{n2} & \dots & c_{nn} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} & \dots & S_{1n} \\ S_{21} & S_{22} & \dots & S_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ S_{n1} & S_{n2} & \dots & S_{nn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & \dots & c_{1n} \\ c_{21} & c_{22} & \dots & c_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{n1} & c_{n2} & \dots & c_{nn} \end{pmatrix} \begin{bmatrix} E_1 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & E_2 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & E_n \end{bmatrix}$$

o bien:

$$HC = SCE$$

La matriz E es la matriz diagonal de las energías orbitales (*eigenvalores*) y C es la matriz de los coeficientes (*eigenvectores*), donde cada columna se refiere a un orbital molecular diferente.

MÉTODOS *AB INITIO* DE ORBITALES MOLECULARES

Un cálculo variacional riguroso en un sistema involucra escribir el operador hamiltoniano del sistema, elegir una función de onda de prueba que posea parámetros variables y finalmente proceder a minimizar la energía \bar{E} de la forma ya descrita con respecto a dichos parámetros. Los cálculos *ab initio* o a primeros principios (122) se refieren precisamente a aquellos cálculos en los cuales se realizan todos los pasos anteriores. Existen métodos que no realizan cálculos variacionales rigurosos, ya que, aunque emplean la técnica del determinante secular, nunca escriben de forma explícita los operadores hamiltonianos y las integrales H_{ij} no se calculan. En este rubro podemos encontrar a los métodos de Hückel simple y Hückel extendido. Este último, por ejemplo, considera que las integrales H_{ij} son iguales a la energía de un electrón en el orbital atómico i de un átomo aislado en el estado apropiado, para lo cual se hace uso de potenciales de ionización como parámetros; por otro lado, las integrales H_{ij} se evalúan en función de las integrales anteriores y el traslape para los orbitales atómicos involucrados. Estos métodos, al igual que otros de los que hablaremos más adelante, se consideran *semiemprícos* (120) ya que combinan el formalismo teórico con parámetros ajustados de los datos experimentales.

El hamiltoniano para la energía electrónica se puede expresar, en unidades atómicas (hartrees), como sigue:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 - \sum_{\mu=1}^N \sum_{i=1}^n \left(\frac{z_{\mu}}{r_{\mu i}} \right) + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \frac{1}{r_{ij}}$$

donde i y j son índices para los n electrones y μ es un índice para los N núcleos. La energía de repulsión nuclear se obtiene como

$$V_{nn} = \sum_{\mu=1}^{N-1} \sum_{\nu=\mu+1}^N \frac{z_{\mu} z_{\nu}}{r_{\mu\nu}}$$

Hemos de observar que se ha partido de la aproximación de Born-Oppenheimer para eliminar los operadores de energía cinética nuclear, y no se toman en cuenta las interacciones magnéticas entre las partículas cargadas, así como efectos relativistas en la masa. Se puede concluir que se trabaja con un sistema no relativista, con los núcleos atómicos "congelados" y sin momentos magnéticos.

Las funciones de onda empleadas se constituyen del producto antisimetrizado (respecto del intercambio de las coordenadas espaciales y de *spin* de los electrones) de uno o más *spin*-orbitales moleculares de un electrón. Para conseguir esto, se construyen las funciones ψ con base en determinantes de Slater que contengan *spin*-orbitales moleculares ϕ , para lo cual partimos de combinaciones lineales de orbitales atómicos centrados en los núcleos y cuya forma funcional y número por átomo están abiertos a elección.

Dado el hamiltoniano y una función de onda de prueba, se puede proceder a aplicar el método variacional lineal, lo cual nos lleva a las ecuaciones de Hartree-Fock:

$$\hat{F} \phi_i = \epsilon_i \phi_i$$

donde \hat{F} es el operador de Fock, cuya expresión explícita es

$$\hat{F}(1) = -\frac{1}{2} \nabla_1^2 - \sum_{\mu} \left(\frac{Z_{\mu}}{r_{1\mu}} \right) + \sum_{j=1}^n (2\hat{J}_j - \hat{K}_j)$$

y los símbolos \hat{J}_j y \hat{K}_j representan los operadores relacionados con los operadores $1/r_{ij}$ de \hat{H} . \hat{J}_j es el *operador coulombico* porque se refiere a términos de energía correspondientes a las repulsiones entre nubes de carga electrónica:

$$\hat{J}_j = \int \phi_j^*(2) (1/r_{12}) \phi_j(2) d\tau(2)$$

\hat{K}_j genera las integrales llamadas de intercambio, por lo que se conoce como *operador de intercambio*:

$$\hat{K}_j \phi_i(1) = \int \phi_j^*(2) (1/r_{12}) \phi_i(2) d\tau(2) \phi_j(1)$$

Se puede ver que la expresión (en notación de *bra-ket*)

$$\langle \phi_i | \hat{F} | \phi_i \rangle = \varepsilon_i$$

lleva a integrales del tipo

$$\langle \phi_i | \hat{J}_j | \phi_i \rangle = \langle \phi_i(1) \phi_j(2) | 1/r_{12} | \phi_i(1) \phi_j(2) \rangle = J_{ij}$$

$$\langle \phi_i | \hat{K}_j | \phi_i \rangle = \langle \phi_i(1) \phi_j(2) | 1/r_{12} | \phi_i(2) \phi_j(1) \rangle = K_{ij}$$

donde la integral J describe la repulsión entre los electrones 1 y 2 en nubes electrónicas descritas por ϕ_i y ϕ_j ; en la integral de intercambio K las dos funciones del producto del integrando difieren por un intercambio de electrones, y se mide la interacción entre la distribución (matemática) de un electrón y otro electrón en la misma distribución. Hay que hacer notar que si el spin asociado con los *spin*-orbitales ϕ_i y ϕ_j difiere, la integral K se hace cero, pero la integral J no se afecta.

De las ecuaciones de Hartree-Fock se podría pensar que los orbitales moleculares ϕ son *eigenfunciones* del operador de Fock y que el operador de Fock es, en efecto, el operador hamiltoniano. Sin embargo, existe una diferencia cualitativa importante entre \hat{F} y \hat{H} , ya que el operador de Fock es a su vez una función de los orbitales moleculares ϕ . Dado que el índice j de la suma en el operador de Fock incluye a i , los operadores \hat{J}_i y \hat{K}_i deben conocerse para poder escribir \hat{F} , pero \hat{J}_i y \hat{K}_i involucran a ϕ_i , y es ϕ_i una eigenfunción de \hat{F} . Por lo tanto, se necesita a \hat{F} para encontrar a ϕ_i , y se necesita a ϕ_i para conocer a \hat{F} . Para sobrepasar este problema, se sigue un camino iterativo. Se parte de orbitales moleculares ϕ de prueba (como aquéllos provenientes de un método semiempírico) para construir al operador \hat{F} , el cual se utiliza para encontrar nuevos orbitales moleculares ϕ' . Estos se utilizan a su vez para construir un nuevo operador de Fock, que entonces se emplea para encontrar nuevos orbitales moleculares que permitan generar un nuevo operador de Fock, y así sucesivamente hasta que no exista un cambio significativo en dos pasos sucesivos de este procedimiento. En este momento, los orbitales moleculares ϕ' producidos por \hat{F} serán los mismos que producen los campos coulómicos y de intercambio de \hat{F} . Este tipo de soluciones se les conoce como auto-consistentes, por lo que el método se conoce como *método de campo auto-consistente*.

Al obtener la energía ε_i como acabamos de describir obtenemos la expresión

$$\varepsilon_i = H_{ii} + \sum_{j=1}^n (2J_{ij} - K_{ij})$$

donde la cantidad H_{ii} es la suma de la energía cinética promedio y la atracción núcleo-electrón para el electrón en ϕ_i . La suma de las integrales coulombica y de intercambio contiene toda la energía de interacción electrónica. El índice j recorre los orbitales moleculares ocupados. Para un valor particular de j , digamos por ejemplo $j = k \neq i$, se obtiene $2J_{ik} - K_{ik}$ como energía de interacción. Esto significa que un electrón en ϕ_i experimenta una energía de interacción con los dos electrones de ϕ_k de la forma

$$2\langle \phi_i(1)\phi_k(2) | 1/r_{12} | \phi_i(1)\phi_k(2) \rangle - \langle \phi_i(1)\phi_k(2) | 1/r_{12} | \phi_k(1)\phi_i(2) \rangle$$

La primera parte corresponde a la repulsión clásica entre un electrón en una nube orbital de carga dada por $|\phi_i|^2$ y los dos electrones con una nube de carga $|\phi_k|^2$. La segunda parte es el término de intercambio que surge de la naturaleza antisimétrica de la función de onda; participa sólo en una ocasión ya que el electrón en ϕ_i tiene el mismo *spin* con uno de los dos electrones en ϕ_k . La suma sobre $2J_{ij} - K_{ij}$ incluye el caso en que $j = i$, donde se obtiene $2J_{ii} - K_{ii}$. Sin embargo, si regresamos a las definiciones ya descritas de las integrales J y K , vemos que $J_{ii} = K_{ii}$, por lo que sólo nos queda J_{ii} . Este término corresponde a la energía de repulsión entre un electrón en ϕ_i (de quien estamos calculando la energía) y el otro electrón en ϕ_i . Dado que estos electrones se presentan con *spin* opuesto, no existe un término de energía de intercambio para dicha interacción.

En conclusión, el término ϵ_i se conoce como *energía orbital* o *energía monoeléctronica*, y se interpreta como la energía de un electrón en ϕ_i que resulta de su energía cinética, su energía de atracción con los núcleos y sus energías de repulsión e intercambio con los demás electrones en sus nubes de carga $|\phi_j|^2$.

Debido a que si sumamos todas las energías orbitales introducimos por duplicado los términos de repulsión e intercambio entre los electrones, la energía electrónica total es la suma de las energías monoeléctronicas menos los términos de repulsión e intercambio:

$$E_{elec} = \sum_{i=1}^n \left[2\epsilon_i - \sum_{j=1}^n (2J_{ij} - K_{ij}) \right] = \sum_{i=1}^n \left[2H_{ii} + \sum_{j=1}^n (2J_{ij} - K_{ij}) \right]$$

Para obtener la energía total (electrónica más nuclear), se añade la energía de repulsión internuclear para los N núcleos:

$$E_{tot} = E_{elec} + V_{nn}$$

$$V_{nn} = \sum_{\mu=1}^{N-1} \sum_{\nu=\mu+1}^N \frac{Z_{\mu}Z_{\nu}}{r_{\mu\nu}}$$

MÉTODOS SEMI-EMPÍRICOS DE ORBITALES MOLECULARES

Como ya hemos visto, los cálculos *ab initio* involucran la evaluación exacta y explícita de todas las integrales presentes en los términos de la matriz de Fock, los cuales podemos resumir de la siguiente manera:

- (a) Energías monocéntricas monoeléctricas $U_{\mu\mu}$, que representan la suma de la energía cinética de un electrón en el orbital atómico ϕ_{μ} del átomo A y la energía potencial debida a la atracción del *core* del átomo A.
- (b) Integrales monocéntricas bielectrónicas de repulsión, es decir, integrales coulombicas $(\mu\mu, \nu\nu) = g_{\mu\nu}$ e integrales de intercambio $(\mu\nu, \mu\nu) = h_{\mu\nu}$.
- (c) Integrales bicéntricas de resonancia de *core* de un electrón $\beta_{\mu\lambda}$.
- (d) Atracciones bicéntricas de un electrón $V_{\mu\nu, B}$ entre un electrón en el átomo A en la distribución $\psi_{\mu}\psi_{\nu}$ y el *core* de un átomo B.
- (e) Integrales bicéntricas bielectrónicas de repulsión dos electrones $(\mu\nu, \lambda\sigma)$.

Para sistemas de muchos núcleos y electrones, el número de integrales de dos electrones se hace enorme, con un costo altísimo en términos de tiempo y capacidades de cómputo. Por lo anterior, se han realizado muchos esfuerzos para realizar simplificaciones que permitan reducir el tiempo de cómputo. En los diversos métodos semiempíricos se desprecia una gran cantidad de estas integrales, lo que se trata de compensar introduciendo parámetros empíricos provenientes de datos atómicos o moleculares experimentales. El número de integrales de repulsión electrónica se reduce también significativamente debido a que estos métodos sólo tratan de manera explícita a los electrones de valencia, pues suponen que los orbitales de *core* no participan en los enlaces químicos. Asimismo emplean una base mínima de orbitales atómicos de valencia (es decir, orbitales tipo Slater o *STO*), lo que permite tener un número pequeño de orbitales para describir bien al sistema (si bien dificulta la evaluación de las integrales bielectrónicas, por lo que se desprecian y/o se introducen parámetros) (120).

Dado que muchas de las integrales de dos electrones tienen valores muy pequeños, una solución obvia ha sido el ignorar dichas integrales. Las aproximaciones que se han desarrollado parten de la idea de lo que se conoce en inglés como *neglect of differential overlap* (eliminación del traslape diferencial) entre orbitales atómicos en las moléculas (120, 122). El traslape diferencial dS entre dos orbitales atómicos χ_a y χ_b es el producto de estas funciones en el elemento diferencial de volumen dV :

$$dS = \chi_a(1)\chi_b(1)dv$$

La única manera para que dicho traslape diferencial se haga igual a cero en dv es que χ_a o χ_b , o ambos, sean idénticamente iguales a cero en dv . El traslape diferencial de cero (*zero differential overlap* o *ZDO*) entre χ_a y χ_b en todos los elementos de volumen requiere que χ_a y χ_b nunca puedan ser finitos en la misma región. Es fácil ver que si existe *ZDO* entre χ_a y χ_b en todos los dv , entonces la integral de traslape S también debe hacerse igual a cero. Lo opuesto no es verdad, sin embargo: S puede ser cero para dos funciones ortogonales aún si son finitas en la misma región. Es fácil pensar en pares de orbitales atómicos que sean ortogonales entre sí, pero dado que en general son funciones exponenciales, siempre existe cierta interpenetración entre ellos.

El principal atractivo de la aproximación de *ZDO* es que hace que todas las integrales multicéntricas se anulen. Por lo tanto, en una base de orbitales atómicos χ que tengan *ZDO*, la integral $\langle \chi_a(1)\chi_c(1) | 1/r_{12} | \chi_b(2)\chi_d(2) \rangle$ se hace igual a cero a menos que $a = c$ y $b = d$. Esto surge a raíz de que, si $a \neq c$, $\chi_a^*(1)\chi_c(1)$ es idéntico a cero, lo que obliga al integrando a anularse en todos lados, sin importar cuánto vale el producto $(1/r_{12})\chi_b^*(2)\chi_d(2)$.

Podemos empezar nuestro tratamiento escribiendo los términos de la energía total que se asocian con todos los *cores*: la energía cinética de los electrones de *core*, la atracción entre los electrones de *core* y los núcleos y la repulsión entre los núcleos y entre los electrones de las distintas capas internas:

$$E_{KL}^{core} = \sum_{\lambda \in K} \left\{ 2 \langle \lambda | -\frac{1}{2} \nabla_{\lambda}^2 - \frac{Z_K}{r_K} | \lambda \rangle + \sum_{\nu \in K} [2(\lambda\lambda | \nu\nu) - (\lambda\nu | \lambda\nu)] \right\} + \frac{Z_K Z_L}{R_{KL}} + \sum_{\lambda \in K, \eta \in L} [2(\lambda\lambda | \eta\eta) - (\lambda\eta | \lambda\eta)] - \sum_{\lambda \in K, \eta \in L} 2 \left\{ \langle \lambda | \frac{Z_L}{r_L} | \lambda \rangle + \langle \eta | \frac{Z_K}{r_K} | \eta \rangle \right\}$$

donde K y L se refieren a los diferentes núcleos, λ y ν son las capas atómicas internas en el átomo K , y η (γ , en lo sucesivo, σ y ζ) denota las capas atómicas internas en el átomo L ($\neq K$). La única parte de la energía que depende de la matriz de densidad (matriz con los cuadrados de los eigenvectores) es la porción de la valencia:

$$E_{KL}^{val} = \sum_{\lambda', \mu'} P_{\lambda', \mu'} H_{\lambda', \mu'}^{core} + \sum_{\eta} [2(\lambda' \mu' | \eta \eta) - (\lambda' \eta | \mu' \eta)] +$$

$$\sum_{\lambda', \mu'} P_{\lambda', \mu'} \sum_{\nu', \eta'} P_{\nu', \eta'} [(\lambda' \mu' | \nu' \eta') - \frac{1}{2}(\lambda' \eta' | \nu' \mu')]$$

las primas denotan las capas de valencia. En la ecuación anterior hemos introducido el término μ para un orbital centrado en el átomo K (y que puede ser igual a λ o ν). Las ecuaciones de Hartree-Fock se deben reescribir de tal forma que sólo sean aplicables a los orbitales de valencia. No presentamos dicha deducción, y procedemos a mostrar los elementos diagonales de la matriz de Fock reducida:

$$F_{\mu' \mu'} = U_{\mu' \mu'} + \sum_{K \neq L} V_{\mu' \mu'}^L + \sum_{\eta', \sigma'} P_{\eta', \sigma'} [(\mu' \mu' | \eta' \sigma') - \frac{1}{2}(\mu' \eta' | \mu' \sigma')]$$

donde

$$U_{\mu' \mu'} = \langle \mu' | -\frac{1}{2} \nabla_{\mu'}^2 - \frac{Z_K}{r_K} | \mu' \rangle + \sum_{\lambda \in K} [2(\mu' \nu' | \lambda \lambda) - (\mu' \lambda | \nu' \lambda)]$$

y

$$V_{\mu' \mu'}^L = \langle \mu' | -\frac{Z_L}{r_L} | \mu' \rangle + \sum_{\eta \in L} [2(\mu' \nu' | \eta \eta) - (\mu' \eta | \nu' \eta)]$$

Los términos fuera de la diagonal, si consideramos un átomo específico K , toman la forma:

$$F_{\mu' \nu'} = U_{\mu' \nu'} + \sum_L V_{\mu' \nu'}^L + \sum_{\eta', \sigma'} P_{\eta', \sigma'} [(\mu' \nu' | \eta' \sigma') - \frac{1}{2}(\mu' \eta' | \nu' \sigma')]$$

y los términos bicéntricos se convierten en:

$$F_{\mu' \zeta'} = H_{\mu' \zeta'}^{core} + \sum_{\nu} [2(\mu' \zeta' | \nu \nu) - (\mu' \nu | \zeta' \nu)] +$$

$$\sum_{\eta'\sigma'} P_{\eta'\sigma'} [(\mu'\zeta'|\eta'\sigma') - \frac{1}{2}(\mu'\eta'|\zeta'\sigma')]$$

Los primeros dos términos de la ecuación anterior son elementos del *hamiltoniano efectivo de core*, que incluye las interacciones entre los electrones de capas internas y los electrones de valencia.

Las integrales monocéntricas bielectrónicas se calculan mediante parámetros espectroscópicos experimentales. Estos, en combinación con los potenciales de ionización (I) y las afinidades electrónicas (A), permiten obtener estimados del término $U_{\mu'\mu'}$ ya descrito.

