



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA ANALÍTICA Y QUÍMICA  
FÍSICA

# Estudio de reacciones químicas de relevancia biológica involucradas en el transporte, almacenamiento y generación de óxido nítrico

Tesis presentada para optar por el título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Inorgánica  
Analítica y Química Física

Autora: **Laura L. Perissinotti**

Directores de Tesis: **Darío A. Estrin**  
**Fabio Doctorovich**

Consejero de Estudios: **Roberto Etchenique**

Lugar de trabajo: Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. INQUIMAE- CONICET.

**Buenos Aires, 2007**

---

Con el deseo terrible de verte reflejada,  
en la tierra fresca o en el cielo,  
recorres los campos a tropezones y  
tienes la fragilidad de una mariposa.  
Te la pasas mirando, jugando o saltando;  
y no tienes noción del tiempo ni de las horas.  
¡Pero si de la vida abundante que buscas!  
¡Pero si de la angustia que te está quemando!  
y quisieras detenerte, respirar un instante.  
Mirar tranquila, sabia, como lo hacen los árboles,  
tener algo tuyo encerrado en las manos para  
¡darle calor! o llenarlo de besos.  
Mover si fuera posible todos los músculos  
y abrir los ojos hasta el infinito.  
Tener la mirada suplicante de una niña a la  
que todos se acercan para mimarla, y sentir  
que tu imagen queda en el recuerdo de los  
que te aman.

Cecilia L. Minervini

---

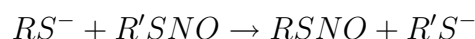
a mamá y papá,  
a mi Pablo,



# Resumen

En esta tesis se presenta el estudio de reacciones químicas relacionadas con los mecanismos de generación, almacenamiento y transporte de óxido nítrico (NO), mecanismos que son de gran importancia en los seres vivos dada la cantidad de funciones asociadas al NO. Los problemas estudiados en esta tesis fueron abordados tanto en forma experimental como teórica, en este último caso mediante el uso de métodos de estructura electrónica y metodologías híbridas cuántico - clásicas.

En lo que se refiere al transporte de esta molécula, la reacción estudiada fue la reacción de transnitrosación:



Esta reacción ha sido propuesta como mecanismo de transporte de NO así como de regulación de la función proteica. En particular se estudió la reacción entre *S*-nitroso-L-cisteína etil ester y L-cisteína etil ester en medio acuoso y en medio orgánico (metanol).

En cuanto al almacenamiento, se cree que los S-nitrosotioles (RSNOs) desempeñan un rol fundamental y por esta razón el estudio de las propiedades de los mismos es de suma relevancia. En este trabajo se muestra una forma interesante de estabilizarlos mediante la unión de los mismos a un centro metálico (Ir(III)). De este modo surge una nueva familia de complejos que contienen *S*-nitrosotioles coordinados. La estabilización originada como consecuencia de la coordinación al centro metálico hace posible la caracterización y el estudio de propiedades de estos compuestos.

Por último, en cuanto a lo que se refiere a generación de NO en ausencia de oxígeno, se realizó un estudio teórico de los posibles mecanismos de generación de dicha molécula en los que se encuentran involucrados la desoxi-Hb y el nitrito.

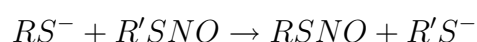
**Palabras Claves:** *óxido nítrico, tioles, S-nitrosotioles, pentacloronitrosiliridato(III), transnitrosación, nitrito, desoxi-Hemoglobina, DFT, métodos ab-initio, SIESTA, QM-MM, Amber.*



# Abstract

The main goal of this thesis has been the study of relevant chemical reactions which are involved in the mechanism of generation, storage and transport of nitric oxide (NO). Given the wide variety and numerous functions associated to NO in living systems, the study of these mechanisms is extremely important. The study of the above mentioned mechanisms has been carried out experimentally and theoretically using different kind of methodologies.

Concerning NO transport and delivery, the transnitrosation reaction has been studied:



This reaction has been proposed as a mechanism of NO transport, and also as an important mechanism for the regulation of protein function. In this work we describe the study of the transnitrosation reaction between *S*-nitroso-L-cystein ethyl ester and L-cystein ethyl ester in aqueous and organic (methanol) media.

Regarding NO storage, it has been suggested that *S*-nitrosothiols play a key role, and for that reason the study of *S*-nitrosothiols properties is specially important. An interesting way of stabilizing these compounds through coordination to a metal center (Ir(III)) is described in this work. The stability gained, allowed the experimental characterization of these compounds and the elucidation of structural aspects and properties.

Finally, dealing with mechanisms of generation of NO in the absence of oxygen, a theoretical study on the possible mechanisms involving nitrite and deoxy-hemoglobin has been performed.

**keywords:** *nitric oxide, thiols, S-nitrosothiols, pentachloronitrosiliciridate(III), transnitrosation, nitrite, deoxy-Hemoglobin, DFT, ab-initio methods, SIESTA, QM-MM, Amber.*



# Índice general

<b>I</b>	<b>Introducción General</b>	<b>1</b>
<b>I.1.</b>	<b>Introducción y objetivos del trabajo</b>	<b>3</b>
I.1.1.	Biosíntesis del NO y mecanismos de generación alternativos. . . . .	4
I.1.2.	Óxido Nítrico (NO): la riqueza química de una simple molécula. . . . .	6
I.1.3.	<i>S</i> -nitrosotioles: transporte y almacenamiento de NO. . . . .	9
I.1.4.	Objetivos del trabajo. . . . .	10
	<b>Bibliografía</b>	<b>13</b>
<b>II</b>	<b>Metodología General</b>	<b>17</b>
<b>II.1.</b>	<b>Parte Experimental.</b>	<b>19</b>
II.1.1.	Aspectos generales . . . . .	19
II.1.2.	Instrumentación . . . . .	20
<b>II.2.</b>	<b>Simulación computacional</b>	<b>23</b>
II.2.1.	Modelos basados en Mecánica Cuántica. . . . .	24
II.2.2.	Modelos clásicos. . . . .	35
II.2.3.	Metodologías híbridas. . . . .	37
II.2.4.	Caracterización de la Superficie de Energía Potencial (SEP). . . . .	38
II.2.5.	Modelado del solvente. . . . .	41
II.2.6.	Programas utilizados . . . . .	42
	<b>Bibliografía</b>	<b>45</b>
<b>III</b>	<b><i>S</i>-Nitrosotioles y reacción de transnitrosación como mecanismo de transporte y almacenamiento de NO</b>	<b>49</b>
<b>III.1.</b>	<b><i>S</i>-nitrosotioles : antecedentes, propiedades generales y reactividad</b>	<b>51</b>



III.1.1. Propiedades . . . . .	51
III.1.2. Síntesis, aspectos generales . . . . .	55
III.1.3. Reactividad . . . . .	57
<b>III.2. <i>S</i>-nitroso-L-cisteína etil ester (<i>SNO</i>-CEE)</b>	<b>61</b>
III.2.1. Preparación de <i>SNO</i> -CEE . . . . .	61
III.2.2. Caracterización espectroscópica de <i>SNO</i> -CEE . . . . .	62
<b>III.3. Reacción de Transnitrosación - El Mecanismo</b>	<b>71</b>
III.3.1. Estudio Computacional . . . . .	72
III.3.2. Medida experimental de la constante de velocidad y la energía de activación.	81
<b>III.4. Detección y caracterización teórico-experimental del intermediario de reacción.</b>	<b>87</b>
III.4.1. Evidencia experimental previa en fase gaseosa . . . . .	87
III.4.2. Detección del intermediario: condiciones experimentales y técnicas de RMN.	88
III.4.3. Detección por <sup>15</sup> N RMN - Asignación asistida por cálculos . . . . .	96
III.4.4. Efectos causados por la presencia de oxígeno. . . . .	97
<b>III.5. Conclusiones y preguntas abiertas</b>	<b>105</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>107</b>
<b>IV Estabilización de <i>S</i>-nitrosotioles por coordinación a [IrCl<sub>5</sub>]<sup>2-</sup></b>	<b>111</b>
<b>IV.1. Síntesis, aislamiento, y propiedades</b>	<b>113</b>
IV.1.1. <i>S</i> -nitrosotioles coordinados a complejos metálicos: antecedentes . . . . .	114
IV.1.2. Reacción de K[IrCl <sub>5</sub> NO] con tioles: aspectos generales . . . . .	115
IV.1.3. RSNOs con grupos aromáticos: complejos tipo a y tipo b . . . . .	118
IV.1.4. RSNOs de relevancia biológica . . . . .	120
IV.1.5. RSNOs del ácido mercaptosuccínico y derivados de éste . . . . .	122
<b>IV.2. Estructura, caracterización espectroscópica y propiedades.</b>	<b>125</b>
IV.2.1. Estructura: difracción de rayos X . . . . .	125
IV.2.2. Espectroscopía UV-Visible . . . . .	130
IV.2.3. Espectroscopía FTIR . . . . .	136
IV.2.4. Espectroscopía <sup>1</sup> H RMN . . . . .	140
IV.2.5. Espectrometría de Masa . . . . .	141

---

<b>IV.3. Estabilidad térmica: estudio teórico - experimental</b>	<b>147</b>
IV.3.1. Estabilidad en fase sólida . . . . .	147
IV.3.2. Estimación de vidas medias en agua . . . . .	147
IV.3.3. Evaluación de posibles mecanismos de descomposición : fase gaseosa y solución. . . . .	157
<b>IV.4. Conclusiones y preguntas abiertas</b>	<b>159</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>163</b>
<b>V La reacción entre la desoxi-hemoglobina humana (desoxi-Hb) y nitrito para generar óxido nítrico (NO) en ausencia de oxígeno: estudio teórico de los posibles mecanismos de reacción</b>	<b>167</b>
<b>V.1. Antecedentes sobre mecanismos de generación de NO</b>	<b>169</b>
V.1.1. desoxi-Hb y nitrito . . . . .	170
V.1.2. Actividad nitrito reductasa (NIR) : comparación con NIRs de bacterias . .	171
V.1.3. Posibles mecanismos propuestos . . . . .	173
V.1.4. Datos experimentales . . . . .	176
<b>V.2. Nitro vs Nitrito: Cálculos de estructura electrónica en sistemas modelo</b>	<b>179</b>
V.2.1. Coordinación del ligando por N, por O y posibles isómeros . . . . .	179
V.2.2. Coordinación de ácido nitroso . . . . .	181
V.2.3. "Nitro" versus "Nitrito" . . . . .	182
<b>V.3. El ligando en el sitio activo: dinámica molecular clásica</b>	<b>185</b>
V.3.1. Subunidad $\alpha$ . . . . .	186
V.3.2. Subunidad $\beta$ . . . . .	187
V.3.3. Aspectos estructurales de la unión del ligando . . . . .	189
<b>V.4. La reacción: Cálculos híbridos</b>	<b>191</b>
V.4.1. Optimizaciones en el sitio activo . . . . .	192
V.4.2. Perfiles de energía . . . . .	194
<b>V.5. Conclusiones y preguntas abiertas</b>	<b>199</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>205</b>

<b>VI Conclusiones Generales</b>	<b>211</b>
Publicaciones Científicas	219
Agradecimientos	221

# I

## Introducción General



# I.1

## Introducción y objetivos del trabajo

El óxido nítrico (NO), fue por primera vez estudiado en 1772 por Joseph Priestley (Experiments and observations on different kinds of airs, 1774-1777) quien llamó a esta molécula como "nitrous air" o "aire nitroso", la describió y definió como un gas incoloro y tóxico. Esta definición continuó vigente hasta su redescubrimiento en 1987 como "molécula bioactiva" [1, 2, 3].



Figura I.1.1: Portada de la Revista Science. Vol.258, Nro. 5090, 1992.

de muchos como "La molécula del año", denominación que le fue dada por la revista Science de dicho año. Más aún, la importancia de esta molécula se materializó como primerísima plana en las noticias del año 1998 cuando Louis J. Ignaro, Robert F. Furchgott y Ferid Murad fueron condecorados con el premio Nobel en medicina y fisiología. El honor de semejante reconocimiento tuvo su fundamento en el descubrimiento del NO como molécula mensajera:

Desde entonces fueron gradualmente surgiendo novedosas funciones asociadas a esta molécula, entre ellas: regulación de la presión sanguínea, mediación en el exterminio de células tumorales por macrófagos, neurotransmisión, inhibición plaquetaria, erección peneana, etc. En el lapso de tiempo que correspondió a los años 1980-1990 esta molécula capturó la atención de muchos investigadores, hecho que condujo al estudio de diferentes aspectos relacionados con ella, los mismos encarados desde diferentes áreas: medicina, bioquímica, biología molecular, química, fisiología, biología celular, farmacología y toxicología.

En 1992[4, 5], esta molécula adquirió la fama suficiente como para ser distinguida por consenso de muchos como "La molécula del año", denominación que le fue dada por la revista Science de dicho año. Más aún, la importancia de esta molécula se materializó como primerísima plana en las noticias del año 1998 cuando Louis J. Ignaro, Robert F. Furchgott y Ferid Murad fueron condecorados con el premio Nobel en medicina y fisiología. El honor de semejante reconocimiento tuvo su fundamento en el descubrimiento del NO como molécula mensajera:

"un gas producido en forma endógena que atraviesa membranas y regula la función celular". Sus propiedades químicas hacen de esta molécula un mensajero muy versátil que ejerce sus funciones por medio de interacciones con distintos blancos celulares desplegando una vasta química.

Actualmente, en el año 2007, podemos estimar en más de 100000<sup>1</sup> las publicaciones científicas que estudian diversidad de aspectos de la vida de esta molécula y su aparente sinfín de roles biológicos y no biológicos, con mayor o menor protagonismo de la misma.

### I.1.1. Biosíntesis del NO y mecanismos de generación alternativos.

El NO puede ser biosintetizado de varias formas, por ejemplo, las plantas utilizan una estrategia no enzimática que consiste en la reacción entre el nitrito y carotenoides u otros metabolitos vegetales [6]. El camino enzimático involucra la óxido nítrico sintasa (NOS) y la reducción de nitrito por nitrito reductasas (NIRs). Las NIRs se hallan presentes en bacterias y organismos animales. En bacterias, junto con otras enzimas, la NIR es una pieza fundamental en el ciclo del nitrógeno; en animales constituye un camino para la síntesis de NO alternativo a la NOS. El método de síntesis de NO más comúnmente utilizado por organismos animales involucra a la familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintasas (NOSs). Las NOSs son miembros de una super familia de enzimas llamadas monooxigenasas, las que contienen al grupo hemo[7]. La NOS cataliza la conversión de L-arginina en L-citrulina y la concomitante liberación de NO. Esta reacción ocurre en presencia de oxígeno. El mecanismo a través del cual ocurre el proceso es muy complejo y aún no se ha elucidado completamente [7].

En 1997, por primera vez Reutov y colaboradores [8], concluyen que la NOS y la NIR son componentes fundamentales en lo que denominaron "*El ciclo de óxido nítrico*" en organismos animales (Figura I.1.2). De esta forma, ante un déficit de oxígeno, por ejemplo una hipoxia funcional asociada a un proceso patológico o un consumo acelerado de oxígeno, la NOS (1) cesaría en su función y se activaría el mecanismo de síntesis de NO por medio de la NIR (3).

Por otro lado, la actividad nitrito reductasa es fundamental pero no sólo para el ciclo mostrado en la Figura I.1.2, sino que es además una pieza clave en el ciclo del nitrógeno efectuado por bacterias. En la Figura I.1.3, se muestra en qué parte del ciclo del nitrógeno desempeña su función la NIR.

En la siguiente tabla (Tabla I.1.1), se muestran algunos potenciales de reducción de interés a la hora de estudiar estas reacciones [9]. Un punto importante a notar al observar los valores de la tabla, es que los potenciales de reducción para todas las especies de nitrógeno

---

<sup>1</sup>Número de publicaciones que surgen como resultado de la búsqueda "nitric oxide" realizada con *Scopus*.

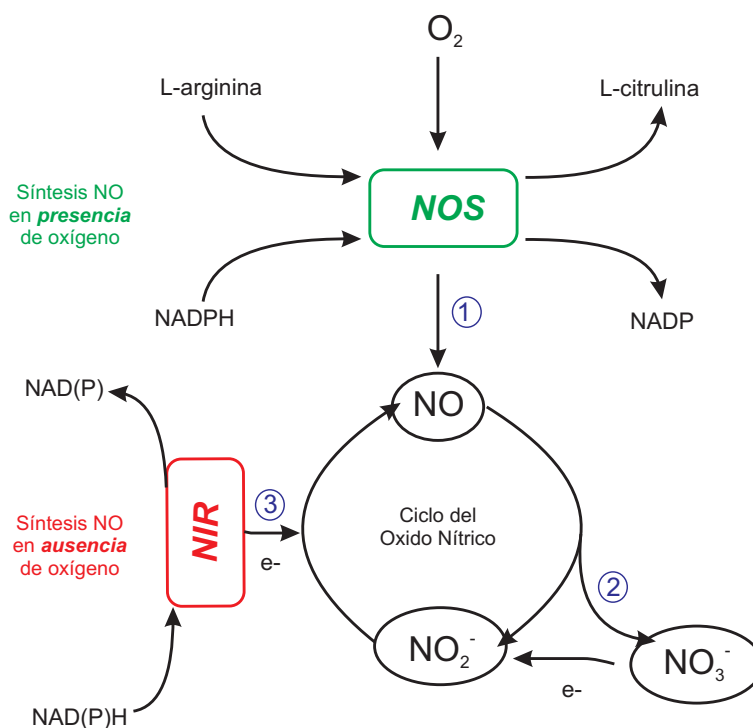


Figura I.1.2: Ciclo del óxido nítrico.

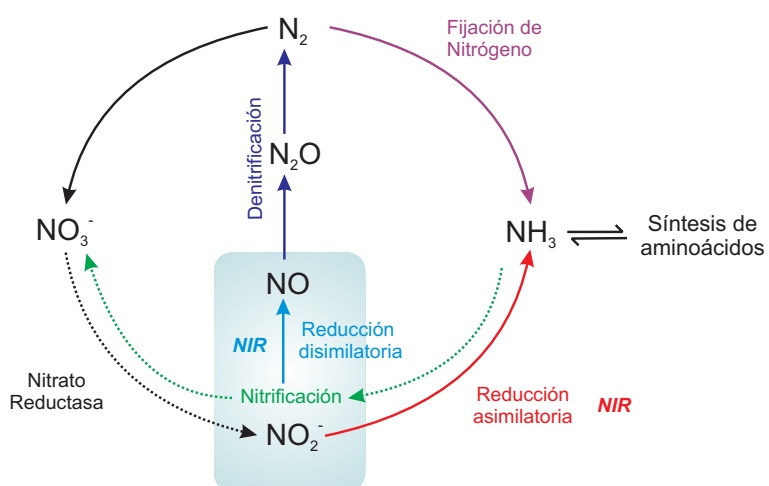


Figura I.1.3: Ciclo del nitrógeno efectuado por bacterias.



Tabla I.1.1: Potenciales de reducción estándar relevantes a pH=7.

Reacción	$E^{\circ}$ (V)
$\text{NO}_3^- + 2 e^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NO}_2^- + 2\text{OH}^-$	+0.42
$2\text{NO}_2^- + 4e^- + 3 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{N}_2\text{O} + 6\text{OH}^-$	+0.77
$\text{NO}_2^- + e^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NO} + 2\text{OH}^-$	+0.37
$2\text{NO} + 2e^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{N}_2\text{O} + \text{OH}^-$	+1.18
$\text{N}_2\text{O} + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$	+1.77
dehidroascorbato + $2e^- + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons$ ascorbato	+0.06
fumarato + $2e^- + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons$ succinato	+0.03
$\text{P-Fe(II)-NO}^+ + e^- \rightleftharpoons \text{P-Fe(II)-NO}^\bullet$	+0.39 a -0.02
$\text{P-Fe(II)-NO}^\bullet + e^- \rightleftharpoons \text{P-Fe(II)-NO}^-$	-0.86

P-(Fe): grupo hemo

listadas son positivos. De esto se desprende que, la reducción del nitrato, nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso y nitrosilos coordinados a grupos hemo (P-Fe(II)-NO<sup>+</sup>) es termodinámicamente factible frente a reductores biológicos relevantes como el ascorbato y el succinato. En el caso de bacterias, por ejemplo, este hecho provee la fuerza impulsora necesaria como para activar la maquinaria de transporte electrónico acoplada a la fosforilación oxidativa. Por otro lado, contrariamente a lo observado para el NO libre, la reducción del NO coordinado a grupos hemos es termodinámicamente más desfavorable.

## I.1.2. Óxido Nítrico (NO): la riqueza química de una simple molécula.

En gran medida la riqueza reactiva de esta molécula se debe a la posibilidad de adoptar distintos estados redox, entre ellos se enumeran los siguientes:

- NO<sup>+</sup> (nitrosonio o nitrosilo), NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrito)
- NO<sup>•</sup> (óxido nítrico)
- NO<sup>-</sup>, HNO (nitroxilo)

Cada una de estas especies, NO<sup>+ / • / -</sup>, presenta propiedades y características distintivas. Como se puede observar en la Tabla I.1.2 [5], a medida que aumenta el estado de oxidación del nitrógeno, aumenta la frecuencia de estiramiento del enlace en el IR y el enlace N-O se acorta. En lo referido a su reactividad, a mayor estado de oxidación de nitrógeno, mayor carácter electrofílico y por lo tanto es más susceptible al ataque por nucleófilos.

Tabla I.1.2: Propiedades de las especies relacionadas al NO\*.

Molécula	Nro. de Oxidación del nitrógeno	Longitud de enlace Å	$\nu_{NO}(\text{cm}^{-1})$
Nitrosonio	3+	0.95	2300
Oxido nítrico	2+	1.15	1840
Nitroxilo	1+	1.26	1290

\* [5]

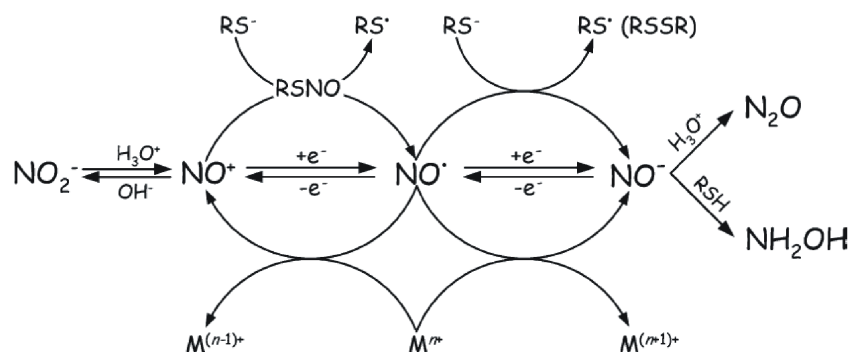
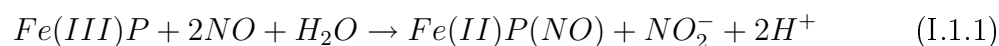


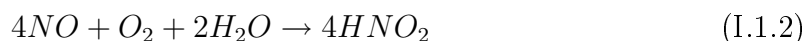
Figura I.1.4: Interconversión de las diferentes formas redox del NO por reacción con oxidantes y reductores biológicamente relevantes.

Reacciones redox del óxido nítrico con *metaloproteínas*, *complejos metálicos*, *tioles*, *óxigeno* conducen a la formación de las especies  $\text{NO}^-$  y  $\text{NO}^+$  (Figura I.1.4), este último en solución acuosa se encuentra mayormente como nitrito. Recordemos que el nitrito desempeña un rol importante en la síntesis de NO en condiciones de anoxia y además en medio ácido es responsable de la nitrosación de tioles y aminas. Veamos dos reacciones biológicamente relevantes que conducen a la formación de nitrito:

1. Nitrosilación reductiva [10] :



2. Autoxidación de NO en solución acuosa [11] :



La transformación del NO en nitrito es clave y sería una forma de almacenar potencialmente NO y de evitar la inactivación del mismo por reacción con otras moléculas [5][12, 13]. Por ejemplo, una de las vías principales de consumo del NO está dada por su reacción con la oxi-mioglobina y la oxi-hemoglobina para originar  $\text{NO}_3^-$  [14]. Por otro lado, en circunstancias en las que está presente el anión superóxido, la reacción del NO con éste es extremadamente

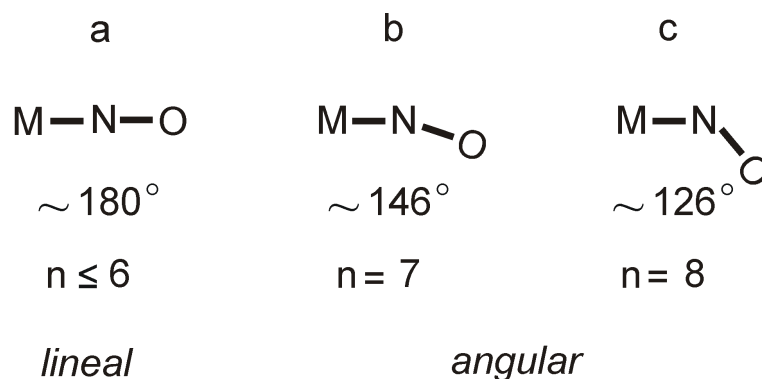


Figura I.1.5: Dependencia del ángulo MNO con la configuración electrónica.

rápida (mucho más rápida que con el oxígeno) y origina como resultado la formación de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), sumamente tóxico [15, 16]. Sin embargo, es importante agregar que los tioles por medio de su reacción con el NO, por ejemplo, dan origen a sus respectivos radicales (Figura I.1.4), los cuales son los principales atrapantes del peroxinitrito dando como resultado la formación de S-nitrosotioles (RSNOs) y disulfuros [17].

## Complejos metálicos

Las propiedades del enlace M-NO pueden ser comprendidas a partir de dos componentes de su estructura electrónica:

- Donación de densidad electrónica desde un orbital del NO de tipo  $\sigma$  al metal.
- Donación o retrodonación de densidad electrónica desde un orbital  $d$  ocupado del metal a un orbital  $\pi^*$  del ligando NO.

Los complejos de nitrosilo son clasificados como especies  $\{M(NO)_x\}^n$  donde  $n$  puede definirse como (i) el número total de electrones asociados con los orbitales  $d$  del metal y/o los  $\pi^*(NO)$  o (ii) el número de electrones  $d$  del metal si el nitrosilo se considera coordinado como  $NO^+$  (notación introducida por Enemark y Feltham) [18]. La mayoría de los complejos mononitrosilados  $\{M(NO)\}^n$  son hexacoordinados y poseen  $n=0-6$ , con electrones ocupando los orbitales  $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$ ,  $d_{yz}$  (con carácter ligante o no ligante). Como resultado de esta ocupación de orbitales se espera que el ángulo correspondiente a la unidad MNO sea esencialmente lineal. Si se agregan electrones ( $n \geq 7$ ), éstos ocuparán orbitales tipo  $\pi$  antiligantes que involucran a los átomos M, N, O. Como consecuencia, el grupo NO se torcerá con el fin de aliviar la tensión. (Figura I.1.5) Los nitrosilos de tipo **a** y **b** son susceptibles al ataque por nucleófilos mientras que existen escasos ejemplos de compuestos con las características del tercero, y la reactividad de éstos complejos aún no se ha elucidado [13, 19].

## Tioles

El NO es una molécula radical muy reactiva, su velocidad de difusión en medios biológicos se estima en  $50\mu\text{m/s}$  y su tiempo de vida media en  $10^{-3}$  s. Estos valores evidencian que para ejercer sus funciones como segundo mensajero de manera eficiente éste debe unirse a alguna molécula que preserve su función protegiéndolo del ataque de otras moléculas, ser trasladado hasta el lugar donde ejercerá su función y ser liberado. Entre estas moléculas se encuentran los tioles, los mismos reaccionan con la forma oxidada del NO formando los *S*-nitrosotioles (RSNOs) (Figura I.1.4). La reacción de los tioles con las otras formas redox,  $\text{NO}^\bullet$  y  $\text{NO}^-$ , origina formación de productos como disulfuros y  $\text{NH}_2\text{OH}$  (Figura I.1.4). Los RSNOs se han propuesto como moléculas almacenadoras y transportadoras del NO. El tiol más abundante a nivel celular es el glutatión (tripéptido: cisteína, glicina y ácido glutámico), éste es el responsable de mantener el potencial redox celular. Este tiol protege a los componentes de la célula de los daños inducidos por radicales, interviene en procesos regulatorios y de señalización celular [20, 21].

### I.1.3. *S*-nitrosotioles: transporte y almacenamiento de NO.

Como se ha mencionado previamente, tioles endógenos pequeños como la cisteína y el glutatión, a través de la formación de RSNOs, constituyen un medio de preservación de las funciones asociadas al NO, transporte y almacenamiento de esta molécula. Los RSNOs están involucrados de esta forma en funciones de biorregulación y han sido detectados en el fluido sanguíneo [24]. Trabajos previamente realizados sobre aspectos fisiológicos de la química de los RSNOs indican lo siguiente:

- Pueden liberar NO en presencia de Cu(I), ascorbato o tioles.
- Suministran los iones  $\text{NO}^+$  y  $\text{NO}^-$ .
- Efectúan reacciones de transnitrosación donde el  $\text{NO}^+$  es transferido de un tiol al otro. Una reacción de este tipo estaría involucrada en modificaciones de las proteínas por nitrosación de alguna de sus cisteínas, lo que constituye un mecanismo de regulación de la función de la misma.

Los RSNOs fueron por primera vez sintetizados en 1909 por Tasker y Jones [22], en esa oportunidad observaron que si se hacía reaccionar al benciltiol con cloruro de nitrosilo se obtenía un compuesto muy inestable color rojo, el *S*-nitroso-benciltiol. Debido a su gran inestabilidad, estos compuestos no llamaron mucho la atención y poco se investigó sobre

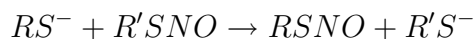
ellos hasta que fuera descubierto su rol biológico [23, 24]. Su poca estabilidad es responsable de que aún actualmente haya pocos RSNOs caracterizados estructuralmente. Hasta la fecha se cuentan seis estructuras cristalinas, éstas corresponden a los siguientes RSNOs: *S*-nitroso-Trifenilmetiltiol ( $\text{Ph}_3\text{CSNO}$ ) [25], *S*-nitroso-L-cisteína etilester (SNO-CEE)[26], *S*-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) [27], *S*-nitroso-triarilmetiltiol (TRM-SNO) [28], *S*-nitroso-captopriltiol [29] y *S*-nitrososilhemoglobina [30].

Los siguientes RSNOs: *S*-nitroso-L cisteína (CysNO), *S*-nitroso-glutati6n (GSNO) y *S*-nitroso-alb6mina (BSNO), han sido detectados en sangre mientras que por ejemplo la *S*-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) es un RSNO sint6tico muy difundido y ampliamente utilizado en experimentos biol6gicos.

#### I.1.4. Objetivos del trabajo.

El objetivo general de este trabajo es estudiar los mecanismos de transporte, almacenamiento y generaci6n de NO. En lo que a esto concierne, m6s espec6ficamente nos interes6 estudiar:

- El rol de los *S*-nitrosotioles en el transporte del NO por medio de la conocida reacci6n de transnitrosaci6n.



- Las propiedades de los *S*-nitrosotioles como mol6culas almacenadoras de NO y la obtenci6n de *S*-nitrosotioles estabilizados por coordinaci6n a un metal de transici6n.
- Mecanismos alternativos de generaci6n de NO en ausencia de ox6geno, situaci6n en la cual la NOS no ser6 operativa.

Este estudio se llev6 a cabo utilizando dos tipos de herramientas, una de ellas basada en simulaciones computacionales, y la otra en diversas t6cnicas experimentales. Los detalles metodol6gicos empleados en ambos tipos de herramientas son presentados en la parte de metodolog6a general (II). Luego se presentan los resultados obtenidos (III, IV y V), cada una de las partes o secciones contiene una breve introducci6n, los resultados y conclusiones. Cada parte pretende abordar los 6tems anteriormente mencionados:

**III. *S*-Nitrosotioles y reacci6n de transnitrosaci6n como mecanismo de transporte y almacenamiento de NO.** Se presenta el estudio de propiedades f6sico-qu6micas de los *S*-nitrosotioles libres. Caracterizaci6n de la *S*-nitroso-L-ciste6na etil ester. Se muestra

el estudio teórico-experimental de la reacción de transnitrosación para un modelo simple y para la L-cisteína etil ester.

*IV. Estabilización de S-nitrosotioles por coordinación a  $[\text{IrCl}_5]^{-2}$ .* Debido a su poca estabilidad muy poco se sabe estructuralmente sobre éstas moléculas. Al ser coordinadas a  $[\text{IrCl}_5]^{-2}$  su estabilidad se incrementa notoriamente, este hecho nos otorga la posibilidad de caracterizarlas estructuralmente y estudiar los efectos que afectan su estabilidad.

