

Estudi teòric de la reaccionabilitat de composts anàlegs de la vitamina B6 amb amines

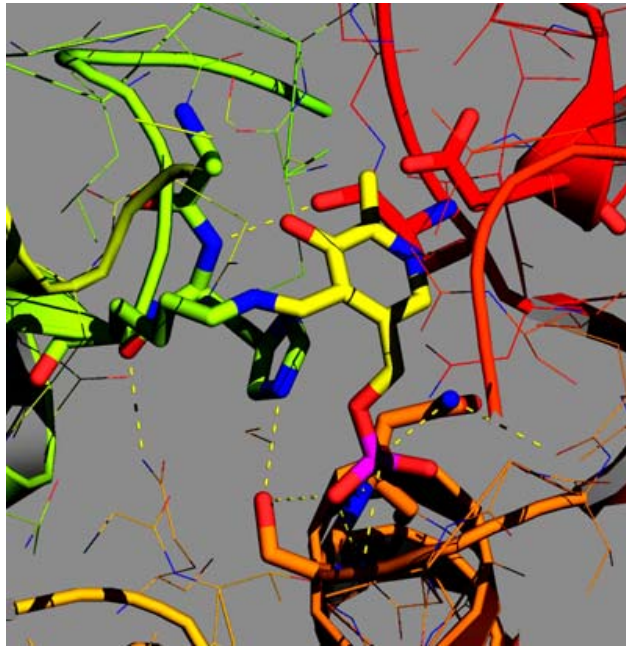


Figura 1. El 5'-fosfat de piridoxal (codi de colors: blau, N; groc, C; vermell, O; violeta, P) forma una base de Schiff amb un residu lisina (verd) en l'estructura cristal·lina de la triptòfan sintasa.

Introducció

L'organisme humà, com el de tots els animals, elabora les seves pròpies proteïnes a partir de la combinació dels diferents tipus d'aminoàcids que són absorbits després de la digestió de les proteïnes contingudes en els aliments. L'organisme és capaç de transformar alguns tipus d'aminoàcids en un altre mitjançant un procés metabòlic anomenat transaminació, que té lloc a l'interior de les cèl·lules hepàtiques. Ara bé, alguns aminoàcids anomenats essencials no poden ser sintetitzats pel fetge i cal que els animals els ingereixin a partir de vegetals.

La transaminació, descarboxilació i transsulfuració dels aminoàcids per a la síntesi de proteïnes seria impossible sense la presència d'una vitamina hidrosoluble, la vitamina B6. Això és així perquè la majoria dels enzims que catalitzen les reaccions esmentades requereixen la presència d'un derivat de la vitamina B6 per ser actius. Més concretament, la vitamina B6 inclou tres composts químics semblants, anomenats vitàmers, que presenten una mateixa activitat biològica: la piridoxina (PN), el piridoxal (PL) i la piridoxamina

(PM). Qualsevol d'aquests composts, però, per ser actiu fisiològicament cal que es converteixi en el seu corresponent èster fosfòric. Així el piridoxal (PL) es converteix en 5'-fosfat de piridoxal o PLP. El PLP és, per tant, un coenzim; és a dir, un compost que aporta als enzims els grups funcionals necessaris per dur a terme la catàlisi de les reaccions metabòliques. El PLP intervé en més de cent reaccions essencials per a la vida.

El PLP s'uneix a l'enzim de forma covalent mitjançant la formació d'una base de Schiff (un compost intermedi de vida mitjana molt curta que es forma per reacció d'un grup amino i un grup carbonil) amb un residu lisina situat al centre actiu de l'enzim. Es forma així l'anomenada "aldimina interna". Mentre que la unió covalent s'estableix mitjançant un enllaç del tipus imino, els grups metil i 5'-fosfat enllaçats a l'anell de piridina mantenen la unió no covalent amb els residus pròxims al centre actiu de l'enzim. L'aminoàcid substrat de l'enzim reacciona amb aquesta aldimina interna i es forma una nova base de Schiff entre aquest i el PLP, de manera que s'allibera el residu lisina en un procés conegut com a transiminació o transaldiminació. Aquesta base de Schiff, formada entre el PLP i l'aminoàcid substrat, es manté enllaçada de forma no covalent amb els residus del centre actiu de l'enzim i rep el nom d'"aldimina externa".