La consideración final que se realiza en la aproximación de *ZDO* se refiere a la manera de calcular las integrales bielectrónicas mono y bicéntricas. Esto se puede hacer a tres niveles distintos. La aproximación más cruda la constituye el método *CNDO* (*Complete Neglect of Differential Overlap*), o de eliminación completa del traslape diferencial, y que implica evaluar solamente las integrales que satisfacen la relación

$$\gamma_{KL}^{CNDO} = (\mu' \nu' | \zeta' \eta') \delta_{\mu'\nu'} \delta_{\zeta'\eta'}$$

que es una expresión que sólo depende de la separación interatómica y la naturaleza de los átomos K y L . Los términos $U_{\mu'\mu'}$ se obtienen de los valores experimentales de los potenciales de ionización y las afinidades electrónicas. Se introducen también parámetros semiempíricos β_{KL}^0 para los hamiltonianos de *core*, y se supone que la energía de repulsión *core-core* se debe a la repulsión coulombica entre dos cargas puntuales. Dentro de esta aproximación y empleando Z'_K para denotar el número de electrones de valencia en el átomo K , se obtienen las siguientes ecuaciones para la matriz reducida de Fock:

$$F_{\mu'\mu'} = -\frac{1}{2}(I_{\mu'} + A_{\mu'}) + \left[\left(\sum_{\mu \in K} P_{\mu'\mu'} \right) - Z'_K - \frac{1}{2}(P_{\mu'\mu'} - 1) \right] \gamma_{KK}^{CNDO} +$$

$$+ \sum_{L \neq K} \left[\left(\sum_L P_{\zeta' \zeta'} \right) - z'_L \right] \gamma_{KL}^{CNDO}$$

$$F_{\mu' \nu'} = -\frac{1}{2} P_{\mu' \nu'} \gamma_{KK}^{CNDO}$$

$$F_{\mu' \zeta'} = \beta_{KL}^0 S_{\mu' \zeta'} - \frac{1}{2} P_{\mu' \zeta'} \gamma_{KL}^{CNDO}$$

Los parámetros β_{KL}^0 se ajustan generalmente contra cálculos *ab initio*. El método *CNDO* es bueno para calcular, por ejemplo, momentos dipolares, pero malo para los calores de formación. En la actualidad no se utiliza frecuentemente.

Dado que sólo se conserva una pequeña porción de las integrales bielectrónicas en el método *CNDO*, éste constituye para muchos fines una aproximación demasiado burda ya que no describe bien un gran número de propiedades. En el método de *INDO* (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*) o de eliminación intermedia del traslape diferencial, se retienen adicionalmente términos del tipo $(\mu' \nu' | \mu' \nu')$. Este método no es aún suficientemente preciso, por ejemplo, para buenas optimizaciones de geometría y la evaluación de propiedades dependientes de ella. Sin embargo, se le utiliza frecuentemente en cálculos espectroscópicos para simulaciones de espectros de *ESR* y *NMR*.

Finalmente, tenemos el nivel más avanzado dentro de la aproximación de *ZDO*, que es el método *NDDO* (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*) o eliminación del traslape diferencial diatómico. En este método, todas las integrales monocéntricas se evalúan por medio de parámetros espectroscópicos, potenciales de ionización y afinidades electrónicas. Posteriormente, las integrales bicéntricas bielectrónicas son evaluadas. Las ecuaciones de la matriz reducida de Hartree-Fock pasan a ser las siguientes:

$$F_{\mu' \mu'} = U_{\mu' \mu'} + \sum_L V_{\mu' \mu'}^L + \sum_{\nu \neq \mu} P_{\nu \nu'} [(\mu' \mu' | \nu' \nu') - \frac{1}{2} (\mu' \nu' | \mu' \nu')] +$$

$$\sum_L \sum_{\eta', \sigma' \in L} P_{\eta' \sigma'} (\mu' \mu' | \eta' \sigma')$$

$$F_{\mu'v} = \sum_L V_{\mu'v}^L + P_{\mu'v} [(\mu'v|\mu'v) - \frac{1}{2}(\mu'\mu'|v'v)] + \sum_L \sum_{\eta'\sigma' \in L} P_{\eta'\sigma'} (\mu'v|\eta'\sigma')$$

$$F_{\mu'\zeta'} = H_{\mu'\zeta'}^{core} - \frac{1}{2} \sum_{v \in K, \sigma' \in L} P_{v\sigma'} (\mu'\zeta'|v\sigma')$$

Esta no es una aproximación tan drástica como en el *CNDO* o *INDO*, y requiere consecuentemente de un mayor esfuerzo computacional. En vez de utilizar el método *NDDO* por completo, se han desarrollado métodos más apropiados desde el punto de vista computacional: *MNDO*, *AM1*, y *PM3*.

Una de las modificaciones iniciales y más populares del método *NDDO* es el método *MNDO* (*Modified Neglect of Differential Overlap*) o de eliminación modificada del traslape diferencial (120, 124-130). En este método, los parámetros que se utilizan provienen de un ajuste de datos espectroscópicos para evaluar las energías atómicas y iónicas. Los valores de las *U* también son diferentes. Ahora, las *V*, o sea la interacción de los electrones de valencia en el átomo *K* con el *core* del átomo *L*, se consideran como sigue:

$$V_{\mu'v}^L = -Z'_L (\mu'v|s^L s^L)$$

donde el *core* del átomo *L* se supone que tiene una distribución esférica. Para las integrales de *core* tenemos que

$$H_{\mu'\zeta'}^{core} = \left(\frac{\beta_{\mu'}^K + \beta_{\zeta'}^L}{2} \right) S_{\mu'\zeta'}$$

donde las β son parámetros empíricos. Los términos de interacción *core-core* se establecen como

$$E_{KL}^{c-c} = Z'_K Z'_L (s^K s^K | s^L s^L) [1 + \exp(-\alpha_K R_{KL}) + \exp(-\alpha_L R_{KL})]$$

Finalmente, las integrales bicéntricas bielectrónicas se expanden como una serie de multipolos que se ajustan para que aproximen las soluciones monocéntricas conforme

$R_{KL} \rightarrow 0$. Los exponentes de Slater en los orbitales atómicos se pre-optimizan para que reproduzcan un gran número de propiedades en moléculas de prueba. El método trabaja bastante bien para propiedades de estado basal, pero tiene varias desventajas importantes (131):

- (1) Se subestima la estabilidad de las moléculas estéricamente sobrepobladas, como el caso del neopentano.
- (2) Se sobreestima la estabilidad de los anillos de cuatro miembros, como el cubano.
- (3) Se subestima la estabilidad de los compuestos hipervalentes, como el ácido sulfúrico.
- (4) Se sobreestiman en general las barreras de activación.
- (5) Se predice que las estructuras no clásicas son inestables con respecto a las estructuras clásicas, como en el radical etilo.
- (6) Los sustituyentes oxigenados en anillos aromáticos están fuera del plano, como en el nitrobeneno.
- (7) El enlace de peróxido se subestima sistemáticamente por alrededor de 0.17 Å.
- (8) El ángulo C-O-C de los éteres se sobreestima por alrededor de 9°.
- (9) Los puentes de hidrógeno son prácticamente inexistentes, como en el caso del dímero de agua.

Para resolver principalmente este último problema, Dewar *et al* modificaron el término de repulsión *core-core*, lo que se tradujo en el método *AMI (Austin Model I)* (132-134). La modificación referida es la siguiente:

$$E_{KL}^{c-c} = Z'_K Z'_L (s^K s^K | s^L s^L) [1 + \exp(-\alpha_K R_{KL}) + \exp(-\alpha_L R_{KL})] + \frac{Z'_K Z'_L}{R_{KL}} \left[\sum_{k=1}^4 a_{KK} \exp(-b_{KK} (R_{KL} - C_{KK})^2) + a_{KL} \exp(-b_{KL} (R_{KL} - CL)^2) \right]$$

la cual contiene doce parámetros nuevos por átomo, introducidos por los términos gaussianos repulsivos adicionales. Las mejoras en este método son las siguientes (131):

- (1) Se reproducen mejor los puentes de hidrógeno.
- (2) Se mejoran las estimaciones de las barreras de activación de reacciones químicas.
- (3) Los compuestos hipervalentes de fósforo se describen mejor.
- (4) Los errores en el calor de formación se reducen alrededor del 40%.

Sin embargo, se introducen algunas deficiencias, entre las que destacan:

- (1) Las interacciones del fósforo con otros átomos a distancias intermedias (3 Å) no se describen bien, y se introducen distorsiones en geometrías simétricas.
- (2) Los grupos alquílicos tienen un error sistemático en el calor de formación, ya que el fragmento CH_2 es muy negativo por alrededor de 2 kcal/mol.
- (3) Los compuestos nitrados, aunque se describen mejor, siguen teniendo sistemáticamente una energía muy alta.
- (4) El enlace de peróxido sigue siendo subestimado sistemáticamente por alrededor de 0.17 Å.

Stewart realizó una reparametrización bastante grande del método *AMI*, y empleando dos en vez de cuatro términos repulsivos por átomo en la ecuación anterior, dió origen al método *PM3* (131,135). Este fue parametrizado y optimizado para un gran conjunto de moléculas de prueba y al parecer da resultados muy buenos comparados con los experimentos. Reproduce muy bien los puentes de hidrógeno y las barreras de rotación interna. Asimismo, los compuestos hipervalentes se describen mucho mejor y los errores en el calor de formación se reducen en un 40% con respecto al método *AMI*. Las desventajas de este método no se conocen del todo debido a que aún no existe suficiente información en la literatura sobre los resultados que produce como para poder juzgarlo adecuadamente. Se sabe, por otro lado, que la barrera de rotación en la formamida prácticamente no se logra reproducir en este método.

Como comentario final sobre todos los métodos semiempíricos, en particular los tres últimos, se debe añadir que, debido a la parametrización, se considera que contienen en alguna forma no explicada del todo la correlación electrónica, lo que les permite aproximar bien en ciertos casos los resultados experimentales.

PROPIEDADES ELECTRÓNICAS

Hasta ahora hemos revisado los fundamentos teóricos de los métodos de orbitales moleculares que permiten obtener las funciones de onda y las energías orbitales asociadas. Veamos ahora cómo podemos obtener, según Mulliken, las distintas variables de estructura electrónica que nos serán de utilidad para nuestro trabajo (120,122).

Hemos visto hasta ahora que la función de onda total de una molécula se puede expresar como el producto de las funciones que describen los orbitales moleculares:

$$\Psi = \phi_1 \phi_2 \cdots \phi_n$$

Para la mayoría de las propiedades físicas de interés, necesitamos conocer la probabilidad de encontrar un electrón en un elemento de volumen tridimensional, que será igual a la suma de las probabilidades de encontrar cada uno de los electrones de la molécula en dicho elemento de volumen, lo que se denomina *función de densidad monoeléctronica* q_i y se expresa de la forma siguiente:

$$q_i = \sum_k n_k c_{ik}^2$$

donde k es el índice del orbital molecular, c_{ik} es el coeficiente de un orbital atómico en el átomo i en el orbital molecular k , n_k es el número de electrones (0,1 o 2) en el orbital molecular k , y la suma se realiza sobre todos los orbitales moleculares.

Cuando lo que se desea es obtener la distribución electrónica en los enlaces en vez de en los átomos, se hace uso del concepto de *orden de enlace* p_{ij} entre átomos vecinos:

$$p_{ij} = 2 \sum_k n_k c_{ik} c_{jk} S_{jk}$$

donde los símbolos son los mismos de la ecuación anterior y la suma se realiza igualmente sobre todos los orbitales moleculares.

De las energías orbitales (los *eigenvalores*) se puede, mediante el teorema de Koopmans (122), obtener una primera aproximación al potencial de ionización (PI), ya que este se obtiene mediante la expresión:

$$PI = -E_{HOMO}$$

El momento dipolar eléctrico (μ) se puede obtener mediante el operador respectivo (120):

$$\hat{\mu} = -\sum_{i=1}^n \vec{r}_i$$

al cual se añaden las contribuciones clásicas debidas a los núcleos (A) con cargas Z . Empleando una conjunto base $\{\phi_{\mu}\}$, el valor esperado del momento dipolar se obtiene mediante la expresión:

$$\langle \mu \rangle = -\sum_{\mu, \nu} P_{\mu\nu} \langle \mu | \vec{r} | \nu \rangle + \sum_A Z_A \vec{R}_A$$

donde la suma involucra a todos los átomos.

Finalmente hablaremos del *calor de formación* (120), que no es propiamente una propiedad electrónica. El calor de formación ΔH_f^{mol} de una molécula se obtiene de su energía total al restarle las energías electrónicas E_{el} y sumarle los calores de formación experimentales ΔH_f de cada uno de los átomos de la molécula:

$$\Delta H_f^{mol} = E_{tot}^{mol} - \sum E_{el} + \sum \Delta H_f$$

Las energías electrónicas de los átomos se calculan de las funciones de onda empleando las mismas aproximaciones y parámetros que el método de cálculo que se esté utilizando.

SUPERFICIES Y VOLÚMENES MOLECULARES

El volumen de van der Waals (115) de una molécula es el volumen que ocupa dicha molécula y que es impenetrable por otras moléculas en el intervalo de energías térmicas a temperaturas ordinarias. El cálculo del volumen de van der Waals presupone un conocimiento de las distancias y ángulos de enlace, así como de las distancias de contacto (radios de van der Waals) y formas características de los átomos en una configuración molecular dada. Un hecho fundamental atrás de este concepto es que el radio de van der Waals de un átomo es generalmente invariante a la combinación química de dicho átomo y a la presencia de otros átomos vecinos no enlazados. Con base en lo anterior, revisemos la naturaleza del radio de van der Waals desde el punto de vista de la distribución de la densidad electrónica en torno a un átomo.

La densidad electrónica ψ^2 a una distancia r del core de un átomo hidrogenoide con un electrón está dada por la expresión:

$$\psi^2 = C^2 \exp\left(-\frac{2\sqrt{2m_e I_0}}{h} r\right)$$

donde m_e es la masa del electrón en reposo, I_0 es el primer potencial de ionización del átomo y C es la constante de normalización. Conforme dos átomos se acercan el uno al otro desde $r = \infty$ sus nubes electrónicas se interpenetran cada vez más. El principio de exclusión de Pauli produce entonces una repulsión de los dos átomos que es directamente proporcional a la densidad electrónica en la región de interpenetración. Se puede entonces definir el radio de van der Waals como la distancia r a la cual esta repulsión se encuentra en equilibrio con las fuerzas de atracción entre los átomos.

Para conocer el valor de la superficie molecular, la estructura atómica se representa como la superposición de esferas de valores apropiados del radio de van der Waals (116). La estructura continua se secciona por una serie de planos paralelos con un espacio predeterminado. La intersección de cada esfera con un plano dado aparece como un círculo. Los arcos de los círculos que traslapan para átomos distintos se

eliminan. El dibujo de cualquier plano se convierte entonces en la superficie continua de van der Waals.

Por otro lado tenemos el concepto de superficie de acceso del disolvente desarrollado por Lee y Richards (116,113) del cual ya se ha hablado anteriormente. Para fines del cálculo, entonces, un átomo o grupo de átomos se definen como accesibles si se puede hacer que una molécula esférica de disolvente de un tamaño específico haga contacto con la superficie de van der Waals de la molécula de soluto. Se centra una esfera en cada posición atómica de acuerdo a las coordenadas proporcionadas y se le asigna un radio R igual a la suma del radio de van der Waals del átomo más el radio escogido de la molécula de disolvente. La superficie calculada es cada posición en la que el centro de la molécula del disolvente se puede poner en contacto con un átomo conforme es deslizada sobre el soluto permitiendo el máximo contacto posible sin que penetre en otros átomos de la molécula. Un átomo es accesible si cualquier parte de un arco alrededor de él hace contacto. La longitud del arco es una medida de la accesibilidad en dicho plano. La superficie accesible total A es directamente proporcional a la suma de las longitudes de todos los arcos de contacto para cada átomo. Sólo hay que hacer la observación de que para calcular el volumen de van der Waals por este tipo de algoritmos, basta con asignarle un valor de cero al radio R de la molécula del disolvente. Una aproximación al área total se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$A = \sum (R \sqrt{R^2 - Z_i^2}) \cdot D \cdot L_i$$
$$D = \Delta Z / 2 + \Delta' Z$$

donde L_i es la longitud del arco de contacto para una sección i dada, Z_i es la distancia perpendicular del centro de la esfera a la sección i , ΔZ es el espaciamiento entre las secciones, y $\Delta' Z$ es $\Delta Z / 2$ o $R - Z_i$, el que sea menor. La suma se realiza sobre todos los arcos de contacto para cada átomo. Es conveniente enfatizar que lo que se calcula aquí es la superficie de acceso al disolvente estática, ya que no se realiza ninguna corrección por la flexibilidad potencial o el movimiento de subgrupos estructurales en las moléculas.

El volumen que encierra la superficie de acceso al disolvente se puede calcular particionando este volumen en formas más simples cuyos volúmenes se puedan calcular más fácilmente por medio de técnicas de geometría de sólidos o cálculo integral.

En nuestro trabajo de tesis procedimos a calcular las superficies y volúmenes ya descritos para todas las moléculas y para grupos químicos estructurales de interés.

RESULTADOS



RESULTADOS DE MECANICA MOLECULAR

Se realizaron varios cálculos a nivel de mecánica molecular para los compuestos inhibidores y el sustrato ya descritos con el fin de obtener, en principio, las geometrías de equilibrio de mínima energía. Estos cálculos se realizaron con el programa PCMODEL, versión 4.0 de Serena Software (Ergo Computing, Inc. for Lahey, 1990), implementado en computadoras personales (PC's) 386-DX y 486-DX del Departamento de Física y Química Teórica.

Se realizó la minimización total de la energía de los compuestos debida a su geometría, y se procedió a verificar que las geometrías obtenidas correspondieran a mínimos globales de energía; esto se realizó por la medición de las barreras de rotación interna de los enlaces que puede realizar el programa. Para aquellos casos en que la energía podía al parecer disminuirse aun más, se operaba la rotación adecuada del enlace apropiado y se realizaba entonces de nuevo una minimización total de la energía al permitirse la relajación de toda la molécula. Este proceso se realizaba varias veces hasta que se obtenía una geometría correspondiente a un mínimo absoluto de energía, y entonces se procedía a registrar las coordenadas internas de los átomos y algunas de las propiedades fisicoquímicas que reporta el programa, en particular el momento dipolar y el calor de formación. De las geometrías finales se extrajeron posteriormente distintos parámetros estructurales, como distancias de enlace e interatómicas, ángulos de enlace y ángulos diedros.

Por otro lado, a partir de las geometrías de mínima energía y con el mismo programa se realizaron cálculos de las superficies totales de van der Waals y de solvatación acuosa, así como de las superficies no polar saturada, no polar insaturada y polar, para ambos casos. En el caso de las superficies de solvatación acuosa, el programa proporcionó también las porciones de superficie accesibles. Para realizar de forma más precisa estos cálculos se ajustó el incremento estándar de 0.25 Å entre los planos de sección de las moléculas a un valor óptimo de 0.05 Å.