*V. La reacción entre la desoxi-Hemoglobina Humana (desoxi-Hb) y nitrito para generar óxido nítrico (NO) en ausencia de oxígeno: estudio teórico de los posibles mecanismos de reacción.* Se presenta el estudio de esta reacción como contraparte anaeróbica de la NOS.

Por último se presentan las conclusiones generales y perspectivas futuras del trabajo (VI).



# Bibliografía

- [1] M. W. Radomski, R. M. J. Palmer, and S. Moncada. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric-oxide and prostacyclin in platelets. *British Journal of Pharmacology*, 92:181–187, 1987.
- [2] L. J. Ignarro, R. E. Byrns, G. M. Buga, and K. S. Wood. Endothelium-derived relaxing factor (edrf) released from artery and vein appears to be nitric-oxide (no) or a closely related radical species. *Federation Proceedings*, 46:644–644, 1987.
- [3] L. J. Ignarro, R. E. Byrns, G. M. Buga, and K. S. Wood. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary-artery and vein possesses pharmacological and chemical-properties identical to those of nitric-oxide radical. *Circulation Research*, 61:866–879, 1987.
- [4] E. Culotta and D. E. Koshland. No news is good-news. *Science*, 258:1862–1865, 1992.
- [5] J. S. Stamler, D. J. Singel, and J. Loscalzo. Biochemistry of nitric-oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258:1898–1902, 1992.
- [6] L. A. del Rio, F. J. Corpas, A. M. Leon, J. B. Barroso, A. Carreras, L. M. Sandalio, and J. M. Palma. The nitric oxide synthase activity of plant peroxisomes. *Free Radical Biology and Medicine*, 36:S41–S41, 2004.
- [7] G. M. Rosen, P. Tsai, and S. Pou. Mechanism of free-radical generation by nitric oxide synthase. *Chemical Reviews*, 102:1191–1199, 2002.
- [8] V. P. Reutov and E. G. Sorokina. No-synthase and nitrite-reductase components of nitric oxide cycle. *Biochemistry-Moscow*, 63:874–884, 1998.
- [9] B. A. Averill. Dissimilatory nitrite and nitric oxide reductases. *Chemical Reviews*, 96 (7):2951–2964, 1996.



- 
- [10] B. O. Fernandez, I. M. Lorkovic, and P. C. Ford. Mechanisms of ferriheme reduction by nitric oxide: nitrite and general base catalysis. *Inorganic Chemistry*, 43(17):5393–402, 2004.
- [11] V. G. Kharitonov, A. R. Sundquist, and V. S. Sharma. Kinetics of nitric oxide auto-oxidation in aqueous solution. *Journal of Biological Chemistry*, 269(8):5881–3, 1994.
- [12] P. C. Ford and I. M. Lorkovic. Mechanistic aspects of the reactions of nitric oxide with transition-metal complexes. *Chemical Reviews*, 102:993–1017, 2002.
- [13] P. J. Farmer and F. Sulc. Coordination chemistry of the hno ligand with hemes and synthetic coordination complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99:166–184, 2005.
- [14] S. Herold, T. Matsui, and Y. Watanabe. Peroxynitrite isomerization catalyzed by his64 myoglobin mutants. *Journal of American Chemical Society*, 123(17):4085–6, 2001.
- [15] R. P. Patel, J. McAndrew, H. Sellak, C. R. White, H. J. Jo, B. A. Freeman, and V. M. rley Usmar. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1411:385–400, 1999.
- [16] J. P. Crow. Peroxynitrite scavenging by metalloporphyrins and thiolates. *Free Radical Biology and Medicine*, 28:1487–1494, 2000.
- [17] L. Grossi, P. C. Montevecchi, and S. Strazzari. S-nitrosothiol and disulfide formation through peroxynitrite-promoted oxidation of thiols. *European Journal of Organic Chemistry*, pages 131–135, 2001.
- [18] J. H. Enemark and R. D. Feltham. Principles of structure, bonding, and reactivity for metal nitrosyl complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 13:339–406, 1974.
- [19] F. Roncaroli, M. Videla, L. D. Slep, and J. A. Olabe. New features in the redox coordination chemistry of metal nitrosyls [m-no+; m-no ; m-no- (hno)]. *Coordination Chemistry Reviews*, 251:1903–1930, 2007.
- [20] R. C. Fahey, J. S. Hunt, and G. C. Windham. Cysteine and cystine content of proteins - differences between intracellular and extracellular proteins. *Journal of Molecular Evolution*, 10:155–160, 1977.
- [21] T. P. M. Akerboom, M. Bilzer, and H. Sies. The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused-rat-liver. *Journal of Biological Chemistry*, 257:4248–4252, 1982.

- [22] H. S. Tasker and H. O. Jones. *Journal of Chemical Society*, 95:1910, 1909.
- [23] J. S. Scharfstein, J. F. Keane, J. S. Stamler, M. A. Rudd, J. A. Vita, and J. Loscalzo. Low-molecular-weight thiols facilitate vascular transfer of nitric-oxide from a plasma-protein pool. *Circulation*, 86:756–756, 1992.
- [24] J. S. Stamler, O. Jaraki, J. Osborne, D. I. Simon, J. Keane, J. Vita, D. Singel, C. R. Valeri, and J. Loscalzo. Nitric-oxide circulates in mammalian plasma primarily as an s-nitroso adduct of serum-albumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89:7674–7677, 1992.
- [25] N. Arulsamy, D. S. Bohle, J. A. Butt, G. J. Irvine, P. A. Jordan, and E. Sagan. Interrelationships between conformational dynamics and the redox chemistry of s-nitrosothiols. *Journal of the American Chemical Society*, 121:7115–7123, 1999.
- [26] J. Yi, M. A. Khan, J. Lee, and G. B. Richter-Addo. The solid-state molecular structure of the s-nitroso derivative of l-cysteine ethyl ester hydrochloride. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, 12:261–266, 2005.
- [27] A. P. Dicks and D. L. H. Williams. Generation of nitric oxide from s-nitrosothiols using protein-bound  $\text{Cu}^{2+}$  sources. *Chemistry and Biology*, 3:655–659, 1996.
- [28] K. Goto, Y. Hino, T. Kawashima, M. Kaminaga, E. Yano, G. Yamamoto, N. Takagi, and S. Nagase. Synthesis and crystal structure of a stable s-nitrosothiol bearing a novel steric protection group and of the corresponding s-nitrothiol. *Tetrahedron Letters*, 41: 8479–8483, 2000.
- [29] H. A. Moynihan and S. M. Roberts. Preparation of some novel s-nitroso compounds as potential slow-release - agents of nitric-oxide in-vivo. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry*, pages 797–805, 1994.
- [30] M. D. Bartberger, K. N. Houk, S. C. Powell, J. D. Mannion, K. Y. Lo, J. S. Stamler, and E. J. Toone. Theory, spectroscopy, and crystallographic analysis of s-nitrosothiols: conformational distribution dictates spectroscopic behavior. *Journal of the American Chemical Society*, 122:5889–5890, 2000.



## II

# Metodología General



## II.1

# Parte Experimental.

### II.1.1. Aspectos generales

Todos los compuestos con los que se trabajó, o su gran mayoría, presentaban la peculiaridad de ser muy sensibles al oxígeno, la humedad, la temperatura y la luz. Trabajar con ellos requirió cuidados especiales y el desarrollo y la puesta a punto de diferentes metodologías experimentales de trabajo. También exigió la adquisición y el desarrollo de una manualidad indispensable para lograr la confiabilidad y reproducibilidad necesaria en los resultados.

Para llevar adelante esta química fueron indispensables cierto equipamiento como una caja seca (ver Figura II.1.1), líneas de vacío, gases inertes, materiales tales como tubos y balones de Schlenk, jeringas, septa, siempre en pos de asegurarse que las reacciones se desarrollen en atmósfera inerte.

Debido a la poca estabilidad de muchos de los compuestos con los que se trabajó, no se pudo contar con el almacenamiento de los mismos para el trabajo diario, sino que debieron ser preparados cada vez que se necesitaron.

Otro cuidado de suma importancia en lo que respecta a los solventes utilizados, es la cuidadosa purificación de los mismos. El empleo de solventes recién destilados o almacenados por cortos períodos de tiempo bajo atmósfera inerte fue indispensable.

#### **Purificación de solventes.**

Todos los solventes fueron secados con los desecantes apropiados y posteriormente destilados. Los solventes más frecuentemente utilizados fueron metanol y acetonitrilo. El metanol fue secado con Mg-iodo y purificado por destilación fraccionada. El acetonitrilo se destiló por destilación fraccionada, se reflujo sobre  $\text{CaH}_2$ , y se destiló bajo nitrógeno en el momento de usarse.



Figura II.1.1: Línea de gases y de vacío, caja seca.

## II.1.2. Instrumentación

Entre las técnicas experimentales empleadas para el análisis de las reacciones y caracterización de los reactivos y productos obtenidos, podemos citar las siguientes:

1. Espectroscopía UV-Visible.
2. Espectroscopía FTIR.
3. Difracción de rayos X.
4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
5. Espectrometría de masa.
6. Microanálisis Elemental.

Los espectros IR fueron obtenidos en un espectrómetro Nicolet Avatar 320 FTIR en pastillas de KBr y utilizando celdas para líquido Spectra Tech con ventanas de NaCl y CaF<sub>2</sub>, según fue el solvente utilizado. Los espectros UV-Visible fueron tomados en un espectrómetro Hewlett Packard 8453 con arreglo de diodos empleando una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Los espectros de RMN se adquirieron en un equipo Bruker AMX500, los espectros obtenidos fueron calibrados mediante el agregado de alguna referencia conocida (en general se utilizó CH<sub>3</sub>CN) o utilizando la señal residual del solvente deuterado respectivo [1]. Se realizaron espectros RMN para diferentes núcleos (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N) mono y bidimensionales. Entre las técnicas de RMN utilizadas podemos mencionar:

$^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN,  $^{15}\text{N}$  RMN.

-**DEPT** (*D*istortionless *E*nhancement by *P*olarization *T*ransfer), esta técnica permite distinguir entre distintos tipos de carbonos, cuando el ángulo del pulso es 135 (*DEPT-135*), la fase de los  $-\text{CH}_3$  y  $-\text{CH}$  resulta invertida respecto a los  $\text{CH}_2$ , mientras que los carbonos cuaternarios no son detectados.

-**COSY** (*C*ORrelation *S*pectroscop *Y*), ofrece correlación bidimensional de espectros  $^1\text{H}$  RMN. Es una técnica muy útil para asignar vecinos.

-**HETCOR** (*HET*eronuclear chemical shift *COR*relation), proporciona una correlación de espectros  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN. Muy útil para asignar las señales del protónico a los carbonos correspondientes.

Los espectros de masa para los complejos resultantes de la reacción de los tioles con el  $[\text{IrCl}_5\text{NO}]\text{K}$  fueron adquiridos en un Micromass Q-Tof acoplado a fuentes de iones ESI y APCI (Laboratorio Thompson de Espectrometría de Masa a cargo del Prof. Marcos Eberlin). Los gases NO y  $\text{N}_2\text{O}$  generados como consecuencia de la reacción de transnitrosación, fueron detectados mediante el uso del espectrómetro de masa cuadrupolar Extrel Emba II (Laboratorio del Doctor Valentín Amorebieta, Universidad de Mar del Plata). Los análisis de estructuras cristalinas por rayos X fueron determinados por los Doctores Gregory Leitun y Linda Shimon del Departamento de Servicios Químicos del Instituto de Ciencias Weizmann (Rehovot, Israel) en un difractor Nonius KappaCCD,  $\text{MoK}\alpha$  ( $\lambda=0.7107\text{\AA}$ ) con monocromador de grafito. Los datos fueron procesados empleando Denzo-Scalepack. Las estructuras se resolvieron por métodos directos con SHELXS-97. Un posterior refinamiento de la matriz se realizó por cuadrados mínimos basado en  $F^2$  con SHELXS-97.

El microanálisis elemental fue realizado en un equipo Carlo Erba 1108. Para el análisis se produjo la combustión de la muestra en un tubo reactor donde fue transformada a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  y  $\text{SO}_2$ . La separación de los gases se realizó por cromatografía gaseosa con columna de paropac de longitud variable y para su detección se utilizó un detector de conductividad térmica. El método requiere una calibración previa con sustancias patrón de composición conocida. Sustancia patrón utilizada para la determinación de C, H, N, y S: Sulfanilamida. Sustancia patrón utilizada para el ensayo control de C, H, y N : Acetanilida.

Parte de los resultados obtenidos se obtuvieron como fruto de colaboraciones con los siguientes grupos:

- Grupo del Profesor D. Milstein, Department of Organic Chemistry, Weizmann Institute of Science (RX) (Rehovot, Israel).
- Grupo del Profesor Eberlin, Thompson Mass Spectrometry Laboratory, Instituto de Química, UNICAMP (ESI-MS) (Campinas, Brasil).



La descripción detallada y específica de la metodología de trabajo se presenta en las partes y secciones correspondientes.

## II.2

# Simulación computacional

Durante las últimas décadas, el área de simulación computacional en química ha recibido un impulso tal, que se ha convertido en una herramienta irreemplazable. La combinación de elementos matemáticos y computacionales con las leyes fundamentales de la física permite abordar el estudio de procesos de relevancia química desde un punto de vista microscópico.

La selección del nivel de teoría adecuado para estudiar un determinado problema, y la capacidad de evaluar la calidad de los resultados obtenidos son dos de las tareas más complicadas dentro del trabajo de un químico computacional. Antes de llevar a cabo cualquier estudio, se deben tener presentes tanto las posibilidades como las limitaciones de los modelos y métodos a utilizar, ya que una aplicación inapropiada de los mismos puede conducir a resultados carentes de sentido. Sin embargo, cuando se emplea adecuadamente, constituye una herramienta muy valiosa en el análisis e interpretación de resultados experimentales, e incluso en la determinación de propiedades moleculares de las que no se dispone de valores empíricos.

Según el problema seleccionado y el nivel de descripción que se requiera podemos mencionar distintos tipos de modelos:

- *Modelos basados en la química cuántica.* A partir de las leyes de la mecánica cuántica, permiten determinar la estructura de las moléculas, calcular propiedades espectroscópicas, estudiar procesos reactivos y comprender el mecanismo de reacciones químicas, caracterizar productos, etc. Pueden ser utilizados como herramienta predictiva, por ejemplo permiten "experimentar" con una sustancia, conocer muchas de sus propiedades sin necesidad de sintetizarla, de modo que se puede orientar a un investigador experimental sobre qué molécula va a tener las características que él desea. De este modo, sólo se sintetiza y analiza aquella que tenga las propiedades que más le interesen, ahorrándole tiempo y dinero.
- *Modelos clásicos.* El modelado de fenómenos que no involucran formación o ruptura de

enlaces químicos, es decir aquellos procesos donde la estructura electrónica no cambia considerablemente, pueden ser descritos por modelos más simples que captan adecuadamente la esencia del problema de estudio haciendo innecesario el uso de modelos más complejos. En estos modelos las moléculas (o átomos) pueden ser representadas por masas puntuales, generalmente provistas de carga, que interactúan a través de un campo de fuerzas clásico.

- *Modelos híbridos cuántico-clásicos.* La base de estos modelos reside en combinar cálculos de estructura electrónica con modelos clásicos. Esta combinación, hace posible el estudio de procesos reactivos para sistemas con un elevado número de átomos (imposible de abordar mediante un modelo puramente cuántico). El sistema en estudio, por ejemplo una enzima, se particiona en un subsistema modelado cuánticamente y otro subsistema modelado clásicamente.

A continuación veremos en más detalle cada uno de estos modelos.

### II.2.1. Modelos basados en Mecánica Cuántica.

La mecánica que rige el comportamiento de partículas pequeñas (como los electrones) es la llamada mecánica cuántica, desarrollada a principios del siglo pasado a partir de contribuciones de Bohr, Einstein, Dirac, Planck, Heisenberg y Schrödinger, entre otros [2]. Para describir el estado de un sistema en mecánica cuántica, se postula la existencia de una función de las coordenadas de las partículas y del tiempo,  $\Psi$ , llamada función de onda o función de estado. La función de onda contiene toda la información que es posible conocer acerca del sistema. Dentro de una aproximación no relativista,  $\Psi$  se obtiene de la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo.

$$-\frac{\hbar}{i} \frac{\partial \Psi(r, t)}{\partial t} = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi(r, t) + V(r, t) \Psi(r, t) \quad (\text{II.2.1})$$

Si la función de energía potencial del sistema no depende del tiempo, se puede separar la parte temporal de la espacial, entonces el sistema puede estar en una de sus estados estacionarios de energía constante. Dichos estados estacionarios se obtienen resolviendo la ecuación de Schrödinger no relativista e independiente del tiempo:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi(r) + V(r) \Psi(r) = E \Psi(r) \quad (\text{II.2.2})$$

Si se define el operador Hamiltoniano como:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(r) \quad (\text{II.2.3})$$

ahora la ecuación II.2.2 se puede escribir como  $\hat{H}\Psi(r) = E\Psi(r)$ , que es la forma más comúnmente utilizada. El Hamiltoniano molecular presentado en la ecuación II.2.4 contiene términos de movimiento y atracción/repulsión entre las diferentes partículas. Tal como se puede observar en la ecuación II.2.4, se incluyen términos asociados a la energía cinética de los núcleos y de los electrones, atracción entre núcleos y electrones, repulsión entre electrones y repulsión entre núcleos.

$$\hat{H} = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (\text{II.2.4})$$

La ecuación II.2.4 sólo puede resolverse exactamente para sistemas de dos partículas, por lo resulta necesario el uso de aproximaciones para sistemas mayores. Una aproximación que resulta sumamente útil para reducir la complejidad del cálculo es la llamada aproximación de *Born-Oppenheimer* [2, 3]. Esta aproximación se basa en que la masa de los núcleos es miles de veces mayor que la de los electrones y éstos se mueven, por lo tanto, mucho más lentamente. Así el movimiento electrónico puede describirse en el campo creado por los núcleos fijos. Entonces, el movimiento de los electrones está desacoplado del movimiento de los núcleos y por ende, se puede decir que los electrones se acomodan instantáneamente a una dada disposición de los núcleos. De modo que, es lícito escribir una función de onda electrónica para cada geometría nuclear siendo ahora el último término de la ecuación II.2.4 una constante.

Mediante el uso de la aproximación de Born-Oppenheimer, hemos simplificado la ecuación de Schrödinger, sin embargo la ecuación continúa siendo irresoluble de forma exacta para sistemas de más de un electrón debido al término de repulsión interelectrónica, por lo que deben hacerse aproximaciones adicionales. Existen diversos métodos, caracterizados por el distinto nivel de aproximación matemática. Una de las clasificaciones más empleadas es la que distingue entre métodos semiempíricos, métodos *ab initio* y el método del funcional de la densidad (DFT). A su vez, en función de la estrategia utilizada para resolver las ecuaciones, estos métodos se clasifican como variacionales o perturbacionales. Antes de pasar a los métodos veamos brevemente qué dice el teorema variacional y la teoría de perturbaciones.

**Teorema Variacional [2, 3].** El valor medio de la energía asociada a una función de onda aproximada o de prueba,  $\Phi$ , se puede calcular como:

$$W = \frac{\int \Phi^* \hat{H} \Phi d\tau}{\int \Phi^* \Phi d\tau} = \frac{\langle \Phi | \hat{H} | \Phi \rangle}{\langle \Phi | \Phi \rangle} \quad (\text{II.2.5})$$

El teorema variacional enuncia que si la función de onda de prueba cumple las condiciones

de contorno del problema, se cumple la siguiente desigualdad:

$$W = \frac{\langle \Phi | \hat{H} | \Phi \rangle}{\langle \Phi | \Phi \rangle} \geq E_0 \quad (\text{II.2.6})$$

$E_0$  es la energía correspondiente al estado fundamental. Esta desigualdad resulta extremadamente útil ya que proporciona un criterio para evaluar la calidad de una función de onda de prueba, cuanto menor sea la energía asociada, mejor será la función de prueba. Esto permite proponer como estrategia para encontrar soluciones aproximadas de la ecuación II.2.4, la búsqueda de aquellas funciones que minimicen la energía del sistema.

**Teoría de perturbaciones [2, 3].** La base de esta teoría consiste en separar el problema en una parte resoluble de forma exacta y una parte complicada para la que no existe solución analítica. Se divide el Hamiltoniano electrónico en dos partes, se supone que estos Hamiltonianos no son muy diferentes y por ende, la energía y la función de onda tampoco lo será. Si describimos la perturbación como:

$$\hat{H}' \equiv \hat{H} - \hat{H}^0 \quad (\text{II.2.7})$$

$$\hat{H} \equiv \hat{H}^0 + \lambda \hat{H}' \quad (\text{II.2.8})$$

$$\hat{H} \Psi_n = (\hat{H}^0 + \lambda \hat{H}') \Psi_n = E \Psi_n \quad (\text{II.2.9})$$

donde el subíndice  $n$  se refiere al nivel energético. En este contexto es posible considerar a la función de onda y la energía como funciones del parámetro  $\lambda$ , tal que  $\Psi_n |_{\lambda=0} = \Psi_n^0$  y  $E_n |_{\lambda=0} = E_n^0$ . En este caso se puede expandir como series de Taylor:

$$\Psi_n = \Psi_n |_{\lambda=0} + \frac{\partial \Psi_n}{\partial \lambda} |_{\lambda=0} \lambda + \frac{\partial^2 \Psi_n}{\partial^2 \lambda} |_{\lambda=0} \frac{\lambda^2}{2!} + \dots \quad (\text{II.2.10})$$

$$E_n = E_n |_{\lambda=0} + \frac{\partial E_n}{\partial \lambda} |_{\lambda=0} \lambda + \frac{\partial^2 E_n}{\partial^2 \lambda} |_{\lambda=0} \frac{\lambda^2}{2!} + \dots \quad (\text{II.2.11})$$

Acotando al segundo orden y definiendo la condición de normalización:  $\langle \Psi_n^0 | \Psi_n^0 \rangle = 1$ , queda:

$$E_n \approx E_n^0 + \langle \Psi_n^0 | \hat{H}' | \Psi_n^0 \rangle + \sum_{m \neq n} \frac{\left| \langle \Psi_n^0 | \hat{H}' | \Psi_m^0 \rangle \right|^2}{(E_n^0 - E_m^0)} \quad (\text{II.2.12})$$

El problema se reduce entonces a encontrar los coeficientes de la expansión. Si la perturbación es pequeña, entonces alcanzará con los primeros términos de dicha expansión.

Habiendo presentado estas dos formas de resolver en forma aproximada la ecuación II.2.2, veamos ahora en que consisten los métodos *ab initio* y DFT.

### ***Métodos ab initio.***

El término *ab initio* (o primeros principios) hace referencia a que los cálculos están basados únicamente en las leyes de la mecánica cuántica y no emplean datos experimentales que no sean los valores de las constantes físicas fundamentales. Son métodos que resuelven la ecuación de Schrödinger haciendo uso de una serie de aproximaciones matemáticas rigurosas. Como ya hemos mencionado anteriormente, el término de repulsión interelectrónica es el responsable de que la ecuación II.2.4 no puede resolverse exactamente en sistemas de más de un electrón. La primera aproximación importante se introdujo de la mano de la teoría de **Hartree-Fock (HF)** [2, 3], en la que la función de onda se aproxima a un producto antisimetrizado de funciones monoeléctricas, es decir, se considera el movimiento de cada electrón en forma independiente. Esta aproximación es conocida con el nombre de "*aproximación orbital*".

$$\Phi = \chi_1(r_1)\chi_2(r_2)\dots\chi_N(r_N) \quad (\text{II.2.13})$$

Donde las  $\chi$  son espín-orbitales unielectricos y  $r$  representa las coordenadas espaciales para cada electrón. Este producto posee una propiedad fundamental para cualquier función de onda electrónica, y esto es, que debe ser antisimétrica respecto a la permutación de un par de electrones (*principio de exclusión de Pauli*). Este requerimiento se satisface fácilmente escribiendo el producto como *determinante de Slater*, definido de la siguiente forma:

$$\Phi = \chi_1(r_1)\chi_2(r_2)\dots\chi_N(r_N) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_i(r_1) & \chi_j(r_1) & \cdots & \chi_k(r_1) \\ \chi_i(r_2) & \chi_j(r_2) & \cdots & \chi_k(r_2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \chi_i(r_{1N}) & \chi_j(r_{1N}) & \cdots & \chi_k(r_{1N}) \end{vmatrix} \quad (\text{II.2.14})$$

Así, permutar dos electrones es equivalente a permutar dos columnas, lo que según las propiedades de los determinantes, le cambia el signo, satisfaciendo así el principio de Pauli.

Ahora bien, en esta aproximación, usando el Hamiltoniano electrónico y empleando una función de onda del tipo determinante de Slater la expresión para la energía queda:

$$E = \langle \Psi | \hat{H}_{el} | \Psi \rangle = \sum_{i=1}^N H_{ii}^{core} + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N (J_{ij} - K_{ij}) \quad (\text{II.2.15})$$

En esta expresión,  $H_{ii}^{core}$  es un Hamiltoniano reducido que depende de las coordenadas de un sólo electrón.  $J_{ij}$  y  $K_{ij}$  son las integrales de Coulomb, e intercambio que dependen de las coordenadas de dos electrones. La primera representa la repulsión electrostática entre los electrones y la segunda es consecuencia del principio de exclusión de Pauli y no encuentra analogía en la física clásica.

$$H_{ii}^{core} \equiv -\frac{1}{2} \langle \chi_i(r_1) | \nabla_1^2 | \chi_i(r_1) \rangle - \left\langle \chi_i(r_1) \left| \sum_A \frac{Z_A}{r_{1A}} \right| \chi_i(r_1) \right\rangle \quad (\text{II.2.16})$$

$$J_{ij} \equiv \langle \chi_i(r_1) \chi_j(r_2) | r_{12}^{-1} | \chi_i(r_1) \chi_j(r_2) \rangle \quad (\text{II.2.17})$$

$$K_{ij} \equiv \langle \chi_i(r_1) \chi_j(r_2) | r_{12}^{-1} | \chi_j(r_1) \chi_i(r_2) \rangle \quad (\text{II.2.18})$$

Luego, mediante el uso del *teorema variacional* se encuentran aquellos orbitales que minimizan la energía en la ecuación II.2.15, y de esta forma se llega a una ecuación de autovalores para los orbitales conocida como ecuación de Hartree-Fock:

$$\hat{F}(r_1) |\chi_i(r_1)\rangle = \sum_{j=1}^N \varepsilon_{ij} |\chi_j(r_1)\rangle \quad (\text{II.2.19})$$

Donde los  $\varepsilon_{ij}$  son los multiplicadores indeterminados de Lagrange asociados a los N espín orbitales  $\chi_i$ , denominados orbitales moleculares de Hartree-Fock, y  $\hat{F}$  es el operador de Fock, el que se define del siguiente modo:

$$\hat{F}(r_1) = \hat{H}_{ii}^{core}(r_1) + \sum_{j=1}^N \left[ \hat{J}_j(r_1) - \hat{K}_j(r_1) \right] \quad (\text{II.2.20})$$

Los operadores  $\hat{H}_{ii}^{core}$ ,  $\hat{J}_j$  y  $\hat{K}_j$  se definen según su acción en un orbital determinado,

$$\hat{H}_{ii}^{core}(r_1) \chi_i(r_1) \equiv -\frac{1}{2} \nabla_1^2 \chi_i(r_1) - \sum_A \frac{Z_A}{r_{1A}} \chi_i(r_1) \quad (\text{II.2.21})$$

$$\hat{J}_{ij}(r_1) \chi_i(r_1) \equiv \left[ \int dr_2 \chi_j^*(r_2) r_{12}^{-1} \chi_j(r_2) \right] \chi_i(r_1) \quad (\text{II.2.22})$$

$$\hat{K}_{ij}(r_1) \chi_i(r_1) \equiv \left[ \int dr_2 \chi_j^*(r_2) r_{12}^{-1} \chi_i(r_2) \right] \chi_j(r_1) \quad (\text{II.2.23})$$

El primero opera sobre las coordenadas de un sólo electrón, en cambio el segundo y tercero, llamados Coulomb e intercambio respectivamente, involucran coordenadas de dos electrones. El operador de Coulomb da la repulsión electrostática efectiva (o promediada) del electrón  $i$  producida por el electrón  $j$ . Es posible diagonalizar la matriz de los multiplicadores de Lagrange mediante una transformación unitaria que no altera el operador de Fock ni el valor del determinante de Slater, el que representa la función de onda total. Luego de aplicada dicha transformación la ecuación de Hartree-Fock queda:

$$\hat{F}(r_1) |\chi_i(r_1)\rangle = \varepsilon_i |\chi_i(r_1)\rangle \quad (\text{II.2.24})$$

Donde las autofunciones  $\chi_i(r_1)$  son los espín-orbitales canónicos, cuyas energías están dadas por los autovalores  $\varepsilon_i$ . Debido a que las soluciones de estas ecuaciones dependen de las funciones que se desea obtener, y éstas a su vez, dependen del operador de Fock, la resolución de las mismas se lleva a cabo utilizando un método iterativo denominado método del campo autoconsistente o SCF. Este método arroja como resultado un conjunto de orbitales atómicos/moleculares y energías orbitales.

El método HF implica la resolución iterativa de un sistema de ecuaciones que entraña gran dificultad, de manera que sólo es factible para átomos y moléculas diatómicas. Para sistemas mayores es necesario introducir una nueva aproximación, propuesta en 1951 por C.C.J.Roothaan y G.G.Hall, que consiste en expresar los orbitales moleculares como una combinación lineal de funciones base.

$$|\chi_i\rangle = \sum_{k=1}^L C_{ki} |\Phi_k\rangle \quad (\text{II.2.25})$$

El problema ahora se reduce a obtener la matriz de coeficientes que minimicen la energía. Reescribiendo la ecuación de Hartree-Fock en esta base finita se obtienen las llamadas *ecuaciones de Roothaan*.

$$\sum_{k=1}^L C_{ki} \left( \langle \Phi_\nu | \hat{F} | \Phi_k \rangle - \varepsilon_i \langle \Phi_\nu | \Phi_k \rangle \right) = 0 \quad (\text{II.2.26})$$

Si definimos la matriz  $F$  cuyos elementos están dados por  $F_{k\nu} \equiv \langle \Phi_\nu | \hat{F} | \Phi_k \rangle$  y la matriz  $S$  con elementos según  $S_{k\nu} = \langle \Phi_\nu | \Phi_k \rangle$ , las ecuaciones de Roothaan pueden reescribirse de la siguiente forma:

$$FC = SC\varepsilon \quad (\text{II.2.27})$$

En esta ecuación  $C$  es la matriz de los coeficientes,  $\varepsilon$  es la matriz diagonal de las energías



orbitales. Conociendo la matriz  $F$ , se puede calcular la matriz de coeficientes y la energía a través de la ecuación secular:

$$\det(F - \varepsilon S) = 0 \quad (\text{II.2.28})$$

Aquí  $F$  depende de los coeficientes, por lo que el problema se resuelve iterativamente, para esto se propone inicialmente una matriz de coeficientes, se calcula  $F$ , se obtienen nuevos coeficientes los que dan una nueva  $F$ , y se repite el procedimiento hasta que la matriz de coeficientes que se obtiene es esencialmente igual a la del paso precedente. De esta forma proceden los programas que utilizan el método HF.

Este método tiene sus limitaciones, una de ellas tiene que ver con la capacidad de la base de representar a los orbitales, cuanto mejor sea la calidad de la base, mejor serán los valores de energía obtenidos. La otra limitación tiene que ver con la correlación electrónica. Los electrones se repelen y tienden a alejarse unos de otros. Los movimientos de los mismos están pues correlacionados entre sí, de modo que la probabilidad de encontrar dos electrones en el mismo punto del espacio ha de ser nula. Dentro de la aproximación HF, cada electrón siente la influencia del resto de los electrones como una distribución promedio. Ello conlleva que, la correlación de sus posiciones instantáneas sea ignorada, de modo que la probabilidad de encontrar a un electrón en un lugar dado del espacio no depende de la posición instantánea de los demás electrones, haciendo que la probabilidad de encontrar a dos electrones con distinto espín en el mismo lugar simultáneamente *no* sea nula.

Se define la energía de correlación como la diferencia entre la energía exacta no relativista y la energía HF:  $E_{corr} = E_{exacta} - E_{HF}$ . De modo que, aunque se usara una base infinita la energía obtenida por este método sería superior a la energía exacta. Se han desarrollado diferentes métodos para tener en cuenta este efecto. Tradicionalmente se conocen con el nombre de métodos *post-HF*, ya que toman como punto de partida el modelo HF, y sobre él añaden correcciones como veremos a continuación.