Aquesta "aldimina externa" és un intermedi comú per a totes les reaccions metabòliques del metabolisme dels aminoàcids. Qualsevol dels grups entorn del carboni alfa de l'aminoàcid pot eliminar-se. L'excés de càrrega que es produeix com a conseqüència d'aquesta eliminació és estabilitzat pel caràcter electròfil que presenta el sistema ressonant imino-anell piridínic, potenciat per la protonació en el nitrogen piridínic. Segons el grup que s'elimina entorn del carboni alfa de l'aminoàcid, es formen diferents intermedis que duen a productes completament diferents, després de la qual cosa es regenera l'aldimina interna. D'aquesta forma, reaccions com la racemització, la beta-eliminació, la desaminació, la transaminació, la descarboxilació i d'altres reaccions d'eliminació i síntesi d'aminoàcids són catalitzades per enzims dependents del PLP.

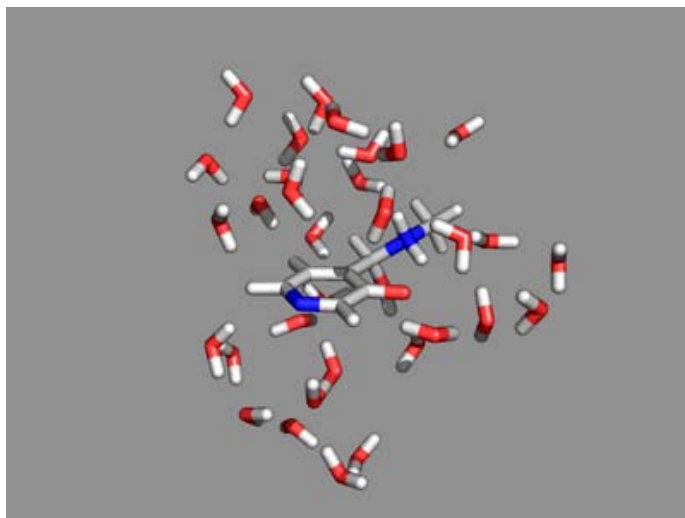


Figura 2. Model de solvatació explícita d'un dels intermedis de la reacció de formació de la base de Schiff.

L'acció catalítica dels enzims dependents del PLP sobre els aminoàcids depèn, en primera instància, de la formació del complex enzim-coenzim (aldimina interna), mitjançant la formació de la base de Schiff entre el PLP i un residu lisina al centre actiu de l'enzim, i de la reacció entre l'aminoàcid substrat de l'enzim amb aquesta aldimina interna per formar l'aldimina externa en el procés de la transaldiminació o transiminació.

Les reaccions de formació de la base de Schiff entre un aminoàcid i el PLP han estat objecte de nombrosos estudis experimentals mitjançant l'ús de composts model en dissolució. Aquests estudis han pogut establir les característiques generals del mecanisme de la reacció i la dependència de la cinètica de la reacció amb la polaritat del dissolvent i amb el grau de protonació de les dissolucions aquoses. Així, segons Snell i Braunstein, l'intermedi principal de la reacció és una carbinolamina, i la seva deshidratació és l'etapa limitant de la reacció. Per a la reacció de transiminació entre un aminoàcid i una base de Schiff, els resultats dels estudis experimentals realitzats sobre composts model suggereixen que es tracta d'una reacció simètrica en la qual una diamina geminal ha de ser l'intermedi principal de la reacció i que l'eliminació de l'amina més bàsica correspon a l'etapa limitant del procés. Els estudis cinètics suggereixen que ha d'existir un efecte de catàlisi àcida general associada al grup hidròxid piridínic i que les transferències d'hidrogen amb el dissolvent han de tenir un paper important. Per a ambdues reaccions, hi ha nombrosos treballs experimentals que descriuen els equilibris de tautomerització del PLP i de la base de Schiff formada entre el PLP i un aminoàcid: no obstant això, no s'han pogut aïllar tots els intermedis de reacció.

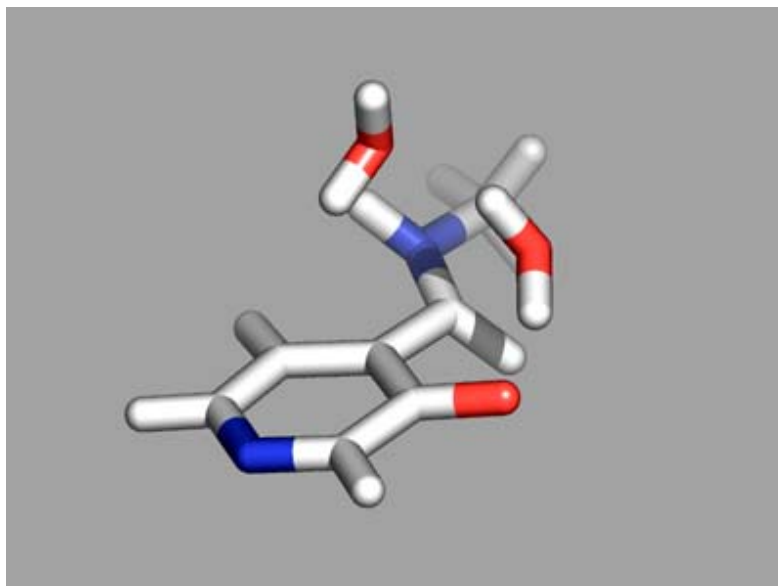


Figura 3. Model corresponent a l'estructura d'estat de transició de la deshidratació, que correspon a l'etapa limitant del mecanisme de formació de la base de Schiff entre el PLP i una amina.