Conviene destacar que no se pudo realizar el estudio correspondiente para los compuestos *fosfoenolpiruvato* y *fosfoglicolato*, ya que el programa utilizado no

tiene los parámetros necesarios para el cálculo de las distintas contribuciones a la energía asociada con el enlace *S-P* de estas dos moléculas.

RESULTADOS DE MNDO Y AM1

Se realizaron varios cálculos químico-cuánticos dentro de las aproximaciones de los métodos semiempíricos MNDO y AM1 para los compuestos inhibidores y el sustrato ya descritos. Estos cálculos se realizaron con el programa MOPAC, versión 6.00 elaborado por el Frank J. Seiler Research Laboratory para Serena Software (Ergo Computing, Inc. for Lahey, 1990), implementado en computadoras personales (PC's) 386-DX y 486-DX del Departamento de Física y Química Teórica.

Para ambos métodos se procedió a introducir como coordenadas internas iniciales aquellas proporcionadas por los cálculos anteriores de mecánica molecular, especificando la carga neta de las moléculas, el límite máximo posible en los criterios de convergencia en energía para las optimizaciones de geometría, el método semiempírico a utilizar, así como otros comandos de control del programa. Se procedió a optimizar al máximo la geometría de cada una de las moléculas para obtener finalmente las propiedades electrónicas de interés. De las geometrías finales se extrajeron posteriormente distintos parámetros estructurales, como distancias de enlace e interatómicas, ángulos de enlace y ángulos diedros. Las variables de estructura electrónica que se investigaron fueron las siguientes:

- (1) Energías de los orbitales moleculares, particularmente el HOMO y el LUMO.
- (2) Cargas netas en los átomos.
- (3) Ordenes de enlace entre los átomos.
- (4) Matriz de densidad electrónica para el HOMO y el LUMO.
- (5) Potencial de ionización, momento dipolar y calor de formación.

A continuación presentamos una tabla donde se presenta la desviación cuadrática media de las distancias interatómicas entre todos los átomos según las geometrías

obtenidas con los métodos MNDO y AM1 con respecto a aquéllas obtenidas con mecánica molecular.

MOLECULA	DESVIACION CUADRATICA MEDIA (Å)	
	MNDO	AM1
Fosfato del ácido 1-hidrox ciclopropanoico	0.0473	0.0315
Z-bromo-fosfoenolpiruvato	0.0336	0.0643
Z-metil-fosfoenolpiruvato	0.0283	0.0147
Z-cloro-fosfoenolpiruvato	0.0282	0.0516
3,3-dicloro-2-dihidroxifosfinoil-metil-2-propenoato	0.0305	0.0512
Z-fluoro-fosfoenolpiruvato	0.0302	0.0350
L-2-Fosfolactato	0.0554	0.0338
E-metil-fosfoenolpiruvato	0.0309	0.0187
Fosfoglicolato	0.0241	0.0185
Dimetil-fosfoenolpiruvato	0.0373	0.0126
Fosfoenolpiruvato fosfonato	0.0360	0.0364
E-ciano-fosfoenolpiruvato	0.0364	0.0564
Fosfonoacetato	0.0139	0.0261
Fosfomalato	0.0304	0.0259
Fosfonopropionato	0.0232	0.0314

Se concluye que los cambios globales en las geometrías de equilibrio después de las optimizaciones con los métodos semi-empíricos son pequeños, si bien esto no significa que las posibles correlaciones entre la actividad y los descriptores geométricos no dependan críticamente de modificaciones muy leves en los últimos. Consideramos que es necesario aquí contar con geometrías de equilibrio confiables (las cuáles no se han reportado en la literatura), como aquéllas provenientes de cálculos *ab initio*, a fin de comparar la calidad de los resultados obtenidos con cada uno de los métodos empleados. Esto permitirá decidir qué método es el más adecuado para realizar una primera aproximación al problema de calcular propiedades geométricas en estudios de QSAR para sistemas químicos parecidos al estudiado en este trabajo, donde hay varios átomos de oxígeno y un átomo de fósforo.

En esta ocasión sí se pudo realizar el estudio correspondiente para los compuestos *fosfoenolpiruvato* y *fosfoglicolato*, lo que permitió ampliar el número de compuestos estudiados con aquéllos que contienen azufre.

SUPERFICIES Y VOLÚMENES DE VAN DER WAALS Y DE ACCESO AL DISOLVENTE

A partir de las geometrías finales optimizadas por los método de MNDO y AM1, se procedió a realizar el cálculo de las superficies y volúmenes (parciales y totales) de van der Waals y de acceso al disolvente (sólo para MNDO, y según la definición de Lee y Richards) por medio de un programa denominado *SAVOL*, cuyo código en FORTRAN fue desarrollado por R. S. Pearlman (del College of Pharmacy, University of Texas at Austin). Este programa lo adaptamos y compilamos en una estación de trabajo *Iris INDIGO* de Silicon Graphics, equipo que pertenece al Departamento de Física y Química Teórica de la Facultad de Química. Los cálculos se realizaron dentro del nivel máximo de precisión que permite el programa, es decir, con incrementos de 0.1° entre cada rotación de los planos de sección de la molécula en estudio. En la siguiente tabla se muestran los radios atómicos de van der Waals que se emplearon para los cálculos realizados (111,114,115):

ATOMO	RADIO ATOMICO DE VAN DER WAALS (Å)*
Carbono	1.7
Hidrógeno	1.1
Oxígeno	1.4
Fósforo	1.9
Azufre	1.8
Flúor	1.4
Cloro	1.8
Bromo	1.9
Nitrógeno	1.5

Para el cálculo de las superficies y volúmenes de van der Waals se consideró que el radio del disolvente era de 0.0 Å, mientras que para las superficies y volúmenes de acceso del disolvente se tomó el radio del disolvente (agua) como 1.4 Å.

El programa es capaz de proporcionar las superficies y los volúmenes ya mencionados por átomo, por grupos de átomos (especificados por el usuario) y de toda la molécula, con base en una geometría de entrada, los radios atómicos de van der Waals y el radio del disolvente proporcionados.

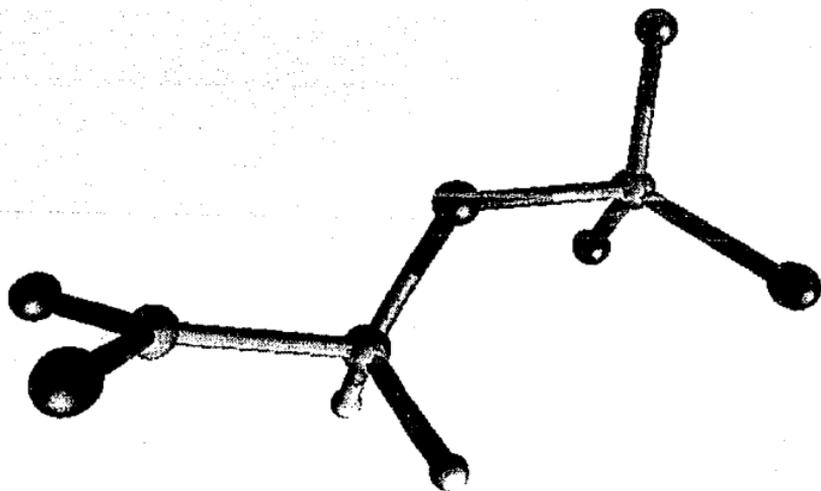
RELACIONES CUANTITATIVAS ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

En este rubro presentamos los parámetros utilizados dentro de la aproximación de Hansch para describir los efectos electrónicos, hidrofóbicos, estéricos y de dispersión que producen los diversos sustituyentes que poseen los inhibidores pertenecientes al grupo de moléculas análogas estrictas al PEP.

Las variables utilizadas fueron σ_p y σ_m (para modelar efectos electrónicos con distinto grado de resonancia involucrada), π , E_s y MR . No se pudieron incluir los parámetros pertinentes para describir las modificaciones que presentan algunos compuestos en torno al puente de oxígeno del éster fosfato debido a que no están reportados en la literatura. Los valores numéricos de las variables ya mencionadas son los siguientes:

SUSTITUYENTE	σ_p	σ_m	π	E_s	MR
H	0	0	0	0	1.03
CH ₃	-0.17	-0.07	-1.24	0.56	5.65
F	0.06	0.34	-0.46	0.14	0.92
Cl	0.23	0.37	-0.97	0.71	6.03
Br	0.23	0.39	-1.16	0.86	8.88
CN	0.66	0.56	-0.51	-0.57	6.33

DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES



DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Nos proponemos en esta sección realizar un análisis de los resultados obtenidos por los diversos métodos empleados, a fin de realizar lo siguiente:

- (1) Encontrar correlaciones estructura-actividad que permitan reproducir las tendencias dentro de las moléculas en estudio y, eventualmente, orientar en la síntesis de nuevos compuestos con variaciones estructurales específicas con base en la predicción de su actividad.
- (2) Verificar nuestra hipótesis de que los inhibidores análogos estrictos al PEP y los análogos no estrictos al PEP constituyen de hecho grupos separables por la forma en que interactúan en el sitio activo. Para ello se considerarán los resultados de las correlaciones multiparamétricas realizadas y de estudios por medio de análisis de discriminantes.
- (3) Contrastar la información que se tiene sobre la estructura y propiedades del sitio activo con aquella que proporcionan de manera indirecta las correlaciones encontradas. Aquí se buscarán integrar de forma crítica y selectiva las dos secciones previas.
- (4) Verificar las hipótesis planteadas por algunos autores (ver la sección titulada "Bioquímica de la Enzima Fosfoenolpiruvato Carboxilasa") sobre qué variables estructurales son las responsables de la actividad de los compuestos inhibidores de la PEPC.

Conviene aclarar varios puntos sobre el inciso (2). A lo largo de nuestra investigación de tesis comenzamos a darnos cuenta de que, en general, la mejor manera de analizar los resultados que se obtenían era separándolos en dos grupos: uno constituido por aquellos resultados pertenecientes a varias moléculas que denominamos *análogas al PEP* por presentar invariablemente la estructura del doble enlace propia del PEP, y el segundo grupo que denominamos *no análogas al PEP*, constituido por aquellas moléculas que no presentan dicha estructura de doble enlace (y que de hecho son más bien análogas al fosfoglicolato). Conviene confesar que inicialmente esta separación de las moléculas en dos grupos obedeció a que los resultados que se obtenían no revelaban nada alentador excepto cuando se separaban en los dos grupos mencionados. Seguimos con esta separación artificial hasta que comenzamos a

sospechar que tal vez las correlaciones aceptables se obtenfan sólo cuando se tenfan separadas las moléculas como resultado de mecanismos diferentes de interacción con el sitio activo. Nos propusimos, pues, verificar si en realidad no es posible encontrar una correlación significativa para todos los compuestos juntos, pero sí factible describir por separado ambos grupos de moléculas, de preferencia con descriptores moleculares diferentes. En la siguiente tabla presentamos los nombres de los inhibidores según su clasificación ya mencionada:

ANALOGOS AL PEP

Z-bromo-fosfoenolpiruvato
 Z-metil-fosfoenolpiruvato
 Z-cloro-fosfoenolpiruvato
 3,3-dicloro-2-dihidroxifosfinoil-metil-2-propenoato
 Z-fluoro-fosfoenolpiruvato
 E-metil-fosfoenolpiruvato
 Fosfoenolpiruvato fosfonato
 Dimetil-fosfoenolpiruvato
 E-ciano-fosfoenolpiruvato
 Fosfoenoltiopiruvato

NO ANALOGOS AL PEP

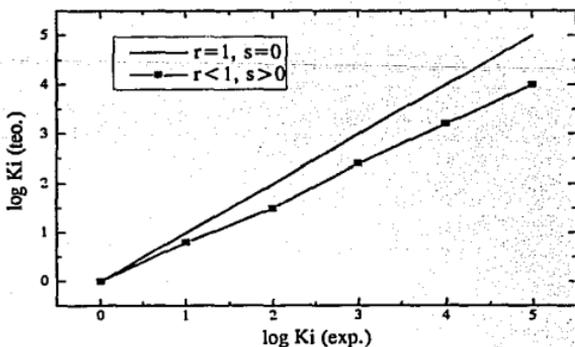
Fosfato del ácido 1-hidrox ciclopropanoico
 L-2-fosfolactato
 Fosfoglicolato
 Fosfonoacetato
 Fosfomalato
 Fosfonopropionato
 Fosfotiglicolato

(A) MECÁNICA MOLECULAR.

Se realizó un análisis estadístico multiparamétrico con algunas de las variables calculadas por medio de las técnicas empleadas de mecánica molecular. Para el caso de las superficies de van der Waals y las superficies de solvatación acuosa, se decidió arbitrariamente emplear únicamente las primeras debido a la alta colinealidad que presentaban con los segundos. Para las variables geométricas, se consideraron los ángulos C-C-O⁻, O-C-C y C-O-P, así como las distancias entre el C del carbonilo y el P, y entre el C-3 y los sustituyentes en *cis* y *trans* (estos dos últimos únicamente para los compuestos análogos estrictos al PEP). Finalmente, se consideró el momento dipolar de los compuestos. Para la descripción de los compuestos no análogos no se consideraron la superficie no polar insaturada de van der Waals ni las distancias entre el C-3 y los sustituyentes en *cis* y *trans*, pues obviamente carecen de estos parámetros.

El análisis estadístico de los datos obtenidos nos proporcionó ecuaciones lineales de varias variables, con la determinación de los valores de cada coeficiente respectivo (como medida del grado de participación de las variables en la ecuación) y sus desviaciones estándar (medida del error asociado con la determinación de dicho coeficiente debido a la dispersión de los datos), el coeficiente de correlación (cuyo cuadrado es la fracción de la variación en las observaciones que explica la ecuación) y la desviación estándar de los valores de $\log Ki$ observados de aquéllos calculados, así como el valor de la prueba de F (cuyo porcentaje asociado se refiere a la probabilidad de que la correlación observada se deba al azar).

Para poder tener una representación visual de estas correlaciones, se trazaron gráficas del valor calculado (teórico) del $\log Ki$ contra el valor experimental. El coeficiente de correlación y la desviación estándar asociada se corresponden con aquéllos de la ecuación multiparamétrica con la que se obtuvieron los valores calculados. La pendiente y la ordenada al origen de esta gráfica son dependientes del coeficiente de correlación y la desviación estándar de la regresión multiparamétrica, pues conforme la calidad de ésta última ecuación aumenta (mayor r y menor s), la pendiente se aproxima a uno y la ordenada al origen se aproxima a cero, como se observa en la siguiente gráfica de ejemplo:



Cuando se analizaron los resultados con los 15 inhibidores juntos (recordando que no se estudiaron el fosfoenolpiruvato y el fosfoglicolato por falta de todas las constantes apropiadas del átomo de azufre), no fue posible encontrar ninguna correlación que explicara siquiera el 30% de la variación de los datos. Esto permite concluir que, al nivel de las propiedades descritas por mecánica molecular, no es posible encontrar un *QSAR* que describa la actividad de todos los inhibidores competitivos de la PEPC.

ANALOGOS AL PEP. Para el tratamiento de los resultados considerando únicamente los nueve inhibidores análogos estrictos al PEP, se encontraron las siguientes cinco mejores correlaciones biparamétricas:

$$\log Ki = 7.7200(\pm 3.7186) - 1.3776(\pm 0.6901)C_3R_{cis} - 0.0281(\pm 0.0303)POC$$

$$r = 0.74869, r^2 = 0.56054, s = 0.53874, F = 3.82652 (8.4872 \%)$$

$$\log Ki = -4.0030(\pm 2.3510) + 0.2702(\pm 0.0980)NPI + 0.0407(\pm 0.0194)NPS$$

$$r = 0.76665, r^2 = 0.58775, s = 0.52179, F = 4.27707 (7.0064 \%)$$

$$\log Ki = 1.0519(\pm 2.6438) - 2.0025(\pm 0.6506)C_3R_{cis} + 0.0206(\pm 0.0154)Tot$$

$$r = 0.78253, r^2 = 0.61235, s = 0.50599, F = 4.73887 (5.8255 \%)$$

$$\log Ki = 3.9180(\pm 0.9288) - 1.9423(\pm 0.6273)C_3R_{cis} + 0.6315(\pm 0.4608)C_3R_{trans}$$

$$r = 0.78570, r^2 = 0.61732, s = 0.50273, F = 4.83945 (5.6041 \%)$$

$$\log Ki = 26.9981(\pm 14.2034) - 1.9002(\pm 0.5870)C_3R_{cis} - 0.1893(\pm 0.1187)CCO$$

$$r = 0.80446, r^2 = 0.64716, s = 0.48273, F = 5.50241 (4.3920 \%)$$

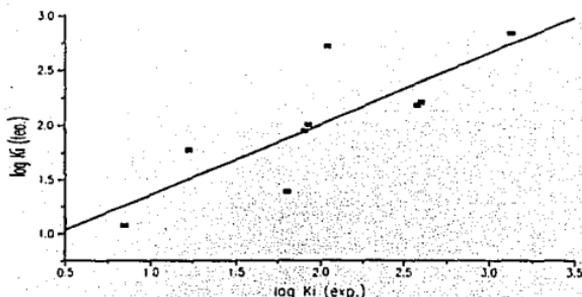
donde C_3R_{cis} es la distancia de enlace entre el C-3 y el primer átomo del sustituyente en posición *cis*, C_3R_{trans} es la distancia de enlace entre el C-3 y el primer átomo del sustituyente en posición *trans*, *POC* es el ángulo de enlace P-O-C, *CCO* es el ángulo de enlace C-C-O°, *Tot* es la superficie total de van der Waals, *NPI* es la superficie no polar insaturada de van der Waals y *NPS* es la superficie no polar saturada de van der Waals. Recordemos sólo que a valores crecientes de *Ki*, menor poder de inhibición. La colinearidad entre las variables anteriores se muestra en la siguiente tabla:

VARIABLE 1	VARIABLE 2	r ²
C_3R_{cis}	C_3R_{trans}	0.1235
C_3R_{cis}	<i>Tot</i>	0.1745
C_3R_{cis}	<i>POC</i>	0.1683
C_3R_{cis}	<i>CCO</i>	0.0771
<i>NPI</i>	<i>NPS</i>	0.8251

La tabla anterior revela que la segunda de las ecuaciones anteriores no es válida por la alta colinealidad entre las variables *NPI* y *NPS*, pero que las demás ecuaciones pueden ser utilizadas libremente (salvo, obviamente, por el hecho de que tienen valores muy bajos para *r* y valores muy altos para las *s*). Se buscaron correlaciones triparamétricas con combinaciones de las variables anteriores, pero los resultados sólo mostraron un incremento del 5% en la variancia explicada de los datos, lo que hace que, junto con el hecho de tratarse ya de demasiadas variables (3) para tan pocos puntos (9), carezcan de significancia estadística y se concluya que la mejor correlación encontrada sea la quinta de las ecuaciones anteriores. La gráfica del valor predicho para el *log Ki* contra el valor experimental para dicha ecuación se muestra a continuación:

$$\log Ki = 26.9981 - 1.9002C_3R_{cis} - 0.1893CCO$$

$$r = 0.80446, r^2 = 0.64716, s = 0.48273, F = 5.50241 (4.3920 \%)$$



La interpretación física de las cuatro ecuaciones con las que nos hemos quedado es relativamente sencilla de realizar. Algo que debe quedar claro es que en todas ellas aparece la variable C_3R_{cis} , y con contribuciones del mismo orden y signo. Interpretaremos esto como una indicación de que, según la descripción que permite la mecánica molecular, el incremento en la distancia que separa al C-3 del sustituyente que tenga unido en posición *cis* es el factor primordial que repercute en un incremento en la capacidad de unión de los inhibidores al sitio activo. Se buscaron correlaciones de una sola variable y claramente sólo una fue significativa (con respecto a las demás):

$$\log Ki = 4.3797(\pm 0.9183) - 1.6402(\pm 0.6230)C_3R_{cis}$$

$$r = -0.70535, r^2 = 0.49752, s = 0.53334, F = 6.93081 (3.3783 \%)$$

Aunque la ecuación anterior no puede ser utilizada para fines predictivos, lo que sí nos dice es que la variable C_3R_{cis} por sí sola es capaz de explicar casi el 50% de la variabilidad de los datos, lo que apoya nuestra afirmación del párrafo anterior en el sentido de que esta variable es el factor más importante para la actividad mostrada por los inhibidores.