**Møller y Plesset (MP)** propusieron la aplicación de la *teoría de perturbaciones* utilizando la solución de HF como punto de partida y la perturbación como la diferencia entre el Hamiltoniano electrónico de Hartree-Fock (suma de los operadores de Fock) y el verdadero.

$$\hat{H}' = \hat{H} - \hat{H}^0 = \sum_l \sum_{m>l} \frac{1}{r_{ml}} - \sum_{m=1} \sum_{j=1} \left[ \hat{J}_j(r_m) - \hat{K}_j(r_m) \right] \quad (\text{II.2.29})$$

Este esquema permite encontrar una corrección a la energía y a la función de onda a un costo computacional razonable, aunque mucho mayor que HF. Si retrocedemos y observamos la ecuación II.2.12, vemos que el primer término corresponde a la energía del sistema sin perturbar, el segundo a la corrección de orden 1, y el tercero a la de orden 2. Es fácil

demostrar que la suma de los dos primeros términos corresponde a la energía obtenida por el método HF. Si incluimos la corrección de orden 2 ( $E^{(2)}$ ), esto es lo que hace el método *MP2*, obtenemos que la energía será:  $E_{MP2} = E_{HF} - E^{(2)}$ . El método MP2 es uno de los métodos más usados para incluir los efectos de la correlación en las propiedades de equilibrio del estado fundamental molecular.

La **teoría de "coupled-clusters" (CC)**, desarrollada por Cížek y Paldus en los 60'[4], sugiere que la función de onda exacta puede describirse como:

$$\Psi = e^{\hat{T}}\Phi_0 \quad (\text{II.2.30})$$

donde  $\Psi$  es la función de onda electrónica molecular exacta del estado fundamental;  $\Phi_0$  es la función de onda HF del estado fundamental y  $\hat{T}$  es un operador de excitación:  $\hat{T} = \hat{T}_1 + \hat{T}_2 + \hat{T}_3 + \dots + \hat{T}_n$ , donde  $\hat{T}_1$  es el operador de excitación de una partícula,  $\hat{T}_2$  es el operador excitación de dos partículas, etc... El efecto del operador  $e^{\hat{T}}$  es expresar a  $\Psi$  como una combinación de determinantes de Slater que incluyen  $\Phi_0$  y todas las posibles excitaciones de los electrones desde los espín-orbitales ocupados a los virtuales. La mezcla en la función de onda de determinantes de Slater con distintos grados de excitación electrónica proporciona una estimación de la correlación electrónica.

En la práctica, el operador  $\hat{T}$  se aproxima considerando únicamente algunos de los operadores que lo componen. La teoría demuestra que la contribución más importante a  $\hat{T}$  la aporta  $\hat{T}_2$ , dando lugar al método de clusters acoplados dobles (CCD). El siguiente paso para mejorar el método es incluir el operador  $\hat{T}_1$ , lo cual da origen al método de clusters acoplados simples y dobles (CCSD). El método CCSDT, que incluye también las excitaciones de tres partículas, proporciona resultados muy precisos para las energías de correlación, pero consume mucho tiempo de cálculo y es factible únicamente para moléculas muy pequeñas. Uno de los métodos actuales más utilizados para incluir de forma precisa la correlación electrónica es el CCSD(T), en el que el efecto de las excitaciones triples se incluye de forma aproximada, este método es muy utilizado como método de referencia.

## Teoría del funcional de la densidad.

Un procedimiento alternativo, y conceptualmente distinto, para obtener información acerca de un sistema y que permite calcular su energía incluyendo la correlación electrónica aparece con la **Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)** [3]. Esta teoría fue desarrollada por Hohenberg y Kohn en 1964 [5]. El formalismo se diferencia de los demás métodos de estructura electrónica por el hecho de considerar la densidad electrónica total  $\rho(r)$  como variable del sistema, en lugar de trabajar con la función de onda de los  $N_e$  electrones,  $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_{N_e})$ . La densidad electrónica en función de  $\Psi$  se expresa como:

$$\rho(r) = \rho(r_1) = eN_e \int \cdots \int dr_2 dr_3 \cdots dr_{N_e} |\Psi(r_1, r_2, \cdots, r_{N_e})|^2 \quad (\text{II.2.31})$$

Este enfoque tiene la gran ventaja de reducir el esfuerzo de hallar una función de  $3N_e$  dimensiones (la función de onda de un sistema de  $N_e$  electrones) al de obtener una función de sólo tres dimensiones, como lo es la densidad electrónica  $\rho(r)$ .

Este formalismo parte de dos resultados establecido por Hohenberg y Kohn:

1. La función de onda del sistema es una *funcional* de la densidad electrónica  $\rho(r)$ .
2. Existe una relación unívoca entre  $\rho$  y  $|\Psi\rangle$ .

De este modo, la energía puede también considerarse un funcional de la densidad,

$$\langle \Psi | \hat{H}_e | \Psi \rangle = \varepsilon_e \equiv \varepsilon_e[\rho(r)] = T[\rho] + V_{ee}[\rho] + V_{ne}[\rho] \quad (\text{II.2.32})$$

Donde  $T$  refiere a la energía cinética,  $V_{ee}$  a la energía potencial de la interacción entre electrones y  $V_{ne}$  a la interacción entre núcleos y electrones. Hohenberg y Kohn aportaron otro aspecto importante en la teoría de los funcionales de la densidad, un *teorema variacional* similar al descrito para el caso HF. En éste se postula que para cualquier  $\rho'$  tal que  $\int \rho'(r) dr = N$  y  $\rho'(r) \geq 0$  en todo el espacio, entonces  $E[\rho'] \geq E_0$ . La igualdad se verifica si  $\rho'$  es la densidad del estado fundamental, lo que equivale a decir que  $\rho_0$  minimiza el funcional de la energía  $E[\rho]$  al igual que la función de onda del estado fundamental vuelve mínima la energía. Volviendo a la ecuación II.2.32, el término de interacción entre núcleos y electrones puede expresarse fácilmente mientras que la teoría no dice cómo calcular la expresión para los otros dos términos. Por otro lado vincula la energía con la densidad electrónica pero no prevé la forma de calcular una u otra. En el año 1965 Kohn y Sham [5] introdujeron una aproximación para la forma funcional de la energía cinética, la enorme importancia que adquirió la teoría desde entonces se vió reflejada en el otorgamiento del premio Nobel al profesor Kohn en 1998.

*Aproximación Kohn y Sham.* Esta aproximación considera un sistema de referencia ficticio compuesto por electrones que no interactúan entre sí, cuya densidad  $\rho_R$  es igual a la densidad real  $\rho_0$ . Entonces, el potencial externo debe ser tal que reproduzca en el sistema de  $N$  electrones independientes una densidad igual a la que corresponde a los  $N$  electrones interactuantes sometidos al potencial real. Si escribimos el Hamiltoniano para el sistema de referencia veremos que no hay términos de interacción interelectrónica, por lo que dicho Hamiltoniano se puede expresar como la suma de  $N_e$  Hamiltonianos unielectrónicos  $\hat{h}_i^{KS}$ , también llamados operadores de Kohn y Sham. Como en el sistema de referencia los electrones

son independientes, la autofunción de  $\hat{H}_R$ ,  $|\Psi_R\rangle$  puede ser expresada como un determinante de Slater y la densidad electrónica se puede evaluar según:

$$\rho_R = \sum_i^N |\chi_i^{KS}|^2 \quad (\text{II.2.33})$$

Las funciones  $\chi_i^{KS}$  son denominadas orbitales de Kohn-Sham, por analogía con HF. Volviendo al nuestro sistema real de electrones interactuantes, resulta conveniente definir la cantidad  $\Delta T$ , como la diferencia entre la energía cinética verdadera y la del sistema de referencia y  $\Delta V_{ee}$  como la contribución no clásica de la interacción entre electrones:

$$\Delta T [\rho] \equiv T [\rho] - T_R [\rho] \quad (\text{II.2.34})$$

$$\Delta V_{ee} [\rho] \equiv V_{ee} - \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 \quad (\text{II.2.35})$$

Estas dos cantidades sumadas, dan lugar a un nuevo término  $E_{xc} [\rho]$ , la energía de intercambio y correlación:

$$E_{xc} [\rho] = \Delta T [\rho] + \Delta V_{ee} [\rho] \quad (\text{II.2.36})$$

La expresión funcional final para la energía (Ec. II.2.32) puede reescribirse como:

$$E [\rho] = T_R [\rho] + V_{ne} [\rho] + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + E_{xc} [\rho] \quad (\text{II.2.37})$$

Ahora, las contribuciones a la energía del estado fundamental son conocidas, salvo el término  $E_{xc} [\rho]$ , de modo que la exactitud del cálculo DFT depende de la aproximación que se elija para describir  $E_{xc} [\rho]$ . El funcional  $E_{xc} [\rho]$  exacto suele descomponerse en la suma de distintos aportes energéticos:

- la correlación cinética definida en la Ec. II.2.34,
- la correlación Coulombiana, asociada a la repulsión electrónica,
- el intercambio, relacionado con la propiedad de antisimetría para la función de onda de un sistema de fermiones,
- la corrección a la "autointeracción" electrostática. Dado que la integral  $\frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2$  incluye la interacción de un electrón con su propia densidad de carga, es necesario introducir una corrección a fin de recuperar la interacción Coulombiana correcta.

Por lo tanto, si se tiene una forma para  $E_{xc}[\rho]$  se puede calcular la energía a partir de los orbitales de Kohn-Sham. Haciendo uso del principio variacional de Hohenberg y Kohn, de minimización de energía total respecto a las variaciones de la densidad sujeta a la condición de normalización de  $|\Psi_R\rangle$ , el problema se traduce en hallar el conjunto de orbitales de Kohn y Sham que minimizan la energía total electrónica, tal que:

$$\frac{\delta \varepsilon_e[\rho]}{\delta \rho} \Big|_{\rho=\rho_0} \quad (\text{II.2.38})$$

donde  $\rho_0$  es la densidad electrónica del estado fundamental, como resultado se obtiene un conjunto de ecuaciones de autovalores denominadas de Kohn-Sham que tienen la siguiente forma:

$$\left[ -\frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_{1A}} + \int \frac{\rho(r_2)}{r_{12}} dr_2 + \nu_{xc}(1) \right] |\chi_i^{KS}\rangle = \varepsilon_i^{KS} |\chi_i^{KS}\rangle \quad (\text{II.2.39})$$

el término  $\nu_{xc}$ , es la derivada funcional de  $E_{xc}[\rho]$ , existen diferentes niveles de aproximación para modelar este término. Es importante remarcar que los orbitales de Kohn y Sham fueron definidos para el sistema de referencia, por lo que no tienen un significado físico, son sólo una herramienta que permite calcular la densidad electrónica. Al igual que en el método HF, para encontrar los orbitales Kohn y Sham, se los expresa como combinación lineal de funciones base conocidas, lo que lleva a la obtención de un conjunto de ecuaciones equivalentes a las de Roothaan y que por ende se pueden expresar de forma matricial:

$$h^{KS}C = SC\varepsilon \quad (\text{II.2.40})$$

Al igual que para HF el sistema debe ser resuelto iterativamente, hasta la autoconsistencia.

Se han desarrollado diferentes esquemas para la obtención de formas aproximadas del funcional para la energía de correlación-intercambio. Los distintos funcionales se clasifican según el modo en que tratan las componentes de correlación e intercambio. De este modo se puede hablar de aproximaciones de densidad local (LDA), en las que se asume que los efectos de correlación-intercambio son locales y dependen únicamente del valor de la densidad electrónica en cada punto (Ej.:VWN, PW92) [6, 7], y de correcciones de gradiente generalizado (GGA), en las que se tiene en cuenta no sólo el valor de la densidad en cada punto, sino que también cómo varía esta densidad en sus alrededores (Ej.: PW86, PBE [8, 9, 10, 11]). Finalmente, también se ha explorado la introducción del intercambio exacto en lo que se conoce con el nombre de funcionales híbridos. Estos definen el funcional de intercambio como una combinación lineal de términos de intercambio HF, local y de corrección

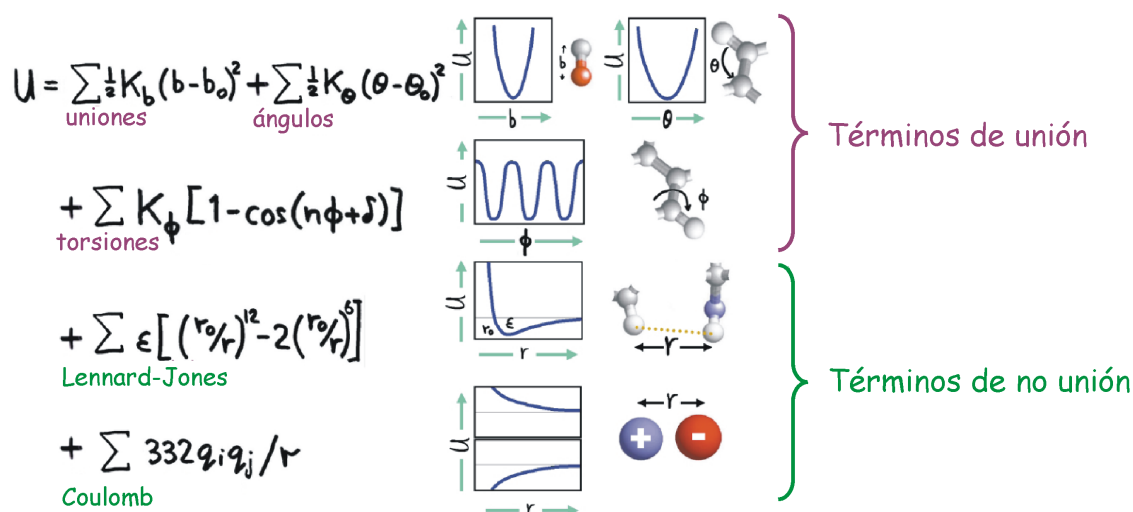


Figura II.2.1: Esquema de las interacciones de unión en un campo de fuerzas clásico.

de gradiente (Ej.:B3LYP, B3PW91).

## II.2.2. Modelos clásicos.

En estos modelos, la naturaleza cuántica de los electrones e incluso éstos son ignorados, la energía del sistema depende únicamente de las posiciones nucleares. La función de energía potencial (dependiente de las posiciones nucleares) recibe el nombre de "campo de fuerzas" ya que el gradiente de esta función permite obtener las fuerzas que actúan sobre cada átomo. Al igual que en los métodos *ab initio* se halla implícita en esta simplificación, la aproximación de Born-Oppenheimer. Dentro del campo de fuerzas, las interacciones entre los núcleos se agrupan en términos de unión, y términos de no unión. Los términos de unión describen de manera aproximada la interacción entre átomos que están unidos entre sí directamente, o hasta 2 átomos de distancia. De modo que la energía de los términos de unión se descompone en distintas contribuciones: estiramiento de un enlace, flexión de un ángulo entre dos enlaces del mismo átomo, rotación de los átomos adyacentes sobre el eje de un enlace (ver Figura II.2.1).

Los términos de no unión describen la interacción entre átomos que están en diferentes moléculas o en la misma pero a más de tres enlaces de distancia. Poseen una contribución electrostática y una contribución debido a las interacciones de Van del Waals (VDW) [12].

Existen diferentes campos de fuerza clásicos y la diferencia entre ellos reside en los parámetros que utilizan en las ecuaciones. En este trabajo de tesis se ha utilizado el campo de fuerzas que se incluye en el paquete de programas de AMBER [13].

En el campo de fuerzas utilizado, la energía potencial es función de la posición de los  $N$  átomos del sistema y su forma funcional es la siguiente:

$$E(r^N) = \sum_{uniones} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{angulos} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \quad (II.2.41)$$

$$+ \sum_{torsiones} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_i^N \sum_{j>1}^N \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

En esta ecuación se reconocen los diferentes términos antes mencionados,

**Estiramientos:** la unión es descrita por un oscilador armónico según la Ley de Hooke. El parámetro  $b_0$  corresponde a la distancia de equilibrio de la unión y  $K$  es la constante de fuerza asociada a la unión. Si bien la curva de energía potencial de un enlace real no es exactamente armónica, esta aproximación es razonablemente buena. Es claro que este potencial no permite la ruptura del enlace.

**Flexión angular:** también es descrita por un potencial armónico, donde  $\theta_0$  es el valor de equilibrio del ángulo y  $K_\theta$  la constante de fuerza. Típicamente los ángulos son más susceptibles a la deformación que los enlaces, de modo que las constantes de fuerza angulares poseen valores entre 30-80 kcal/mol/Rad y las de enlace entre 200-500 kcal/mol/Å.

**Torsión:**  $\phi$  es el valor del ángulo diedro, el término  $V_n$  está relacionado con la magnitud de la barrera entre dos mínimos adyacentes, "n" es la multiplicidad, la que indica cuántos mínimos hay para la rotación entre 0 y 360 grados, y " $\gamma$ " es la fase que determina que el ángulo pase por el primer mínimo.

**Término de no unión:** este término generalmente se divide en dos contribuciones, la electrostática y la de VDW. La interacción electrostática es consecuencia de la distribución asimétrica de la densidad de carga en las moléculas. Ahora bien, si sólo tuviéramos en cuenta la interacción electrostática con cargas de signos opuestos se atraerían hasta colapsar en el mismo punto del espacio, obteniéndose un valor infinito de energía. La fórmula que describe de manera adecuada este tipo de interacción repulsiva a corto alcance y dispersiva a largo alcance, es el potencial de *Lennard-Jones*. El potencial de Lennard-Jones posee dos parámetros que dependen del par de átomos en cuestión, estos son : la distancia del mínimo de energía entre ambos átomos ( $R_{ij}^*$ ) y el valor para la energía en ese punto ( $\epsilon_{ij}$ ). Los parámetros están tabulados según el tipo de átomo, de manera que para encontrar los parámetros correspondientes a la interacción del par de átomos  $i, j$ , se utilizan las siguientes reglas de combinación:  $R_{ij}^* = (R_i^* + R_j^*)$  y  $\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j}$ . Luego los términos de la ecuación del campo de fuerzas se calculan como  $A_{ij} = \epsilon_{ij} (R_{ij}^*)^{12}$  y  $B_{ij} = 2\epsilon_{ij} (R_{ij}^*)^6$ . El cálculo del término de no unión es el más costoso, por ello sólo típicamente son calculados entre los pares de átomos que se encuentran a una distancia menor que un valor de corte elegido por el usuario (radio de corte), usualmente son mayores a 10 Å [12].

## II.2.3. Metodologías híbridas.

Hasta aquí hemos visto y estudiado modelos puramente cuánticos (QM) y modelos clásicos (MM). En las secciones anteriores se ha dejado en claro el alcance de los distintos modelos y qué clase de preguntas es posible contestar mediante el uso de ellos. Ahora bien, ¿qué metodología usaríamos para estudiar un proceso reactivo que ocurre en una enzima o en fase condensada?: sabemos que para estudiar un proceso reactivo necesitamos recurrir a modelos cuánticos, pero ahora nuestro sistema contiene por ejemplo más de 100 átomos y por lo tanto resulta inabordable mediante modelos puramente cuánticos. Por otro lado sabemos que la reacción en una enzima, por ejemplo, ocurre en el sitio activo, el cual consiste en una pequeña parte de ésta. Del mismo modo, si hablamos de una reacción en fase condensada, las moléculas de solvente seguramente no intervengan en el proceso reactivo. En vista de esto, nuestro sistema podría ser dividido en dos subsistemas, uno donde ocurra el proceso reactivo, descrito por modelos QM, y el otro formado por el resto de la enzima o el solvente, para el cual una descripción MM es más que suficiente. Por lo tanto, la estrategia para estudiar este tipo de sistemas consiste en usar una metodología que combine ambos modelos, o sea, una *metodología híbrida QM-MM* [14].

La base de esta metodología consiste en combinar cálculos de estructura electrónica con la mecánica molecular clásica a través de un Hamiltoniano híbrido ( $H_{QM-MM}$ ). Este método propone que es posible escribir la energía como suma de tres contribuciones:

$$E_{TOT} [\{R_i\}, \{\tau_\alpha\}] = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM-MM} \quad (\text{II.2.42})$$

Donde  $E_{QM}$  denota la energía del subsistema cuántico,  $E_{MM}$  la del subsistema clásico y  $E_{QM-MM}$  es la energía introducida por la interacción de ambos subsistemas.  $R_i$  y  $\tau_\alpha$  son las coordenadas de los núcleos clásicos y cuánticos respectivamente.

La energía correspondiente al subsistema cuántico puede calcularse con cualquier método de estructura electrónica, en el caso particular de este trabajo de tesis se utilizó DFT. Del mismo modo, cualquier campo de fuerzas clásico puede aplicarse al subsistema correspondiente. La energía que corresponde a la interacción entre ambos subsistemas puede calcularse se la siguiente forma:

$$E_{QM-MM} = \sum_{i=1}^C q_i \int \frac{\rho(r)}{|r - \tau_i|} dr + \sum_{i=1}^C \sum_{\alpha=1}^Q \frac{q_i Z_\alpha}{|R_\alpha - \tau_i|} + E_{QM-MM}^{LJ} \quad (\text{II.2.43})$$

$C$  es el número de átomos clásicos con cargas parciales  $q_i$ ,  $Q$  es el número de átomos cuánticos con índice  $\alpha$ . El primer término representa la interacción entre la densidad electrónica cuántica y las cargas parciales de los átomos clásicos. El segundo representa la interacción



entre los núcleos de los átomos cuánticos y las cargas parciales clásicas. Estos dos términos representan la interacción electrostática entre los dos subsistemas. El tercer término representa la interacción de VDW entre los átomos de ambos subsistemas y se calcula usando un potencial de Lennard-Jones, idéntico al usado en el campo de fuerzas clásico.

**Frontera cuántico-clásica: método del "link-atom".** En el estudio mediante métodos híbridos, como ya hemos mencionado, el sistema es particionado en un subsistema cuántico y otro clásico. Para el caso de reacciones en fase condensada las moléculas de soluto son incluidas en el subsistema cuántico mientras que el solvente en el subsistema clásico. Para el caso del estudio de reacciones en proteínas, la situación es más compleja. sólo ciertos aminoácidos, aquellos que forman parte del sitio activo, deben ser incluidos en el subsistema cuántico mientras que el resto de la proteína formaría parte del subsistema clásico. Esto último implica que debemos considerar en subsistemas diferentes átomos unidos covalentemente.

Existen diferentes métodos para tratar este tipo de fronteras covalentes. En este trabajo de tesis se ha utilizado el método SPLAM (Scaled Position Link Atom Method) [15] adaptado al programa SIESTA, la implementación fue realizada por nuestro grupo [16]. En el método SPLAM un átomo de hidrógeno (el link atom  $H_L$ ) es agregado al sistema en cada unión entre un átomo cuántico y uno clásico. Este hidrógeno cierra el sistema cuántico y se encuentra siempre ubicado sobre el enlace  $C_{QM} - C_{MM}$ . Las fuerzas que siente el  $H_L$  son trasladadas sobre los átomos  $C_{QM}$  y  $C_{MM}$ . Por otro lado, para mantener el enlace entre  $C_{QM}$  y  $C_{MM}$ , los términos de unión, ángulos y diedros que involucran al enlace son considerados del campo de fuerzas clásico. Las interacciones de Lennard-Jones de los átomos  $H_L$  y  $C_{QM}$  con los átomos clásicos a menos de 3 enlaces de la unión  $C_{QM} - C_{MM}$  son anuladas. Por último, dada la cercanía entre la densidad electrónica del  $H_L$  y la carga parcial del  $C_{QM}$ , la misma se hace cero. El método SPLAM ha demostrado ser eficiente y ha sido probado con éxito en diferentes sistemas de naturaleza biológica [16, 17].

#### II.2.4. Caracterización de la Superficie de Energía Potencial (SEP).

El curso de una reacción química está determinado por la función de energía potencial  $U(q_\alpha)$ , donde  $q_\alpha$  indica las coordenadas de los  $N$  núcleos de las moléculas reactivas. Para obtener la superficie de energía potencial (SEP)  $U(q_\alpha)$ , deberíamos resolver la ecuación de Schrödinger electrónica para un gran número de configuraciones nucleares, lo cual es una tarea formidable y en la mayoría de los casos, imposible. Conocer la SEP en forma completa nos permitiría saber todas las propiedades termodinámicas y cinéticas del sistema,

para sistemas de 3, 4 y 5 átomos se precisan del orden de  $10^3$ ,  $10^6$ , y  $10^9$  cálculos. Excepto para sistemas de muy pocos átomos, esto es imposible y por lo tanto nos conformamos con encontrar los puntos más importantes sobre la superficie. Se intenta entonces, localizar los puntos de la superficie en los cuales las derivadas primeras  $\frac{\partial U}{\partial q_\alpha}$  (las componentes del gradiente) son cero. Estos son los llamados puntos estacionarios. Un punto estacionario puede ser un mínimo local, un máximo local o un punto silla. Para determinar la naturaleza del punto estacionario, se evalúan las  $(3N-6)^2$  derivadas segundas  $\frac{\partial^2 U}{\partial q_\alpha \partial q_\alpha}$  (componentes de la matriz Hessiana) en dichos puntos. Estas derivadas segundas se utilizan también para obtener las frecuencias vibracionales en los puntos estacionarios y así caracterizarlos. En un mínimo local, todas las frecuencias vibracionales son números reales. Para el estado de transición (punto silla) se encuentra una única frecuencia imaginaria entre las reales. Los mínimos locales corresponden a reactivos, productos o intermediarios de reacción. Veamos como se buscan estos puntos sobre la SEP.

**Minimización de la energía.** La SEP puede poseer muchos mínimos locales y el menor de todos corresponde al mínimo global. Para la búsqueda de estos puntos se utiliza un algoritmo de minimización. Los algoritmos de minimización de primer orden (aquellos que utilizan únicamente las derivadas primeras) más frecuentemente utilizados son el "steepest descend" y el de gradientes conjugados (GC) [18]. Estos algoritmos en cada etapa de búsqueda se mueven según lo dictamine el gradiente ( $-\nabla U$ , gradiente) el que indica dirección y sentido para el cual  $U$  decrece más rápidamente. Además de usar el gradiente, algunos métodos de minimización de energía usan también las derivadas segundas de  $U$ . El conjunto de derivadas segundas cuando se dispone en una ordenación cuadrada, forman la matriz denominada Hessiana o matriz de constantes de fuerza ( $H$ ). Un ejemplo de este tipo de algoritmos es el Newton-Raphson, éste aproxima  $U$  por un desarrollo de Taylor, el que se usa para evaluar en forma precisa el gradiente y  $H$ . Una variación de este método, que lo hace menos costoso, consiste en partir de una estimación de  $H$  que gradualmente se mejora (cuasi-Newton). Dentro de estos métodos, uno mejor y más eficiente es Eigenmode-Following (EF), éste calcula los autovalores y autovectores de  $H$  y los utiliza para la búsqueda del punto estacionario. El algoritmo "Berny" [19] utilizado por el programa Gaussian utiliza un algoritmo similar a éste.

**Búsqueda del camino de reacción y del estado de transición.** Mientras que las propiedades termodinámicas están relacionadas con los mínimos de energía y la energía relativa entre éstos, la cinética de un proceso viene determinada por la altura de la barrera (Energía de activación) que separa los mínimos relevantes del sistema. Al camino de mínima energía que conecta reactivos y productos sobre la SEP se lo conoce como camino de reacción. El punto de máxima energía sobre este camino corresponde al estado de transición (punto silla). Veamos cómo se encuentra el estado de transición y el camino de reacción.

Obtener estados de transición sobre una PES es mucho más difícil que encontrar los mínimos locales de energía. Entre los algoritmos descritos anteriormente, el algoritmo EF o algunos basados en "Berny" suelen ser utilizados para este fin. Una vez encontrado el estado de transición se lo debe vincular a los mínimos a través de la coordenada de reacción para poder definir el perfil de reacción. Una ayuda para esto es el hecho de que los desplazamientos en el modo normal de vibración que corresponde a la frecuencia imaginaria del estado de transición encontrado, deben estar en las direcciones que conducen a reactivos o productos.

Otra forma de construir el perfil de reacción consiste en utilizar la técnica denominada optimización restringida. En esta aproximación el sistema es empujado hacia arriba en la SEP a lo largo de la coordenada de reacción mientras se realiza una minimización para el resto de las coordenadas. Para esto se agrega el siguiente término armónico al Hamiltoniano:

$$V_R = \frac{1}{2}k(\xi - \xi_0)^2 \quad (\text{II.2.44})$$

Donde  $k$  es una constante de fuerza ajustable, tal que fuerce al sistema a moverse hacia arriba en la SEP,  $\xi$  es el valor de la coordenada que tiene el sistema y  $\xi_0$  el valor de la coordenada de reacción deseado. Al mover  $\xi_0$  a lo largo de la coordenada de reacción, en pasos fijos y minimizando la energía en cada punto elegido se obtienen los valores de energía a lo largo del camino de reacción. El punto más alto en el camino corresponde al punto de ensilladura y la conformación del mismo es una aproximación al estado de transición para el proceso en estudio.

**Dinámica molecular.** Las moléculas grandes pueden tener un número enorme de conformaciones que son mínimos de energía. Usualmente se está interesado en obtener no sólo la conformación de más baja energía (mínimo global), sino también los mínimos cuyas energías son lo suficientemente bajas como para que estas conformaciones tengan poblaciones significativas a temperatura ambiente. Los conformeros biológicamente activos de una biomolécula podrían no ser conformaciones cercanas al mínimo global. Actualmente, no existe ningún método que garantice que puede encontrar el mínimo global y todos los mínimos más bajos de una molécula flexible grande. La dinámica molecular calcula la progresión temporal "real del sistema" de modo que las propiedades termodinámicas extraídas correspondan de manera precisa con los valores reales. Las posiciones atómicas de los átomos del sistema son propagadas temporalmente integrando las ecuaciones de movimiento de Newton. Se aplica entonces la segunda ley de Newton a cada átomo, donde cada componente de la fuerza sobre el átomo  $i$  se calcula como  $F_{x,i} = \frac{\partial U}{\partial x_i}$ , y  $U$  se obtiene a partir del campo de fuerzas de la mecánica molecular. Se integra numéricamente la segunda ley de Newton (algoritmo de Verlet [20]) para obtener la posición de cada átomo en los tiempos  $\Delta t, 2\Delta t, 3\Delta t, \dots$ , donde el intervalo de tiempo  $\Delta t$  (time step) es, habitualmente,  $10^{-15}$ s, y se puede seguir los movi-

mientos atómicos, del orden de  $10^{-9}$ s. Existen varias razones por las cuales el investigador puede querer controlar la temperatura, en particular si se desea conocer el comportamiento del sistema al variarla, o simplemente para estudiar reacciones a temperatura constante. Uno de los métodos más usados para mantener la temperatura fija en un valor deseado en una simulación de dinámica molecular es el algoritmo de Berendsen [21]. El termostato de Berendsen acopla al sistema un baño térmico (a la temperatura deseada) que actúa como fuente o sumidero de energía térmica.

## II.2.5. Modelado del solvente.

El hecho de introducir una molécula de soluto polar en un disolvente polar produce una serie de efectos de orientación e inducción de momentos dipolares sobre ambos. El resultado de dichos efectos es que el disolvente adquiere una polarización global en la región que rodea a cada molécula de soluto, generando un campo eléctrico para cada una de éstas moléculas y produciendo por lo tanto un momento dipolar inducido que se suma al momento dipolar permanente de la molécula aislada. En consecuencia, la función de onda electrónica molecular y todas las propiedades moleculares en disolución diferirán en mayor o menor extensión de las obtenidas en fase gaseosa. Una forma de tener en cuenta el efecto del solvente es considerarlo en forma explícita y utilizar el método QM-MM anteriormente descrito, donde por ejemplo el solvente formaría parte del subsistema clásico. Otra técnica comúnmente utilizada para calcular los efectos del disolvente, es el empleo de un modelo continuo. En este caso, la estructura del disolvente se ignora y este se modela como un dieléctrico continuo de extensión infinita que rodea una cavidad que contiene la molécula de soluto. El dieléctrico continuo se caracteriza por su constante dieléctrica y la molécula de soluto puede tratarse clásicamente o cuánticamente. En el tratamiento cuántico, la interacción entre la molécula de soluto y el continuo que la rodea se simula mediante un término de energía que se añade al Hamiltoniano. En la implementación usual del modelo de solvatación continuo, se permite que cambien la función de onda electrónica y la densidad electrónica de la molécula al pasar de fase gaseosa a fase disolución, de forma que se alcance la autoconsistencia entre la distribución de carga del soluto y el campo eléctrico creado por el solvente (SCRF) [3]. Existen muchas versiones de los modelos SCRF, las diferencias radican en la elección, tamaño y forma de la cavidad que contiene al soluto y en el cálculo de la energía de interacción soluto-solvente.

## II.2.6. Programas utilizados

Los métodos teóricos previamente descriptos han sido implementados en diferentes programas, en lo que sigue se describirán brevemente los programas que ha sido utilizados en este trabajo de tesis.