Els estudis teòrics relacionats amb la vitamina B6 descrits a la bibliografia es concentren en la descripció dels equilibris de tautomerització del PLP i de la base de Schiff mitjançant l'aplicació de la metodologia semiempírica, *ab initio* i DFT. Quant a la reactivitat química, s'han descrit les reaccions sobre la cadena lateral de l'aminoàcid: la racemització, la descarboxilació i la transaminació.

La Mecànica Quàntica proporciona una explicació correcta de l'estructura i de les propietats físiques de les molècules mitjançant una descripció de la distribució i els nivells d'energia disponibles dels electrons. Per això, és el principal marc teòric de la Química. Des d'aquesta perspectiva, l'objectiu de la tesi ha estat la descripció teòrica del mecanisme de dues reaccions comunes a tots els enzims que depenen de la vitamina B6 i que duen a la formació de l'aldimina externa, el principal intermedi de les reaccions del metabolisme dels aminoàcids. En primer lloc la formació de la base de Schiff entre una amina com a compost anàleg d'un aminoàcid i la vitamina B6. En segon lloc la formació de la diamina geminal en el procés de transaminació entre una molècula d'amina i la base de Schiff formada entre una amina i la vitamina B6.

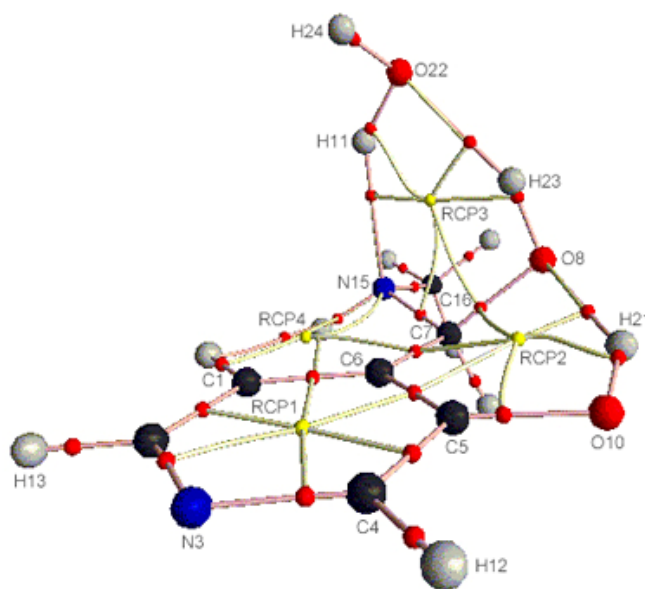


Figura 4. Gràfic molecular en el qual es mostren les característiques topològiques de la funció densitat de càrrega de la carbinolamina, l'intermedi més estable del mecanisme de la reacció de formació de la base de Schiff entre el PLP i una molècula d'amina.

Per a la descripció del mecanisme d'aquestes reaccions s'han portat a terme càlculs mecanoquàntics sobre els complexos reactius formats per aquests compostos anàlegs en els quals s'han identificat i caracteritzat els intermedis i els estats de transició mitjançant dues metodologies distintes: semiempírica i per aplicació de la teoria del funcional de la densitat.

En la metodologia semiempírica s'ha usat el hamiltonià semiempíric PM3 en fase gas i en

solvatació aquosa amb dos models diferenciats: en un mitjà continu i en un entorn format amb molècules d'aigua discretes (aproximació supermolecular). En la metodologia basada en l'aplicació de la teoria del funcional de la densitat (DFT) s'ha usat el funcional híbrid B3LYP i el conjunt de funcions de base 6-31+G(d). Amb les funcions d'ona de les estructures optimitzades obtingudes amb aquesta metodologia s'ha portat a terme un estudi topològic de la funció densitat de càrrega electrònica d'acord amb la teoria de Bader per tal de caracteritzar els enllaços, especialment la formació de xarxes de ponts d'hidrogen intra i intermoleculars.