Lo único que podemos concluir claramente es que la ecuación cuya gráfica se ha mostrado sólo nos permite reproducir (dentro de sus propios límites estadísticos) las tendencias dentro del grupo de moléculas estudiadas, pero ciertamente no constituye una correlación de calidad adecuada que pueda dar información veraz sobre los factores que intervienen en la unión de los inhibidores al sitio activo receptor. La ecuación anterior predice un valor de 176.17 μ M para la Ki del PEP.

NO ANALOGOS AL PEP. Cuando se consideraron únicamente los seis inhibidores no análogos al PEP, se obtuvieron las siguientes correlaciones:

$$\log Ki = 6.6238(\pm 1.3338) - 0.4364(\pm 0.1429)MD$$

$$r = -0.83661, r^2 = 0.69991, s = 0.70679, F = 9.32942 (3.7865 \%)$$

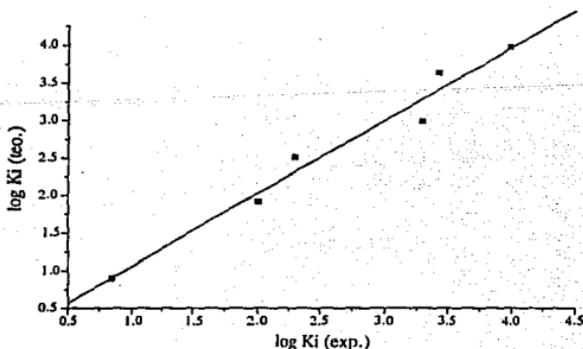
$$\log Ki = 7.1501(\pm 0.4951) - 0.8256(\pm 0.0908)MD + 0.0761(\pm 0.0146)NPS$$

$$r = 0.98502, r^2 = 0.97027, s = 0.25688, F = 48.95564 (0.5126 \%)$$

donde, adicionalmente a las variables ya descritas anteriormente, MD es el momento dipolar.

Se obtuvieron adicionalmente varias correlaciones biparamétricas donde siempre aparecía el momento dipolar con alguna otra variable (ángulo P-O-C, superficie total de van der Waals, superficie polar de van der Waals, ángulo C-C-O y la distancia interatómica entre el carbono del carbonilo y el fósforo), pero cuyos incrementos en r fueron como máximo a 0.85813. Esto significa que hubo un incremento de la variancia explicada de 70% a 73.6%, motivo por el cual no se incluyeron en nuestros resultados, ya que no representan ningún avance significativo en la calidad de las ecuaciones. La única correlación biparamétrica que se incluyó es la última ecuación, en virtud de sus excelentes valores de r y F , y sus bajas s . Existen, sin embargo, dos puntos que objetarle a esta última ecuación: las variables son altamente colineales con un valor de $r^2 = 0.67321$, y se están empleando dos variables para describir un conjunto de seis observaciones (por lo que de alguna manera se están "sobreajustando"). La gráfica del valor predicho para el $\log Ki$ contra el valor experimental para dicha ecuación se muestra a continuación:

$$\log Ki = 7.1501 - 0.8256MD + 0.0761NPS$$
$$r = 0.98502, r^2 = 0.97027, s = 0.25688, F = 48.95564 (0.5126 \%)$$



La ecuación anterior nos puede dar información con respecto a los factores que intervienen en la actividad de los inhibidores, al menos dentro de la aproximación de la mecánica molecular. Al parecer, se da un aumento en la fuerza de unión al sitio activo con el incremento en la magnitud del momento dipolar, lo que se explica en términos de interacciones de tipo electrostático no específicas, ya que el momento dipolar es una medida global de la forma en que está distribuida en promedio la carga en una molécula. Por la contribución del momento dipolar a la ecuación anterior y debido a la alta correlación que muestra en la regresión de una sola variable (donde explica el 70% de la variancia de los datos), consideramos que este parámetro es el factor más importante para determinar la actividad de los inhibidores. Por otro lado, el incremento en la superficie no polar saturada de los inhibidores se traduce en un decremento en la capacidad de unión al sitio activo, posiblemente debido a interacciones de tipo hidrofóbico con zonas no polares en la enzima.

(B) MNDO.

Se realizó nuevamente un análisis multiparamétrico de distintas propiedades electrónicas seleccionadas (en función de los análisis para una sola variable) proporcionadas por los cálculos del método MNDO: cargas netas en el fosfato, carboxilato, C-3, doble enlace (C-2 + C-3), sustituyentes en *cis* y *trans*; contribuciones al HOMO del fosfato, carboxilato y el doble enlace; energía del HOMO y diferencia de energía LUMO-HOMO; órdenes de enlace en el doble enlace y en el enlace del puente de éster fosfato P-O; y momento dipolar. A partir de las geometrías finales obtenidas por este método se consideraron también los ángulos O-C-C y C-O-P y las distancias C_3-R_{cis} , C_3-R_{trans} y entre el carbono del carbonilo y el fósforo. En virtud de los cálculos de los volúmenes y superficies de van der Waals realizados con las geometrías finales del método MNDO, se incluyeron también en los análisis los volúmenes de los sustituyentes (en *cis* y en *trans*).

Para la descripción de los compuestos no análogos no se consideraron las propiedades del doble enlace (carga, orden de enlace y contribución al HOMO), las distancias entre el C-3 y los sustituyentes en *cis* y *trans* ni la carga en el C-3 y los sustituyentes en *cis* y *trans*, pues obviamente carecen de estos parámetros. Por otro lado, se incluyó la contribución al HOMO de los sustituyentes y el carbono central (todos juntos), y los volúmenes de van der Waals de los sustituyentes se incluyeron

distinguiendo arbitrariamente a éstos últimos en términos de "hacia fuera del plano" (saliente) y "hacia dentro del plano" (entrante) cuando se observa a la molécula desde el plano que permite tener al fosfato del lado derecho y al carboxilato del lado izquierdo (en analogía a la cara *si* del PEP).

Se investigaron todas las correlaciones de una sola variable y de todas las posibles combinaciones de dos variables considerando los 17 inhibidores juntos, y no fue posible encontrar ninguna correlación que pudiera explicar siquiera el 60% de la variabilidad de los datos. Cuando se investigaron las correlaciones de tres variables (aquellas que, debido al número de observaciones debieran ser las óptimas) y de cuatro variables, el nivel de descripción tuvo una mejoría significativa, como lo revelan las siguientes mejores correlaciones de dos, tres y cuatro variables encontradas:

$$\log Ki = 8.4719(\pm 2.2684) - 0.5154(\pm 0.2207) LH - 0.2126(\pm 0.0483) MD$$

$$r = 0.76339, r^2 = 0.58277, s = 0.69935, F = 9.77722 (0.2201 \%)$$

$$\log Ki = 9.3334(\pm 2.5032) - 0.2096(\pm 0.0489) MD - 0.5441(\pm 0.2254) LH$$

$$- 0.0055(\pm 0.0640) OCC$$

$$r = 0.77776, r^2 = 0.60491, s = 0.70622, F = 6.10831 (0.9147 \%)$$

$$\log Ki = 9.2313(\pm 2.2559) - 0.1963(\pm 0.0481) MD - 0.5083(\pm 0.2132) LH$$

$$- 0.0071(\pm 0.0050) POC$$

$$r = 0.79907, r^2 = 0.63850, s = 0.67553, F = 8.03484 (0.3285 \%)$$

$$\log Ki = 8.6325(\pm 2.0941) - 0.1928(\pm 0.0458) MD - 0.5556(\pm 0.2047) LH$$

$$+ 4.3241(\pm 2.3264) H_{CO_2}$$

$$r = 0.81876, r^2 = 0.67037, s = 0.64507, F = 8.81270 (0.1891 \%)$$

$$\log Ki = 7.3917(\pm 2.1458) - 0.1880(\pm 0.0459) MD - 0.5634(\pm 0.2031) LH$$

$$+ 0.4193(\pm 0.2159) HOMO$$

$$r = 0.82256, r^2 = 0.67661, s = 0.63894, F = 9.06649 (0.1676 \%)$$

$$\log Ki = -0.9968(\pm 4.1631) - 0.1571(\pm 0.0461)MD - 0.8978(\pm 0.2390)LH \\ - 13.5015(\pm 5.2682)qCO_2^-$$

$$r = 0.85018, r^2 = 0.72281, s = 0.59154, F = 11.29985 (0.0632 \%)$$

$$\log Ki = 0.6120(\pm 4.1834) + 2.9956(2.1519)H_{CO_2^-} - 11.3662(\pm 5.3141)qCO_2^- \\ - 0.8652(\pm 0.2320)LH - 0.1528(\pm 0.0447)MD$$

$$r = 0.87255, r^2 = 0.76135, s = 0.57129, F = 8.81270 (0.1891 \%)$$

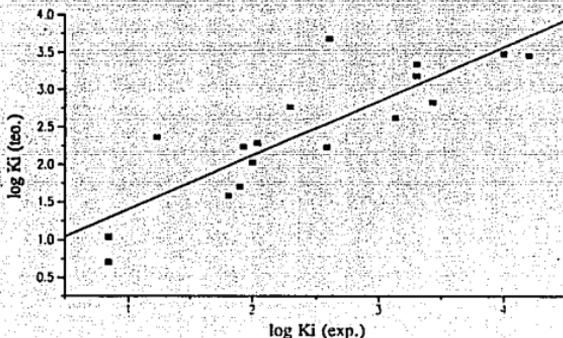
donde *MD* es el momento dipolar, *LH* es la diferencia de energía LUMO-HOMO, *HOMO* es la energía del HOMO, $H_{CO_2^-}$ es la contribución del CO_2^- al HOMO, qCO_2^- es la carga del carboxilato, *POC* es el ángulo P-O-C y *OCC* es el ángulo O-C-C. La colinealidad entre las variables se muestra en la siguiente tabla:

VARIABLE 1	VARIABLE 2	r^2
<i>MD</i>	<i>LH</i>	0.19915
<i>MD</i>	<i>CCO</i>	0.02368
<i>MD</i>	<i>POC</i>	0.06506
<i>MD</i>	qCO_2^-	0.37054
<i>MD</i>	<i>HOMO</i>	0.12606
<i>MD</i>	$H_{CO_2^-}$	0.09250
<i>LH</i>	<i>CCO</i>	0.04036
<i>LH</i>	<i>POC</i>	0.00872
<i>LH</i>	qCO_2^-	0.51127
<i>LH</i>	<i>HOMO</i>	0.06779
<i>LH</i>	$H_{CO_2^-}$	0.05108
qCO_2^-	$H_{CO_2^-}$	0.16360

Como podemos observar, la colinealidad entre las variables es muy baja, excepto para las variables involucradas en la penúltima ecuación (*MD*, *LH* y qCO_2^-). Las ecuaciones encontradas son de calidad aceptable (con valores bajos de *r*, y altos de *F*), y al parecer pueden ser utilizadas para reproducir tendencias en la actividad de los inhibidores. La penúltima ecuación permite obtener la siguiente gráfica del valor predicho para el $\log Ki$ contra el valor experimental:

$$\log K_i = -0.9968 - 0.1571 MD - 0.8978 LH - 13.5015 qCO_2^-$$

$$r = 0.85018, r^2 = 0.72281, s = 0.59154, F = 11.29985 (0.0632 \%)$$



De esta última ecuación podemos obtener información sobre cuáles son los factores que intervienen en la unión al sitio activo según las propiedades calculadas al nivel de MNDO. Al parecer, el incremento en el momento dipolar (representativo de interacciones electrostáticas no específicas), el incremento de la carga del carboxilato (representativo de interacciones electrostáticas específicas) y el incremento en la diferencia de energía LUMO-HOMO, se traducen en una mayor fuerza de unión de todos los inhibidores al sitio activo. Con respecto a la contribución de la variable *LH*, creemos que debe ser interpretada en términos de la relación que guarda con la electronegatividad (χ), la cual se puede calcular de forma aproximada, según la definición de Mulliken, como $\chi \approx \frac{1}{2} (PI + AE) \approx \frac{1}{2} (E_{LUMO} - E_{HOMO})$. Al parecer, el incremento en la capacidad de los inhibidores de atraer electrones, posiblemente en procesos de transferencia de carga, repercute en una mayor fuerza de inhibición. Esto puede tener relación con el mecanismo de acción de la PEPC propuesto por Janc *et al* (6), en el cual se supone que participan al menos dos bases. Suponemos que es posible que existan otras bases en el sitio activo que participen decisivamente en la unión de los inhibidores. La ecuación anterior predice un valor de 5336.80 μM para la K_i del PEP.

ANÁLOGOS AL PEP. Se consideraron los diez inhibidores análogos al PEP, y se obtuvieron las siguientes tres mejores correlaciones biparamétricas:

$$\log Ki = 18.2498(\pm 6.8847) + 8.4789(\pm 3.7783)qPO_4^{2-} - 0.1415(\pm 0.0397)MD$$

$$r = 0.81362, r^2 = 0.66198, s = 0.51383, F = 6.85433 (2.2455 \%)$$

$$\log Ki = 8.6126(\pm 2.3307) - 0.6008(\pm 0.2398)LH - 0.1471(\pm 0.0384)MD$$

$$r = 0.83279, r^2 = 0.69354, s = 0.48925, F = 7.92086 (1.5933 \%)$$

$$\log Ki = 15.6678(\pm 6.1657) + 7.0820(\pm 3.3989)qPO_4^{2-} - 0.0648(\pm 0.0164)VR_{cis}$$

$$r = 0.84023, r^2 = 0.70598, s = 0.47922, F = 8.40405 (1.3782 \%)$$

donde qPO_4^{2-} es la carga en el fosfato, MD es el momento dipolar, LH es la diferencia de energía LUMO-HOMO y VR_{cis} es el volumen de van der Waals del sustituyente en *cis*. La colinealidad entre las variables se muestra en la siguiente tabla:

VARIABLE 1	VARIABLE 2	r ²
<i>MD</i>	<i>LH</i>	0.15751
<i>MD</i>	qPO_4^{2-}	0.13333
qPO_4^{2-}	VR_{cis}	0.06848
<i>LH</i>	qPO_4^{2-}	0.14300

De la tabla anterior se ve que todas las ecuaciones cumplen claramente con el requisito de que sus variables sean independientes entre sí. Hubo sólo una ecuación de tres variables con una ligera mejoría de su calidad estadística:

$$\log Ki = 19.3110(\pm 5.3546) - 0.1646(\pm 0.0323)MD - 0.4825(\pm 0.2029)LH$$

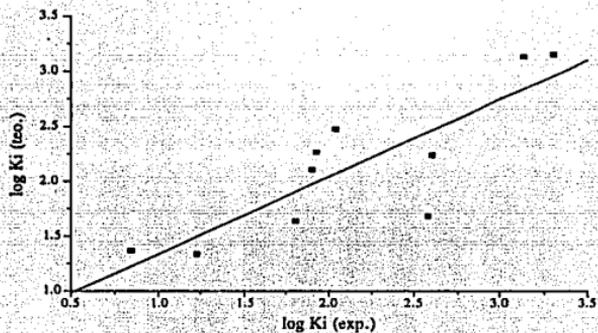
$$+ 6.5035(\pm 3.0439)qPO_4^{2-}$$

$$r = 0.90882, r^2 = 0.82596, s = 0.39825, F = 9.49803 (1.0731 \%)$$

Las dos últimas ecuaciones permiten obtener las siguientes gráficas del valor predicho para el $\log Ki$ contra el valor experimental:

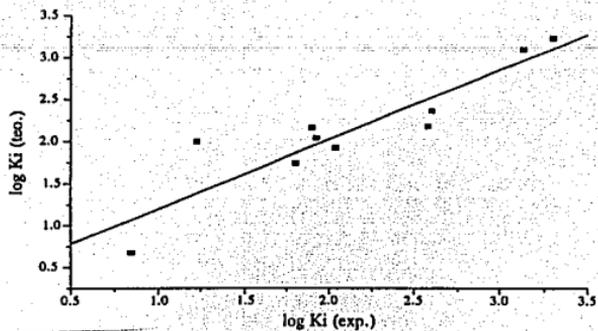
$$\log Ki = 15.6678 + 7.0820qPO_4^{2-} - 0.0648VR_{eis}$$

$r = 0.84023, r^2 = 0.70598, s = 0.47922, F = 8.40405 (1.3782 \%)$



$$\log Ki = 19.3110 - 0.1646MD - 0.4825LH + 6.5035qPO_4^{2-}$$

$r = 0.90882, r^2 = 0.82596, s = 0.39825, F = 9.49803 (1.0731 \%)$



De las ecuaciones anteriores podemos obtener información sobre cuáles son los factores que intervienen en la unión al sitio activo según las propiedades calculadas al nivel de MNDO. Los incrementos en la carga negativa del fosfato (representativa de interacciones electrostáticas específicas) y en el volumen de van der Waals del sustituyente en *cis* repercuten en una mejor unión al sitio activo. Asimismo, encontramos de nuevo que el incremento en la separación de energía LUMO-HOMO contribuye favorablemente a la actividad de los inhibidores. La mejor ecuación de dos variables predice un valor de 146.23 μM para la K_i del PEP. La ecuación en tres variables predice un valor de 64.81 μM para la K_i del PEP.