***Gaussian98 y 03.*** Es un paquete de programas que llevan a cabo distintos tipos de cálculo [22]. Incluye todos los métodos *ab initio* comunes, muchos métodos semiempíricos y los métodos DFT. Utiliza bases Gaussianas. Gran parte de los cálculos realizados en este trabajo se llevaron a cabo utilizando este programa.

**Tipos de bases y métodos utilizados.** En este trabajo de tesis se han utilizado diferentes métodos, entre ellos podemos nombrar: MP2, CCSD(T), CBS-QB3, DFT(BP86, B3LYP, PBE1PBE). Cabe aclarar que el método CBS-QB3 entra dentro de la clasificación de "Métodos compuestos para cálculos de energía CBS". En general, los métodos CBS-Q [23] son variantes de los métodos compuestos CBS (Serie Base Completa), propuestos para cálculos de energía. Estos métodos usan procedimientos especiales diseñados para extrapolar las energías calculadas en el límite de la base completa. Incluyen también cálculos de correlación efectuados para la geometría optimizada a un nivel bajo de teoría.

Los métodos nombrados anteriormente han sido combinados con distintas bases según el sistema en estudio: 6-31G\*\* (doble zeta polarizada), 6-311+G\* (triple zeta: simple Z para el core y triple Z para los OA de valencia, con funciones de polarización y funciones difusas), cc-pVDZ (correlación consistente con funciones doble zeta de valencia polarizadas), SDDall (doble zeta para elementos livianos y pseudopotenciales para elementos pesados: utiliza el potencial efectivo de Core Stuttgart-Dresden ), SDB (potencial efectivo de Core Stuttgart-Dresden con funciones de polarización).

**Pseudopotenciales atómicos (ECP):** es una construcción que incluye al núcleo del átomo junto con los electrones internos, y que permite que sólo sea necesario calcular explícitamente las interacciones de los electrones de valencia y que se puedan representar adecuadamente y a bajo costo los efectos relativistas que pueden ser relevantes en átomos pesados.

**Modelado del solvente.** En la mayoría de los cálculos se utilizó la implementación del modelo PCM (Modelo del continuo polarizado) [24]. En este se define la cavidad como la superposición de una serie de esferas cuyo radio es el radio de VDW del átomo en cuestión. Se utiliza un método numérico para obtener el término de energía de interacción. El modelo PCM original ha sufrido diversas modificaciones que han dado lugar a los modelos IPCM (modelo del continuo polarizable de isodensidad) [25], en el que la superficie de la cavidad molecular se define como una superficie de contorno de densidad electrónica constante de la molécula, y CPCM (PCM conductor) [26], en este se usan cargas superficiales en la superficie de la cavidad de la molécula de soluto.

**Búsqueda del estado de transición.** El programa Gaussian contiene muchas posibilidades diseñadas para obtener estados de transición [27]. Para localizar un estado de transición se puede introducir una estructura intermedia entre reactivos y productos, y usar la clave Opt=(TS, CalcFC). TS utiliza un algoritmo tipo Berny [19] y CalcFC calcula con precisión las constantes de fuerzas en los puntos de la geometría inicial en lugar de estimarlas, si bien aumenta el tiempo de cálculo también aumentan las probabilidades de éxito en la búsqueda. Otros métodos utilizan un procedimiento llamado de tránsito síncrono y necesitan como input las coordenadas de reactivos y productos (QST2), o reactivos, productos y estructura aproximada del estado de transición (QST3). Por otro lado, la clave Scan permite explorar la SEP.

**Cálculo de modos normales, corrección del punto cero (zpe) y térmica.** Cada punto estacionario encontrado ha sido caracterizado mediante el cálculo de modos normales. Como las energías correspondientes a las geometrías optimizadas corresponden a 0 K, los efectos térmicos fueron estimados realizando correcciones que tienen en cuenta los cambios producidos por la temperatura en las poblaciones de los niveles vibracionales, rotacionales y traslacionales de las especies consideradas. Estas correcciones se realizaron utilizando fórmulas de la mecánica estadística usando las aproximaciones de rotor rígido, oscilador armónico y gases ideales.

Por último, también se han calculado cargas (NBO) [28], RESP (MK: fitea las cargas atómicas de manera de reproducir el potencial electrostático molecular (MEP) para una serie de puntos alrededor de la molécula) [29], y desplazamientos químicos para RMN (GIAO) [30, 31].

**SIESTA (*Spanish Initiative for Electronic Structure Simulations of Thousands of Atoms*) [32, 33].** Es una implementación de DFT, pero a diferencia de la mayoría de las implementaciones de DFT, el código SIESTA utiliza funciones de base numéricas fijas definidas en una grilla tridimensional finita. Esto lo hace extremadamente rápido y eficiente en comparación con programas que usan Gaussianas u ondas planas. Los algoritmos realizan todos los cálculos requeridos en forma numérica. Otra ventaja del uso de funciones numéricas es que la función puede adoptar la forma que se desee. En particular, estas funciones numéricas se ajustan a los llamados "Orbitales Pseudo Atómicos" (PAO), que corresponden a las autofunciones del Pseudopotencial Atómico confinado a una esfera de potencial infinito (más allá de la esfera la función de onda vale cero). En este esquema de cálculo el tiempo computacional crece más lentamente con el número de átomos, lo que permite tratar sistemas con un número de átomos relativamente grande, en tiempos razonables. Una consecuencia del confinamiento, es que los PAOs poseen una mayor energía cinética que las autofunciones no confinadas. Este incremento de energía se mantiene igual para todos los PAOs, obtenién-

dose de esta forma una base balanceada. La magnitud de este incremento o "*pseudoatomic orbital energy shift*" ( $\Delta PAO$ ) es un parámetro variable que debe ser ajustado por el usuario. Para moléculas de tamaño mediano, valores de  $\Delta PAO$  cercanos a 100 meV permiten obtener resultados similares a los obtenidos con bases Gaussianas de tamaño convencional. En el caso de querer utilizar moléculas que contienen metales de transición como Cu, Pt, o Fe se requiere usar valores menores, del orden de 20-30 meV. Los núcleos y electrones internos están descriptos por pseudopotenciales.

Actualmente el programa SIESTA contiene funcionales de intercambio y correlación del tipo LDA, y el funcional GGA PBE. Otro parámetro importante que debe determinar el usuario es la precisión de la grilla, "*Energy cut off* ( $E_{cut}$ )". Esto se determina eligiendo la energía correspondiente a una onda plana de la máxima frecuencia posible y que entra en la grilla. Valores entre 100-200 Rydbergs aseguran una buena precisión.

Mediante el uso de este programa se optimizaron moléculas de mayor tamaño.

**AMBER.** Es un paquete de programas para realizar dinámica molecular que contiene el campo de fuerzas de Wang [13]. Se utilizó para realizar las dinámicas moleculares.

Es importante mencionar que los cálculos QM-MM se realizaron utilizando un código desarrollado en nuestro grupo en el que se implementa la metodología híbrida basada en DFT (SIESTA) y el campo de fuerzas de AMBER [16].

**Visualizadores Gráficos.** Molden, Gaussview 3.0, VMD.

Por último, al igual que para la parte experimental, se encontrará una descripción detallada y específica de la metodología de trabajo en las distintas partes y secciones de este trabajo de Tesis.

# Bibliografía

- [1] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, and A. Nudelman. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *Journal of Organic Chemistry*, 62(21):7512–7515, 1997.
- [2] A. Szabo and N. S. Ostlund. *Modern Quantum Chemistry*. Mc Graw-Hill Publishing Company, New York, 1989.
- [3] I. Levine. *Quantum Chemistry*, volume 5. Prentice-Hall, New Jersey, 2000.
- [4] R. J. Bartlett. Accurate coupled-cluster solutions of the molecular schrodinger-equation - a citation classic commentary on many-body perturbation-theory, coupled-pair many-electron theory, and the importance of quadruple excitations for the correlation-problem bartlett,r.j., purvis,g.d. *Current Contents/Physical Chemical & Earth Sciences*, pages 20–20, 1989.
- [5] W. Kohn and L. J. Sham. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Review*, 140:1133–&, 1965.
- [6] J. P. Perdew, K. Burke, and M. Ernzerhof. Generalized gradient approximation made simple. *Physical Review Letters*, 77:3865–3868, 1996.
- [7] S. H. Vosko, L. Wilk, and M. Nusair. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin-density calculations - a critical analysis. *Canadian Journal of Physics*, 58:1200–1211, 1980.
- [8] J. P. Perdew and Y. Wang. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation-energy. *Physical Review B*, 45:13244–13249, 1992.
- [9] J. P. Perdew and W. Yue. Accurate and simple density functional for the electronic exchange energy - generalized gradient approximation. *Physical Review B*, 33:8800–8802, 1986.



- 
- [10] J. P. Perdew. Generalized gradient approximation for the fermion kinetic-energy as a functional of the density. *Physics Letters A*, 165:79–82, 1992.
- [11] C. T. Lee, W. T. Yang, and R. G. Parr. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. *Physical Review B*, 37:785–789, 1988.
- [12] A. R. Leach. *Molecular Modeling*. Longman, 1997.
- [13] J. M. Wang, P. Cieplak, and P. A. Kollman. How well does a restrained electrostatic potential (resp) model perform in calculating conformational energies of organic and bio logical molecules? *Journal of Computational Chemistry*, 21:1049–1074, 2000.
- [14] G. Monard and K. M. Merz. Combined quantum mechanical/molecular mechanical methodologies applied to biomolecular systems. *Accounts of Chemical Research*, 32: 904–911, 1999.
- [15] M. Eichinger, P. Tavan, J. Hutter, and M. Parrinello. A hybrid method for solutes in complex solvents: Density functional theory combined with empirical force fields. *Journal of Chemical Physics*, 110:10452–10467, 1999.
- [16] A. Crespo, D. A. Scherlis, M. A. Marti, P. Ordejon, A. E. Roitberg, and D. A. Estrin. A dft-based qm-mm approach designed for the treatment of large molecular systems: Application to chorismate mutase. *Journal of Physical Chemistry B*, 107:13728–13736, 2003.
- [17] C. Rovira, B. Schulze, M. Eichinger, J. D. Evanseck, and M. Parrinello. Influence of the heme pocket conformation on the structure and vibrations of the fe-co bond in myoglobin: A qm/mm density functional study. *Biophysical Journal*, 81:435–445, 2001.
- [18] W. H. Press, S. A. Teulosky, W. T. Vetterling, and B. P. Flannery. *Numerical Recipes. The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.
- [19] H. B. Schlegel. Optimization of equilibrium geometries and transition structures. *Journal of Computational Chemistry*, 3:214–218, 1982.
- [20] L. Verlet. Computer experiments on classical fluids .i. thermodynamical properties of lennard-jones molecules. *Physical Review*, 159:98, 1967.

- [21] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Vangunsteren, A. Dinola, and J. R. Haak. Molecular-dynamics with coupling to an external bath. *Journal of Chemical Physics*, 81:3684–3690, 1984.
- [22] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Jr. Montgomery, R. Stratmann, J. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, and J. A. Pople. *Gaussian 98, Rev.A7, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA*, 1998.
- [23] J. A. Montgomery, J. W. Ochterski, and M. J. Frisch. An improved complete basis set (cbs) model chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 211:231–HYS, 1996.
- [24] S. Miertus, E. Scrocco, and J. Tomasi. Electrostatic interaction of a solute with a continuum - a direct utilization of abinitio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chemical Physics*, 55:117–129, 1981.
- [25] J. B. Foresman, T. A. Keith, K. B. Wiberg, J. Snoonian, and M. J. Frisch. Solvent effects .5. influence of cavity shape, truncation of electrostatics, and electron correlation ab initio reaction field calculations. *Journal of Physical Chemistry*, 100:16098–16104, 1996.
- [26] V. Barone and M. Cossi. Quantum calculation of molecular energies and energy gradients in solution by a conductor solvent model. *Journal of Physical Chemistry A*, 102:1995–2001, 1998.
- [27] C. Y. Peng, P. Y. Ayala, H. B. Schlegel, and M. J. Frisch. Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *Journal of Computational Chemistry*, 17:49–56, 1996.
- [28] A. E. Reed, L. A. Curtiss, and F. Weinhold. Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint. *Chemical Reviews*, 88:899–926, 1988.

- 
- [29] U. C. Singh and P. A. Kollman. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *Journal of Computational Chemistry*, 5:129–145, 1984.
- [30] A. P. Zens, P. D. Ellis, and Ditchfie. R. C-13 nuclear magnetic-resonance chemical-shifts of fluoroallenes - comparison between theory and experiment. *Journal of the American Chemical Society*, 96:1309–1312, 1974.
- [31] Ditchfie. R. Self-consistent perturbation-theory of diamagnetism .1. gauge-invariant lcao method for nmr chemical-shifts. *Molecular Physics*, 27:789–807, 1974.
- [32] J. M. Soler, E. Artacho, J. D. Gale, A. Garcia, J. Junquera, P. Ordejon, and D. Sanchez-Portal. The siesta method for ab initio order-n materials simulation. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 14:2745–2779, 2002.
- [33] D. Sanchez Portal, P. Ordejon, E. Artacho, and J. M. Soler. Density-functional method for very large systems with lcao basis sets. *International Journal of Quantum Chemistry*, 65:453–461, 1997.

### III

*S*-Nitrosotioles y reacción de  
transnitrosación como mecanismo de  
transporte y almacenamiento de NO



## III.1

# *S*-nitrosotioles : antecedentes, propiedades generales y reactividad

Los *S*-nitrosotioles (RSNOs), también conocidos como tionitritos, resultan ser mucho menos conocidos que sus parientes, los alquilnitritos, esto es en parte debido a su gran inestabilidad. Tal como se ha mencionado en la introducción general (I.1.3), fueron sintetizados por primera vez en 1909 [1]. Sin embargo, el interés en ellos recién surgió a partir de los 90'. No es una coincidencia este resurgimiento con el descubrimiento de las novedosas funciones asociadas al NO. El particular interés en estas moléculas se podría decir que tiene su fundamento en las siguientes razones:

- RSNOs han sido detectados *in vivo* y se piensa que están involucrados en muchas de las funciones asociadas al NO, posiblemente a través de mecanismos de transporte y almacenamiento de éste último.
- Tienen un potencial uso médico como moléculas donoras de NO.

A lo largo de ésta sección veremos algunas de sus propiedades, sus métodos de preparación, y aspectos sobre su reactividad.

### III.1.1. Propiedades

#### Aspectos generales

Los RSNOs son compuestos sólidos o líquidos muy coloreados, los mismos se obtienen por nitrosación de tioles primarios (rojos), secundarios (rojos-rosados) o terciarios (verdes).

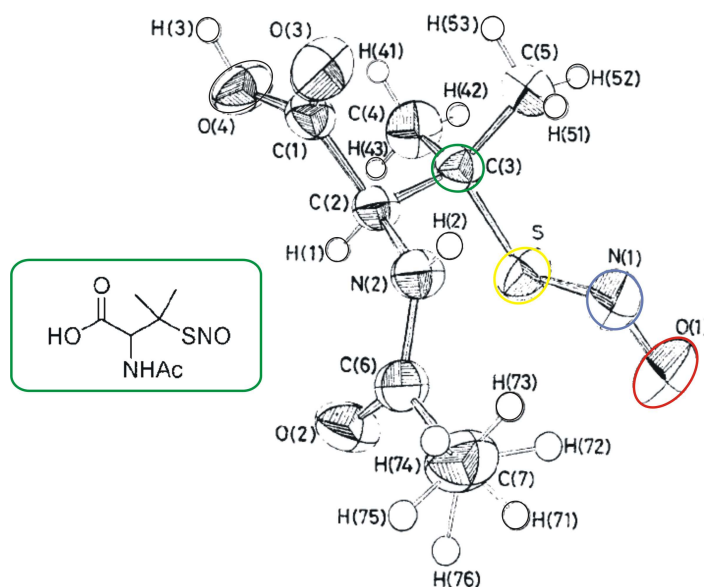


Figura III.1.1: Estructura cristalina del SNAP.

Los *S*-nitrosotioles terciarios resultan ser en general más estables que los primarios o secundarios. RSNOs pequeños (derivado de la cisteína), aquellos de tamaño mediano (derivado del glutatión) así como RSNOs de proteínas, han sido detectados en sangre.

Son pocos los tioles que han sido aislados como sólidos, en la sección I.1.3 de la introducción general hemos nombrado algunos de ellos. El primero en ser aislado como sólido fue el SNAP (Figura III.1.1), éste puede ser almacenado durante años a temperatura ambiente siempre y cuando se lo mantenga en un recipiente cerrado y protegido de la luz. En todos los casos, el disulfuro es el producto de descomposición más importante. Disueltos en buffers fisiológicos se descomponen rápidamente dando lugar a la formación del disulfuro y NO. Otros productos pueden originarse dependiendo esto de la naturaleza del tiol, buffer, etc. La estabilidad en solución varía en función de la temperatura, pH, oxígeno, nucleófilos, especies redox y contenido de metales. En resumen, podemos itemizar las siguientes propiedades:

- Sólidos o líquidos coloreados.
- Sensibles a la luz.
- Se descomponen en presencia de trazas de metales (Cu(I)/Cu(II), Fe(II)).
- Muy sensibles a la humedad.
- Valores de pH bajos incrementan su estabilidad.
- Muy sensibles al ataque de nucleófilos, especial cuidado al seleccionar el buffer.

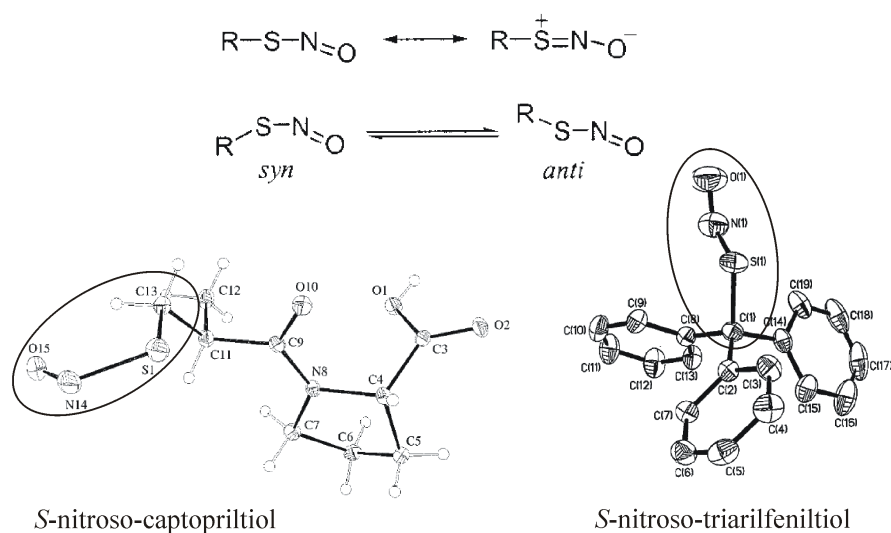


Figura III.1.2: Isómeros conformacionales *syn* y *anti* para los RSNOs.

## Caracterización espectroscópica y estructural

**Difracción de rayos X.** Esta técnica es particularmente útil en lo que respecta a las orientaciones que puede adoptar la unidad C-S-N-O. El enlace S-NO posee un importante carácter de doble enlace debido a la deslocalización del par de electrones del átomo de azufre sobre la unidad S-N-O. Surge por lo tanto, la posibilidad de que existan dos isómeros, *syn* y *anti* [2]. (Figura III.1.2) La preferencia por uno u otro isómero depende del tipo de RSNO, por ejemplo los RSNOs terciarios prefieren el isómero *anti* mientras que los primarios prefieren el *syn* (ver Tabla III.1.1). Cálculos DFT sobre  $\text{Ph}_3\text{CSNO}$  [3] muestran que el isómero *anti* es en este caso, apenas más estable que el *syn* por unas 0.15 kcal/mol. Cálculos sobre  $\text{CH}_3\text{SNO}$  y  $\text{EtSNO}$  muestran preferencia por el isómero *syn*. La barrera de interconversión calculada está estimada en  $\sim 11$  kcal/mol.

**Espectroscopía UV-visible.** El espectro UV-Visible muestra tres bandas, dos de ellas muy intensas en la zona UV y una débil en la región visible. La primera banda se encuentra localizada alrededor de los 225-261 nm ( $\epsilon \sim 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), la misma se atribuye a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  [4]. La segunda banda se encuentra alrededor de 330-350 nm ( $\epsilon \sim 10^3 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), ésta se atribuye a la transición permitida  $n_{\text{O}} \rightarrow \pi^*$  [5]. La tercera banda está situada alrededor 550-600 nm ( $\epsilon \sim 20 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y presenta un hombro, dicha banda es atribuida a la transición prohibida  $n_{\text{N}} \rightarrow \pi^*$ . Esta última banda es la responsable del color del RSNO y junto con la segunda, usualmente son utilizadas para monitorear reacciones en las que están involucrados los RSNOs. Tal como se ha mencionado, esta banda presenta un hombro para todos los RSNOs y este hombro es atribuido a la coexistencia de los dos isómeros. (ver Tabla III.1.1)

**Espectroscopía RMN.** En los espectros  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN se observa un corrimiento



Tabla III.1.1: Tabla isómeros syn y anti para los RSNOs.

RSNO	$\Delta G_{relativo}^a$ (kcal/mol)	[anti]/[syn] <sup>b</sup> (calc.)	[anti]/[syn] <sup>c</sup> (exp.)	<sup>15</sup> N RMN <sup>d</sup> (calc.)	Promedio	<sup>15</sup> N RMN <sup>e</sup> (exp.)	Promedio	$\lambda_{max}^f$ (calc.)	$\lambda_{max}$ , visible (exp.)
CH <sub>3</sub> SNO		0.27			381.2				
syn	0			365.9				520.1	
anti	0.78			438.1				556.9	
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> SNO		0.47	0.37		398.7		397.0		<i>rojo</i>
syn	0			378.4		378.4		531.0	520
anti	0.45			441.8		447.2		561.2	552
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHSNO		0.84	0.43		405.1		401.5		<i>rojo</i>
syn	0			378.4		381.9		532.6	524
anti	0.11			436.8		446.7		560.4	556
(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CSNO		7.69	4.78		470.5		452.4		<i>verde</i>
syn	1.19			419.5		403.3		571.2	550
anti	0			477.1		462.7		591.6	596

<sup>a</sup>B3LYP/6-311+G\*. <sup>b</sup>Estimado suponiendo distribución de Boltzmann 298K. <sup>c</sup>298K. <sup>d</sup>GIAO-B3LYP/6-311++G(3df,2df,2p)//B3LYP/6-311+G\*, Referencia: nitrometano, <sup>e</sup>Referencia: nitrometano, <sup>e</sup>183K. <sup>f</sup>TD-B3LYP/6-311++G(3df,2df,2p)//B3LYP/6-611G\*.

a campos bajos para los protones  $\alpha$  ( $\sim 1$  ppm) y carbonos  $\alpha$  ( $\sim 7-13$  ppm) del tiol luego de ocurrida la nitrosación. En lo que se refiere a  $^{15}\text{N}$  RMN, para RSNOs los desplazamientos aparecen alrededor de 730-790 ppm (Referencia: amoníaco líquido) o 350-410 ppm (Referencia: nitrometano) [6]. En todos los casos debido a la coexistencia de los dos isómeros conformacionales la señal es ancha a temperatura ambiente, a  $-50$  °C ya comienzan a distinguirse dos señales. En la Tabla III.1.1 se muestran los valores para cada isómero, para estos RSNOs los espectros fueron tomados a  $-115$  °C.

**Espectroscopía FTIR.** Esta espectroscopía es particularmente útil para la identificación del grupo *S*-nitroso. Para la mayoría de los RSNOs, la frecuencia de estiramiento del enlace N-O ( $\nu_{NO}$ ) generalmente aparece en el rango 1480-1530  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que la frecuencia de estiramiento S-N ( $\nu_{SN}$ ) se encuentra alrededor de 650-670  $\text{cm}^{-1}$  y es menos intensa [3, 5, 7].

## Electroquímica

La electroquímica indica que los RSNOs exhiben un único pico de reducción irreversible controlado por difusión, [8]. Si bien existe poca información en literatura sobre la reducción electroquímica de los RSNOs, se ha sugerido que esta ocurre a través de la formación de un intermediario ( $\{RSNO\}^{\bullet-}$ ) [3], el que luego decae y da lugar a la formación de  $\text{NO}^{\bullet}$  y tiolato. Los potenciales medidos que se muestran en la Tabla III.1.2, se asignarían entonces a la reacción:



Los potenciales de reducción son bastante más negativos que los correspondientes al  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ( $-0.3$  V vs NHE, pH=7) y Ascorbato/dehidroascorbato ( $+0.06$  V vs NHE, pH=7), por ejemplo. Esto sugiere que en el mecanismo de liberación de NO ante estos reductores, no ocurre vía un mecanismo que involucre una transferencia electrónica directa al RSNO. (Tabla III.1.2)

Existe una correlación lineal entre los valores de potenciales de reducción y los pKa, indicando que cuanto más fácil sea para el tiol estar como tiolato, más fácil será la reducción del correspondiente RSNO.

## III.1.2. Síntesis, aspectos generales

La síntesis de RSNOs implica la reacción del tiol correspondiente (RSH) y derivados de la oxidación del NO como  $\text{NO}_2$  ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ),  $\text{N}_2\text{O}_3$  y  $\text{NO}_2^-$  ( $\text{NO}^+$ ,  $\text{H}_2\text{NO}_2^+$ ). El NO como tal, reacciona con los tioles originando disulfuros y  $\text{NO}^-$ , y no RSNOs (ver Figura I.1.4, pág. 7).

Tabla III.1.2: Potenciales de reducción para distintos RSNOs y pKa para los respectivos tioles medidos por Hou y colaboradores.

RSNOs	Ep, V	pKa (tiol)
S-nitroso-l-cisteína etil ester	-0.80	6.5
S-nitroso-l-cisteína	-0.99	8.3
S-nitroso-glutati3n	-0.98	8.7
S-nitroso-mercaptoetanosulfonato	-1.05	9.1
S-nitroso-N-acetil-l-cisteína	-1.14	9.5
S-nitroso-3-mercaptopropianato	-1.08	10.2
S-nitroso-ácid0 mercaptoacético	-1.14	10.3

S3lo se logra obtener RSNOs, utilizando NO en presencia de ox3geno o alg3n otro oxidante. De hecho, la *S*-nitrosaci3n ocurre como consecuencia de la formaci3n de alguno de los 3xidos mencionados previamente [9]. Existen tres m3todos para preparar RSNOs:

1. *Nitritos inorgánicos* en medio acuoso ácid0: es el m3todo m3s ampliamente usado, se trabaja a bajas temperaturas ( $<4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), usando HCl, en presencia de EDTA (quelante de los iones metálicos que catalizan su descomposici3n). La reacci3n se realiza en relaci3n agente nitrosante/RSH estequiométrica, el agregado de exceso de agente nitrosante puede conducir a la oxidaci3n del tiol o del RSNO y a la N-nitrosaci3n en el caso de aminotioles.
2. *Óxidos de nitr3geno*, NO<sub>2</sub> (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: es un m3todo utilizado para preparar RSNOs poco polares. Se trata el tiol con N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> usando como solventes cloroformo o tetracloruro de carbono. Tambi3n se trabaja en fr3o y en cantidades estequiométricas.
3. *Alquilnitritos*: es un m3todo muy bueno y selectivo en el caso de la presencia de aminas primarias [7], los m3s usados son el terbutilnitrito y el etilnitrito. Es muy utilizado para sintetizar RSNO solubles en solventes orgánicos, tambi3n se trabaja a bajas temperaturas y en cantidades estequiométricas.

Para todos los casos, independientemente de cuál estrategia de s3ntesis se elija, los RSNOs deben ser almacenados protegidos de la luz, en atm3sfera de arg3n o nitr3geno y a baja temperatura ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Algunos, como los RSNOs mencionados en la introducci3n general, resultan ser f3ciles de aislar y otros extremadamente dif3ciles o imposibles debido a su r3pida descomposici3n. Para estos 3ltimos se recomienda que sean preparados en el momento de ser usados.

### III.1.3. Reactividad

#### (a) *Descomposición.*

**Térmica y fotoquímica.** Los RSNOs se descomponen espontáneamente y al ser calentados originando la formación del disulfuro y liberación de NO (Ec. III.1.2).



La descomposición probablemente involucre tanto la ruptura homolítica como la heterolítica de la unión S-N (Figura III.1.3). Según estudios realizados previamente [10, 11], la ruptura homolítica requiere menor energía que la heterolítica. En la Figura III.1.4 se mues-

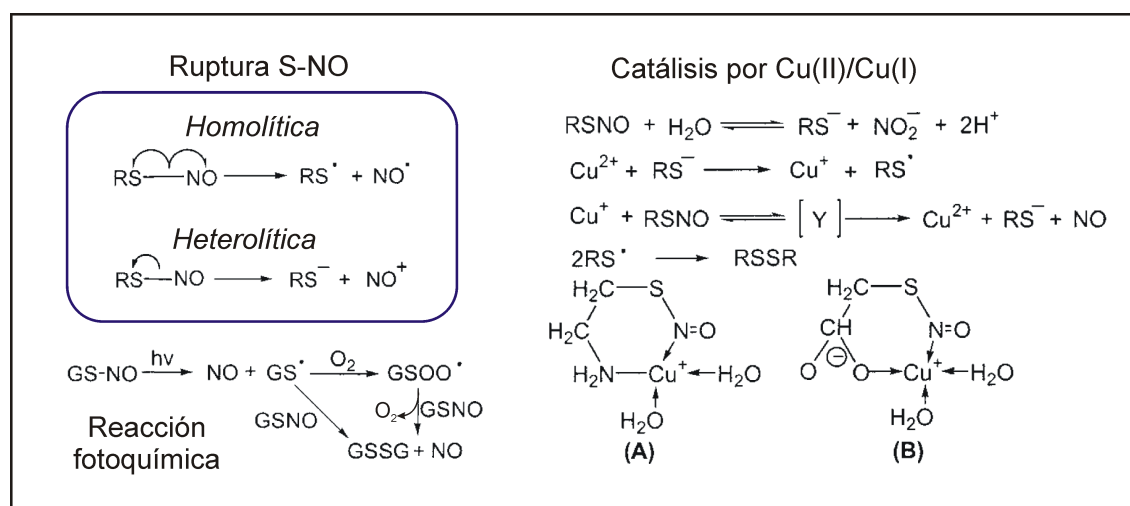


Figura III.1.3: Descomposición de RSNOs.

tran varios datos relevantes tanto experimentales como calculados, y una forma de estimar, mediante la utilización de un ciclo termodinámico, la energía para la ruptura heterolítica a partir de datos experimentales. Tal como puede observarse en la Tabla III.1.4, la ruptura heterolítica ( $\sim 50$  kcal/mol) siempre requiere más energía que la homolítica ( $\sim 20$  kcal/mol). Este hecho es interesante ya que indica que estas moléculas tienen una excelente capacidad para reaccionar con el  $\text{NO}^+$ , almacenarlo como tal y liberarlo como  $\text{NO}^\bullet$ . Es por esta razón que los efectos biológicos producidos por los RSNOs han sido atribuidos a la ruptura homolítica de la unión S-N, que como consecuencia da origen al  $\text{NO}^\bullet$ . Otro detalle digno de notar es que para los compuestos aromáticos la ruptura homolítica requiere menor energía, esto se puede observar en la tabla de la Figura III.1.4, a estos valores podemos agregarles otros valores medidos para tioles no aromáticos: 28.9 kcal/mol ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{SNO}$ ) y 31.6 kcal/mol ( $\text{c-C}_6\text{H}_{11}\text{SNO}$ ) [11].

La misma reacción ocurre fotoquímicamente, y ha sido extensamente estudiada. Irradiando *S*-nitrosoglutatión (GSNO) a las longitudes de onda 340 o 545 nm se libera NO en un proceso que es aproximadamente de primer orden [12]. Estos resultados son consistentes con el mecanismo planteado en la Figura III.1.3 , para la reacción fotoquímica. El radical tiol reacciona con oxígeno produciendo un radical peroxi el que también reacciona con el RSNO para dar RSSR y NO.