Els perfils energètics obtinguts mitjançant la descripció de les estructures dels intermedis i dels estats de transició per aplicació de les metodologies semiempírica i DFT estan d'acord amb l'evidència experimental i han permès descriure de forma detallada el mecanisme de les dues reaccions estudiades. No obstant això, el perfil energètic obtingut per aplicació de la metodologia DFT és més simplificat que el que es desprèn de l'aplicació de la metodologia semiempírica gràcies a la descripció d'estats de transició concertats vinculats a transferències d'àtoms d'hidrogen.

Aquests estats de transició es troben en la reacció de formació de la base de Schiff en l'atac nucleòfil de l'amina sobre el carboni carbonílic, en la tautomerització de la carbinolamina i en la deshidratació de la carbinolamina, l'etapa limitant de la reacció. Per a la reacció de formació de la diamina geminal, es troba un estat de transició concertat en la reacció de tautomerització de la diamina geminal. En dos d'aquests estats de transició és destacable que la molècula d'aigua que forma part del complex molecular participa com a veritable reactiu, intercanviant un dels seus hidrògens amb les dues espècies reaccionants i facilitant així la transferència d'hidrogen entre llocs distants. En aquests casos, la presència de la molècula de dissolvent és un requisit per a la verificació de la reacció, la qual cosa és coherent amb l'observació experimental que ha d'existir una diferència de nombre de molècules de dissolvent entre els intermedis i els estats de transició.

Una altra característica general d'ambdós mecanismes que es dedueix dels càlculs que s'han realitzat sobre els complexos moleculars es troba en la formació de xarxes d'enllaços d'hidrogen a distàncies superiors a les considerades com a estàndards per a aquest tipus d'interaccions, com ho revela l'estudi de la topologia de la funció densitat de càrrega per a aquestes estructures. La presència d'aquestes xarxes de ponts d'hidrogen, que formen estructures cícliques no covalents, és especialment notòria per als intermedis principals de la reacció: la carbinolamina, en les seves formes zwitteriònica i no zwitteriònica per a la reacció de formació de la base de Schiff, i la diamina geminal per a la reacció de transiminació.

La formació d'aquestes xarxes d'enllaços d'hidrogen en els intermedis de reacció contribueix no solament a proporcionar una major estabilitat relativa a les dites espècies intermèdies, sinó que, a més, afavoreix la formació d'estats de transició concertats vinculats a transferències d'àtoms d'hidrogen en les estructures. La molècula d'aigua té un doble paper en aquestes xarxes: d'una banda és partícip indispensable en la seva formació i, de l'altra, actua com a reactiu en la formació d'estats de transició concertats.

La descripció d'aquestes estructures d'intermedis i d'estats de transició per a la reacció de la formació de la base de Schiff entre una amina i el compost anàleg al PLP, i de la transiminació d'aquesta amb una segona molècula d'amina, i les característiques generals d'aquests mecanismes, pretén ser una contribució a la modelització de les reaccions que duen a la formació del complex enzim-coenzima i a la formació del complex enzim-substrat per als enzims dependents de la vitamina B6.

Referència de la tesi

Títol: “Estudio teórico de la reaccionabilidad de compuestos análogos de la vitamina B6 con aminas”.

Autor: Antoni Salvà Salvà

Directors de la tesi: Dra. Josefa Donoso Pardo i Dr. Joan Frau Munar

Membres del tribunal

President: Dr. Francisco Muñoz Izquierdo, catedràtic de Química Física de la UIB

Dr. Bartomeu Vilanova Canet, professor titular de Química Física de la UIB

Dr. Tomás Luis Sordo Gonzalo, professor titular de Química Física de la Universitat d'Oviedo

Dr. Manuel A. Aguilar Espinosa, professor titular de Química Física de la Universitat d'Extremadura

Dr. Ignacio N. Tuñón García de Vicuña, professor titular de Química Física de la Universitat de València

Qualificació

Excel·lent *cum laude*

Articles derivats de la tesi

Salvà, A.; Donoso, J.; Frau, J.; Muñoz, F. “Theoretical studies on Schiff base formation of vitamin b6 analogues” J. Mol Struct (Theochem) 2002, **29**, 577.

Salvà, A.; Donoso, J.; Frau, J.; Muñoz, F. “Theoretical studies on transimination of vitamin

b6 analogs” Int. J. Quantum Chem 2002, **89**, 48.

Salvà, A.; Donoso, J.; Frau, J.; Muñoz, F. “DFT Studies on Schiff Base Formation of Vitamin B6 Analogues” J. Phys. Chem. A. 2003, 107, 9409.

Salvà, A.; Donoso, J.; Frau, J.; Muñoz, F. “DFT studies on transimination of vitamin b6 analogues through geminal diamine formation” J. Phys. Chem. B 2004, 108, 11709.