NO ANALOGOS AL PEP. En el análisis de los resultados para los siete inhibidores no análogos al PEP se obtuvieron las siguientes mejores correlaciones:

$$\log K_i = 11.502(\pm 0.3618) - 0.3889(\pm 0.1175)LH$$

$$r = -0.82861, r^2 = 0.68659, s = 0.34737, F = 10.95333 (2.1250 \%)$$

$$\log K_i = 6.3017(\pm 1.0387) - 1.2535(\pm 0.3374)MD$$

$$r = -0.85680, r^2 = 0.73411, s = 0.99732, F = 13.80456 (1.3778 \%)$$

$$\log K_i = 16.3681(\pm 5.0439) - 0.0667(\pm 0.0333)VR_s - 1.2522(\pm 0.4934)LH$$

$$r = 0.91838, r^2 = 0.84343, s = 0.58485, F = 9.69137 (4.9070 \%)$$

$$\log K_i = 17.7857(\pm 2.9530) - 0.1107(\pm 0.0281)VR_c - 1.3882(\pm 0.2860)LH$$

$$r = 0.96745, r^2 = 0.93597, s = 0.37402, F = 38.82284 (0.7175 \%)$$

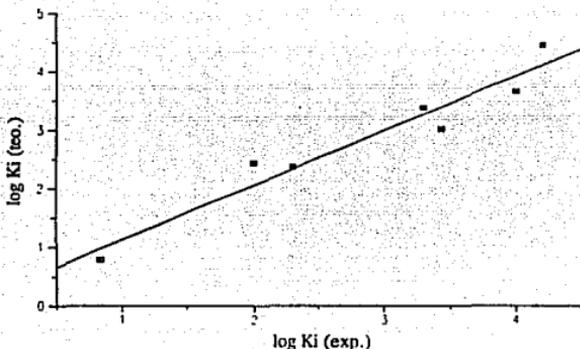
donde LH es la diferencia de energía LUMO-HOMO, MD es el momento dipolar y VR_c y VR_s son los volúmenes de van der Waals de los sustituyentes que penetran y salen, respectivamente, del plano ya definido de la molécula. La colinealidad entre las variables se muestra en la siguiente tabla:

VARIABLE 1	VARIABLE 2	r ²
LH	VR_s	0.27007
LH	VR_c	0.11168

De la tabla anterior se ve que las dos ecuaciones biparamétricas cumplen con el requisito de que sus variables sean independientes entre sí. La última ecuación permite obtener la siguiente gráfica del valor predicho para el $\log Ki$ contra el valor experimental:

$$\log Ki = 17.7857 - 0.1107VR_e - 1.3882 LH$$

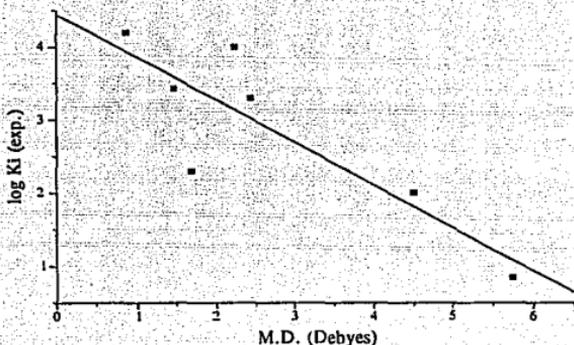
$$r = 0.96745, r^2 = 0.93597, s = 0.37402, F = 38.82284 (0.7175 \%)$$



Como se puede observar, en las dos ecuaciones biparamétricas mostradas, el parámetro LH aparece con el mismo signo y con valores similares de contribución a la ecuación. En función de la calidad de estas ecuaciones y de aquella de una sola variable con dicha variable, consideramos que se puede afirmar que la diferencia de energía LUMO-HOMO (interpretada por su relación directa con la electronegatividad global de las moléculas) es el factor primordial que permite predecir la actividad de los inhibidores. Para el caso de las regresiones de una variable (las más adecuadas en virtud del número de puntos), la más significativa fue aquella del momento dipolar, lo que puede permitimos afirmar que la mejor correlación predice que el incremento en el momento dipolar permite una mejor interacción electrostática no específica de los inhibidores con el sitio activo. La gráfica para dicha ecuación es la siguiente:

$$\log Ki = 6.3017 - 1.2535MD$$

$$r = -0.85680, r^2 = 0.73411, s = 0.99732, F = 13.80456 (1.3778 \%)$$



(C) AM1.

Se realizó nuevamente un análisis multiparamétrico de las mismas propiedades electrónicas calculadas por el método MNDO, pero en este caso por el método AM1: cargas netas en el fosfato, carboxilato, C-3, doble enlace (C-2 + C-3), sustituyentes en *cis* y *trans*; contribuciones al HOMO del fosfato, carboxilato y el doble enlace; energía del HOMO y diferencia de energía LUMO-HOMO; órdenes de enlace en el doble enlace y en el enlace del puente de éster fosfato P-O; y momento dipolar. A partir de las geometrías finales obtenidas por este método se consideraron también los ángulos O-C-C y C-O-P y las distancias C_3-R_{cis} , C_3-R_{trans} y entre el carbono del carbonilo y el fósforo. Se consideraron también los volúmenes de van der Waals de los sustituyentes en *cis* y *trans*.

Para la descripción de los compuestos no análogos de nuevo no se consideraron las propiedades del doble enlace (carga, orden de enlace y contribución al HOMO), las

distancias entre el C-3 y los sustituyentes en *cis* y *trans* ni la carga en el C-3 y los sustituyentes en *cis* y *trans*, pues obviamente carecen de estos parámetros. Por otro lado, se incluyó la suma de las contribuciones al HOMO de los sustituyentes y el carbono central. Se consideraron los volúmenes de van der Waals de los sustituyentes "salientes" y "entrantes", ya definidos.

Se investigaron todas las correlaciones de una sola variable y de todas las posibles combinaciones de dos y tres variables considerando los 17 inhibidores juntos, y no fue posible encontrar una correlación que pudiera explicar más del 60% de la variabilidad de los datos. Esto permite concluir que, al nivel de las propiedades descritas por el método AM1, no es posible encontrar un QSAR significativo que describa la actividad de todos los inhibidores competitivos de la PEPC.

ANALOGOS AL PEP. Al considerar los diez inhibidores análogos estrictos al PEP, se obtuvieron las siguientes mejores correlaciones biparamétricas:

$$\log Ki = 4.2498(\pm 0.7736) - 2.3041(\pm 1.2874)H_{C=C} - 0.1176(\pm 0.0481)MD$$

$$r = 0.80070, r^2 = 0.64112, s = 0.52945, F = 6.25256 (2.7690 \%)$$

$$\log Ki = 5.5205(\pm 0.9349) - 1.8806(\pm 1.2991)H_{C=C} - 1.6018(\pm 0.6152)C_3R_{cis}$$

$$r = 0.81363, r^2 = 0.66198, s = 0.51382, F = 6.85473 (2.2452 \%)$$

$$\log Ki = 9.8097(\pm 3.4701) - 2.5235(\pm 0.6926)C_3R_{cis} + 2.3683(\pm 1.6122)qPO_4^{2-}$$

$$r = 0.81504, r^2 = 0.66429, s = 0.51207, F = 6.92565 (2.19220 \%)$$

$$\log Ki = 16.3672(\pm 7.6734) - 1.9150(\pm 0.5639)C_3R_{cis} + 12.4460(\pm 8.2487)qCO_2^{-}$$

$$r = 0.81767, r^2 = 0.66858, s = 0.50879, F = 7.06076 (2.0956 \%)$$

$$\log Ki = 9.7194(\pm 3.1397) - 2.1781(\pm 0.5746)C_3R_{cis} - 0.4709(\pm 0.2940)LH$$

$$r = 0.82378, r^2 = 0.67861, s = 0.50104, F = 7.39006 (1.8821 \%)$$

$$\log Ki = 6.2537(\pm 1.0578) - 2.8044(\pm 1.4845)O_{O-p} - 2.5802(\pm 0.6275)C_3R_{cis}$$

$$r = 0.84208, r^2 = 0.7091, s = 0.47667, F = 8.53177 (1.3277 \%)$$

$$\log Ki = -2.7953(\pm 2.3916) + 1.2986(\pm 0.5324)C_cP - 0.1519(\pm 0.0413)MD$$

$$r = 0.84690, r^2 = 0.71724, s = 0.46995, F = 8.87817 (1.2021 \%)$$

$$\log Ki = -0.1383(\pm 2.3964) - 1.9521(\pm 0.5006)C_3R_{cis} + 1.1106(\pm 0.5089)C_cP$$

$$r = 0.85944, r^2 = 0.73863, s = 0.45183, F = 9.89103 (0.9128 \%)$$

donde C_3R_{cis} es la distancia de enlace entre el C-3 y el sustituyente en *cis*, $H_{C=C}$ es la contribución al HOMO del doble enlace C=C, $q_{CO_2^-}$ es la carga en el carboxilato, $q_{PO_4^{2-}}$ es la carga en el fosfato, O_{O-P} es el orden del enlace O-P, MD es el momento dipolar, LH es la diferencia de energía LUMO-HOMO y C_cP es la distancia entre el carbono del carboxilo y el fosfato. La colinealidad entre las variables se muestra en la siguiente tabla:

VARIABLE 1	VARIABLE 2	r^2
C_3R_{cis}	O_{O-P}	0.29189
C_3R_{cis}	LH	0.06706
C_3R_{cis}	$q_{CO_2^-}$	0.00084
C_3R_{cis}	$q_{PO_4^{2-}}$	0.32920
C_3R_{cis}	$H_{C=C}$	0.14403
C_3R_{cis}	C_cP	0.00013
MD	C_cP	0.01155
MD	$H_{C=C}$	0.07466

De la tabla anterior se ve que todas las ecuaciones (salvo la tercera y la sexta, donde existe cierta colinealidad entre las variables) cumplen claramente con el requisito de que sus variables sean independientes (ortogonales) entre sí. Con respecto a la última ecuación hay que destacar que es de calidad aceptable, si bien su r no es muy alta, pero las variables involucradas son perfectamente independientes entre sí y el valor de la F es excelente. Podemos obtener de dicha ecuación cierta información con respecto a los factores que intervienen en la unión de los inhibidores al sitio activo. Como podemos observar, las dos variables involucradas son exclusivamente estructurales (geométricas). Conforme se incrementa la distancia entre el C-3 y el sustituyente en *cis* y se disminuye la distancia entre el carbono del carbonilo y el fósforo, hay un aumento en la fuerza de unión al sitio activo. Si observamos todas las

ecuaciones que hemos reportado para describir a los análogos estrictos al PEP, nos daremos cuenta que la variable C_3R_{cis} aparece sistemáticamente (como sucedía en las correlaciones para estas mismas moléculas según la descripción de mecánica molecular); esto sugiere que dicha distancia es el factor primordial que determina la actividad de los inhibidores análogos al PEP. Además, la mejor correlación de una sola variable fue precisamente aquella con la variable C_3R_{cis} :

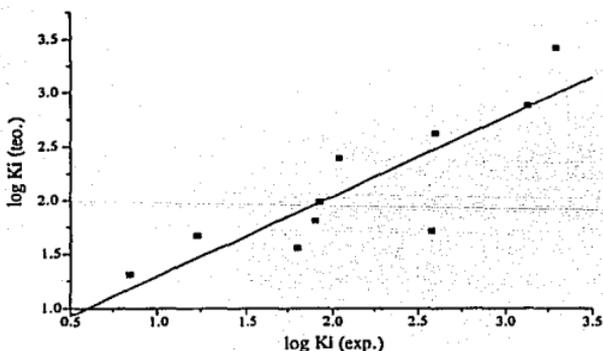
$$\log Ki = 2.0181(\pm 0.2046) - 0.2891(\pm 0.0905)C_3R_{cis}$$

$$r = -0.74886, r^2 = 0.56079, s = 0.21152, F = 10.2148 (1.2687 \%)$$

La última ecuación biparamétrica predice un valor de 242.48 μM para la Ki del PEP, y la gráfica del valor predicho para el $\log Ki$ contra el valor experimental es la siguiente:

$$\log Ki = -0.1382 - 1.9522C_3R_{cis} + 1.1106C_cP$$

$$r = 0.85944, r^2 = 0.73863, s = 0.45183, F = 9.89096 (0.9128 \%)$$



Las correlaciones triparamétricas no resultaron en un incremento muy significativo en la calidad de las ecuaciones, como se observa en las siguientes cinco mejores correlaciones:

$$\log Ki = 0.3137(\pm 2.5759) - 3.1540(\pm 1.8173)C_3R_{cis} + 1.2793(\pm 0.5828)C_cP \\ + 0.0380(\pm 0.0550)VR_{cis} \\ r = 0.87055, r^2 = 0.75786, s = 0.46974, F = 6.25965 (2.8084 \%)$$

$$\log Ki = -1.1981(\pm 2.7157) - 1.1748(\pm 1.0177)C_3R_{cis} + 1.2003(\pm 0.5271)C_cP \\ - 0.0712(\pm 0.0807)MD \\ r = 0.87671, r^2 = 0.76862, s = 0.45918, F = 6.64387 (2.4625 \%)$$

$$\log Ki = 0.0155(\pm 2.3927) - 1.1292(\pm 1.1022)qR_{trans} + 1.0203(\pm 0.5147)C_cP \\ - 1.7942(\pm 0.5221)C_3R_{cis} \\ r = 0.88179, r^2 = 0.77754, s = 0.45024, F = 6.99056 (2.1974 \%)$$

$$\log Ki = -0.6935(\pm 2.3299) - 1.8506(\pm 0.4847)C_3R_{cis} + 1.1615(\pm 0.4879)C_cP \\ + 0.0193(\pm 0.0149)VR_{trans} \\ r = 0.89188, r^2 = 0.79545, s = 0.43175, F = 7.77734 (1.7222 \%)$$

$$\log Ki = -15.4169(\pm 4.0838) - 5.3179(\pm 1.3819)qPO_4^{2-} - 4.3451(\pm 1.1163)qR_{trans} \\ + 1.8038(\pm 0.5289)C_cP \\ r = 0.89978, r^2 = 0.80960, s = 0.41654, F = 8.50417 (1.3976 \%)$$

donde, adicionalmente a las variables ya definidas, VR_{trans} y VR_{cis} son los volúmenes de van der Waals de los sustituyentes en *trans* y *cis*, respectivamente. La colinealidad entre las variables (no descrita en la tabla anterior) se muestra en la siguiente tabla:

VARIABLE 1	VARIABLE 2	r ²
C_3R_{cis}	MD	0.74351
C_3R_{cis}	VR_{trans}	0.02644
C_3R_{cis}	VR_{cis}	0.90194
C_3R_{cis}	C_cP	0.00013
C_3R_{cis}	qR_{trans}	0.08391
C_cP	VR_{trans}	0.00665
C_cP	VR_{cis}	0.01453

VARIABLE 1

VARIABLE 2

 r^2 $C_e P$ qR_{trans}

0.0258

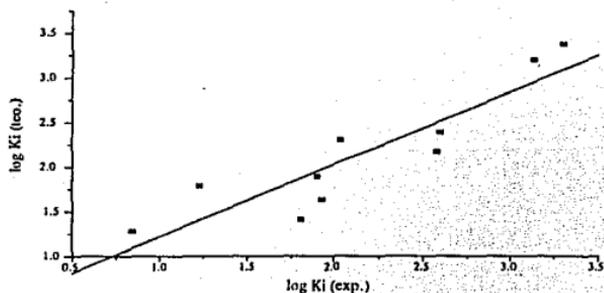
 $C_e P$ qPO_4^{2-}

0.20682

De la tabla anterior se ve que sólo para la primera y segunda ecuaciones no cumplen con el requisito de que sus variables sean independientes entre sí. La penúltima y última ecuaciones no son de muy buena calidad, particularmente porque incluyen, como todas las otras, un exceso de variables (3) para el número de puntos considerados (10); sin embargo, consideramos que pueden ser útiles para reproducir mejor las tendencias en actividad dentro del grupo de moléculas estudiadas. La penúltima ecuación indica que el incremento en la distancia entre el C-3 y el sustituyente en *cis*, junto con un decremento del volumen del sustituyente en *trans* y de la distancia entre el carbono del carbonilo y el fósforo, se traducen en un aumento de la fuerza de unión al sitio activo. La última expresión indica que, adicionalmente, el incremento en las cargas del fosfato y del sustituyente en *trans* permiten una mejor unión del inhibidor al sitio activo; asimismo predice un valor de 90.58 μM para la K_i del PEP y permite obtener la siguiente gráfica del valor predicho para el $\log K_i$ contra el valor experimental:

$$\log K_i = -15.4169 - 5.3179qPO_4^{2-} - 4.3451qR_{trans} + 1.8038C_e P$$

$$r = 0.89978, r^2 = 0.80960, s = 0.41654, F = 8.50417 (1.3976 \%)$$



NO ANALOGOS AL PEP. Se encontraron las siguientes mejores nueve correlaciones de una y dos variables al tomar en cuenta a los diez inhibidores no análogos estrictos al PEP:

$$\log Ki = 12.0872(\pm 0.4240) - 0.3127(\pm 0.1377) LH$$

$$r = -0.71255, r^2 = 0.50773, s = 0.40706, F = 5.15706 (7.2356 \%)$$

$$\log Ki = 5.6187(\pm 1.3065) - 1.0011(\pm 0.4243) MD$$

$$r = -0.72577, r^2 = 0.52675, s = 1.2544, F = 5.56518 (6.4826 \%)$$

$$\log Ki = 32.0044(\pm 8.5073) + 2.3691(\pm 1.2108) qPO_3^{2-} - 2.1981(\pm 0.6424) LH$$

$$r = 0.86515, r^2 = 0.74848, s = 0.74127, F = 5.95156 (6.3264 \%)$$

$$\log Ki = 17.2701(\pm 6.426) - 0.3935(\pm 0.1872) MD - 1.1904(\pm 0.5883) LH$$

$$r = 0.87530, r^2 = 0.76615, s = 0.71476, F = 6.55237 (5.4687 \%)$$

$$\log Ki = 30.1761(\pm 7.0683) - 0.0166(\pm 0.0072) OCC - 2.2927(\pm 0.5978) LH$$

$$r = 0.88838, r^2 = 0.78921, s = 0.67859, F = 6.16534 (8.6564 \%)$$

$$\log Ki = 16.7208(\pm 6.1146) - 0.1232(\pm 0.0528) VR_c - 1.1919(\pm 0.5522) LH$$

$$r = 0.88963, r^2 = 0.79145, s = 0.67499, F = 7.58994 (4.3494 \%)$$

$$\log Ki = -3.3803(\pm 1.4102) + 3.5717(\pm 0.8730) H_{PO_3^{2-}} + 0.9887(\pm 0.2679) H$$

$$r = 0.91589, r^2 = 0.83885, s = 0.59335, F = 10.41063 (2.5970 \%)$$

$$\log Ki = 1.1450(\pm 8.4081) - 22.9398(\pm 7.7748) qCO_2^- - 1.8894(\pm 0.4575) LH$$

$$r = 0.91925, r^2 = 0.84502, s = 0.58187, F = 10.90507 (2.4018 \%)$$

$$\log Ki = 51.3179(\pm 8.5213) - 3.5264(\pm 0.5922) LH - 2.2192(\pm 0.5519) C_c P$$

$$r = 0.94993, r^2 = 0.90236, s = 0.46184, F = 18.48418 (0.9533 \%)$$

donde *MD* es el momento dipolar, *LH* es la diferencia de energía LUMO-HOMO, *H* es la energía del HOMO, $H_{PO_3^{2-}}$ es la contribución del fosfato al HOMO, qCO_2^- es la