RSNO	pK <sub>a</sub> <sup>a</sup>	Δ <i>H</i> <sub>rxn</sub> <sup>b</sup> (kcal/mol)	Δ <i>H</i> <sub>het</sub> <sup>c</sup> (kcal/mol)	<i>E</i> <sub>ox(S<sup>-</sup>)</sub> <sup>d</sup> (V)	Δ <i>H</i> <sub>homo</sub> (kcal/mol)	
					exptl <sup>e</sup>	calcd <sup>f</sup>
<b>1 G-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>S-NO</b>						
G = 4-H	20.0	-22.0 ± 0.6	49.2 ± 1.2	-0.427 ± 0.005	19.4 ± 1.3	20.2
4-MeO	20.9	-25.0 ± 0.9	53.5 ± 1.7	-0.546 ± 0.010	21.0 ± 1.9	18.4
4-Cl	19.0	-21.4 ± 0.7	47.2 ± 1.3	-0.351 ± 0.004	19.2 ± 1.4	19.7
3-Cl	18.4	-21.7 ± 0.7	46.6 ± 1.3	-0.250 ± 0.004	20.9 ± 1.4	20.4
2-Cl	18.3	-20.7 ± 0.8	45.6 ± 1.4	-0.275 ± 0.003	19.3 ± 1.5	20.5
4-Me	20.5	-24.8 ± 0.5	52.7 ± 1.1	-0.494 ± 0.004	21.4 ± 1.2	19.6
3-Me	20.3	-23.5 ± 0.5	51.1 ± 1.1	-0.491 ± 0.005	19.9 ± 1.2	19.7
4-NO <sub>2</sub>	15.3	-18.4 ± 0.7	39.3 ± 1.3	-0.035 ± 0.008	18.6 ± 1.5	20.9
<b>2 RS-NO</b>						
R = <i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	27.5	-20.3 ± 0.5	57.6 ± 1.1	-0.549 ± 0.005	25.0 ± 1.2	27.5
PhCH <sub>2</sub>	25.0	-22.0 ± 0.4	56.0 ± 1.0	-0.440 ± 0.005	25.9 ± 1.1	28.8

$RS-NO + H^+ \longrightarrow RS-H + NO^+ \quad -\Delta H_{rxn}$   
 $RS-H \longrightarrow RS^- + H^+ \quad pK_a$   
 $RS^- \longrightarrow RS + e^- \quad E_{ox}(RS^-)$   
 $NO^+ + e^- \longrightarrow NO \cdot \quad E(NO^+/NO)$   
 $RS-NO \longrightarrow RS^- + NO \cdot \quad \Delta H_{homo}(S-NO)$

$\Delta H_{het}(S-NO) = 1.364 pK_a - \Delta H_{rxn} \quad (\text{kcal/mol}) \quad (1)$

$\Delta H_{homo}(S-NO) = 1.364 pK_a - \Delta H_{rxn} + 23.06 [E(NO^+/NO) - E_{ox}(RS^-)] \quad (\text{kcal/mol}) \quad (2)$

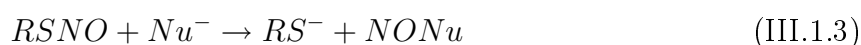
<sup>a</sup>Obtenido a partir de pK<sub>a</sub> (MeCN) = 0.982 pK<sub>a</sub> (DMSO) + 9.94 (Izutsu, K. Acid-Base Dissociation Constants in Dipolar Aprotic solvents, IUPAC Chem. Data Ser. No.35; Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1990). <sup>b</sup>Medido en MeCN a 25°C por titulación calorimétrica. <sup>c</sup>Derivado de la ecuación (1). <sup>d</sup>Medido en MeCN a 25°C por voltametría cíclica vs la cupla ferrocenium/ferroceno. <sup>e</sup>Derivado de la ecuación (2) y tomando *E*<sub>1/2</sub>(NO<sup>+</sup>)=0.863V. <sup>f</sup>Calculado: B3LYP/6-31+G\*.

Figura III.1.4: Ruptura Heterolítica vs Homolítica.

**Catalizada por metales.** La descomposición de los RSNOs en solución acuosa es catalizada por iones metálicos como Cu(I)/Cu(II), Fe(II), Hg(II) y Ag(I) [13, 14, 15]. Dado que el cuerpo humano contiene 0.1 gr de Cu(I/II)/75 Kg, la descomposición catalizada por cobre ha sido ampliamente estudiada. En la Figura III.1.3 se muestra el mecanismo planteado donde se postula la presencia de una especie intermediaria (Y: A , B). En la presencia de quelantes como el EDTA, neocuproína, la descomposición de los RSNOs por esta vía se ve inhibida como consecuencia de la formación del complejo Quelante-Metal [16].

### (b) Reacción con nucleófilos.

Estos compuestos reaccionan con nucleófilos (Nu<sup>-</sup>) vía el átomo de nitrógeno, generando la especie NONu (Ec. III.1.3 ), la que puede resultar ser un producto estable o seguir reaccionando. El otro producto de la reacción, el tiolato, en presencia de aire se termina oxidando para generar el disulfuro.



Existen una amplia cantidad de nucleófilos capaces de reaccionar con los RSNOs, entre ellos podemos mencionar: RS<sup>-</sup>(transnitrosación), RR'NH, NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>OH, N<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>,

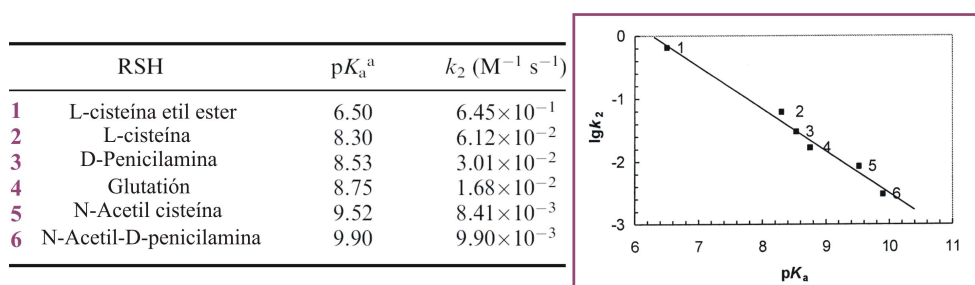
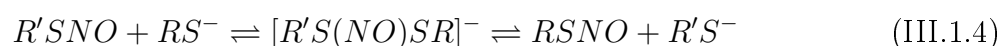


Figura III.1.5: Dependencia con el pH para la reacción de transnitrosación de la S-nitroso seroalbúmina bovina con distintos tioles. <sup>a</sup>[19]

$S_2^{-2}$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  (superóxido) y ascorbato [17, 18]. En lo que sigue veremos dos reacciones vinculadas a la liberación de NO, la reacción con los tioles y el ascorbato. Diremos también unas palabras sobre la reacción con el superóxido.

**Tioles: " Reacción de transnitrosación "**. Se propone que es una reacción reversible y que obedece una cinética de primer orden en ambos reactivos (RSH y RSNO):



Como resultado del ataque del tiolato al RSNO se transfiere el grupo NO de un tiol a otro [9].

- Obedece una cinética de segundo orden. Ley de velocidad [5]:

$$v = k[RSNO][RS^-] \quad (III.1.5)$$

- Paso lento: formación del intermediario  $[R'S(NO)SR]^-$  [5].
- La especie que ataca es el tiolato: la reacción va a depender del carácter nucleofílico del tiolato y del pH al cual se lleva a cabo la reacción [19] (Figura III.1.5).

En general las constantes de velocidad medidas para reacciones de transnitrosación van desde valores de  $3 \times 10^{-1}$  a  $8 \times 10^{-3} M^{-1}s^{-1}$ . En la Figura III.1.5, se muestra la dependencia de la constante con el pH y en la tabla se puede observar el rango de valores mencionado para la constante de velocidad.

En la Tabla III.1.3, se muestran valores medidos para la constante de equilibrio a 25 °C para la reacción entre el SNAP y diferentes tioles. Traducidos en  $\Delta G^\circ$  estos valores van desde -1.26 a 0.22 kcal/mol [19].

Con el tiempo, debido a la inestabilidad de los RSNOs y dependiendo de varios factores como: la relación  $RS^-/RSNO$ , la presencia de oxígeno en el medio, estas reacciones terminan

Tabla III.1.3: Constantes de equilibrio medidas a 25 °C para la reacción de trasnitrosación entre SNAP y diferentes tioles.

Tiol	$K_{eq}$
2-mercapto etanol	8.44
ácido 3-mercaptopropiónico	5.04
2-propentiol	5.04
L-cisteína etil ester	4.99
cisteinamina	3.89
L-cisteína	3.63
Glutati3n	3.34
N-acetil-cisteína	1.47

originando otros productos como disulfuros, amoníaco, NO, hidroxilamina, N<sub>2</sub>O, sulf3xidos, etc [20, 21].

**Ascorbato.** El ascorbato reacciona con los tioles de dos formas diferentes seg3n sea la relaci3n RSNO/ascorbato. 1) *Defecto de ascorbato*: act3a como agente reductor llevando el Cu(II) a Cu(I), catalizando de esta forma la descomposici3n, el producto mayoritario es el disulfuro. 2) *Exceso de ascorbato*: act3a como reductor O-nitros3ndose y conduce a la formaci3n de NO, tiolato y dehidroascorbato [5].

**Super3xido.** La velocidad de la reacci3n de los RSNOs con el super3xido es varios3rdenes de magnitud menor que la correspondiente a la reacci3n con el NO, la cual es difusional. En vista de esto podr3amos decir que los RSNOs proveen una forma de almacenamiento del NO protegi3ndolo de la reacci3n con el super3xido, por ejemplo [5].

**Resumiendo.** Existen varios procesos reactivos en los que est3n involucrados los RSNOs, dichos procesos incluyen, dimerizaci3n para formar disulfuros, aductos con nucle3filos, procesos catal3ticos que involucran iones met3licos, especies oxigenadas y enzimas. Como corolario podemos decir que; estos procesos reactivos controlan su concentraci3n y su disponibilidad *in vivo*.

En las siguientes secciones se mostrar3 la s3ntesis y algunas propiedades del *S*-nitrosotiol derivado de la L-cisteína etil ester, la *S*-nitroso-L-cisteína etil ester (SNO-CEE). Luego, se har3 uso de este nitrosotiol para el estudio te3rico-experimental de la reacci3n de transnitrosaci3n: medida de su barrera e identificaci3n y caracterizaci3n del intermediario de reacci3n.

## III.2

# *S*-nitroso-L-cisteína etil ester (*SNO*-CEE)

En esta sección se mostrará la síntesis y algunas propiedades del *S*-nitrosotiol derivado de la L-cisteína etil ester, la *S*-nitroso-L-cisteína etil ester (*SNO*-CEE). La elección de este RSNO se basó en las siguientes razones:

- Estaba previamente descrito en literatura, aunque no caracterizado en forma completa [22].
- Ofrecía posibilidades de ser aislado como sólido.
- Soluble tanto en agua como en solventes orgánicos.

Se decidió entonces, preparar este RSNO, estudiar sus propiedades y completar su caracterización con el fin de usarlo luego para el estudio de la reacción de transnitrosación.

### III.2.1. Preparación de *SNO*-CEE

Para la síntesis de este RSNO se utilizó el tercer método descrito en la sección III.1.2 (pág. 55-56). Tal como se muestra en el Figura III.2.1 se hizo reaccionar etilnitrito con la L-cisteína etil ester utilizando metanol como solvente de reacción. Se debieron hacer varias modificaciones a la síntesis descrita en bibliografía [22], debido a que tal como figuraba en el trabajo citado, el rendimiento era mínimo y en algunos casos nulo. Estas modificaciones se describen a continuación en la sección experimental. (pág. 68-69)

Una vez aislado, el sólido se guardó en freezer bajo atmósfera de argón y protegido de la luz. En dichas condiciones, el sólido resiste varias semanas, sin embargo se prefirió prepararlo inmediatamente antes de utilizarlo. El compuesto es extremadamente sensible a la humedad,



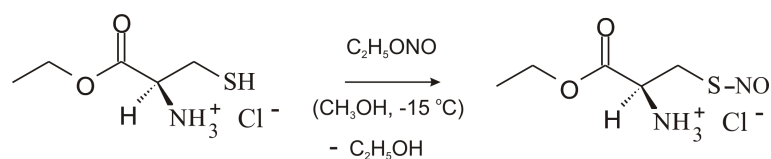


Figura III.2.1: Obtención de SNO-CEE.

una vez disuelto en agua se descompone en el lapso de 3-4 horas; este período se puede extender con el agregado de EDTA. Disuelto en metanol, la situación cambia notablemente, a temperatura ambiente se descompone casi en su totalidad luego de 1-2 días, guardado en freezer puede persistir hasta un par de semanas en buen estado. Por lo visto, en metanol no operan las vías de descomposición que lo hacen en agua, y gracias a ésto se conserva mejor en este solvente.

La SNO-CEE fue preparada usando etilnitrito y eventualmente butilnitrito. Ambos alquilnitritos debieron ser preparados en el laboratorio, para ello se siguió la metodología descrita en el libro de Vogel [23] con algunas modificaciones que se indican en la sección experimental. En lo que concierne al etilnitrito, su preparación exigió bastante cuidado. Dado que tiene un punto de ebullición de 16.5 °C se debió trabajar a baja temperatura (aproximadamente -20 °C), lo cual requirió una manipulación cuidadosa del compuesto para obtener un rendimiento óptimo. La preparación y manipulación de butilnitrito es mucho más sencilla debido a su mayor punto de ebullición (76.5-77.5 °C) pero presenta la desventaja que el butanol (producto de la reacción) y el eventual exceso de butilnitrito dificultan el aislamiento y la estabilidad de la SNO-CEE. Sólo se utilizó el butilnitrito en los casos que se trabajó con nitrito marcado, ya que era posible prepararlo en microescala con buen rendimiento, hecho que era más dificultoso con el etilnitrito. Los alquilnitritos se descomponen lentamente y deben ser almacenados en frío, es preferible que sean utilizados en el lapso de dos semanas luego de preparados.

### III.2.2. Caracterización espectroscópica de SNO-CEE

Tal como se mencionó anteriormente, la caracterización de este RSNO era hasta el momento incompleta, por lo que se requirió completarla.

**Espectro UV-visible.** Al igual que todos los RSNOs descriptos previamente el espectro presenta las bandas características. En la Figura III.2.2 se puede ver el espectro en agua con las bandas características señaladas junto con sus correspondientes coeficientes de absorptividad molar.

**Espectroscopía RMN.** En la Figura III.2.3 muestran los espectros <sup>1</sup>H RMN correspondientes al tiol (CEE) y SNO-CEE junto con sus asignaciones. Como ya se ha mencionado

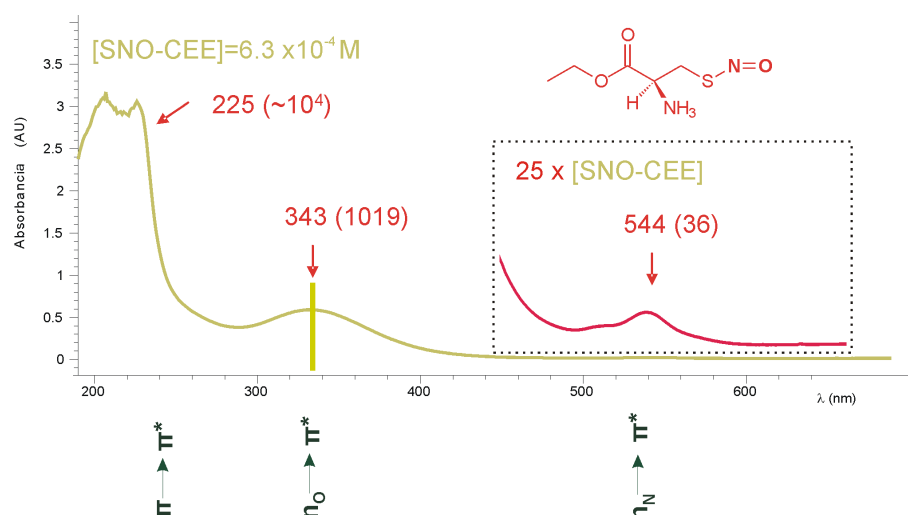


Figura III.2.2: Espectro UV-visible de SNO-CEE,  $\lambda_{max.}$  : nm, ( $\epsilon$  :  $M^{-1}cm^{-1}$ ).

previamente, el SNO-CEE es bastante sensible (luz, humedad, oxígeno, trazas de metales). Con el objeto de asegurar la mínima descomposición, la SNO-CEE se generó *in situ* en el medio de reacción, por esta razón es que en el espectro de RMN aparece el etanol, el cual se produce como resultado de la formación de la SNO-CEE. En la Figura III.2.4, se muestra el espectro del disulfuro producto de la descomposición del RSNO en ausencia total de oxígeno. En la Tabla III.2.1, se muestran las asignaciones para las señales que aparecen en los espectros  $^1H$  RMN y  $^{13}C$  RMN. Para la asignación de las señales correspondientes al carbono se midieron los DEPT-135 correspondientes.

Tabla III.2.1: Desplazamientos químicos ( $\delta$ (ppm)) para *CEE*, *SNO-CEE* y el disulfuro de *CEE*. 500 MHz, referencia: señal residual del solvente (3.31ppm)

$^1\text{H}$ RMN				$^{13}\text{C}$ RMN			
H	<i>CEE</i> <sup>a</sup>	disulfuro- <i>CEE</i> <sup>a</sup>	<i>SNO-CEE</i> <sup>a</sup>	C	<i>CEE</i> <sup>a</sup>	disulfuro <sup>a</sup>	<i>CEE-SNO</i> <sup>a</sup>
(a) <sup>b</sup>	3.14-3.19(2H, dd)	3.46-3.47(4H, dd)	4.39-4.41(2H, m)	(a)	25.40	38.26	33.37
(b)	4.33-4.34(1H, m)	4.48(2H, t)	4.53(1H, t)	(b)	56.02	53.29	53.91
(c)	4.34-4.39(2H, m)	4.34-4.36(4H, c)	4.25-4.27(2H,c)	(c)	64.41	64.37	64.19
(d)	1.34 (3H, t)	1.36(6H, t)	1.30(3H, t)	(d)	14.71	14.56	14.67
(e)	8.71 (N-H)	8.87 (N-H)	8.89 (N-H)	(C=O)	168.99	169.01	169.20
(f) <sup>c</sup>	2.40 (S-H)	-	-				

<sup>a</sup>Medidos en  $\text{CD}_3\text{OD}$ , EtOH: 1.19 (3H,t), 3.61-3.63(2H, c); 18.2 ( $\text{CH}_3$ ), 58.50 ( $\text{CH}_2$ ). <sup>b</sup>Patrón tipo ABX para carbonos quirales. <sup>c</sup>Al igual que para (e) señal muy ancha debido al intercambio, no aparece en agua.

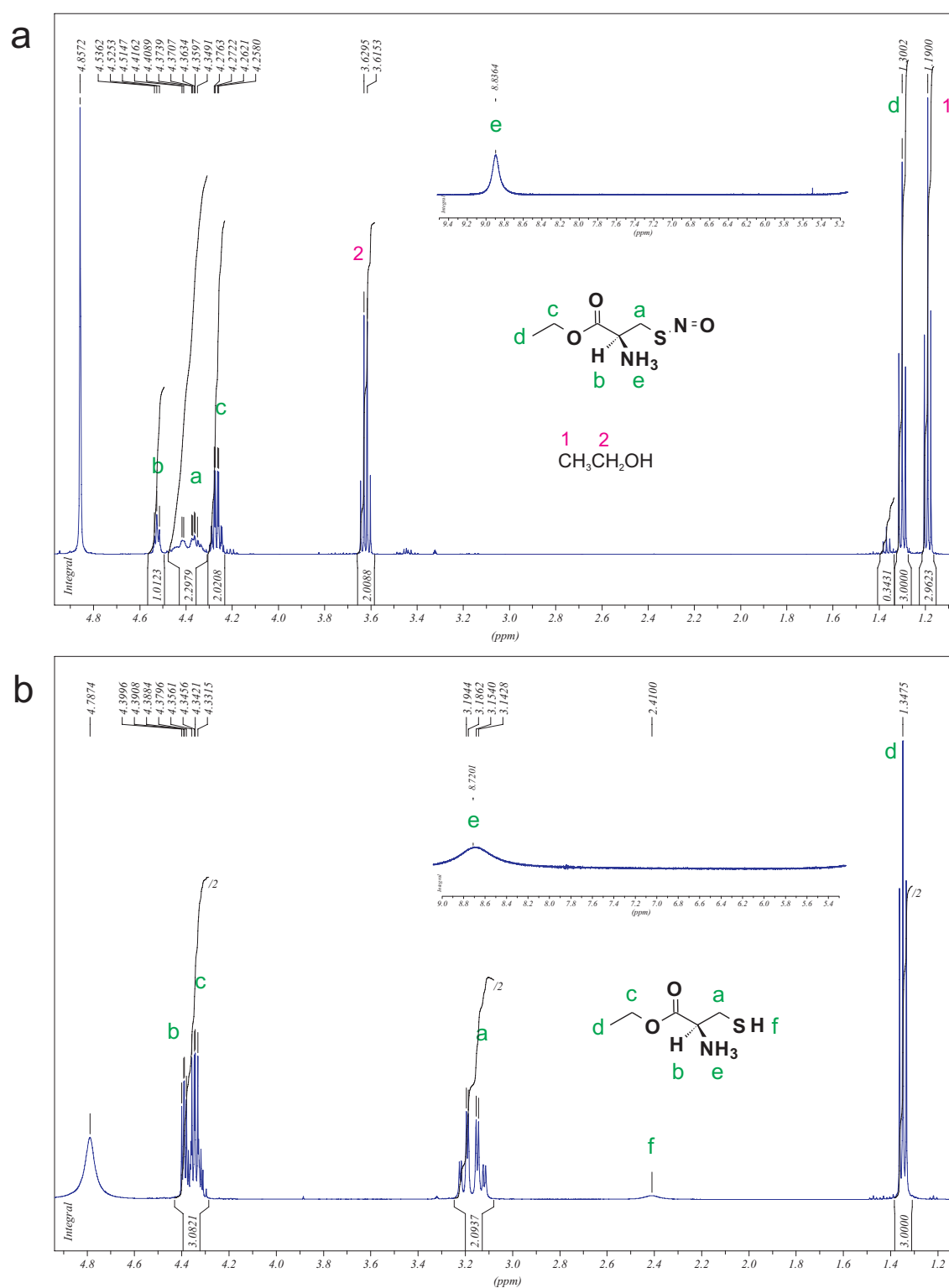


Figura III.2.3: Espectros <sup>1</sup>H RMN correspondientes a SNO-CEE (a) y CEE (b) ; 500 MHz, solvente: CD<sub>3</sub>OD, referencia: señal residual del solvente (3.31 ppm).

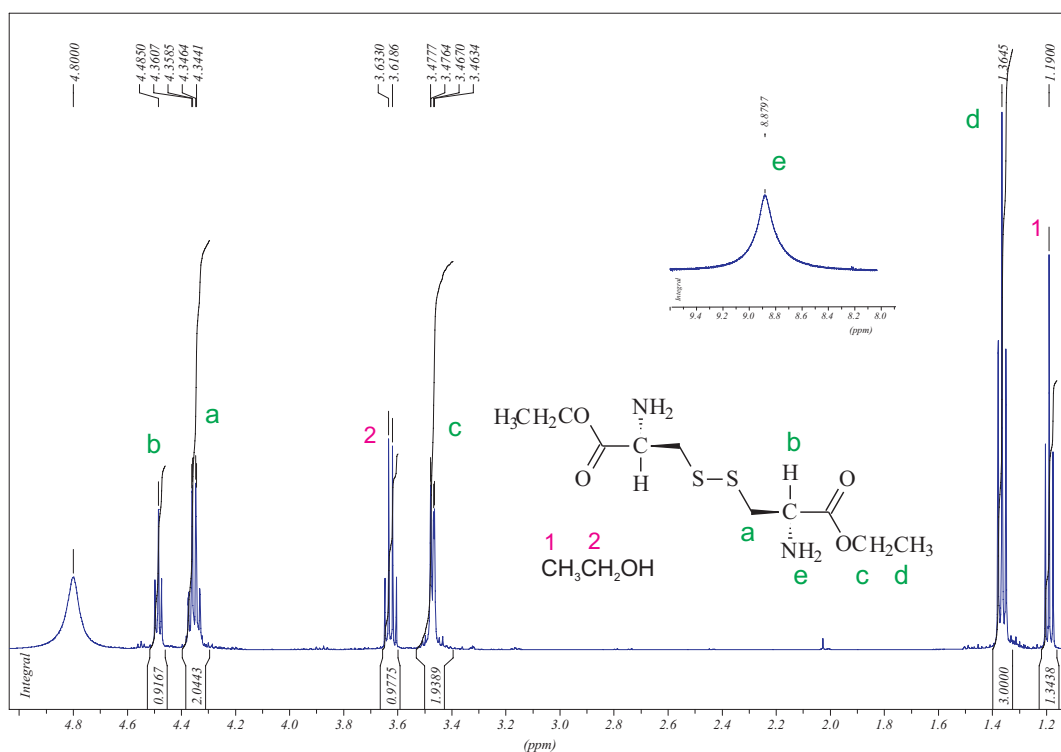


Figura III.2.4: Espectro  $^1\text{H}$  RMN para el disulfuro de la CEE; 500 MHz, solvente:  $\text{CD}_3\text{OD}$ , referencia: señal residual del solvente (3.31 ppm).

En la Figura III.2.5, se muestra el espectro  $^{15}\text{N}$  RMN realizado por primera vez para este RSNO. Se puede observar que la señal medida a temperatura ambiente es ancha, evidenciando la existencia de los dos isómeros conformacionales en solución (*syn* y *anti*), al igual que ocurre con los demás RSNOs (ver Tabla III.1.1, pág 54). Se tomó como referencia el valor de nitrito marcado con respecto a nitrometano (232 ppm) [24].

**Espectroscopía FTIR.** Por primera vez se asignaron los estiramientos  $\nu_{\text{NO}}$  y  $\nu_{\text{SN}}$  en el sólido. En la Figura III.2.6 A se muestra el espectro en KBr para la SNO-CEE y la CEE, es importante observar la desaparición de la banda que corresponde al estiramiento S-H ( $2468\text{ cm}^{-1}$ ) luego de la *S*-nitrosación. En la Figura III.2.6 B, se muestran los espectros correspondientes a la SNO-CEE, la  $\text{S}(^{15}\text{N})\text{O}$ -CEE y el espectro diferencia que muestra las bandas sensibles al isótopo  $^{15}\text{N}$ .

Por último cabe agregar que se intentó cristalizar el RSNO sin éxito. Recientemente y cuando ya se había finalizado de trabajar con este compuesto apareció una publicación en el año 2005 donde se informaba la estructura cristalina del mismo [25]. En la Figura III.2.7 A se muestran los dos isómeros, el componente mayoritario se muestra en líneas llenas, en la parte B se ofrece una vista diferente sólo del componente mayoritario y se compara con C, la estructura optimizada en el presente trabajo utilizando DFT.

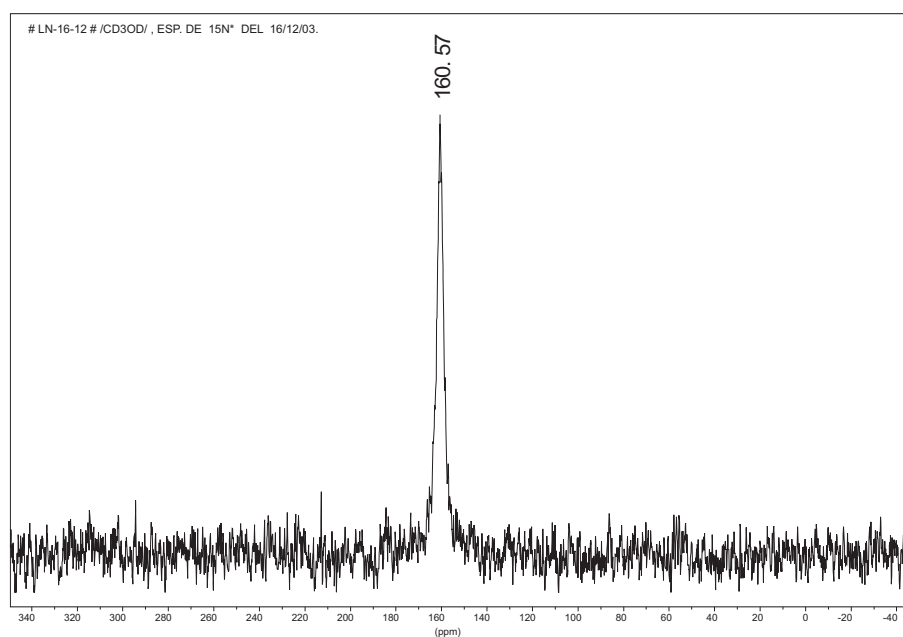


Figura III.2.5: Espectro  $^{15}\text{N}$  RMN para SNO-CEE referido al nitrito (referencia externa), solvente:  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Al valor para la señal se le debe sumar 232 ppm para tener la señal referida a nitrometano (392.57 ppm).

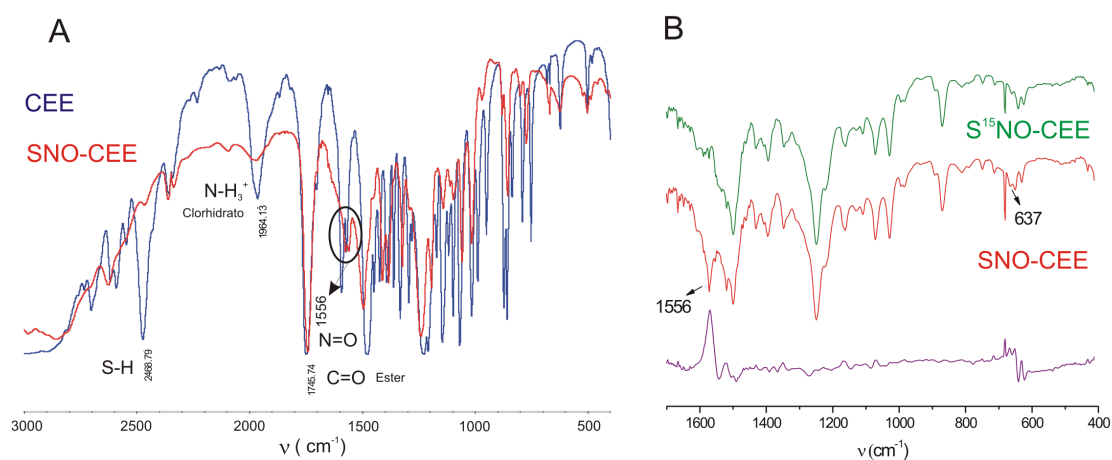


Figura III.2.6: Espectros FTIR para: CEE (azul) y SNOCEE (rojo) (A); y SNO-CEE (rojo) y  $\text{S}^{(15}\text{N})\text{O}$ -CEE (verde) junto con espectro diferencia (B).

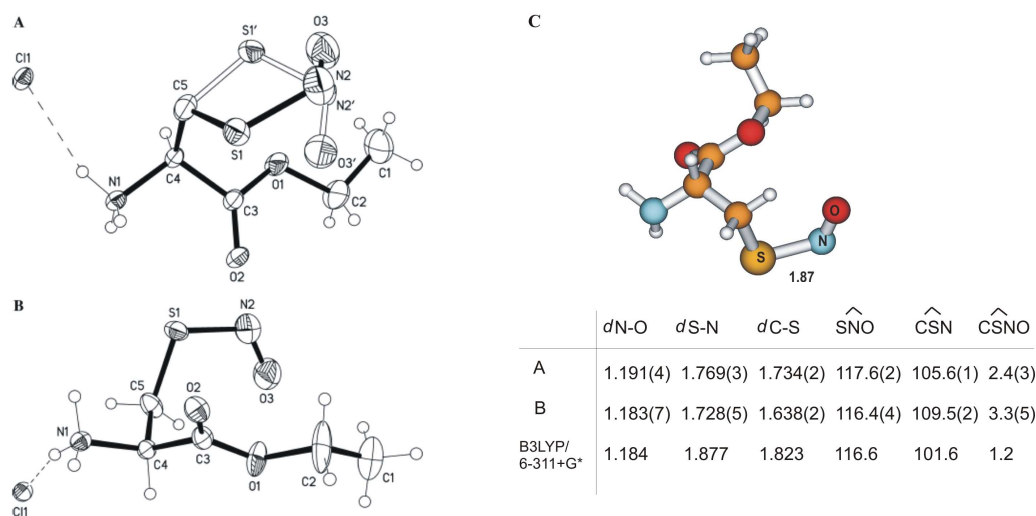


Figura III.2.7: Estructuras cristalinas (A, B) [25] y calculada para *SNO*-CEE, B3LYP/6-311+G\*, distancias (*d*) en Å y ángulos en grados (C).

### Experimental

**Reactivos.** La L-cisteína etil ester fue obtenida de Sigma-Aldrich. El  $\text{NaNO}_2$  fue obtenido de Sigma-Aldrich al igual que el  $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ . Los solventes deuterados ( $\text{CD}_3\text{OD}$  y  $\text{D}_2\text{O}$ ) fueron obtenidos de Aldrich. En todos los casos se utilizó agua MilliQ, EDTA (10 mM) y buffer de fosfato (0.5M). Se trabajó en ausencia de oxígeno usando la técnica de Schlenk o la caja seca. La preparación de los diferentes compuestos se llevó a cabo bajo campana, en especial para los alquilnitritos ya que la inhalación de los mismos es causante de severos dolores de cabeza y puede ocasionar problemas cardíacos.

**Preparación de etilnitrito.** 9.5 g de nitrito de sodio se disolvieron en 30 mL de agua, enfriando en freezer (Solución I). Por otro lado, se enfrió una solución de 7 mL de agua y 8.25 mL de etanol destilado, y se agregó lentamente 3.4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{c})$ , se mantuvo en frío (solución II). En un balón situado en baño de hielo-sal se agregó la solución I, con agitación y se purgó con argón. Una vez que el sistema alcanzó la temperatura aproximada de  $-10^\circ\text{C}$ , se agregó la solución II lentamente, con agitación, durante 30 minutos. Una vez finalizado el agregado se observan dos fases, se separó la fase acuosa, la fase orgánica (etilnitrito, amarillo) se lavó con tres porciones de solución de bicarbonato al 2% (mantenida en freezer). El etilnitrito lavado se guardó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en freezer. En ocasiones se realizó la síntesis en menor escala, partiendo de 2.37 g de nitrito. Cuando se preparó etilnitrito marcado se realizó la síntesis partiendo de 0.18 g de  $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ .

**Preparación de butilnitrito.** 9.5 g de nitrito de sodio se disolvieron en 37.5 mL de agua, enfriando en freezer (Solución I). Por otro lado, se enfrió una solución de 2.5 mL de agua y 11.4 mL de butanol, y se agregó lentamente 3.4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{c})$ , se mantuvo en frío (solución II). En un balón situado en baño de hielo-sal se agregó la solución I, con agitación y se purgó con argón. Una vez que el sistema alcanzó la temperatura aproximada de  $-10^\circ\text{C}$ , se agregó la solución II lentamente, con agitación, durante 45-60 minutos. Una vez finalizado el agregado se mantuvo la agitación por 1.5 horas. Se filtró el sulfato de sodio, se separó la capa superior amarilla de butilnitrito se lavó con tres porciones de solución de bicarbonato al 2% (mantenida en freezer). El butilnitrito lavado se guardó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en freezer. En ocasiones se realizó la síntesis en menor escala, partiendo de 3-4 g de nitrito. Cuando se preparó butilnitrito marcado se realizó la síntesis partiendo de 0.23 g de  $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ .

**Preparación de *SNO*-CEE.** Se disolvió 1 g ( $5.33 \times 10^{-3}$  moles) de L-cisteína etil ester en metanol seco bajo

atmósfera de argón, se enfrió a  $\sim 20$  °C (baño: etanol-agua-sal-nitrógeno líquido). Se agregó 0.4 mL de etilnitrito ( $5.33 \times 10^{-3}$  moles) a la misma temperatura. Inmediatamente se observó la aparición de color rojo intenso, se dejó reaccionar durante 15 min. Se precipitó con acetona bien fría y se secó bajo vacío. Otra alternativa con muy buen resultado consiste en agregar el etilnitrito directamente sobre el sólido en cantidad estequiométrica y guardar en el freezer, al cabo de unos minutos el sólido está completamente rojo, luego se lava con acetona bien fría y se seca al vacío. Se recomienda fuertemente no seguir el procedimiento indicado en el trabajo citado ya que no conduce a buenos resultados particularmente la parte que sugiere emplear el rotavap a 37 °C !!!, temperatura a la que se descompone cualquier RSNO disuelto en solvente. Para obtener el producto marcado ( $^{15}\text{N}$ ) se utilizó el primer procedimiento partiendo de menor cantidad de CEE. Si bien el rendimiento no fue tan bueno, se pudo obtener el producto  $\text{S}^{15}\text{NO-CEE}$  puro.

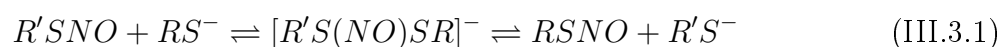




## III.3

# Reacción de Transnitrosación - El Mecanismo

A lo largo de esta sección se estudiará la reacción de transnitrosación, la importancia de esta reacción ya ha sido discutida en secciones anteriores (III.1.3, pág 59). Se propone que es una reacción reversible:



Para comenzar recordemos qué es lo que se sabe acerca de esta reacción:

- Obedece una cinética de segundo orden [5]:  $v = k[RSNO][RS^-]$
- La formación del intermediario constituye el paso lento de la reacción [5]:  $[R'S(NO)SR]^-$
- La especie que ataca es el tiolato: la reacción va a depender del carácter nucleofílico del tiolato y del pH al cual se lleva a cabo. Si consideramos el equilibrio ácido-base para el tiol con su respectiva constante (K), la ecuación de velocidad queda (Ec. III.3.3):



$$v = \frac{kK[RSH]_T[RSNO]}{K + [H^+]} \quad (\text{III.3.3})$$

Donde  $k$  es la constante de velocidad,  $K$  la constante de equilibrio ácido-base y  $[RSH]_T$  la concentración analítica de tiol. Como ya se ha mencionado, debido a la inestabilidad de los RSNOs y dependiendo de varios factores como: la relación  $RS^-/RSNO$ , la presencia de oxígeno en el medio, la temperatura, etc, estas reacciones terminan originando otros productos como disulfuros, amoníaco, NO, hidroxilamina,  $N_2O$ , sulfóxidos, etc [20, 21].

Los objetivos propuestos para esta parte fueron los siguientes:

- Obtener un valor para la barrera energética de esta reacción.
- Estudiar la factibilidad de la existencia del intermediario propuesto.

Para llevar a cabo estos objetivos la estrategia abordada consistió en utilizar métodos de simulación computacional junto con distintas herramientas experimentales.



### III.3.1. Estudio Computacional

En lo que sigue se mostrará el estudio de la reacción de transnitrosación por medio de simulación computacional. El estudio se llevó a cabo de la siguiente forma:

Se seleccionó como modelo de reacción de transnitrosación el metiltiol. Este resulta ser el modelo más simple y por ende el menos costoso posible en lo que respecta a tiempo de cálculo. Se utilizaron diferentes niveles de teoría, métodos *ab initio* (MP2, CCSD) y basados en DFT (B3LYP, BP86). Mediante la optimización de geometrías y cálculo de los modos normales, se caracterizó la superficie de energía potencial identificando mínimos, intermediarios y estado de transición para el sistema aislado y en solución acuosa. Para el modelado del solvente se utilizó el método de solvatación del continuo PCM, previamente descrito en la metodología (II.2.5 y II.2.6).

#### Modelo del Metiltiol

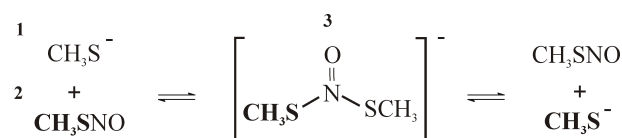


Figura III.3.1: Esquema de reacción para el modelo metiltiol.

Dependiendo del pH y del solvente, el metiltiol (MeSH) se va a encontrar como MeSH o  $\text{MeS}^-$ . En solución acuosa el pK del metiltiol es 10.3, lo que significa que a  $\text{pH}=7$  existirá principalmente como MeSH pero habrá una cantidad significativa de tiolato. Debido a que se ha propuesto que la especie  $\text{RS}^-$  es la especie reactiva, se investigó la reacción de transnitrosación que se muestra en la Figura III.3.1.

*La reacción para el sistema aislado.* Con el objeto de validar la metodología luego empleada, se comenzó calculando los reactivos ( $\text{CH}_3\text{SH}$  y  $\text{CH}_3\text{SNO}$ ), se calcularon los dos posibles

Tabla III.3.1: Parámetros geométricos (distancias y ángulos), y energéticos para los distintos intermediarios.

	Intermediario I	Intermediario II	Intermediario III
dS-N(Å)	2.331/2.331	2.246/2.443	2.242/2.406
dN-O(Å)	1.188	1.176	1.183
$\hat{S}\hat{N}\hat{S}$ (°)	106.29	106.41	105.02
$\hat{O}\hat{N}\hat{S}$ (°)	108.39	110.34	107.46
Energía Relativa a 3-I (kcal/mol)			
MP2/6-31G**	0	— <sup>a</sup>	2.36
BP86/6-31G**	0	4.55	1.78
B3LYP/6-31G**	0	4.37	1.53

<sup>a</sup>No fue encontrado con MP2.

isómeros para el metil-SNO. Se utilizaron distintas combinaciones de métodos y bases y se comparó con valores calculados y experimentales conocidos e informados para los RSNOs en bibliografía [3].

La especie **3**, resultó ser un mínimo estable y fue encontrado en forma independiente con diferentes métodos (MP2, DFT (BP86, B3LYP)). Se consideró la posibilidad de otras especies (ver Figura III.3.2) las que también resultaron ser mínimos, siendo la especie **3-I** la más estable. Tal como se puede observar en la Tabla III.3.1 la formación del intermediario **3-I** está favorecida termodinámicamente para el sistema aislado respecto a los otras dos especies. En lo que sigue nos referiremos a la especie **3-I** simplemente como especie **3**.

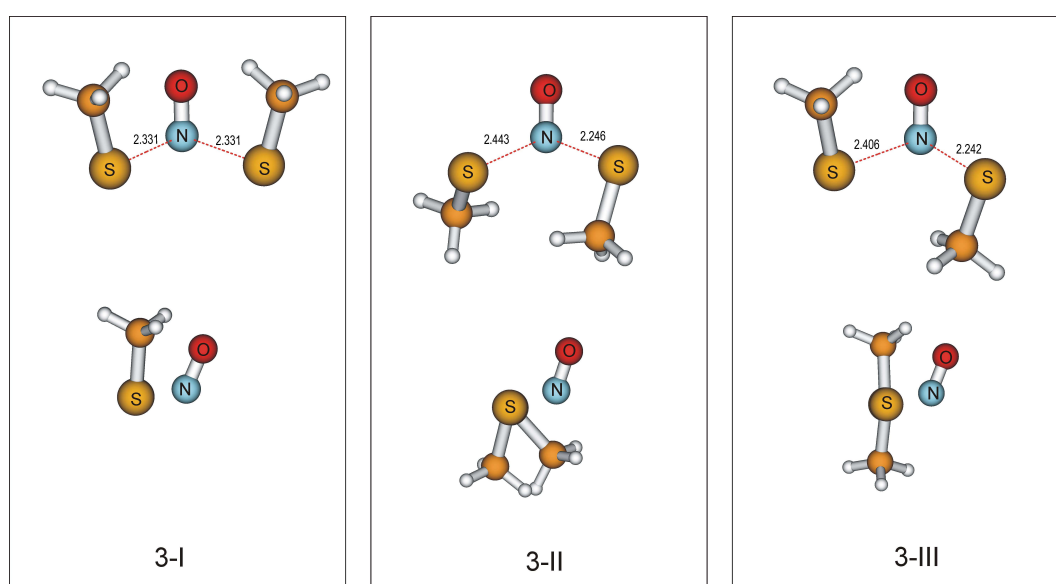


Figura III.3.2: Posibles intermediarios para la reacción de transnitrosación de metiltiol. Vista frente (parte superior) y perfil (parte inferior).

En lo que respecta a la búsqueda del estado de transición, un primer paso consistió en escanear la superficie de energía potencial desde la especie **3** hacia los productos (**1**, **2**). Para esto se realizaron optimizaciones restringiendo la distancia S-N (coordenada de reacción). En la Figura III.3.3 se muestra el resultado obtenido utilizando el método BP86 junto con la base 6-31G\*\*. Se encontró que en fase gaseosa existe un precomplejo (especie **5**) y que el estado de transición (ET, especie **4**) correspondería a una distancia S-N de 3.7 a 3.9 Å.

Según lo que indican los resultados obtenidos del escaneo de la superficie de energía potencial, en la Figura III.3.4, se muestra el esquema que correspondería al perfil de energía para esta reacción de transnitrosación que tiene la peculiaridad que los reactivos y los productos son iguales, por lo que el diagrama es perfectamente simétrico.

Se seleccionó la estructura que correspondería al estado de transición y se utilizó como estructura inicial para la búsqueda del estado de transición utilizando el algoritmo TS, descrito previamente en la metodología general (II.2.4 y II.2.6).

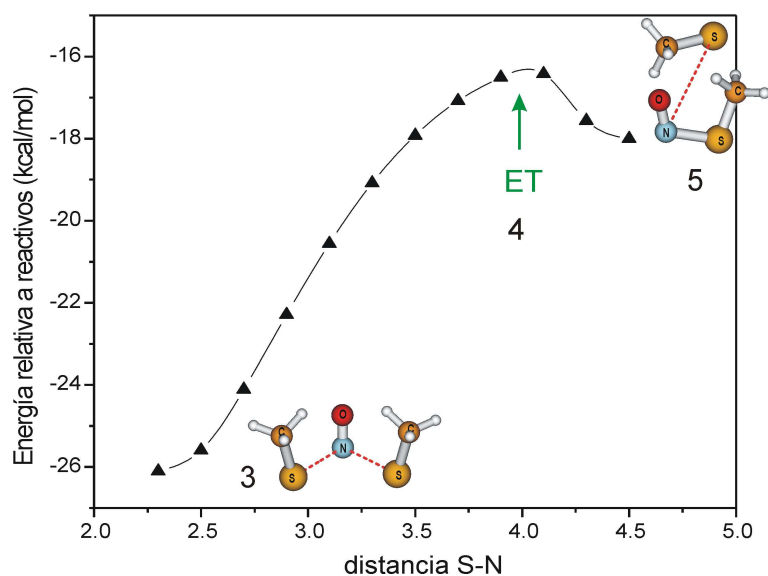


Figura III.3.3: Escaneo de la distancia S-N sobre la superficie de energía potencial versus energía, BP86/6-31G\*\* para el sistema aislado, partiendo del intermediario **3**.

Una vez encontrado y caracterizado adecuadamente el estado de transición a través de distintos métodos, se confeccionaron las Tablas III.3.2 y III.3.3. Como se puede observar en la Tabla III.3.2, los parámetros geométricos obtenidos por los diferentes métodos muestran un buen acuerdo entre las distintas metodologías. En el caso de los resultados informados para el método CCSD, sólo se optimizaron las estructuras para los reactivos/productos y se realizaron cálculos de energía a geometría fija (optimizada con MP2) para las demás especies. En la Tabla III.3.3, se muestran las energías relativas a los reactivos, tal como se puede observar, para los métodos DFT las energías resultan ser muy sensibles a la base utilizada. Por ejem-

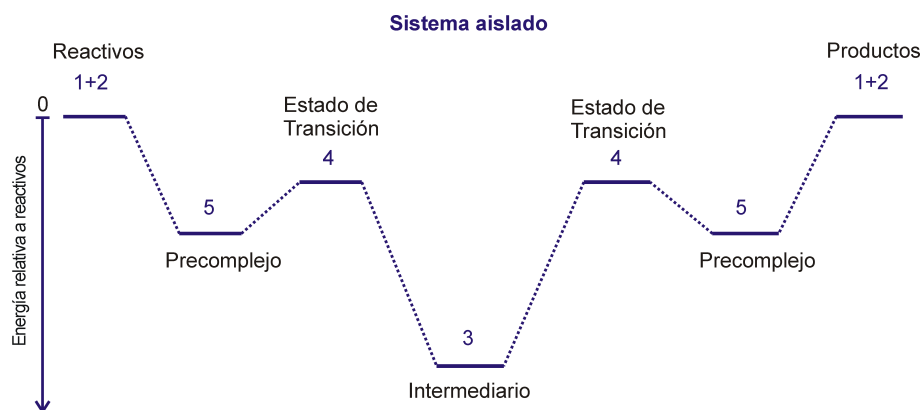


Figura III.3.4: Esquema correspondiente al perfil de energía para la reacción de transnitrosación del metiltiol.

plo, al pasar de una base 6-31G\*\* a una 6-311+G\* se obtiene una descripción prácticamente similar a la de métodos como MP2/6-31G\*\* y CBS-QB3/6-311+G\* y CCSD/6-31G\*\*. En lo que continúa se presentan los cálculos realizados utilizando DFT, en especial el funcional B3LYP y la base 6-311+G\* ya que ofrece la descripción más apropiada y a menor costo que los métodos MP2, CBS-QB3 y CCSD.

*Método de solvatación del continuo.* Una vez obtenidos los resultados para el modelo aislado, se decidió considerar el efecto del solvente a través de dos métodos de solvatación que consideran al solvente como un dieléctrico continuo en dos aproximaciones diferentes, PCM e IPCM (descritos en la parte metodológica, II.2.5). En la Figura III.3.5, se puede observar como se modifica el perfil de reacción al considerar el efecto del solvente usando como aproximación el método PCM y el IPCM, Figura III.3.5. Se puede observar que el solvente modifica apreciablemente el perfil de reacción, hecho que era de esperar si se tiene en cuenta que varias de las especies consideradas son especies cargadas. En solución no se considera la existencia del precomplejo ya que en presencia del solvente no sería una especie relevante.

Hasta aquí, podemos decir que este modelo muy simple sugiere que es factible la existencia de un intermediario y que su estabilidad estaría fuertemente afectada por el medio, siendo mucho más estable en medios poco polares. La diferencia de energía entre la especie **4** y **3**, para el sistema aislado resultó ser 8.22 kcal/mol, para el modelo PCM 8.63 kcal/mol y para IPCM 4.79 kcal/mol. Estas diferencias indican que una vez formada la especie **3**, las barreras para originar los productos para el sistema aislado y PCM son similares, mientras que el modelo IPCM predice una barrera menor.

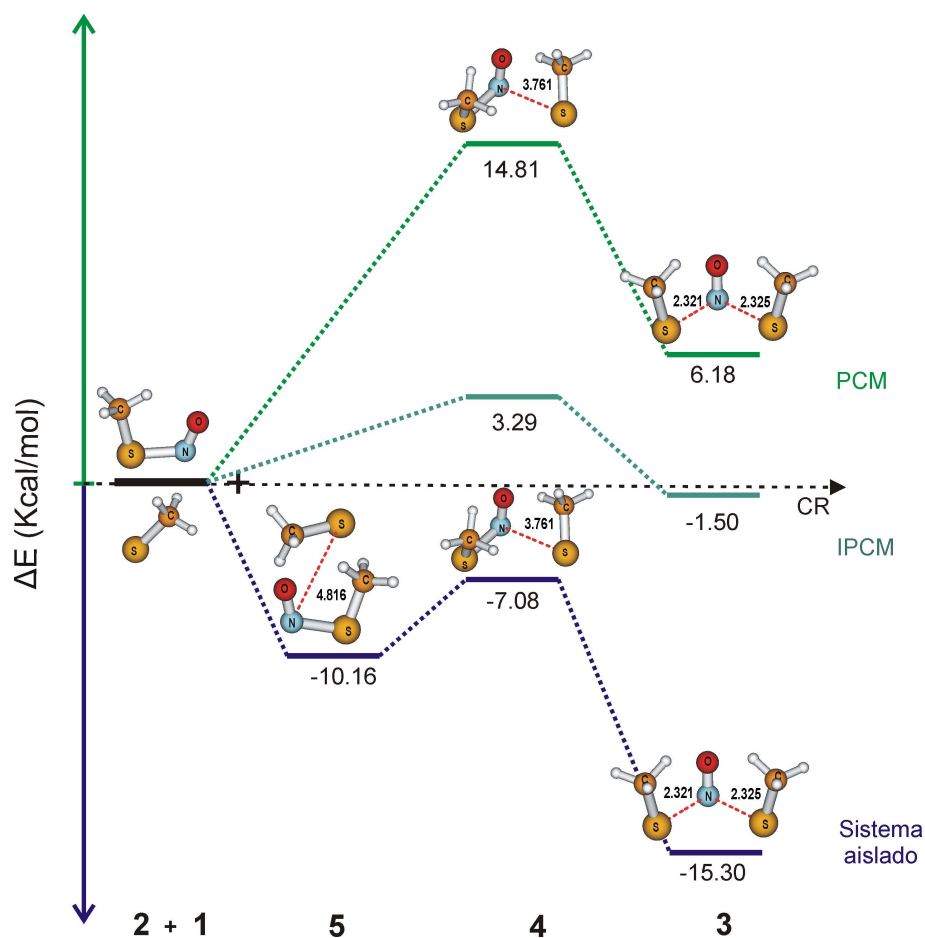


Figura III.3.5: Perfiles de energía en vacío y solución para la reacción de transnitrosación del metiltiol, B3LYP/6-311+G\*.

## Otras especies

Hasta el momento en este estudio, se ha considerado, en base a lo que se sugiere en bibliografía, que la especie reactiva es el tiolato. En la Figura III.3.6, se muestran dos reacciones de formación del intermediario protonado en la que la especie reactiva sería el tiol. Para cualquiera de los dos casos se observa que para el sistema aislado la formación del intermediario protonado está desfavorecida termodinámicamente con respecto a la misma reacción que se ha venido estudiando en las secciones precedentes.

Resultados prácticamente idénticos a los obtenidos en este trabajo (III.3.1) fueron publicados por otro grupo antes de que los aquí presentados pudiesen ser publicados [26]. En vista de esto, se decidió utilizar la experiencia adquirida y proponer un modelo más realista y abordable experimentalmente, el cual discutiremos en la próxima sección.

Si bien en lo que sigue de este trabajo se abandonó el modelo del metiltiol, es importante remarcar que resultó ser un modelo muy útil y que podría utilizarse también para estudiar

Tabla III.3.2: Parámetros geométricos para todas las especies intervinientes en la reacción de transnitrosación del metiltiol, distancias en Å , ángulos en grados.

Especie/unión	BP86/6-31G**	B3LYP/6-31G**	B3LYP/6-311+G*	MP2/6-31G**	CCSD/6-31G** <sup>a</sup>
<b>1</b>					
S-C	1.84	1.84	1.84	1.82	1.83
<b>2</b>					
N-O	1.19	1.18	1.18	1.22	1.20
S-N	1.92	1.86	1.86	1.78	1.80
S-C	1.81	1.81	1.81	1.79	1.81
ONS	115.93	116.62	117.32	114.95	115.17
NSC	99.87	101.59	101.97	100.19	100.05
<b>3</b>					
N-O	1.20	1.19	1.18	1.21	
S-N	2.34	2.33	2.32	2.31	
S-C	1.81	1.81	1.81	1.78	
S-S	3.75	3.73	3.69	3.58	
<b>4</b>					
N-O	1.19	1.21	1.18	1.20	
S-N	1.94/3.78	1.85/3.26	1.94/3.76	2.05/3.81	
S-C	1.81	1.79	1.81	1.81	
S-S	3.67	3.72	4.12	4.26	

<sup>a</sup>**3** y **4** sólo se calculó la energía para la geometría optimizada con MP2.



Tabla III.3.3: Energías relativas a los reactivos en kcal/mol, los valores contienen la corrección zpe y térmica (298 K).

Especie	BP86/6-31G**	B3LYP/6-31G**	B3LYP/6-311+G*	MP2/6-31G**	CCSD/6-31G**	CBS-QB3/6-311+G*
Reactivos (1+2)	0	0	0	0	0	0
Pre-complejo (5)	-19.07	-14.50	-10.16	-11.73	-	-11.6
Intermediario(3)	-24.94	-20.55	-15.30	-15.85	-10.20	-15.3
ET (4)	-15.06	-10.95	-7.08	-7.64	-6.92	-7.1

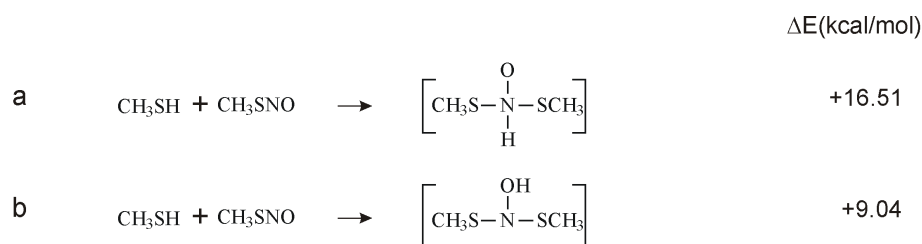


Figura III.3.6: Otras especies consideradas para la reacción de transnitrosación, B3LYP/6-311+G\*.

otros aspectos de esta reacción, como el efecto de la solvatación y la reactividad frente a diferentes nucleófilos. Como prueba de esto en el año 2006 otro grupo de investigación publicó un trabajo donde utilizan este modelo para el estudio de otros aspectos y obtienen resultados similares a los que aquí se informan para la reacción de transnitrosación en particular [27]. (Figura III.3.7) Nótese que con el modelo de solvatación CPCM el intermediario resulta ser bastante más estable en solución comparado con los modelos PCM e IPCM. En este trabajo, también calculan el perfil en acetonitrilo (medio menos polar que el agua) y como se puede ver en la Figura III.3.7 encuentran que el intermediario es aún más estable, tal como habíamos mencionado previamente.

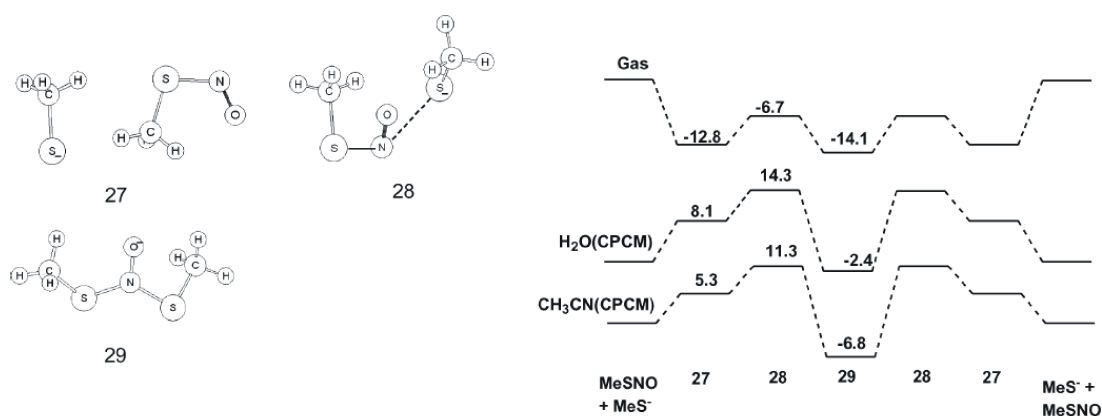


Figura III.3.7: Modelo de la reacción de transnitrosación para el metilmercaptano propuesto por Schelegel [27]. CBS-QB3/6-311G(2d,d,p), CPCM(conductor-like polarizable continuum model)

## Modelo SNO-CEE

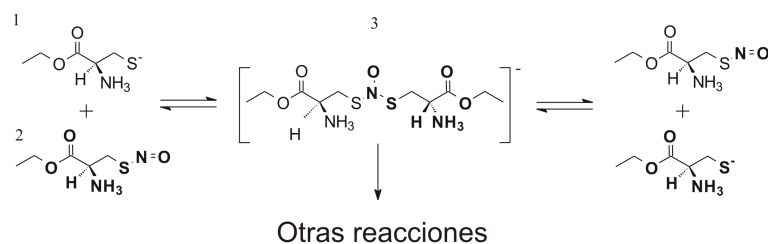


Figura III.3.8: Esquema del modelo del CEE.

El modelo simple permitió calcular el perfil de la reacción tanto para el sistema aislado como en solución y arrojó una evidencia importante: *la existencia del intermediario planteado para el sistema aislado y que su estabilidad depende fuertemente del medio*. Con el objeto de considerar una situación más cercana a la realidad y a lo que se puede medir en el laboratorio, se consideró un modelo más complejo, que sin ser demasiado costoso computacionalmente es factible de ser estudiado desde el punto de vista experimental. Se debe tener en cuenta que el metiltiol es un gas y no hay trabajos experimentales, por lo menos en esta área, con el mismo. Se seleccionó entonces el sistema CEE/SNO-CEE, dado que como se mostró en el capítulo anterior la SNO-CEE es posible de ser aislada como sólido, es soluble en solventes orgánicos y es relativamente estable como para ser manipulada sin demasiadas complicaciones.

Se procedió de manera análoga al metiltiol y se obtuvo el perfil de reacción que se muestra en la Figura III.3.10. El intermediario y el estado de transición resultaron ser muy similares estructuralmente (Tabla III.3.4). Sin embargo la distancia S-N no es exactamente igual, de modo que a diferencia de lo que ocurrió para el caso del metiltiol, no es perfectamente simétrico, a esto se le debe sumar el hecho que la CEE tiene un centro quiral por lo que existen dos enantiómeros (L y D). Dado que el enantiómero relevante a nivel biológico es el L, los cálculos se hicieron para éste, por lo que la especie intermedia no tiene simetría respecto al plano que contiene por la unión N-O y que se muestra en la Figura III.3.9. Es probable que los efectos estéricos y la menor simetría presentes en el caso de este sistema modelo y ausentes para el metiltiol, sean los responsables de la diferencias en las uniones S-N. Según se puede observar en el perfil de reacción obtenido (Figura III.3.10), a diferencia de lo que ocurre para el modelo anterior, aquí el precomplejo no fue encontrado sobre la superficie de energía potencial. La barrera resultó ser mayor para este modelo tanto para el sistema aislado (9.81 kcal/mol) como en solución (19.4 kcal/mol). Por otro lado, al igual que para el modelo del metiltiol se encontró que la estabilidad del intermediario aumenta notablemente al variar la polaridad del solvente, tal como se muestra en la Figura III.3.10, al pasar de agua (PCM) al sistema aislado [28].

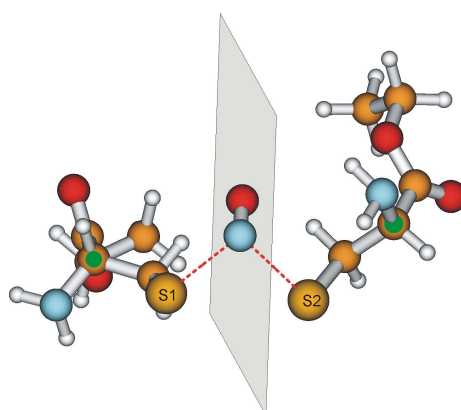


Figura III.3.9: Intermediario de la reacción de transnitración para el modelo CEE/*SNO*-CEE, en verde se señalan los carbonos quirales.

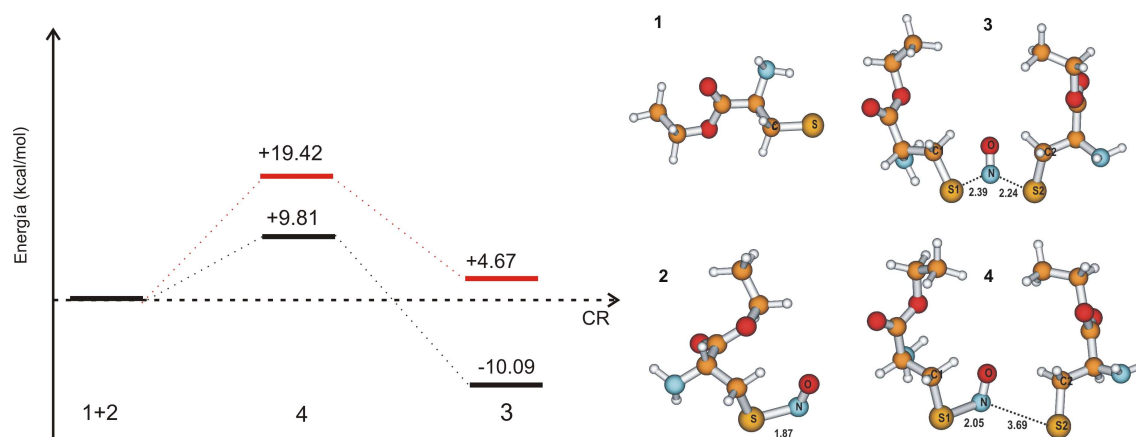


Figura III.3.10: Perfiles de energía en vacío y solución para la reacción de transnitración para *SNO*-CEE/CEE, B3LYP/6-311+G\*. Sistema aislado (negro) y PCM: agua (rojo).

### III.3.2. Medida experimental de la constante de velocidad y la energía de activación.

Se estudió la reacción de transnitración para el sistema CEE/*SNO*-CEE. En bibliografía se puede encontrar mucha información sobre reacciones de este tipo donde lo que se estudia es la transnitración entre el tiol y el *S*-nitrosotiol derivado del mismo [20, 21, 29, 30]. Si bien existe mucha información en cuanto a constantes de velocidad, no hay valores medidos para los parámetros de activación de esta reacción.

Tabla III.3.4: Parámetros estructurales para ambos modelos, B3LYP/6-311+G\*.