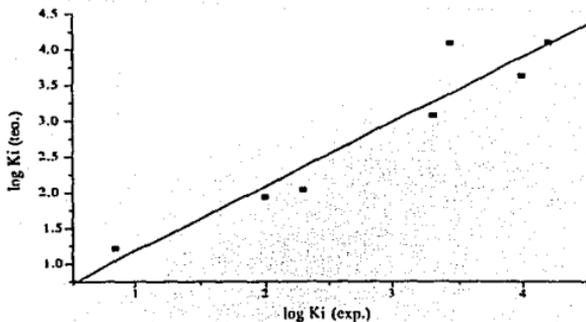
carga del carboxilato, qPO_4^{2-} es la carga del fosfato, VR_e es el volumen de van der Waals del sustituyente "entrante", OCC es el ángulo O-C-C y C_cP es la distancia interatómica entre el carbono del carbonilo y el fósforo. La colinealidad entre todas las variables anteriores se muestra en la siguiente tabla:

VARIABLE 1	VARIABLE 2	r^2
LH	qCO_2^-	0.03876
LH	OCC	0.23444
LH	MD	0.12275
LH	qPO_4^{2-}	0.20883
LH	VR_e	0.11232
LH	C_cP	0.63858
HPO_4^{2-}	H	0.21599

Como revela la tabla anterior, las variables no están correlacionadas entre sí, excepto por aquéllas involucradas en la última y mejor ecuación presentada. La última ecuación permite obtener la siguiente gráfica del valor predicho para el $\log K_i$ contra el valor experimental:

$$\log K_i = 51.3179 - 3.5264LH - 2.2192C_cP$$

$$r = 0.94993, r^2 = 0.90236, s = 0.46184, F = 18.48418 (0.9533 \%)$$

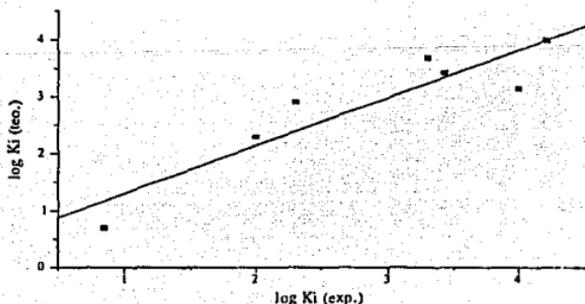


Como se puede observar en seis de las siete ecuaciones biparamétricas mostradas, aparece el parámetro LH , aproximadamente con el mismo signo y orden de contribución a la ecuación. En función de la calidad de estas ecuaciones, y de la existencia de una correlación (aunque de hecho no muy aceptable) de una variable para dicho mismo parámetro, consideramos que se puede afirmar que la diferencia de energía LUMO-HOMO es el factor primordial que permite predecir la actividad de los inhibidores no análogos estrictos al PEP. Es importante mencionar que este mismo resultado se obtuvo del análisis de los resultados de los cálculos realizados con el método MNDO. Al parecer, al aumentar la capacidad de los inhibidores de atraer electrones se incrementa su capacidad inhibitoria. La última ecuación puede ser utilizada para predecir la actividad de otros compuestos, a pesar de que la colinealidad entre las variables involucradas es bastante alta.

Una expresión que es interesante desde el punto de vista físico es la antepenúltima de las ecuaciones anteriores. Esta ecuación tiene la siguiente gráfica del valor predicho para el $\log Ki$ contra el valor experimental:

$$\log Ki = -3.3803 + 3.5717H_{PO_4^{2-}} + 0.9887H$$

$$r = 0.91589, r^2 = 0.83885, s = 0.59335, F = 10.41063 (2.5970 \%)$$



En esta ecuación se indica que la disminución de la energía del HOMO se traduce en un incremento en la unión de los inhibidores al sitio activo, probablemente

porque existe algún proceso de transferencia de carga desde el sitio activo de la enzima hacia el inhibidor, lo que estabiliza dicha interacción. Por otro lado, la disminución de la fracción porcentual del HOMO en el fosfato también resulta en un incremento en la unión al sitio activo, quizá como resultado indirecto de la transferencia de carga antes mencionada a otros sitios (hasta ahora no identificados) de la moléculas, cuyas fracciones porcentuales del HOMO se incrementan de forma no específica. Al parecer, se puede concluir que, al nivel de las propiedades descritas por el método AM1, las dos variables anteriores son de las más importantes que determinan la actividad de los inhibidores no análogos estrictos al PEP.

(D) RELACIONES LINEALES DE ENERGÍA LIBRE.

Con los parámetros σ_p , σ_m , π , E_s y MR se procedió al análisis estadístico multiparamétrico con las siguientes consideraciones:

- (1) No se incluyeron los compuestos análogos no estrictos al PEP debido a la escasa variación en los sustituyentes que poseen (siempre H o CH_3). Estos compuestos son el fosfato del ácido 1-hidrox ciclopropanoico, el L-2-fosfolactato, el fosfoglicolato, el fosfonoacetato, el fosfomalato y el fosfonopropionato.
- (2) Las regresiones se obtuvieron con base en las variables ya mencionadas, pero tomando éstas siempre como la suma de las constantes individuales para el sustituyente en *cis* y el sustituyente en *trans*. Esto impide, por supuesto, un análisis combinado de los factores fisicoquímicos con la geometría (lugar de sustitución), pero se realizó de esta manera ante el número limitado de compuestos (observaciones) de los que se dispone: un total de diez en el mejor de los casos.
- (3) Una segunda aproximación implicó la eliminación de los compuestos que presentaban variación estructural en el oxígeno del puente del éster fosfato (sustitución por azufre o un grupo $-\text{CH}_2-$), es decir, el 3,3-dicloro-2-dihidroxifosfinoil-metil-2-propenoato, el fosfoenolpiruvato fosfonato y el fosfoenoltiopiruvato. Esto se hizo debido a que en la aproximación de Hansch que se siguió no hay forma de incluir variables fisicoquímicas que contabilicen este cambio estructural.
- (4) Finalmente se llegó al extremo de incluir sólo los compuestos con sustituyentes en posición *cis*, es decir, aquéllos con configuración Z, con el fin de encontrar alguna correlación en extremo buena para describir esta serie.

Para el caso descrito en el inciso (2) anterior, donde se incluyeron todas las moléculas análogas estrictas al PEP, no se encontró ninguna correlación (de una, dos o incluso tres variables) que pudiera explicar siquiera el 50% de la variación en las observaciones. Sólo mencionaremos que se analizaron todas las posibles combinaciones de variables, cuyas correlaciones no mostramos, ya que carecen de significado estadístico y físico.

Cuando se tomaron en cuenta únicamente las moléculas con variaciones estructurales en sus sustituyentes (*cis* o *trans*), como ya se describió en el inciso (3) anterior, sólo se encontró la siguiente correlación significativa de dos variables de entre todas las combinaciones posibles que se analizaron:

$$\log Ki = 1.50975(\pm 0.39771) - 1.13204(\pm 0.43618)E_s - 1.86221(\pm 0.54524)\pi$$

$$r = 0.86297, r^2 = 0.74473, s = 0.47694, F = 5.83467 (6.5165 \%)$$

Un problema adicional con la ecuación anterior, aparte del bajo valor de r y los altos valores de s , lo constituye la alta colinealidad entre las variables involucradas, E_s y π : $r^2 = 0.5577$.

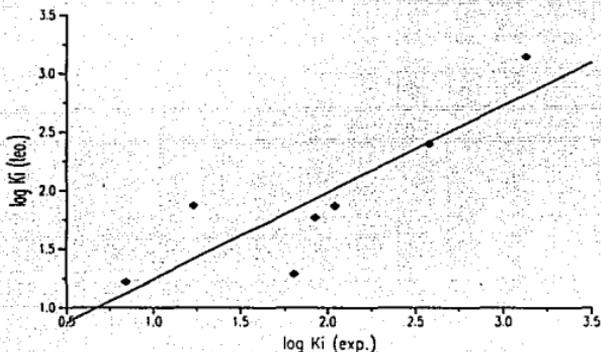
La expresión anterior tiene un serio inconveniente en cuanto a que no es capaz de distinguir entre los isómeros *cis* y *trans*. La ecuación anterior nos puede dar, sin embargo, cierta información con respecto al papel que juegan los sustituyentes en conjunto sobre la actividad de los compuestos estudiados. El signo de la contribución de π revela que el incremento en la hidrofobicidad global de los sustituyentes favorece la unión al sitio activo, posiblemente con regiones hidrofóbicas. A su vez, la contribución de E_s revela que el incremento en el impedimento estérico (en este caso tal vez visto bajo su correlación con el radio de van der Waals) que producen ambos sustituyentes favorece la unión al sitio activo. La ecuación anterior predice un valor de 32.34 μM para la K_i del PEP.

No se encontró ninguna otra correlación importante de dos variables, y la adición de una tercera variable no representó ninguna mejoría apreciable en la correlación observada.

La gráfica del valor predicho para el $\log Ki$ contra el valor experimental para la última ecuación se muestra a continuación:

$$\log Ki = 1.50975 - 1.13204E_s - 1.86221\pi$$

$$r = 0.86297, r^2 = 0.74473, s = 0.47694, F = 5.83467 (6.5165 \%)$$



Finalmente, se analizaron las correlaciones para una y dos variables para la serie de compuestos con sustituyentes en posición *cis*, como se menciona en el inciso (4) anterior, y la única correlación que se obtuvo fue la siguiente:

$$\log Ki = 2.38707(\pm 0.01287) + 5.36256(\pm 0.10788)\pi - 0.62149(\pm 0.01015)MR$$

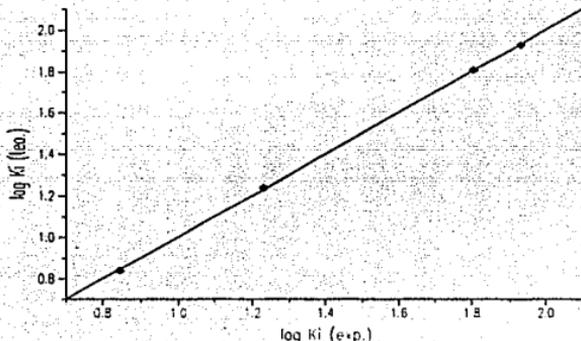
$$r = 0.99993, r^2 = 0.99986, s = 0.01026, F = 3663.86 (1.1681 \%)$$

La ecuación anterior revela una correlación en extremo buena, con una s muy baja; sin embargo, su principal problema radica en que se han empleado dos variables cuando que sólo se cuenta con cuatro observaciones (moléculas). Finalmente, las variables tienen una altísima colinealidad entre sí: $r^2 = 0.96869$.

La gráfica del valor predicho para el $\log Ki$ contra el valor experimental se muestra a continuación:

$$\log Ki = 2.38707 + 5.36256\pi - 0.62149MR$$

$$r = 0.99993, r^2 = 0.99986, s = 0.01026, F = 3663.86 (1.1681 \%)$$



Al parecer, el signo de la contribución de MR habla de que el incremento en las fuerzas de dispersión en la región de los sustituyentes facilita la unión de las moléculas con grupos de polaridad intermedia en el sitio activo. Por otro lado, la contribución de π indica que conforme aumenta la hidrofobicidad de los sustituyentes en *cis*, la fuerza de unión al sitio activo disminuye. Esto está en cierta contradicción con la primera ecuación que mostramos, donde señalamos que el efecto era el contrario, en ese caso considerando en conjunto a los sustituyentes en *cis* y en *trans*. No nos fue posible resolver este problema buscando correlaciones entre las variables involucradas en ambas ecuaciones (π , MR y E_s) para posiciones específicas, como puede ser el caso de π_{cis} con E_s (en *trans* o global), o π (global) con MR_{cis} , ni buscando correlaciones para tres variables. Lo único que podemos concluir es que las dos ecuaciones anteriores nos permiten reproducir (según la calidad de cada una) las tendencias dentro del grupo de moléculas estudiadas, pero que en forma alguna constituyen una correlación única que dé información veraz sobre las fuerzas que intervienen en la unión de los inhibidores al sitio activo receptor. La última ecuación predice un valor de 55.84 μM para la Ki del PEP.

(D) ANÁLISIS DE DISCRIMINANTES.

En esta sección nos proponemos hacer énfasis en los resultados obtenidos en las correlaciones multiparamétricas, con el objeto de presentar evidencias adicionales derivadas de análisis de discriminantes por la técnica de cúmulos que parecen indicar que sí es posible subdividir a los compuestos inhibidores competitivos de la PEPC en dos grupos estructuralmente distinguibles y caracterizables por sus propiedades electrónicas, y que corresponden precisamente a los denominados análogos estrictos al PEP y no análogos estrictos al PEP.

En la siguiente tabla se resumen los mejores resultados obtenidos de todas las regresiones multiparamétricas, considerando que *A* se refiere a los análogos, *NA* a los no análogos y *MM* a mecánica molecular.

Método	Caso	# de moléculas	# de variables	Mejor r^2	# de variables	Mejor r^2
<i>MM</i>	<i>A + N</i>	15	2	< 0.30	3	---
<i>MM</i>	<i>A</i>	9	2	0.64716	3	< 0.70
<i>MM</i>	<i>N</i>	6	1	0.69999	2	0.97027
<i>MNDO</i>	<i>A + N</i>	17	2	< 0.60	3	0.72281
<i>MNDO</i>	<i>A</i>	10	2	0.70598	3	0.82596
<i>MNDO</i>	<i>N</i>	7	1	0.73411	2	0.93597
<i>AMI</i>	<i>A + N</i>	17	2	< 0.60	3	< 0.60
<i>AMI</i>	<i>A</i>	10	2	0.73863	3	0.80960
<i>AMI</i>	<i>N</i>	7	1	0.52675	2	0.90236

En primer lugar hay que destacar el hecho de que no fue posible encontrar un *QSAR* que explicara siquiera el 60% de la variancia de los datos para todos los inhibidores juntos, excepto para los resultados de las regresiones de tres variables de los resultados de *MNDO*.

Como podemos observar en la tabla anterior, el nivel de descripción en función del número de observaciones y variables empleadas nunca llegó a tener el mínimo de calidad (como por ejemplo, un valor de r^2 superior a 0.8) para considerársele como una

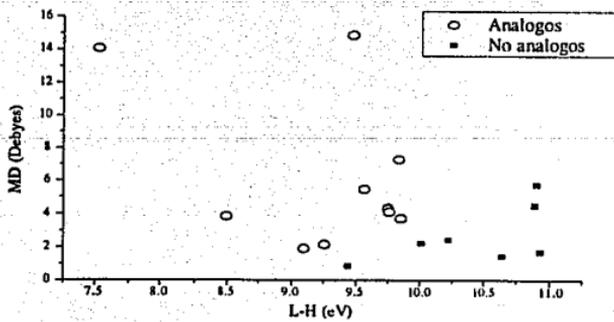
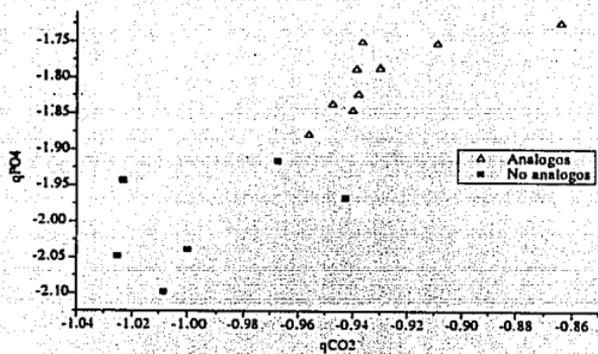
indicación de que se tenía una correlación altamente significativa para explicar la actividad de todos los inhibidores por los distintos métodos empleados. Por otro lado, el nivel de descripción generalmente fue significativamente mejor cuando se tenían a los grupos de inhibidores por separado.

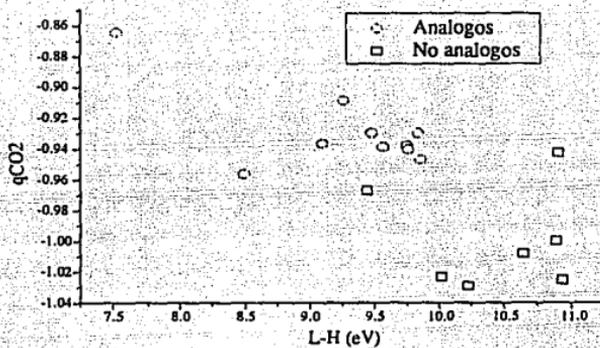
Consideramos que una forma de comprobar nuestra teoría era recurrir al análisis de discriminantes por medio de cúmulos. Como mencionamos en la sección titulada "Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad", lo que se persigue con estos métodos es encontrar un hiperplano que bisecte de la mejor manera a dos cúmulos de puntos (cuyas coordenadas son los valores numéricos de dos o más de sus descriptores moleculares), de tal forma que sea posible clasificar a un compuesto en alguno de los dos grupos. Usualmente el enfoque es separar compuestos químicos en grupos de activos/inactivos. Nosotros adaptamos la técnica para corroborar la subdivisión de los inhibidores estudiados en grupos de análogos/no análogos.

Para seguir esta técnica, consideramos aquellas variables estructurales que eran comunes a todos los inhibidores, que habían sido las más significativas en las correlaciones encontradas para cada grupo, y que como máximo era necesario eliminar un punto (compuesto) en caso de ausencia de dicho parámetro (como un grupo fosfato). Los resultados se presentan por medio de gráficas para facilitar su comprensión.

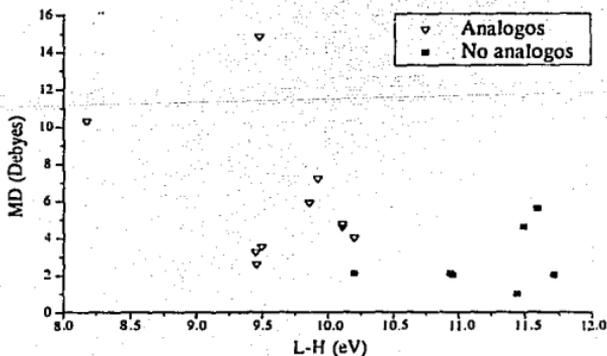
En el caso de las variables de mecánica molecular debemos precisar que no nos fue posible encontrar ninguna separación limpia de cúmulos, por lo que, dentro de este nivel de descripción, sólo contamos con los resultados del análisis de regresión múltiple para apoyar nuestra teoría.