	<i>SNO</i> -Me	<i>SNO</i> -CEE	(MeS) <sub>2</sub> NO	(CEE) <sub>2</sub> NO	ET (MeS <sup>-</sup> / <i>SNO</i> -Me)	ET (CEE <sup>-</sup> / <i>SNO</i> -CEE)
distancias (Å)						
S2-N	1.862	1.877	2.321	2.397	1.946	2.059
S1-N			2.325	2.241	3.761	3.691
S-S			3.696	3.642	4.122	4.844
ángulos (grados)						
O-N-S2	117.328	116.640	108.858	110.876	117.875	113.019
O-N-S1			108.758	108.182	81.893	91.308
N-S2-C2	101.971	101.607	93.888	94.324	98.045	95.871
N-S1-C1			93.982	93.235	75.572	77.334

## Condiciones experimentales y consideraciones realizadas para las cinéticas.

La reacción de transnitrosación a largo plazo termina originando diversos productos dependiendo fundamentalmente de la relación  $RS^-/RSNO$ , la presencia de oxígeno y la presencia de trazas de metales. En la Figura III.3.11 se muestran las distintas vías propuestas para esta reacción en el caso particular del glutatión en ausencia y presencia de oxígeno. Teniendo en cuenta las diferentes vías que puede tomar la reacción y que el paso lento es la formación de la especie **3**, la manera más apropiada de abordar el estudio experimental de la cinética para esta reacción, consiste en trabajar en exceso de tiol y ausencia de oxígeno. Por lo tanto, toda la especie intermedia formada se consume rápidamente reaccionando con el exceso de tiol tal como representa la vía remarcada en la Figura III.3.11 (flecha de color verde) de modo que se puede seguir la cinética midiendo el decaimiento de la absorbancia de la SNO-CEE que es la única especie coloreada.

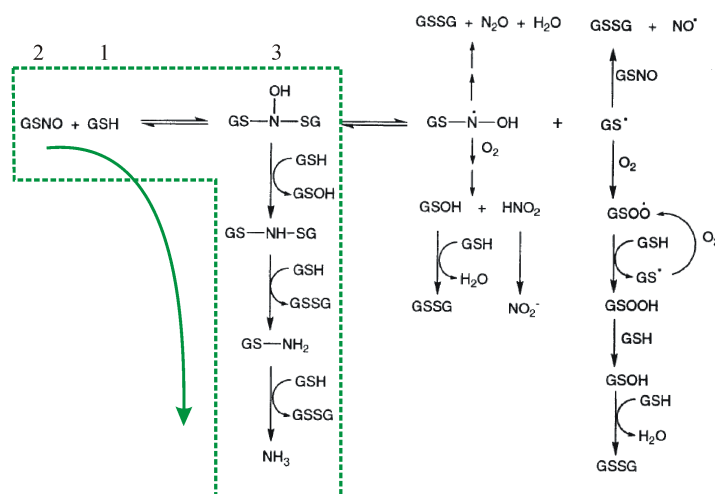


Figura III.3.11: Vías competitivas para el sistema GSH/GSNO.

La presencia de trazas de metales desempeña un rol clave en la reacción, de modo que fue necesario ajustar la cantidad de EDTA necesaria para minimizar la descomposición de la SNO-CEE catalizada por metales. Esto se corroboró midiendo la absorbancia a 343 nm (ver espectro SNO-CEE, Figura III.2.2, pág. 63) controlando su estabilidad durante el intervalo de tiempo en que se midió la reacción de interés, de esta forma se asegura que lo que se está midiendo es la transnitrosación y no otro evento.

Otro tema importante, es la dependencia con el pH, todos los estudios se realizaron utilizando buffer de fosfato pH=7.4, con el agregado de EDTA. Es importante descartar que los fosfatos intervengan en la reacción [31], con este fin se midieron algunas cinéticas utilizando buffer Tris-HCl obteniéndose idénticos resultados. Un hecho que complica el estudio

es la existencia de varias especies según el pH con sus respectivos equilibrios y  $K$  asociadas [32, 33]. Tal como se observa en la Figura III.3.12, existen cuatro especies, de las cuales las que se consideran reactivas son B y D (especies tiolato). Al pH al cual se trabajó se estima que un 21 % corresponde a B+D. Recordemos (Ec. III.3.3), que dada la dependencia con el pH la constante medida es una constante observada que contiene el valor de las constantes de equilibrio correspondientes y la concentración de protones.

$$[B + D] = \left( \frac{[H^+]K_a + K_aK_b}{[H^+]^2 + [H^+]K_a + [H^+]K_c + K_aK_b} \right) [RSH]_T \quad (\text{III.3.4})$$

$$k_{obs} = k \left( \frac{[H^+]K_a + K_aK_b}{[H^+]^2 + [H^+]K_a + [H^+]K_c + K_aK_b} \right) \quad (\text{III.3.5})$$

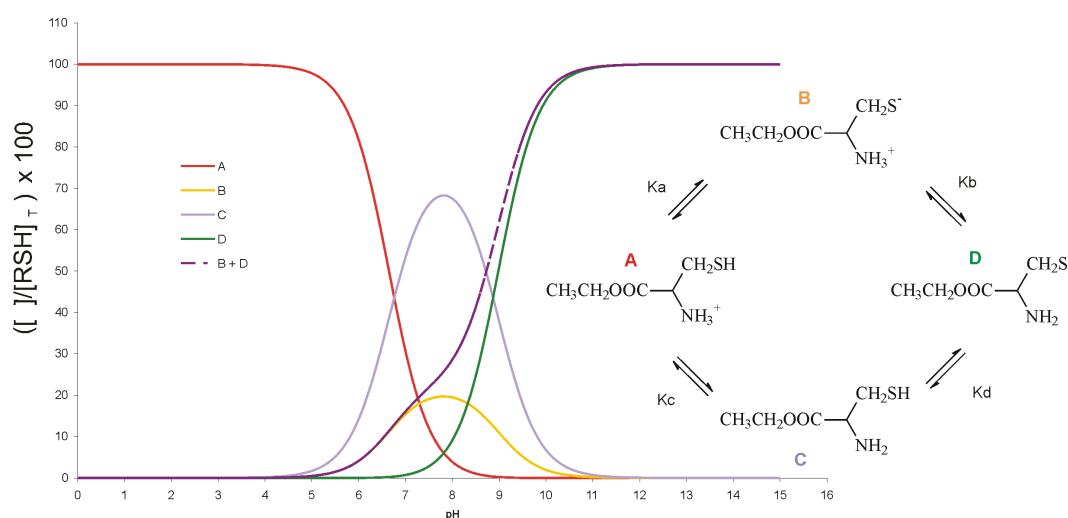


Figura III.3.12: Diagrama de especiación para CEE. ( $pK_a=7.45$ ,  $pK_b=8.41$ ,  $pK_c=6.77$ ,  $pK_d=9.09$ ). [32]

### Valores experimentales de $k_{obs}$ y parámetros de activación: comparación con los calculados.

Se midieron distintas  $k_{obs}$  en el rango de temperaturas de 25-45°C. La constante de velocidad medida a 26 °C fue  $k_{obs}=15.6 \pm 0.2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (pH=7.4). El valor encontrado concuerda con valores reportados para reacciones de transnitrosación de tioles en solución acuosa [29]. Con el objeto de determinar la energía de activación para la reacción se utilizó la ecuación de Arrhenius:

$$k(T) = Ae^{-E_a/RT} \quad (\text{III.3.6})$$

donde  $E_a$  es la llamada energía de activación,  $A$  es el factor preexponencial y  $R$  es la constante de los gases. Si se linealiza esta expresión y se grafica  $\ln k$  versus  $1/T$ , de la

pendiente de la recta graficada se obtiene el valor para  $E_a$  (Figura III.3.13).

El valor experimental encontrado para la energía de activación fue  $22.7 \pm 0.2$  kcal/mol (Figura III.3.13). Este es el primer valor de energía de activación reportado para transnitrosación, y concuerda bastante bien con el estimado por los cálculos (19.4 kcal/mol) [28]. Haciendo uso de la Teoría del Estado de Transición (TET):

$$k(T) = \frac{k_B T}{h} e^{-(\Delta G^\ddagger/RT)} \quad (\text{III.3.7})$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzman y  $h$  la constante de Planck, linealizando esta ecuación y graficando se obtienen los parámetros de activación. Se obtuvieron los siguientes valores  $\Delta H^\ddagger = 22.2 \pm 0.9$  kcal/mol y  $\Delta S^\ddagger = -8.5 \pm 3.1$  cal/K mol. El signo obtenido para  $\Delta S^\ddagger$  es consistente con el tipo de reacción que se está estudiando (Ec. III.3.8):

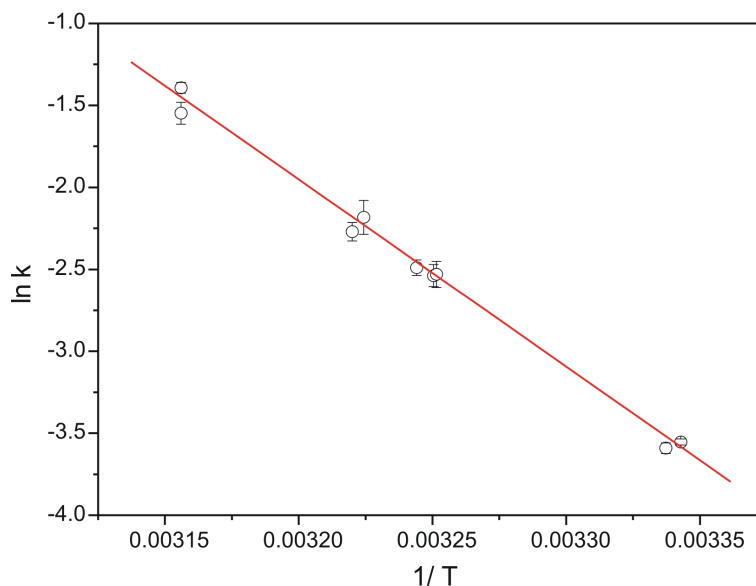


Figura III.3.13: Gráfico de Arrhenius para la reacción de transnitrosación CEE/SNO-CEE.



### *Experimental*

**Reactivos.** La L-cisteína etil ester (CEE) fue obtenida de Sigma Aldrich. La SNO-CEE fue preparada tal como se describió en la parte experimental de la sección anterior, ver páginas 68-69. En todos los experimentos se utilizó agua MilliQ y se trabajó en ausencia de oxígeno.

**Instrumentación.** Los espectros UV-Visible fueron tomados en un espectrómetro Hewlett Packard 8453 con arreglo de diodos empleando una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Se utilizó el termostato RC6 LAUDA para el control de la temperatura. Se controló el pH utilizando el pHmetro Metrohm 744 PH meter.

**Medidas de las constantes de velocidad.** Todas las mediciones cinéticas fueron realizadas en buffer de fosfato (pH=7.4, 0.5M) y EDTA (10 mM). Previo a cada medida se preparó una solución fresca de SNO-CEE, cuya concentración fue fijada en  $1 \times 10^{-3} \text{M}$  y confirmada espectroscópicamente a través de la medida de la absorbancia a 343 nm. Se utilizó exceso de CEE (0.1M) con el objetivo de trabajar en condiciones de pseudorden. La reacción se siguió midiendo el decaimiento de la absorbancia a 343 nm. En todos los casos se observó un excelente ajuste a primer orden y una buena reproducibilidad de los valores obtenidos. A 25 °C, la reacción se completa en su totalidad aproximadamente a los 15 minutos. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa OriginPro 7.5.

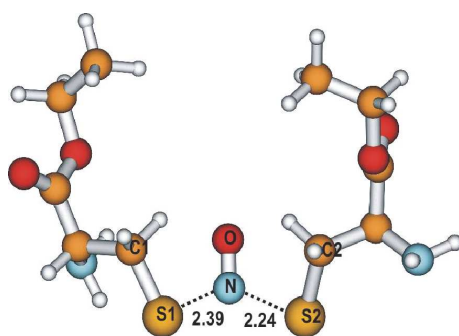
**Medida de la energía de activación.** Las medidas de las constantes de velocidad se realizaron tal como se detalló en el párrafo anterior, se termostatózó adecuadamente las soluciones, se tuvo en cuenta la variación del pH con la temperatura a través de la preparación de diferentes buffers según la temperatura medida. La medición se realizó por duplicado en forma independiente para cada medida.

### *Simulación Computacional*

Todos los cálculos realizados fueron llevados a cabo utilizando el paquete Gaussian98, las geometrías fueron optimizadas utilizando diferentes métodos y bases como MP2/6-31G\*\*, CCSD/6-31G\*\*, DFT (BP86/6-31G\*\*, B3LYP/6-31G\*\* y /6-311+G\*), CBS-QB3/6-311+G\*. Cada punto estacionario encontrado sobre la superficie de energía potencial fue caracterizado a través de un cálculo de modos normales. La búsqueda del estado de transición se llevó a cabo mediante el uso del algoritmo TS y QST desarrollado por Schlegel. El solvente fue modelado como un continuo utilizando el método PCM y IPCM, previamente descripto.

## III.4

# Detección y caracterización teórico-experimental del intermediario de reacción.



En esta sección nos ocuparemos específicamente del intermediario de la reacción de trans-nitrosación. En la sección anterior mediante el uso de cálculos computacionales, se construyó el perfil de reacción identificando los reactivos, el intermediario y el estado de transición, y se mostraron las medidas experimentales para la constante de velocidad y los parámetros de activación.

### III.4.1. Evidencia experimental previa en fase gaseosa

Es necesario mencionar, que ya en el año 2001 se había sugerido la existencia de este intermediario, y se presentaba como prueba la evidencia experimental obtenida mediante espectrometría de masa, en particular ESI<sup>+</sup>-MS. En dicho trabajo se realizó la reacción entre una enzima (Aldosa Reductasa), en cuyo sitio activo se encuentra una cisteína (Cys-298), y el *S*-nitrosotiol SNAP. Esta enzima, cuya función es la reducción NADPH dependiente de

una gran variedad de sustratos, cesa su función por inhibición al formarse la *SNO*-Cys-298 o al oxidarse la Cys-298 a disulfuro [34]. Luego, en el año 2003 apareció juntamente con el modelo teórico del metiltiol otra evidencia también suministrada por la espectrometría de masa, en este caso para la reacción NAP/SNAP [26]. En la Figura III.4.1 se muestran dichos espectros de masa.

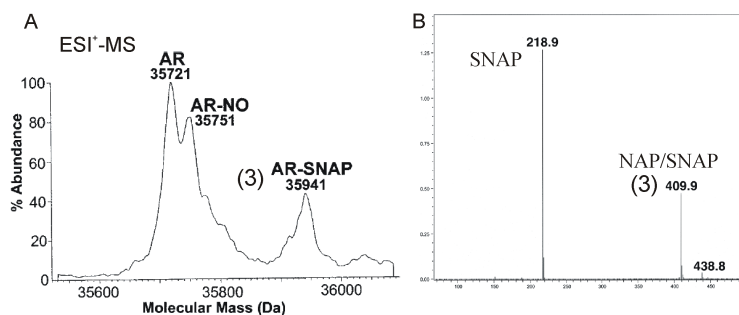


Figura III.4.1: Evidencia de la existencia del intermediario en fase gaseosa. (A) Reacción para la Aldosa Reductasa (AR) y SNAP. (B) Reacción para NAP/SNAP.

Dado que la evidencia experimental existente hacía referencia a la fase gaseosa, se decidió buscar evidencia de este intermediario en solución. Para esto se debieron seleccionar las condiciones apropiadas en cuanto a; solvente, relación de concentraciones, método espectroscópico, entre otras.

### III.4.2. Detección del intermediario: condiciones experimentales y técnicas de RMN.

Se tuvieron en cuenta las siguientes cuestiones:

**El solvente.** A partir de la experiencia acumulada en los dos secciones anteriores (III.2 y III.3) se sabía que:

*Metanol:* la síntesis del *SNO*-CEE se realiza en metanol, en este solvente resulta ser bastante estable a temperatura ambiente (1-2 días).

*Agua:* es bastante inestable una vez disuelto en agua, se descompone casi en su totalidad al cabo de 2-3 horas a temperatura ambiente. Por ejemplo al tomar las medidas cinéticas, el *SNO*-CEE debió ser almacenado sobre hielo o en el freezer para poder ser usado durante el transcurso de un par de horas sin que se descomponga.

**Relación de concentraciones.** Para favorecer la formación y permanencia del intermediario y retrasar su desaparición por otras vías, la relación 1:1 de CEE/*SNO*-CEE sería en principio adecuada.

**Cálculos computacionales.** Para el modelo del metiltiol, los cálculos sobre el intermediario, indicaban un corrimiento de  $56\text{ cm}^{-1}$  hacia frecuencias menores para el estiramiento de la unión N-O con respecto al mismo estiramiento para el RSNO, y de  $52\text{ cm}^{-1}$  para el modelo de la CEE. De este modo, si consideramos el valor experimental informado para la SNO-CEE ( $\nu_{NO}$ :  $1556\text{ cm}^{-1}$ ), el valor para el intermediario debería aparecer alrededor de los  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Asimismo, los desplazamientos químicos calculados para los espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ , evidenciaban diferencias, siendo más notoria la diferencia para el caso del  $^{15}\text{N}$  RMN (-288 ppm tomando como referencia la señal para SNO-CEE) .

**Técnica experimental de detección.** En principio, las técnicas de FTIR, UV-Visible y RMN serían potenciales herramientas para la detección del intermediario.

Los primeros intentos para la detección del intermediario se realizaron en ambos solventes haciendo uso de las distintas técnicas en relación 1:1 de CEE/SNO-CEE y a temperatura ambiente. En agua, se trabajó en buffer (pH=7.4) y EDTA, pero no se encontró evidencia alguna de la existencia del intermediario por ninguna de las tres técnicas mencionadas. De igual modo, en metanol no se logró detectar el intermediario a través de FTIR y UV-Visible, sin embargo por medio de la técnica de RMN se observaron indicios reproducibles de su presencia.

### **$^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, $^{13}\text{C}$ DEPT-135, COSY y HETCOR.**

Cuando se realizó la reacción tal como se detalla en la parte experimental de esta sección, se observó la aparición de nuevas señales en el espectro  $^1\text{H}$  RMN que luego de varias horas a temperatura ambiente desaparecieron, dando lugar a la formación de productos. En la Figura III.4.2 se muestra el espectro completo para la reacción 1:1. Se puede observar que aparecen nuevas señales, la señal que corresponde al ( $-\text{SCH}_2$ ), cambia su patrón y levemente su desplazamiento con respecto a la CEE, y es importante notar que se trata de dos señales superpuestas que pueden ser fácilmente deconvolucionadas, ver Figura III.4.3. También se puede observar que si el espectro se adquiere inmediatamente luego de realizada la mezcla (mantenida a  $0^\circ\text{C}$ ), la presencia de disulfuro es mínima.<sup>1</sup>

Se utilizaron diversas técnicas de RMN con el fin de asignar las señales. (Figura III.4.4 a y b, Figura III.4.5 y III.4.6). Es importante notar que la nueva señal correspondiente al ( $-\text{SCH}_2$ ) correlaciona con dos señales del espectro  $^{13}\text{C}$  RMN, ver Figuras III.4.4 y III.4.5. En lo que respecta al triplete que aparece en 2.5 ppm se recurrió a la ayuda de los espectros bidimensionales para su asignación, éstos proporcionaron la siguiente información:

1. HETCOR: no se observa correlación con ningún carbono, por lo que se trata de un H

---

<sup>1</sup>Los espectros para CEE, SNO-CEE y el disulfuro se mostraron previamente en la sección III.2.

que no está unido a carbono.

2. COSY: se observa correlación con el  $-SCH_2$ . Tiene como vecino un  $-CH_2$ .

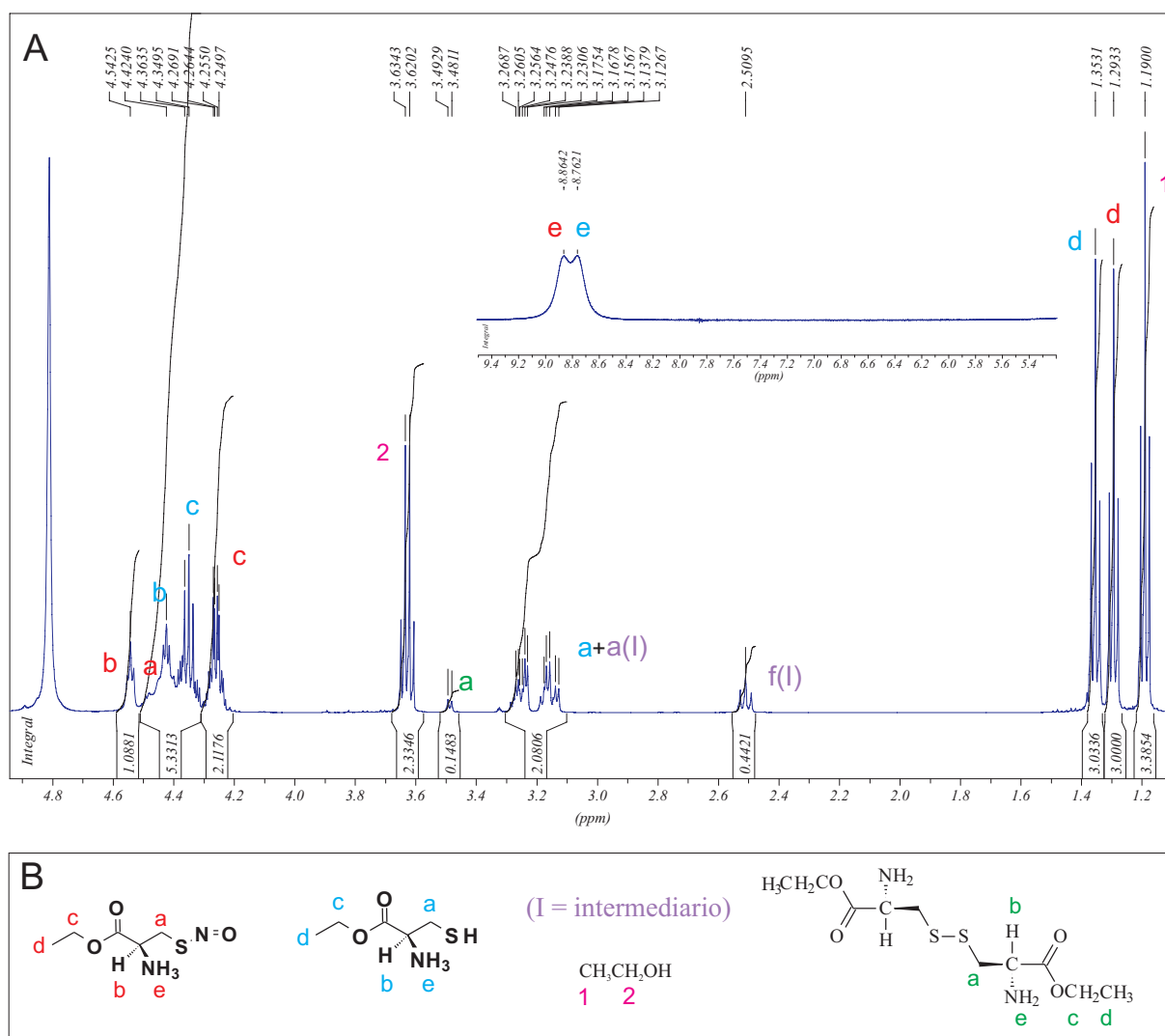


Figura III.4.2: Espectro  $^1H$  RMN para la reacción junto con la asignación correspondiente (A), estructura de las diferentes especies presentes en la reacción (B). 500 MHz, solvente:  $CD_3OD$ , referencia: señal residual del solvente (3.31 ppm).

Dada la información aportada por los espectros bidimensionales, se concluyó que muy probablemente la señal correspondería a un S-H. Es decir, por alguna razón ahora algún S-H no se intercambia con el solvente como sí ocurría para el CEE sola, donde apenas se ve una

señal muy ancha en esta región del espectro (Figura III.2.3, sección III.2). En las Figuras III.4.5 y III.4.6, se observan los respectivos espectros junto con la asignación y el código de colores para las distintas especies presentes en la reacción.

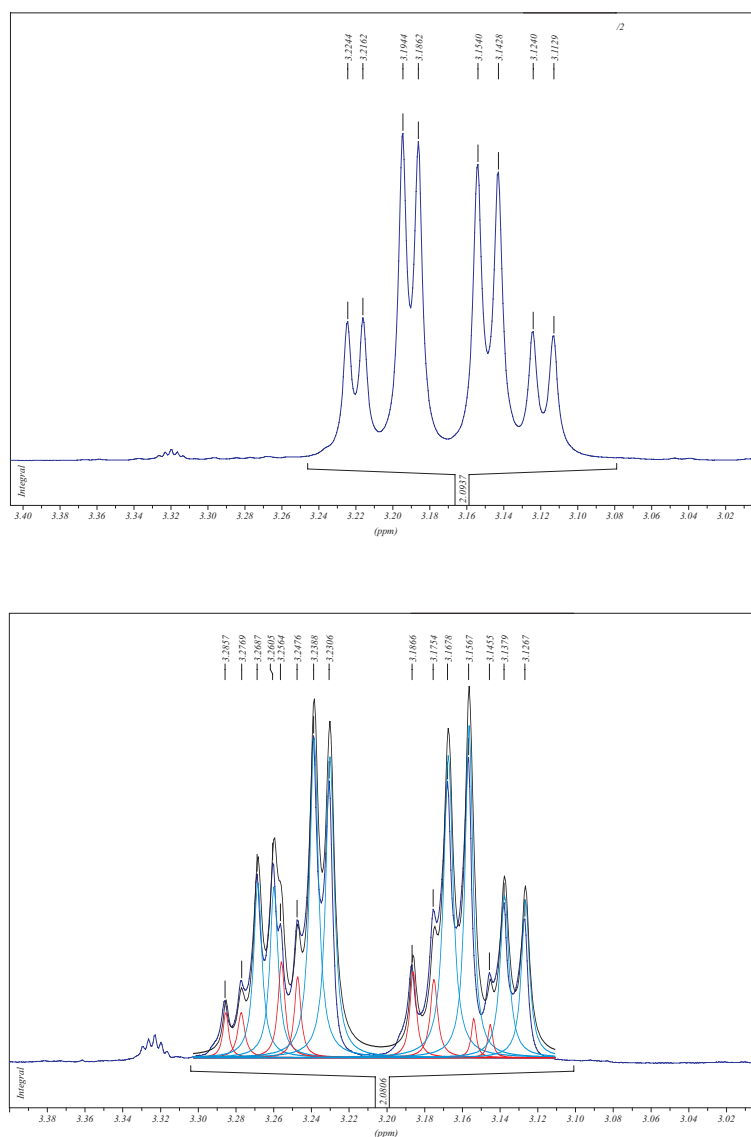


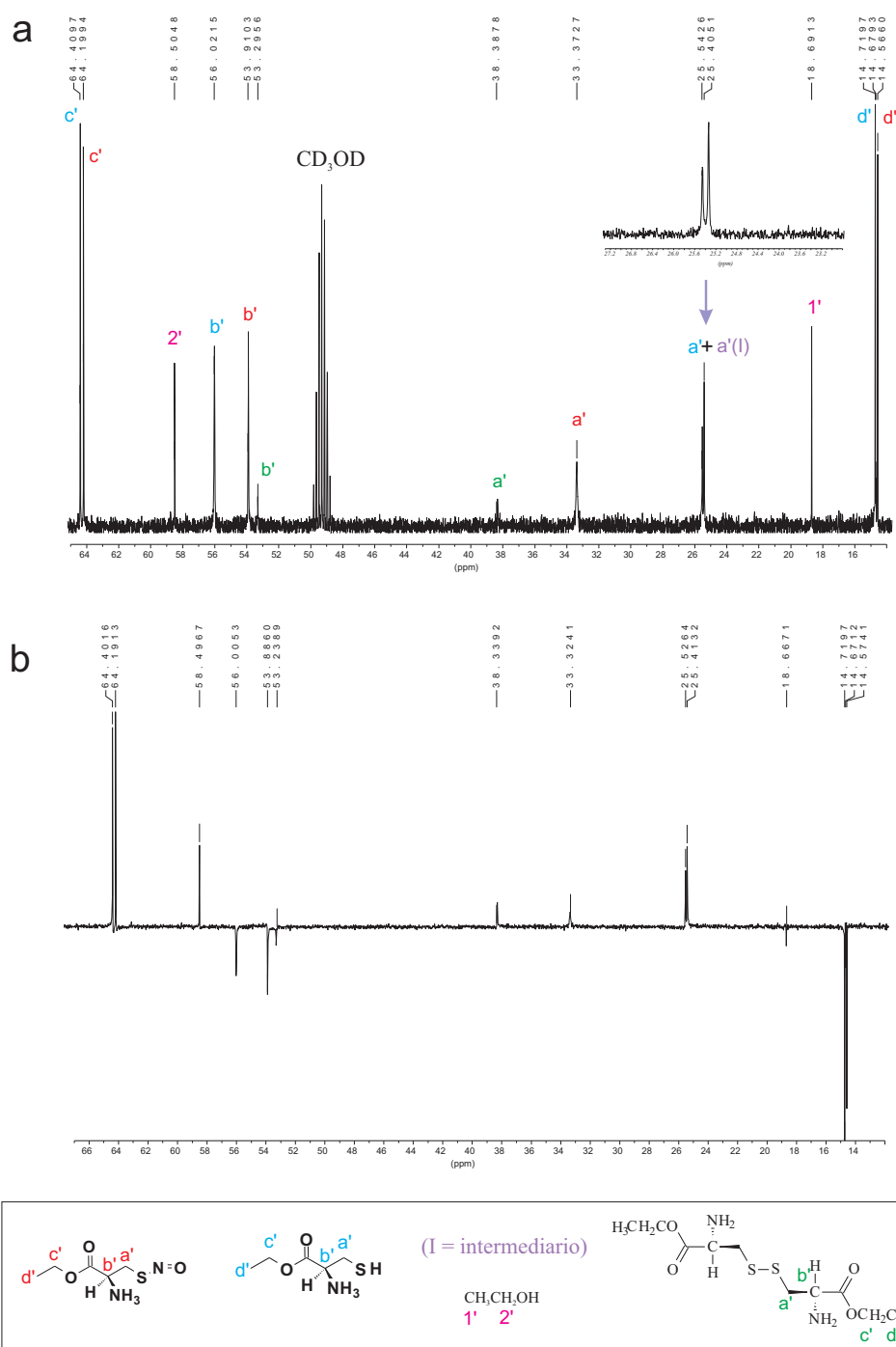
Figura III.4.3: Patrón tipo ABX de la señal para  $-SCH_2$  en la CEE (parte superior) . Patrón de la señal para  $-SCH_2$  en la reacción (parte inferior). RMN  $^1H$ , 500 MHz, solvente:  $CD_3OD$ , referencia: señal residual del solvente (3.31 ppm).

En base a la evidencia encontrada por las distintas técnicas de espectroscopía RMN, la estructura del intermediario podría tener la forma que se muestra en la Figura III.4.7.

Suponiendo una estructura de este tipo, uno de los enlaces S-N más largo (de acuerdo con los resultados de los cálculos descritos previamente), se postula que las señales para el intermediario serían muy parecidas a las de la CEE y SNO-CEE, y probablemente debido a la baja proporción del intermediario quedarían tapadas por los reactivos. A su vez, la

interacción del intermediario con alguna molécula de CEE, sería responsable de que su S-H no se intercambie con el solvente.

Si bien se han presentado indicios de la existencia de una especie intermediaria, la prueba más concluyente se consiguió a través de la espectroscopía  $^{15}\text{N}$  RMN.


 Figura III.4.4: Espectros <sup>13</sup>C RMN (a) y <sup>13</sup>C DEPT (b) para la reacción.