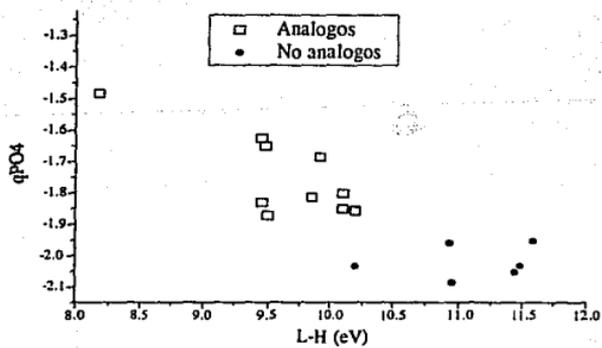
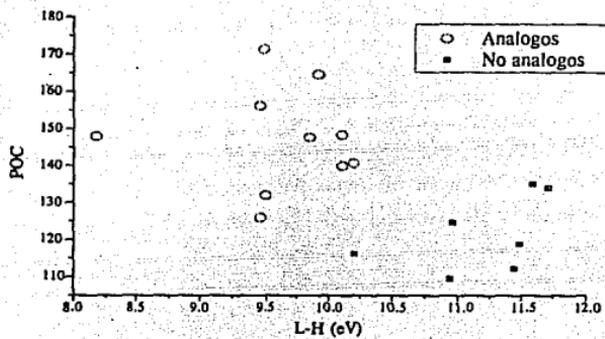
En los resultados con el método de MNDO encontramos los siguientes discriminantes que confirman nuestra hipótesis:





En los resultados con el método de AM1 encontramos los siguientes discriminantes:





Con base en los resultados de las regresiones multiparamétricas y en el análisis de discriminantes, creemos justificado afirmar que, dentro de la calidad de los resultados que proporcionan los métodos de cálculo utilizados, existen dos grupos de inhibidores (según los denominamos: análogos y no análogos) que pueden ser distinguibles por sus propiedades electrónicas.

Consideramos igualmente que esto también es un indicador de que es muy posible que los mecanismos de interacción con el sitio activo de estos dos grupos sean distintos. Para ello hacemos particular énfasis en el primer discriminante (de MNDO) presentado, donde la conjunción de las diferencias en las cargas netas del fosfato y del carboxilato entre los análogos y los no análogos constituyen una evidencia clara de que las interacciones electrostáticas que puedan ocurrir en el sitio activo, y aun cuando no sean las que principalmente determinen la fuerza de unión al mismo, no ocurren de igual forma para ambos grupos de inhibidores por la desigual distribución de la carga que hemos descubierto.

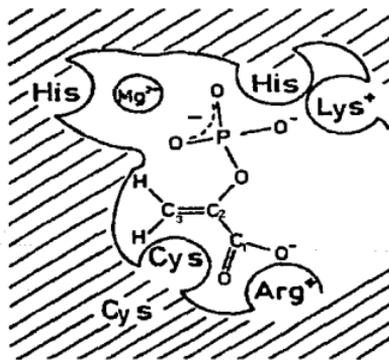
También es importante destacar que la diferencia de energía LUMO-HOMO (o bien, la electronegatividad) permite separar, en conjunción con otros descriptores moleculares, a los inhibidores no análogos (cuya actividad siempre correlacionó mejor con dicha variable) de los análogos.

(E) QSAR Y EL SITIO ACTIVO.

Dado que consideramos justificada la separación de los inhibidores en los dos grupos ya trabajados, analizaremos por separado la información que se obtiene indirectamente del sitio activo a partir de las correlaciones ya reportadas.

En el caso de los análogos, suponemos que la distancia entre el C-3 y el sustituyente en *cis* es el factor más importante que determina la fuerza de unión al sitio activo. Al parecer se consigue un mejor "ajuste" espacial de dicha porción de las moléculas con la parte del sitio activo con la que interactúan. Este efecto se logra modelar con la distancia interatómica ya mencionada, y al parecer puede tratarse de un acoplamiento a una región grande del sitio activo, pues el volumen del sustituyente en *cis* correlacionó bien con la actividad según uno de los resultados de MNDO. Si consideramos aquí los resultados que se obtuvieron con el método de Hansch para los

compuestos sólo con sustituyentes en posición *cis*, podemos suponer que el incremento en la distancia entre el sustituyente y el resto de la molécula permite una mejor interacción con grupos de polaridad intermedia el sitio activo mediante fuerzas de dispersión, siempre y cuando no se incremente la hidrofobicidad del sustituyente (que contribuye de forma negativa a la actividad). Con base en la representación esquemática que se ha hecho del sitio activo, y que volvemos a reproducir a continuación, recordaremos que no hay información alguna con respecto al tipo de aminoácidos con los que pudieran interactuar de forma directa los sustituyentes en *cis* de los inhibidores. Esto impide, por supuesto, que confrontemos nuestras conclusiones. En la descripción de los inhibidores con cambios estructurales sólo en sus sustituyentes en *cis* y *trans*, siguiendo el método de Hansch, se encontró que el incremento en la hidrofobicidad y el tamaño de dichos sustituyentes favorece la unión al sitio activo. Esto puede ser el resultado global de la interacción con una región amplia e hidrofóbica en el sitio activo.



Modelo del sitio activo de la PEPC propuesto por Andreo *et al* (3).

El modelo anterior sólo nos es válido para confrontar resultados donde las interacciones que parezcan ser las responsables de la unión al sitio activo sean de tipo electrostático, hidrofóbico o de dispersión. En este sentido, no es posible hacer

comentarios con respecto a la aparente importancia que tienen variables estructurales como los ángulos de enlace y las distancias interatómicas que se descubrió que son relevantes para predecir la actividad. Aquí al parecer es particularmente importante la distancia entre el carbono del carbonilo y el fósforo (según los resultados de AM1), ya que si esta distancia aumenta, la capacidad de unión al sitio activo de los inhibidores análogos disminuye (y, de hecho, la de los inhibidores no análogos aumenta).

Dado que en las distintas correlaciones que se obtuvieron con los diferentes métodos aparecen frecuentemente términos que describen las cargas netas de fragmentos estructurales de los inhibidores, no es difícil justificar su presencia en términos de la interacción electrostática de dichos fragmentos con las diferentes porciones del sitio activo, donde observamos que predominan aminoácidos con carga o polares. Esto puede ser la explicación de que el momento dipolar haya aparecido como el factor de mayor peso según las descripciones de MNDO y AM1.

En el caso de los no análogos, parece que la electronegatividad es la principal responsable de la actividad, lo que sugiere ciertamente que deben existir regiones básicas en el sitio activo que faciliten la unión por medio de procesos de transferencia de carga. Las interacciones electrostáticas no específicas que modela el momento dipolar son también responsables en gran medida de la unión eficiente al sitio activo. Algo importante que se descubrió es que la superficie no polar saturada de estos compuestos (y que cubre a los sustituyentes de estos compuestos) contribuye de forma negativa a la actividad. Esto se puede relacionar con la región del sitio activo con la que interactúan los sustituyentes de los análogos, que al parecer tiene propiedades hidrofóbicas. Dado que la superficie no polar saturada se relaciona con la hidrofobicidad, al parecer existen regiones polares en el sitio activo (donde interactúan los sustituyentes de los no análogos) adyacentes a las regiones hidrofóbicas con las que interactúan los sustituyentes de los análogos. También se descubrió que la actividad es dependiente del volumen de los sustituyentes de estos compuestos, lo que significa que la región con la que interactúan, al igual que con los análogos, es grande.

(F) COMENTARIOS FINALES.

En el capítulo titulado "Bioquímica de la Enzima Fosfoenolpiruvato Carboxilasa" presentamos una síntesis de las hipótesis que han presentado algunos

autores con respecto a cuáles factores moleculares consideran ellos que son los más importantes para una unión efectiva de los inhibidores competitivos con el sitio activo. En esta sección nos proponemos contrastar nuestros resultados con dichas hipótesis.

O'Leary comenta (17), como ya se mencionó en su momento, que la actividad de los inhibidores se incrementa conforme el ángulo en torno al C-2 varía de 109° (en el fosfoglicolato) incrementándose sucesivamente en el L-2-fosfolactato, en el Z-fluoro-fosfoenolpiruvato, en el Z-bromo-fosfoenolpiruvato, hasta llegar a 120° en el fosfato del ácido 1-hidrox ciclopropanoico. Veamos a continuación los resultados que nosotros obtuvimos:

MOLECULA	MEC. MOL.	MNDO	AM1
<i>Fosfoglicolato</i>	114.40	114.17	116.86
<i>L-2-fosfolactato</i>	99.35	112.19	113.57
<i>Z-fluoro-PEP</i>	117.56	116.04	117.53
<i>Z-bromo-PEP</i>	119.03	115.53	119.66
<i>1-HCP</i>	116.34	112.50	114.56
<i>PEP</i>	117.48	115.15	115.47

Como podemos observar, ni los ángulos ni las tendencias que se predicen se verifican en ninguno de los resultados obtenidos por los tres métodos. Sin embargo, es evidente que aquí se puede sugerir realizar cálculos *ab initio* con una base apropiada para optimizar las geometrías de estos compuestos (y todos los demás) y posiblemente obtener resultados más confiables.

Esta autora comenta igualmente (31) que la densidad electrónica en torno al doble enlace del PEP es muy parecida a aquella en torno al anillo de ciclopropano presente en el fosfato del ácido 1-hidrox ciclopropanoico (1-HCP). Veamos qué resultados obtuvimos nosotros para las cargas netas de estos fragmentos estructurales con los dos métodos semi-empíricos que utilizamos:

MOLECULA	MNDO	AM1
<i>PEP</i>	-0.1600	-0.1785
<i>1-HCP</i>	-0.0901	-0.1026

Consideramos que las diferencias en las cargas netas entre ambos compuestos son poco significativas, por lo que podemos, en principio, confirmar la hipótesis de O'Leary. Es probable que un cálculo más preciso de dichas cargas permita tener resultados más confiables.

O'Leary y colaboradores (17,29) y Jenkins y colaboradores (3,32) mencionan que las propiedades del oxígeno del puente del éster fosfato (C-O-P) son muy importantes para determinar las diferencias en actividad de los compuestos que tienen variaciones estructurales en dicho lugar, por lo que propone comparar esencialmente la carga neta en el oxígeno (o el grupo que esté presente) y el ángulo C-O-P entre los compuestos PEP, Fosfoenolpiruvato y Fosfoenolpiruvato fosfonato (para los análogos), y fosfoglicolato, fosfotiglicolato y fosfonopropionato (para los no análogos). Veamos a continuación qué resultados obtuvimos nosotros por los dos métodos semiempíricos trabajados para estas propiedades, y el tipo de correlaciones que se obtienen para dichas propiedades contra la actividad inhibitoria.

Molécula	Carga en el puente del éster fosfato (qO)		Angulo de enlace P-O-C (POC)	
	MNDO	AMI	MNDO	AMI
<i>PEP</i>	-0.4995	-0.6620	137.97	137.44
<i>Fosfoglicolato</i>	-0.5655	-0.7303	127.21	112.13
<i>PEP fosfonato</i>	-0.2731	-0.6017	125.62	131.95
<i>Fosfoenolpiruvato</i>	-0.4389	-0.7417	125.88	126.02
<i>Fosfonopropionato</i>	-0.3149	-0.6502	119.78	109.36
<i>Fosfotiglicolato</i>	-0.5150	-0.9230	116.07	116.10

El único resultado satisfactorio que se obtuvo fue la siguiente correlación para los cinco inhibidores anteriores, según los resultados obtenidos por los cálculos realizados con el método MNDO:

$$\log Ki = 23.1658(\pm 6.1499) + 0.5744(\pm 1.8808)qO - 0.1598(\pm 0.0495)POC$$

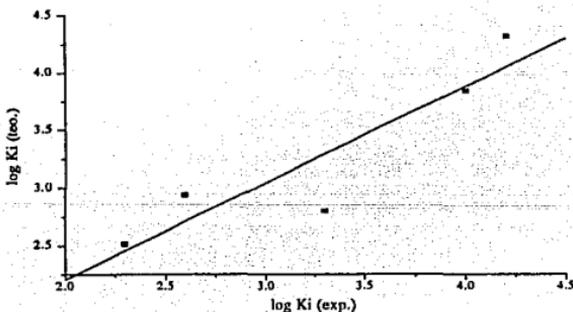
$$r = 0.91647, r^2 = 0.83991, s = 0.47264, F = 5.43128 (15.549\%)$$

Del resultado anterior se concluye que a medida que la carga sobre el grupo del puente del éster fosfato (oxígeno, metileno o azufre) se hace más negativa, y el ángulo P-O-C en torno a dicho grupo se incrementa, la fuerza de unión al sitio activo aumenta. La correlación obtenida posee variables perfectamente ortogonales ($r^2 = 0.00024$), pero no es de muy buena calidad por el bajo valor de F y el "sobreajuste" debido al bajo número de puntos con respecto al número de variables. Concluimos que esta primera aproximación parece corroborar dentro de ciertos límites las hipótesis originalmente planteadas por los autores anteriormente mencionados.

La gráfica del valor predicho del $\log K_i$ contra el valor experimental para la ecuación anterior es la siguiente:

$$\log K_i = 23.1658 + 0.5744qO - 0.1598POC$$

$$r = 0.91647, r^2 = 0.83991, s = 0.47264, F = 5.43128 (15.549\%)$$



Por otro lado, al parecer hemos encontrado evidencia en favor de las afirmaciones de Andreo y colaboradores (2) en el sentido de que las sustituciones en *cis* favorecen la unión al sitio, pero aún no es claro cuál el papel que juegan las sustituciones en *trans*, si bien los resultados de mecánica molecular parecen afirmar que el incremento en la distancia entre el C-3 y el sustituyente en *trans* desfavorece la unión al sitio activo.

CONCLUSIONES

Con base en la calidad de las regresiones multiparamétricas realizadas y el análisis de discriminantes consideramos que se pueden concluir los siguientes puntos:

(1) Existen evidencias a nivel de las propiedades electrónicas de los inhibidores competitivos de la PEPC de que éstos se pueden subdividir en dos grandes grupos: los *análogos al PEP* (que poseen la típica estructura de doble enlace) y los *no análogos al PEP* (que no poseen dicho doble enlace). Al parecer, las cargas netas en los grupos fosfato y carboxilato de los inhibidores son las propiedades moleculares electrónicas que permiten corroborar esta separación en cuanto que sugieren que existen diferencias en las interacciones electrostáticas de los inhibidores (debido a estos grupos químicos) con el sitio activo, sin que esto pueda ser utilizado para predecir la actividad de alguno de los grupos de moléculas. Algo relevante es que la diferencia de energía LUMO-HOMO, que sí se correlaciona muy bien con la actividad (particularmente de los no análogos), junto con otros descriptores, también permite discriminar a ambos grupos de inhibidores.

(2) Es posible formular ecuaciones que dependan de uno o varios descriptores moleculares para reproducir las tendencias en la actividad de cada uno de los grupos de inhibidores. Estas ecuaciones podrían ser utilizadas para predecir la actividad de nuevos compuestos, siempre y cuando los valores de sus descriptores moleculares se encuentren dentro de los límites que tenga el grupo original de compuestos de donde se obtuvieron.

(3) La información que se obtuvo acerca del sitio activo proporcionó nueva información acerca del medio químico y del tipo de fuerzas involucradas en la interacción con los sustituyentes de los inhibidores. Se hace preciso contar con un mayor número de compuestos inhibidores con el fin de caracterizar mejor dichos sitios de interacción y para probar variaciones estructurales en el grupo fosfato.

(4) En virtud de que no fue posible del todo encontrar correlaciones para los mismos descriptores con los resultados de cada uno de los métodos de cálculo empleados,

consideramos que la siguiente etapa de este proyecto de investigación es la realización de cálculos *ab initio*. Tenemos confianza en que estos cálculos podrán proporcionar geometrías de equilibrio y propiedades electrónicas mucho más confiables que permitirán verificar los resultados que hemos presentado en esta tesis. Creemos que también será importante obtener los potenciales electrostáticos de los inhibidores, con el fin de visualizar en conjunto las propiedades volumétricas y las electrostáticas.

(5) Creemos que todo estudio de *QSAR* debe comenzar con resultados obtenidos de cálculos al nivel de aquéllos que nosotros empleamos para nuestro trabajo de tesis, pues pueden proporcionar información acerca de las variables estructurales que son relevantes para la actividad y cuyo cálculo conviene mejorar. Con base en la experiencia obtenida de este trabajo, consideramos necesario mencionar que las propiedades geométricas y electrónicas que se obtienen a través de métodos semi-empíricos (y de mecánica molecular) deben ser tomadas con reserva para estudios de este tipo, particularmente si no se cuenta con una serie de moléculas lo suficientemente grande como para abarcar intervalos amplios en los valores de sus descriptores moleculares y compensar así los errores propios de los métodos.

(6) El estudio teórico de los compuestos inhibidores y activadores alostéricos deberá realizarse en un futuro tomando en cuenta las propiedades geométricas y electrónicas que determinan la actividad de los inhibidores competitivos. El objetivo deberá ser, en principio, realizar un análisis de discriminantes con aquellos descriptores moleculares que tengan en común todos los tipos de moduladores de la actividad de la PEPC, con el fin de poder encontrar las propiedades intrínsecas de los compuestos que determinen el tipo de comportamiento bioquímico que exhibirán. La búsqueda de un *QSAR* para los inhibidores y activadores alostéricos sólo podrá lograrse cuando éstos puedan agruparse en función del sitio regulador de la enzima con el que interactúen.

APÉNDICE

SIGNIFICADO DE K_m y V_{max} .

La K_m es una combinación de constantes de velocidad que puede interpretarse físicamente como la concentración de sustrato que produce la mitad de la velocidad máxima de una reacción enzimática, por lo que de hecho se le considera una medida de la especificidad de una enzima por su sustrato. La V_{max} es la velocidad máxima de reacción a la que se puede llegar en una reacción enzimática, a una concentración constante de enzima, al irse incrementando la concentración de sustrato hasta saturar los sitios activos disponibles.

El criterio V_{max}/K_m se emplea a menudo para decidir cuál de entre varios sustratos posibles (o formas químicas distintas de un mismo sustrato debidas, por ejemplo, a su grado de disociación) es el que prefiere la enzima. Considerando que la V_{max} de una enzima es constante al depender únicamente de su concentración (o sea, del número de sitios activos), los cambios en la K_m para distintos sustratos permiten identificar al sustrato preferido. Si la enzima es más afín por cierto compuesto, éste tendrá una K_m menor y el cociente V_{max}/K_m será mayor para dicho compuesto.

DEFINICIÓN Y SIGNIFICADO DE LA CONSTANTE DE INHIBICIÓN K_i .

Cualquier sustancia que reduce la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente se considera como un *inhibidor*. Un inhibidor competitivo es una sustancia que se une a la enzima libre de forma tal que impida la unión con el sustrato. Esto implica que el sustrato y el inhibidor son mutuamente excluyentes, en general debido a que compiten por el mismo sitio en la enzima. Desde el punto de vista cinético, el efecto de un inhibidor competitivo es el de incrementar la K_m aparente del sustrato. Conforme se incrementa la concentración del inhibidor, la K_m aparente aumenta. La velocidad máxima de la reacción (V_{max}) no se altera, pero en presencia de un inhibidor competitivo se requiere de una mucha mayor concentración del sustrato para que la reacción llegue a cualquier velocidad dada. El grado de inhibición depende

de las concentraciones del sustrato [S] y el inhibidor [I], así como en la K_m y K_i . El incremento en [S] a una [I] constante disminuye el grado de inhibición. El incremento en [I] a una [S] constante aumenta el grado de inhibición. Mientras más pequeño sea el valor de K_i , mayor será el grado de inhibición a unan [S] y [I] dadas. La K_i es equivalente a la concentración de inhibidor que duplica el valor de la pendiente en una gráfica de Lineweaver-Burk ($1/v$ contra $1/[S]$). La ecuación de la velocidad para una inhibición competitiva, en su forma recíproca, es la siguiente:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

de donde se puede ver que

$$\frac{K_{m_{app}}}{V_{max}} = \frac{K_m}{V_{max} K_i} [I] + \frac{K_m}{V_{max}}$$

REFERENCIAS

- (1a) Lehninger, A.L. *Principles of Biochemistry*, First edition, 1982, Worth Publishers, Inc., U.S.A. p. 669-672.
- (1b) Stryer, L. *Bioquímica*, Tercera edición, 1988, Editorial Reverté, S.A., Barcelona, España, p. 545-547.
- (2) Andreo, C.S., González, D.H., and Iglesias, A.A. (1987), *FEBS Lett.* **213**, 1-8.
- (3) Jenkins, C.L.D. (1989), *Plant Physiol.* **89**, 1231-1237.
- (4) González, D.H. and Andreo, C.S. (1989), *TIBS* **14**, 24-27.
- (5) O'Leary, M.H. (1982), *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**, 297-315.
- (6) Uedan, K. and Sugiyama, T. (1976), *Plant Physiol.* **57**, 906-910.
- (7) González, D.H., Iglesias, A.A., and Andreo, C.S. (1986), *Arch. Biochem. Biophys.* **245**, 179-186.
- (8) Stiborová, M. and Leblová, S. (1986), *FEBS Lett.* **205**, 32-34.
- (9a) Mukerji, S.K. (1977), *Arch. Biochem. Biophys.* **182**, 343-351.
- (9b) Mukerji, S.K. (1977), *Arch. Biochem. Biophys.* **182**, 352-359.
- (10) Janc, J.W., O'Leary, M.H., and Cleland, W.W. (1992), *Biochemistry* **31**, 6421-6426.
- (11) Ausenhus, S.L. and O'Leary, M.H. (1992), *Biochemistry* **31**, 6427-6431.
- (12) O'Leary, M.H., Rife, J.E., and Slater, J.D. (1981), *Biochemistry* **20**, 7308-7314.
- (13) Wedding, R.T., Rustin, P., Meyer, C.R., and Black, M.K. (1988), *Plant Physiol.* **88**, 976-979.
- (14) Iglesias, A.A., González, D.H., and Andreo, C.S. (1984), *Biochim. Biophys. Acta* **788**, 41-47.
- (15) Miller, R.S., Mildvan, A.S., Chang, H-C., Easterday, R.L., Maruyama, H. and Lane, M.D. (1968), *J. Biol. Chem.* **243**, 6030-6040.
- (16) Mizioroko, H.M., Nowak, T., and Mildvan, A.S. (1974), *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 378-389.
- (17) O'Leary, M.H. (1983), *Physiol. Vég.* **21**, 883-888.
- (18) Maruyama, H. Easterday, R.L., Chang, H-C., and Lane, M.D. (1966), *J. Biol. Chem.* **241**, 2405-2412.
- (19) Jawali, N. and Bhagwat, A.S. (1987), *Photosynth. Res.* **11**, 153-159.

- (20) Nishikido, T. and Takanaishi, H. (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **53**, 126-133.
- (21) Stiborová, M. and Leblová, S. (1983), *Physiol. Věd.* **21**, 935-942.
- (22) Iglesias, A.A. and Andreo, C.S. (1983), *Biochim. Biophys. Acta* **749**, 9-17.
- (23) Hansen, D.E. and Knowles, J.R. (1982), *J. Biol. Chem.* **257**, 14795-14798.
- (24) Rose, I.A., O'Connell, E.J., Noce, P., Utter, M.F., Wood, H.G., Willard, J.M., Cooper, T.G., and Benziman, M. (1969), *J. Biol. Chem.* **244**, 6130-6133.
- (25) Janc, J.W., Urbauer, J.L., O'Leary, M.H., and Cleland, W.W. (1992), *Biochemistry* **31**, 6432-6440.
- (26) O'Leary, M.H. (1980), *Methods Enzymol.* **64B**, 83.
- (27) Janc, J.W., Cleland, W.W., and O'Leary, M.H. (1992), *Biochemistry* **31**, 6441-6446.
- (28) Shi, J-N., Wu, M-X., and Jiao, J.A. (1988), *Acta Phytophysiol. Sin.* **14**, 308-312.
- (29) Sikkema, K.D., and O'Leary, M.H. (1988), *Biochemistry* **27**, 1342-1347.
- (30) Liu, J., Peliska, J.A., and O'Leary, M.H. (1990), *Arch. Biochem. Biophys.* **277**, 143-148.
- (31) O'Leary, M.H., DeGooyer, W.J., Dougherty, T.M. and Anderson, V. (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 1320-1325.
- (32) Jenkins, C.L.D., Harris, R.L.N., and McFadden, H.G. (1987), *Biochem. Int.* **14**, 219-226.
- (33) O'Leary, M.H. and Díaz, E. (1982), *J. Biol. Chem.* **257**, 14603-14605.
- (34) González, D.H. and Andreo, C.S. (1986), *Z. Naturforsch* **41c**, 1004-1010.
- (35) Díaz, E., O'Laughlin, J.T., and O'Leary, M.H. (1988), *Biochemistry* **27**, 1336-1341.
- (36) González, D.H. and Andreo, C.S. (1988), *Eur. J. Biochem.* **173**, 339-343.
- (37) Izui, K., Matsuda, Y., Kameshita, I., Katsuki, H., and Wood, A.E. (1983), *J. Biochem.* **94**, 1789-1795.
- (38) González, D. H. and Andreo, C.S. (1988), *Biochemistry* **27**, 177-183.
- (39) Fujita, N., Izui, K., Nishino T., and Katsuki, H. (1984), *Biochemistry* **23**, 1774-1779.
- (40) González, D. H. and Andreo, C.S. (1988), *Biochem. J.* **253**, 217-222.
- (41) Wirsching, P. and O'Leary, M.H. (1988), *Biochemistry* **27**, 1355-1360.
- (42) Wirsching, P. and O'Leary, M.H. (1985), *Biochemistry* **24**, 7602-7606.
- (43) Jenkins, C.L.D., Harris, R.L.N., and McFadden, H.G. (1986), *Biochem. Int.* **12**, 619-625.

- (44) Selinioti, E., Karabourniotis, G., Manetas, Y., and Gavalas, N.A. (1985), *J. Plant Physiol.* **121**, 353-360.
- (45) Rodríguez-Sotres, R. and Muñoz-Clares, R.A. (1990), *Arch. Biochem. Biophys.* **276**, 180-190.
- (46) González, D.H., Iglesias, A.A., and Andreo, C.S. (1987), *Biochem. J.* **241**, 543-548.
- (47) Lowe, J. and Slack, C.R. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **235**, 207-209.
- (48) Huber, S.C. and Edwards, G.E. (1975), *Can. J. Bot.* **53**, 1925-1933.
- (49) Wirsching, P. and O'Leary, M.H. (1988), *Biochemistry* **27**, 1348-1355.
- (50) Kaufman, J.J. (1977), *Int. J. Quant. Chem. QBS* **4**, 375-412.
- (51) Martin, Y.C. (1981), *J. Med. Chem.* **24**, 229-237.
- (52) Hansch, C. (1976), *J. Med. Chem.* **19**, 1-6.
- (53) Zanger, M. and Gennaro, A.R. in *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1980), Mach Publishing Company, 16th. edition, U.S.A., p. 420-435.
- (54) Redl, G., Cramer, R.D., III, and Berkoff, C.E. (1974), *Chem. Soc. Rev.* **3**, 273-292.
- (55) Hansch, C. and Dunn, W.J., III (1972), *J. Pharm. Sci.* **61**, 1-19.
- (56) Hansch, C. and Leo, A.J., *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology* (1979), John Wiley & Sons, Inc., 1st. edition, U.S.A.
- (57) Kubinyi, H. (1980), *Prog. Drug. Res.* **23**, 97-198.
- (58) Saxena, A.K. and Ram, S. (1980), *Prog. Drug. Res.* **23**, 199-232.
- (59) Hansch, C. and Fujita, T. (1964), *J.A.C.S.* **86**, 1616-1626.
- (60) Fujita, T., Iwasa, J., and Hansch, C. (1964), *J.A.C.S.* **86**, 5175-5180.
- (61) Hansch, C., Leo, A., Unger, S.H., Kim, K.H., Nikaitani, D., and Lien, E.J. (1973), *J. Med. Chem.* **16**, 1207-1216.
- (62) Klopman, G. and Kalos, A.N. (1985), *J. Comp. Chem.* **6**, 492-506.
- (63) McFarland, J.W. (1970), *J. Med. Chem.* **13**, 1192-1196.
- (64) Hansch, C., Silipo, C., and Steller, E.E. (1975), *J. Pharm. Sci.* **64**, 1186-1191.
- (65) Coburn, R.A. and Solo, A.J. (1976), *J. Med. Chem.* **19**, 748-754.
- (66) Parsons, J.R. and Govers, H.A.J. (1990), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **19**, 212-227.
- (67) Schultz, T.W., Arnold, L.M., Wilke, T.S., and Moulton, M.P. (1990), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **19**, 243-253.
- (68) Denny, W.A., Cain, B.F., Atwell, G.J., Hansch, C., Panthananicall, A., and Leo, A. (1982), *J. Med. Chem.* **25**, 276-315.
- (69) Recanatini, M., Klein, T., Yang, C.H., McClarin, J., Langridge, R., and Hansch, C. (1985), *Mol. Pharmacol.* **29**, 436-446.

- (70) Werbel, L.M., Cook, P.D., Eislager, E.F., Hung, J.H., Johnson, J.L., Kesten, S.J., McNamara, D.J., Ortwine, D.F., and Worth, D.F. (1986), *J. Med. Chem.* **29**, 924-939.
- (71) Taft, R.W., Jr. (1953), *J.A.C.S.* **75**, 4538-4539.
- (72) Fujita, T. (1983), *J. Pharm. Sci.* **72**, 285-289.
- (73) Hantsch, C. and Klein, T.E. (1986), *Acc. Chem. Res.* **19**, 392-400.
- (74) Pauling, L. and Pressman, D. (1945), *J.A.C.S.* **67**, 1002-1012.
- (75) Hansch, C. and Caldwell, J. (1991), *J. CAMD* **5**, 441-453.
- (76) Klopman, G. (1984), *J.A.C.S.* **106**, 7315-7321.
- (77) Enslein, K. and Borgstedt, H.H. (1989), *Toxicol. Lett.* **49**, 107-121.
- (78) Hodes, L. (1986), *J. Med. Chem.* **29**, 2207-2212.
- (79) Yuta, K. and Jurs, P.C. (1981), *J. Med. Chem.* **24**, 241-251.
- (80) McFarland, J.W. and Gans, D.J. (1987), *J. Med. Chem.* **30**, 46-49.
- (81) Livingstone, D.J., Hesketh, G., and Clayworth, D. (1991), *J. Mol. Graphics* **9**, 115-118.
- (82) Dove, S., Franke, R., Mndshojan, O.L., Schkuljev, W.A., and Chashakjan, L.W. (1979), *J. Med. Chem.* **22**, 90-95.
- (83) Cammarata, A. and Menon, G.K. (1976), *J. Med. Chem.* **19**, 739-747.
- (84) Moriguchi, I., Komatsu, K. and Matsushita, Y. (1980), *J. Med. Chem.* **23**, 20-26.
- (85) Buydens, L., Massart D.L., and Geerlings, P. (1986), *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.* **21**, 35-43.
- (86) Hopfinger, A.J. (1985), *J. Med. Chem.* **28**, 1133-1139.
- (87) Kerlén, A., Johansson, A.M., Kenne, L., Arvidsson, L.E., and Hacksell, U. (1986), *J. Med. Chem.* **29**, 917-924.
- (88) Loew, G.H., Poulsen, M.T., Spangler, D., and Kirkjian, E. (1983), *Int. J. Quant. Chem. QBS* **10**, 201-213.
- (89) Kaufman, J.J. (1981), *Int. J. Quant. Chem. QBS* **8**, 419-439.
- (90) Audry, E., Dubost, J-P., Colleter, J-C., and Dallet, Ph. (1986), *Eur. J. Med. Chem. - Chim. Ther.* **21**, 71-72.
- (91) Croizet, F., Langlois, M.H., Dubost, J-P., Braquet, P., Audry, E., Dallet, Ph., and Colleter, J-C. (1990), *J. Mol. Graphics* **8**, 153-155.
- (92) Gilliom, R.D., Beck J-P., and Purcell, W.P. (1985), *J. Comp. Chem.* **6**, 437-440.
- (93) Klopman, G., Namboodiri, K., Schochet, M. (1985), *J. Comp. Chem.* **6**, 28-38.

- (94) Krygowski, T.M., Wozniak, K., Bock, C.W., and George, P. (1989), *J. Chem. Res. (S)* 396-397.
- (95) Mares-Guia, M., Nelson, D.L., and Rogana, E. (1977), *J.A.C.S.* **99**, 2331-2336.
- (96) Johnson, C.L. and Green, J.P. (1974), *Int. J. Quant. Chem.* **QBS 1**, 159-167.
- (97) Shinagawa, Y. and Shinagawa, Y. (1974), *Int. J. Quant. Chem.* **QBS 1**, 169-178.
- (98) Thomson, C. and Brandt, R. (1983), *Int. J. Quant. Chem.* **QBS 10**, 357-373.
- (99) Efang, S.M.N., and Boudreau, R.J. (1991), *J. CAMD 5*, 405-417.
- (100) Petrongolo, C. (1978), *Gazz. Chim. Ital.* **108**, 445-448.
- (101) Boudon, A., Szymoniak, J., Chrétien, J.R., and Dubois, J-E. (1988), *Can. J. Chem.* **66**, 2995-3002.
- (102) Weinstein, H., Chou D., Kang, S., Johnson, C.L., and Green, J.P. (1976), *Int. J. Quant. Chem.* **QBS 3**, 135-150.
- (103) Sjöberg, P., Murray, J.S., Brinck, T., Evans, P., and Politzer, P. (1990), *J. Mol. Graphics 8*, 81-85.
- (104) Kendrick, J. and Fox, M. (1991), *J. Mol. Graphics 9*, 182-187.
- (105) Sokalski, W.A. and Sneddon, S.F. (1991), *J. Mol. Graphics 9*, 74-77.
- (106) Spivak, C.E., Waters, J.A., Yadav, J.S., Shang, W-C., Hermsmeier, M., Liang, R.F., and Gund, T.M. (1991), *J. Mol. Graphics 9*, 105-110.
- (107) Hopfinger, A.J. (1983), *J. Med. Chem.* **26**, 990-996.
- (108) Meyer, A.Y. and Richards, W.G. (1991), *J. CAMD 5*, 427-439.
- (109) Norinder, U. (1991), *J. CAMD 5*, 419-426.
- (110) Rozas, I., Arteca, G.A., and Mezey, P.G. (1991), *Int. J. Quant. Chem.* **QBS 18**, 269-288.
- (111) Moriguchi, I., Kanada, Y., and Komatsu, K. (1976), *Chem. Pharm. Bull.* **24**, 1799-1806.
- (112) Moriguchi, I. and Kanada, Y. (1977), *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 926-935.
- (113) Connolly, M.L. (1983), *Science* **221**, 709-713.
- (114) Iwase, K., Komatsu, K., Hirono, S., Nakagawa, S., and Moriguchi, I. (1985), *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 2114-2121.
- (115) Bondi, A. (1964), *J. Phys. Chem.* **68**, 441-451.
- (116) Lee, B. and Richards, F.M. (1971), *J. Mol. Biol.* **55**, 379-400.
- (117) Burkert, U. and Allinger, N.L., *Molecular Mechanics*, ACS Monograph 177, 1982, American Chemical Society, Washington, D.C., U.S.A., p. 1-78.

- (118) Wilson, S., *Chemistry by Computer. An Overview of the Applications of Computers in Chemistry*, 1st. edition, 1986, Plenum Press, New York, U.S.A., p. 85-110, 207-213.
- (119) Jurs, P.C., *Computer Software Applications in Chemistry*, 1st. edition, 1986, John Wiley & Sons, Inc., U.S.A., p. 179-185.
- (120) Eriksson, L.A., *Computational Quantum Chemistry: Applications to Radical Cations, Polymerisation Reactions, Polymers and Charge Transfer Systems*, Tesis Doctoral, Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala 1992.
- (121) Wilson, E.B. (1972), *Chem. Soc. Rev.* 1, 293-318.
- (122) Lowe, J.P., *Quantum Chemistry*, Student edition, 1978, Academic Press, Inc., U.S.A., págs. 107-134, 150-346.
- (123) Wilson, S., *Chemistry by Computer. An Overview of the Applications of Computers in Chemistry*, First edition, 1986, Plenum Press, U.S.A., págs. 41-83.
- (124) Dewar, M.J.S. and Thiel, W. (1977), *J.A.C.S.* 99, 4899-4907.
- (125) Dewar, M.J.S. and Thiel, W. (1977), *J.A.C.S.* 99, 4907-4917.
- (126) Dewar, M.J.S. and Rzepa, H.S. (1978), *J.A.C.S.* 100, 58-67.
- (127) Dewar, M.J.S., McKee, M.L., and Rzepa, H.S. (1978), *J.A.C.S.* 100, .
- (128) Dewar, M.J.S. and Rzepa, H.S. (1983), *J. Comp. Chem.* 4, 158-169.
- (129) Dewar, M.J.S. and Healy, E. (1983), *J. Comp. Chem.* 4, 542-551.
- (130) Dewar, M.J.S. and Reynolds, C.H. (1986), *J. Comp. Chem.* 7, 140-143.
- (131) *UniChem Chemistry Codes*, 1991, Cray Research, Inc., U.S.A., págs. 363-365.
- (132) Dewar, M.J.S., Zebisch, E.G., Healy, E.F., and Stewart, J.J.P. (1985), *J.A.C.S.* 107, 3902-3909.
- (133) Dewar, M.J.S. and Zebisch, E.G. (1988), *J. Mol. Struct. (Theochem)* 180, 1-21.
- (134) Dewar, M.J.S. and Jie, C. (1989), *J. Mol. Struct. (Theochem)* 187, 1-13.
- (135) Stewart, J.J.P. (1989), *J. Comp. Chem.* 10, 209-220.