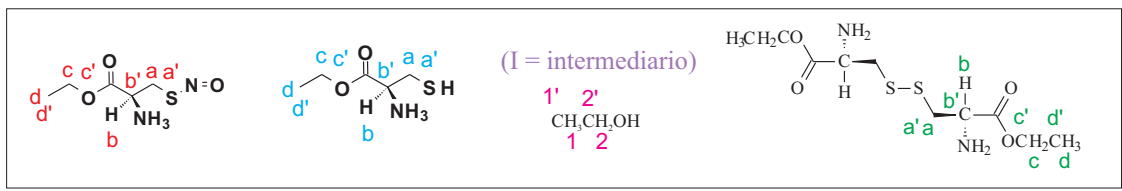
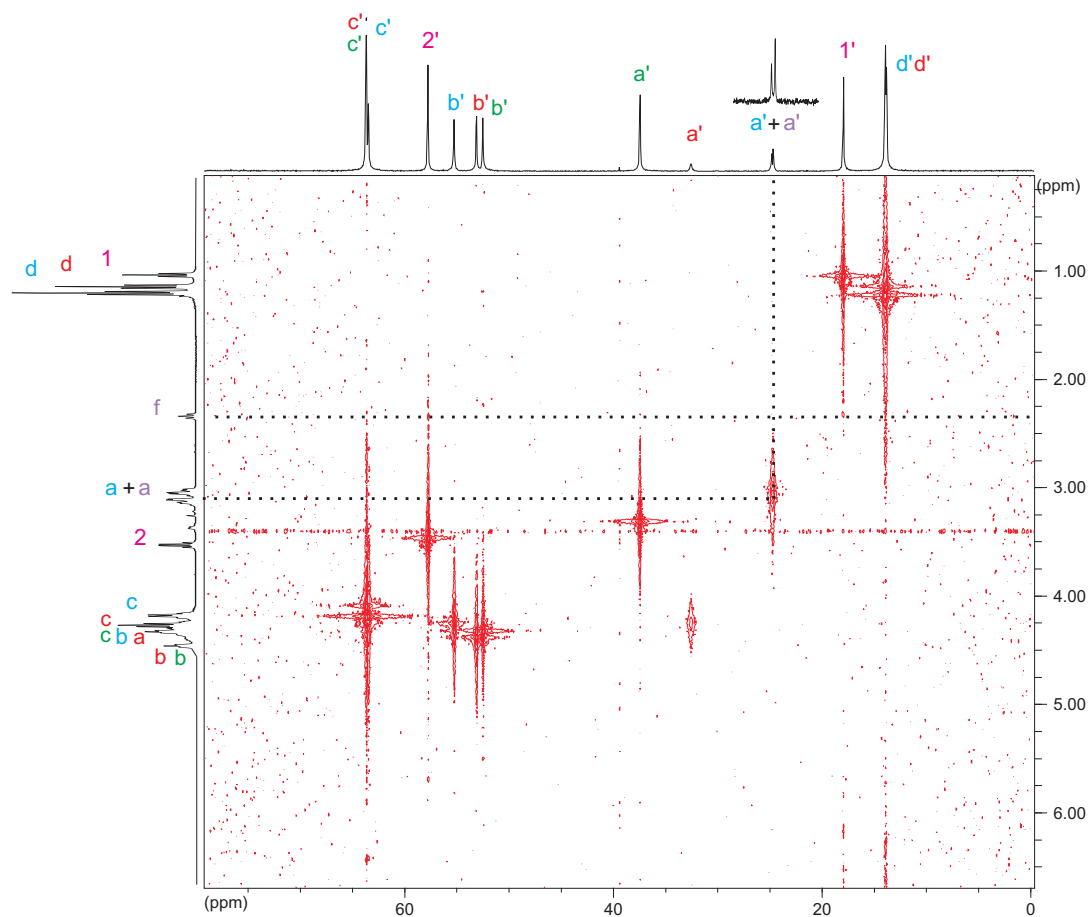


Figura III.4.5: HETCOR para la reacción. RMN <sup>1</sup>H, 500 MHz, solvente: CD<sub>3</sub>OD, referencia: señal residual del solvente (3.31 ppm).

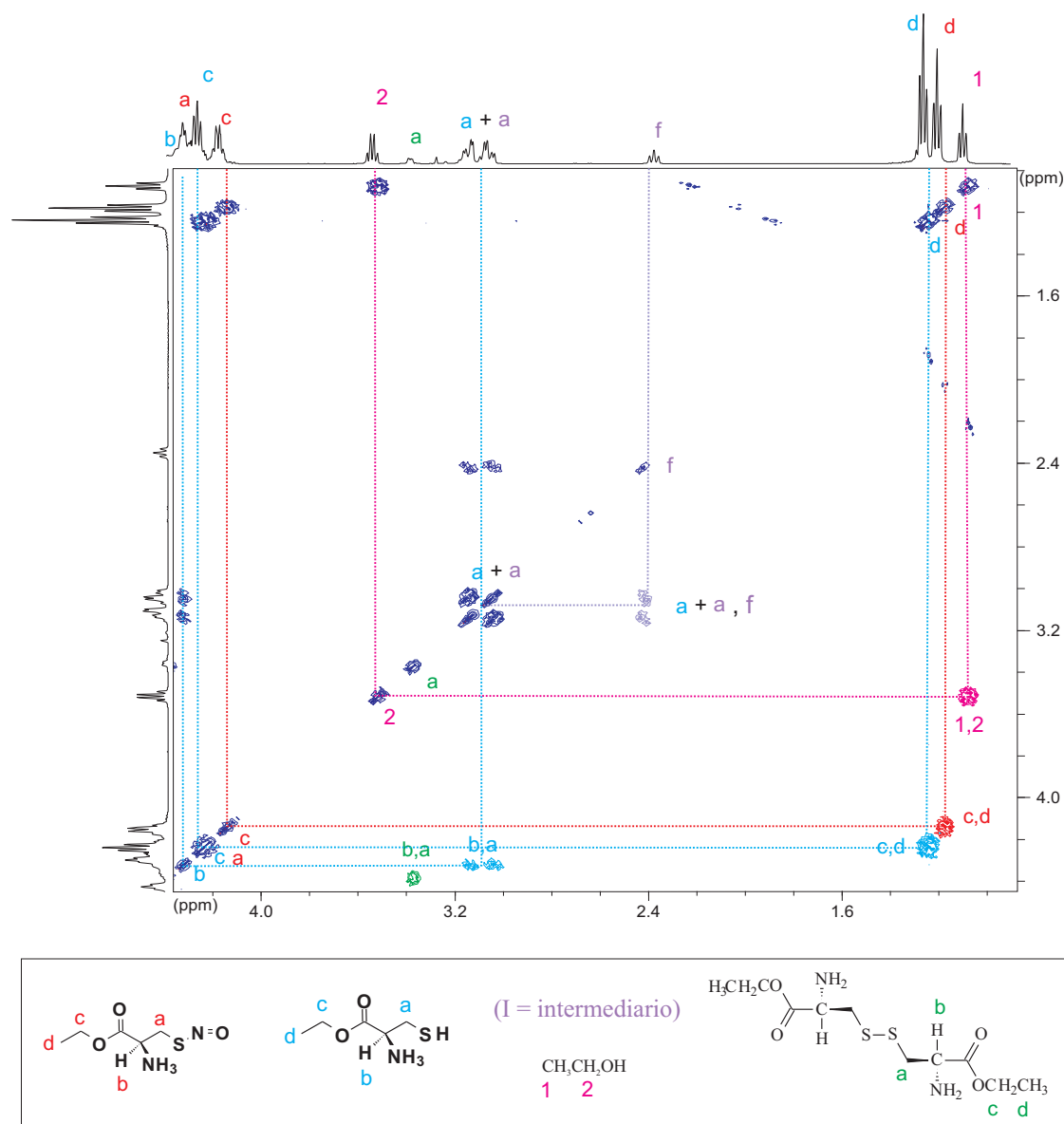


Figura III.4.6: Espectro COSY para la reacción, no se muestran las correlaciones (a,b) para el *SNO*-CEE ni (a,b) para el disulfuro de la CEE. RMN <sup>1</sup>H, 500 MHz, solvente: CD<sub>3</sub>OD, referencia: señal residual del solvente (3.31 ppm).

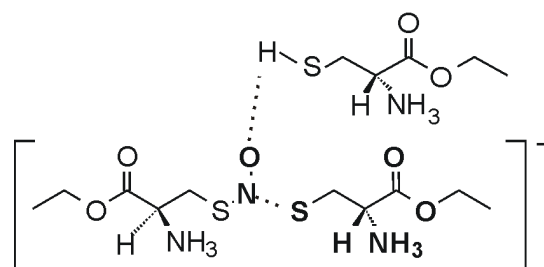
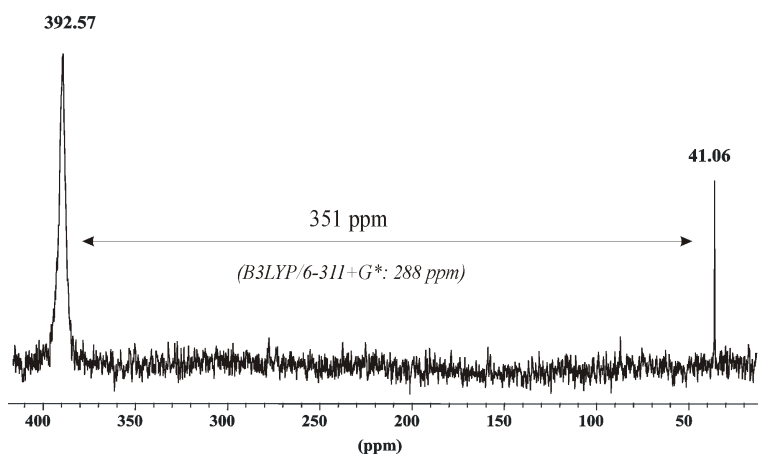


Figura III.4.7: Estructura posible del intermediario en metanol.

### III.4.3. Detección por $^{15}\text{N}$ RMN - Asignación asistida por cálculos

Con el propósito de lograr una prueba concluyente de la existencia de este intermediario en solución, se decidió trabajar con el SNO-CEE enriquecido en el isótopo  $^{15}\text{N}$  y previamente caracterizado por medio esta técnica (Sección III.2.2, pág. 66-67). Se realizó la reacción de igual modo y se tomó el espectro de  $^{15}\text{N}$  RMN. (Figura III.4.8) Se observó claramente la presencia del SNO-CEE (392.57 ppm referencia nitrometano) y otra señal (41.06 ppm, referencia: nitrometano o -351 ppm, referencia: SNO-CEE).

Figura III.4.8: Espectro  $^{15}\text{N}$  RMN, SNO-CEE (392.57 ppm) e intermediario (41.06 ppm). Referencia externa:  $\text{NaNO}_2$  (232 ppm respecto a nitrometano)

Esta señal fue asignada al intermediario y avalada mediante cálculos computacionales los que predijeron un corrimiento de -288 ppm, tomando como referencia el SNO-CEE. Los resultados obtenidos por esta espectroscopía resultaron ser reproducibles [28]. Es importante mencionar que en el espectro final ninguna de estas señales se halló presente, y se observó una

única señal a -353 ppm (referencia: nitrometano), zona donde aparece el amoníaco, producto propuesto de la reacción del intermediario por diferentes vías (Figura III.3.11).

### III.4.4. Efectos causados por la presencia de oxígeno.

El intermediario se termina descomponiendo originando diferentes productos que ya hemos mencionado previamente. Hasta aquí, todos los experimentos se hicieron en ausencia total de oxígeno, en tales condiciones el único producto observado por  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN fue el disulfuro, por  $^{15}\text{N}$  RMN amoníaco y por espectrometría de masa NO y  $\text{N}_2\text{O}$ <sup>2</sup>. (Figura III.4.9)

Con el objeto estudiar el efecto del oxígeno y de verificar las condiciones experimentales de trabajo, se quiso saber de qué forma afectaba a esta reacción y a los productos observados, la presencia del mismo. Se decidió entonces trabajar en presencia de éste. En las Figuras III.4.10 y III.4.11, se muestran los espectros  $^1\text{H}$  RMN, en los mismos se puede observar lo siguiente:

- Las señales que evidencian la presencia del intermediario siguen apareciendo (Figura III.4.10).
- Inmediatamente comienzan a aparecer señales nuevas y claramente diferentes a las del disulfuro (Figura III.4.10 : círculo y III.4.11).

---

<sup>2</sup>Los gases NO y  $\text{N}_2\text{O}$ , fueron detectados para la reacción realizada en metanol a temperatura ambiente en ausencia de oxígeno luego de 10 horas, la determinación se realizó en forma semicuantitativa indicando aproximadamente un 20 % de cada gas.

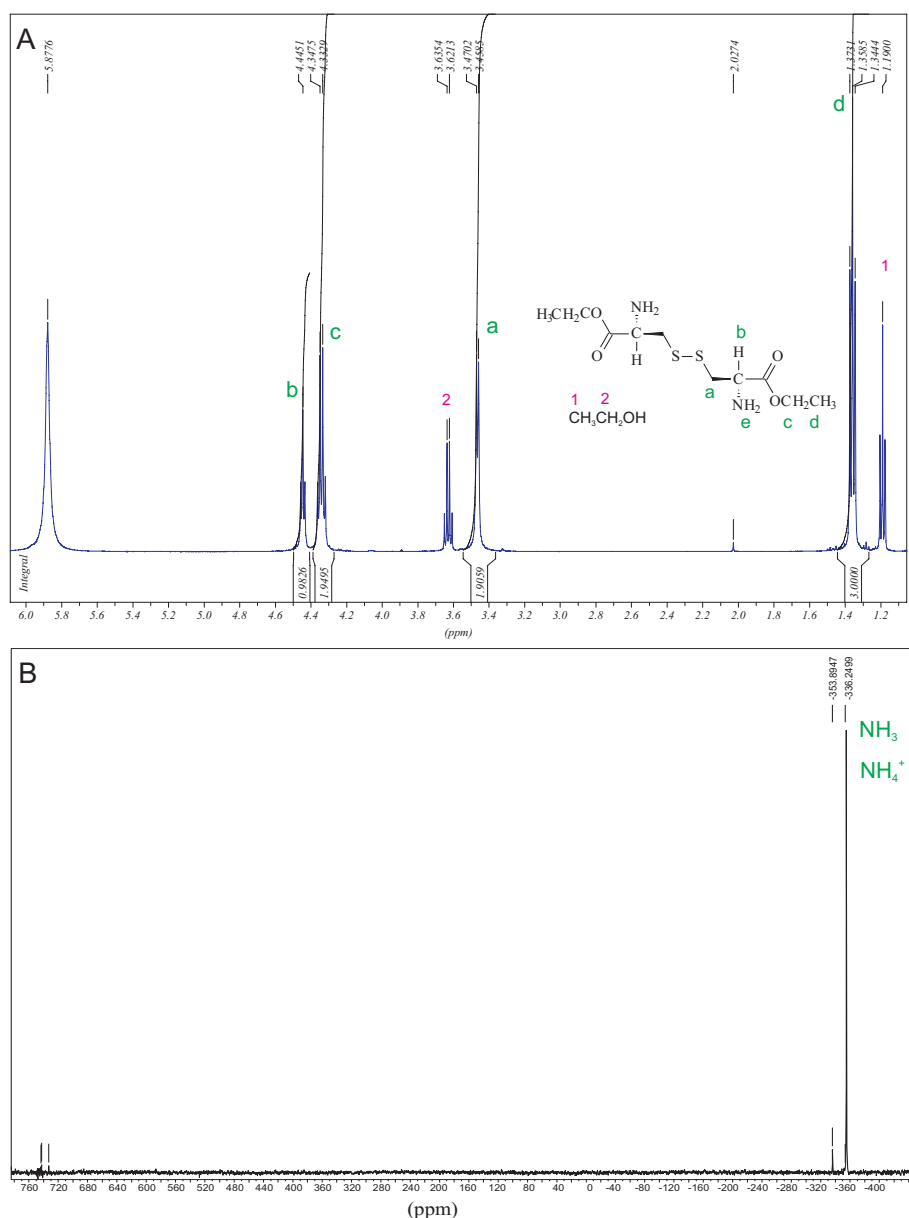


Figura III.4.9: Productos de descomposición en ausencia de oxígeno.  $^1\text{H}$  RMN (A),  $^{15}\text{N}$  RMN (B). 500 MHz, solvente:  $\text{CD}_3\text{OD}$ , referencia: pico residual del solvente (3.31 ppm).

Este hecho es interesante, ya que demuestra que el intermediario se forma y sigue siendo estable en este medio, aunque según lo observado, mucho menos que en ausencia de oxígeno. Una diferencia notable es que al final de la reacción, en presencia de oxígeno se obtuvo una sustancia amarilla viscosa, mientras que en ausencia del mismo la solución resultó ser prácticamente incolora. También fue posible notar claras diferencias organolépticas con respecto a la reacción sin oxígeno. En presencia de oxígeno se pudo percibir un olor picante característico de los acrilatos o sulfoacrilatos. De modo que se prestó especial atención a la zona de campos bajos en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN. Efectivamente se observaron señales

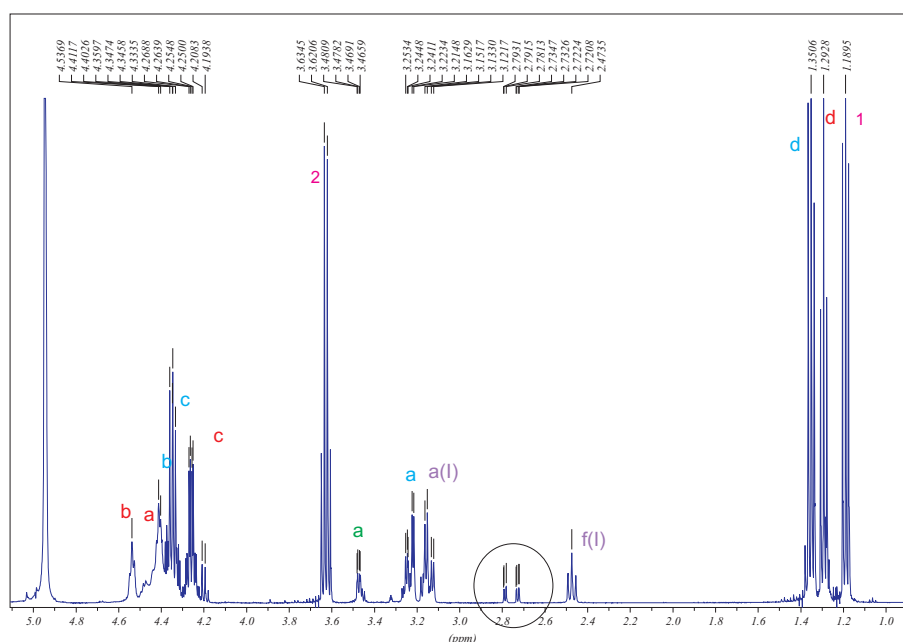


Figura III.4.10: Reacción de transnitrosación en presencia de oxígeno. RMN  $^1\text{H}$ , 500 MHz, solvente:  $\text{CD}_3\text{OD}$ , referencia: señal residual del solvente (3.31 ppm).

muy poco intensas, debido seguramente a la volatilidad del/los compuestos asociados a estas, correspondientes a dobles enlaces y posiblemente asignables a tales especies. Si bien no se identificaron estos compuestos, en la figura III.4.11 B se muestran posibles estructuras, donde X podría ser el grupo  $-\text{NH}_2$ , también podrían considerarse posibles las estructuras que resultan de la desesterificación. La pregunta que surge en forma inmediata es, ¿cómo se formaron estos compuestos?.

Este tipo de productos no han sido informados previamente en literatura como consecuencia de una reacción de transnitrosación. Aunque una publicación del año 1992 [35] hace mención de los acrilatos como productos de descomposición de episulfuros o tioepóxidos originados a partir de la reacción de varios tioles con exceso de nitrito. Entre éstos, se encontró descrita la formación del episulfuro por reacción de la CEE con exceso de nitrito. Este trabajo llevó hacia otro anterior del año 1978 [36], donde se sintetizaban los tioepóxidos y se los caracterizaba espectroscópicamente. En este trabajo se encontró la asignación espectroscópica  $^1\text{H}$  RMN para el tioepóxido derivado de la CEE en  $\text{CDCl}_3$ , curiosamente se lo describía como un líquido viscoso amarillo ( $\lambda_{\text{max}}=215(\epsilon 530)$  y  $280(\epsilon 110)$  nm). En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN se observó muy claramente señales a 2.70 (1H, dd,  $j:1.0\text{Hz}$  y  $6.0\text{Hz}$ ) y a 2.79 (1H, dd,  $j:1.0\text{Hz}$  y  $4.9\text{Hz}$ ) idénticas a las informadas en el trabajo publicado, las demás señales tal como se puede observar en la Figura III.4.11 no están en una zona limpia del espectro (aparece también el disulfuro). También se debe mencionar que cuando se midieron los productos para la reacción en presencia de oxígeno por espectrometría de masas, se detectó NO, varios

fragmentos orgánicos ( 10-18 y 33-46 m/z) y prácticamente nada de  $N_2O$ .<sup>3</sup>

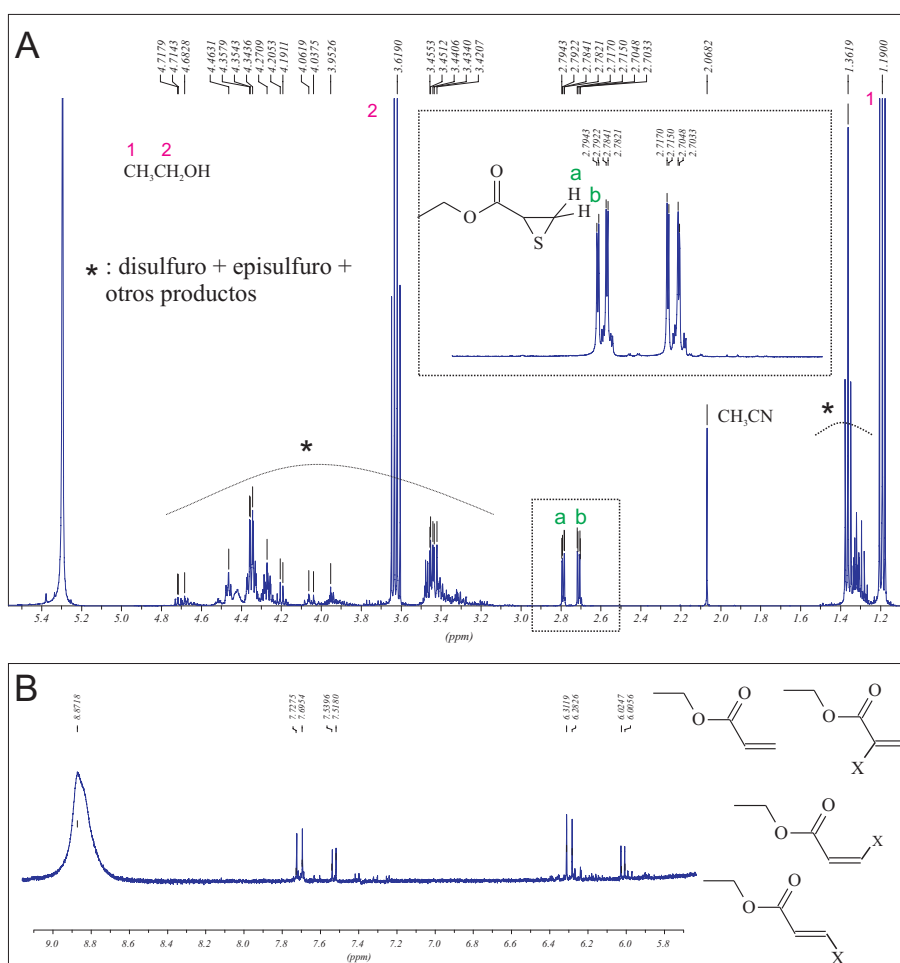


Figura III.4.11: Productos en presencia de oxígeno. Episulfuro, disulfuro y otros productos (A), ampliación a campos bajos, productos insaturados (B). RMN <sup>1</sup>H, 500 MHz, solvente: CD<sub>3</sub>OD, referencia: CH<sub>3</sub>CN (2.06 ppm).

Dos puntos interesantes se dependen de este análisis:

- La presencia de oxígeno se evidencia fácilmente a través de la presencia de estos peculiares productos, episulfuros y acrilatos.
- Es la primera vez que se proponen estos productos como consecuencia de la reacción de transnitrosación. Estos productos son de gran relevancia biológica ya que es posible que se formen naturalmente y pueden poseer propiedades dignas de ser investigadas.

En la Figura III.4.12 se muestra un esquema que muestra información recopilada de bibliografía junto con vías propuestas a raíz de este trabajo. En verde se muestran los productos

<sup>3</sup>La reacción fue realizada en idénticas condiciones, en metanol a temperatura ambiente en presencia de oxígeno.

de los que, a través de las distintas técnicas espectroscópicas, se ha tenido indicios de su presencia en este trabajo. En la parte superior se muestran las vías operativas en presencia de oxígeno, se muestra también el caso particular cuando  $R=CEE$ . Para este caso se generan los productos antes descritos, o bien como consecuencia de la reacción de transnitrosación o por descomposición del RSNO en presencia de oxígeno. El mecanismo propuesto para el caso  $R=CEE$ , se basa en la referencia bibliográfica correspondiente a la obtención de los episulfuros a partir de tioles en presencia de exceso de nitrito. En la parte inferior del diagrama se muestran tres vías propuestas que serían importantes en ausencia de oxígeno, dos de ellas (I y II) implican la reacción del intermediario con el tiol con el que se encuentra en equilibrio; la otra vía (III) involucra radicales. Es importante recordar que el estudio de los productos de descomposición originados como consecuencia de la reacción de transnitrosación tanto en ausencia como en presencia de oxígeno surgió como una curiosidad ajena al objetivo del trabajo, por lo que no se presenta un estudio detallado.



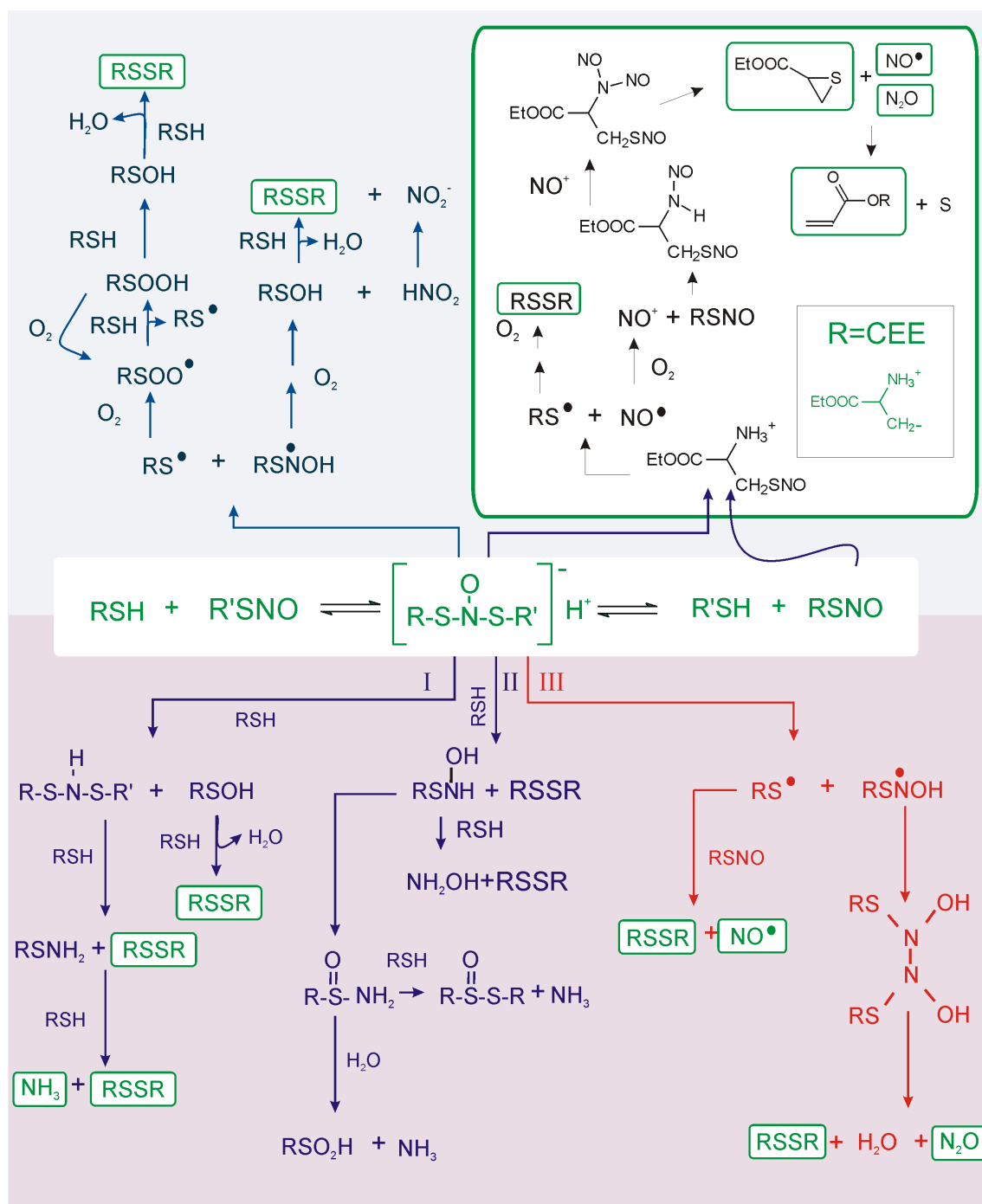


Figura III.4.12: La reacción de transnitrosación y las diferentes vías que operan en la descomposición del intermediario. RSH representa diferentes tioles estudiados, en verde se muestran los productos identificados para el caso de la reacción CEE/SNO-CEE.

### *Experimental*

**Reactivos.** La L-cisteína etil ester (CEE) fue obtenida de Sigma Aldrich. La SNO-CEE fue preparada tal como se describió en la parte experimental de la sección anterior, ver página 69. Los solventes deuterados fueron obtenidos de Sigma Aldrich.

**Instrumentación y Medidas.** Los diferentes espectros de RMN fueron adquiridos para la reacción *in situ*, las concentraciones de CEE y SNO-CEE fueron ambas fijadas en 0.1M, la reacción se realizó en CD<sub>3</sub>OD sin control de pH. Los espectros de <sup>15</sup>N RMN fueron medidos a 50.68 MHz, se tomaron 6150 transientes con un tiempo de relajación de 5 segundos. Se referenció externamente con Na<sup>15</sup>NO<sub>2</sub> disuelto en el mismo solvente (232 ppm respecto a nitrometano). Las medidas de espectrometría de masa se realizaron para la reacción en proporciones 1:1 CEE y SNO-CEE, en metanol, a temperatura ambiente, bajo atmósfera de argón y en presencia de oxígeno.

### *Simulación Computacional*

Todos los cálculos realizados fueron llevados a cabo utilizando el paquete Gaussian98, partiendo de la estructura del intermediario previamente optimizada se realizó el cálculo de modos normales y se utilizó el método GIAO (Gauge-Independent Atomic Orbital) para el cálculo de los desplazamientos químicos, ver metodología general.



## III.5

# Conclusiones y preguntas abiertas

A lo largo de esta primera parte de los resultados (III), se ha presentado el estudio de los RSNOs como moléculas almacenadoras y transportadoras del NO. Hemos visto sus propiedades y reactividad, aspecto fundamental para entender los factores que condicionan su potencial como moléculas que almacenan y preservan las funciones asociadas al NO.

En lo que respecta al transporte de esta molécula, hemos visto que la reacción de transnitrosación desempeña un rol fundamental, se ha presentado un estudio teórico-experimental del mecanismo a través del cual ocurre la misma, en lo que a esto respecta se han hecho los siguientes aportes:

- Medida de los parámetros de activación, los que no estaban informados. El conocer estos valores es de suma importancia ya que brinda la posibilidad de comparar este proceso con otros procesos reactivos donde están involucrados los RSNOs.
- Identificación y caracterización del intermediario en solución.

Es importante notar que la estrategia teórico-experimental abordada para el estudio de esta reacción resultó complementarse en forma adecuada, sirviendo de guía para la selección de las condiciones experimentales apropiadas.

Tal como se ha mostrado a lo largo de esta parte, trabajar experimentalmente con los tioles/*S*-nitrosotioles no fue una tarea sencilla debido a su extremada sensibilidad a numerosos factores. Si bien todo el estudio se realizó en ausencia de oxígeno, con el objeto de mostrar el efecto del mismo se trabajó en presencia de éste, demostrando que pequeñas cantidades se evidencian muy fácilmente a través de los productos obtenidos. Si bien el objetivo no consistió en analizar exhaustivamente los productos que aparecen como consecuencia de esta reacción, se ha mostrado que para esta reacción de transnitrosación en particular, aparecen productos como los episulfuros y acrilatos que hasta el momento no habían sido informados. Actualmente han aparecido algunas publicaciones acerca de episulfuros derivados de la

CEE [37], éstos son considerados piezas fundamentales en la síntesis de inhibidores de las cistein-proteasas.

Para finalizar, si bien hemos logrado responder varias de las preguntas que nos hemos formulado, muchas otras han quedado abiertas. En lo que a esto respecta dos puntos son interesantes de marcar:

1. La fuerte dependencia del perfil de reacción con el solvente, es atractivo desde el punto de vista químico y debería ser abordado a través de otra metodología donde se considere al solvente en forma explícita.
2. Los productos que se obtienen como resultado de la reacción de transnitrosación en presencia de oxígeno para el caso particular CEE/*SNO*-CEE son interesantes y deberían ser cuantificados y caracterizados.

# Bibliografía

- [1] H. S. Tasker and H. O. Jones. *Journal of Chemical Society*, 95:1910, 1909.
- [2] M. D. Bartberger, K. N. Houk, S. C. Powell, J. D. Mannion, K. Y. Lo, J. S. Stamler, and E. J. Toone. Theory, spectroscopy, and crystallographic analysis of s-nitrosothiols: Conformational distribution dictates spectroscopic behavior. *Journal of the American Chemical Society*, 122:5889–5890, 2000.
- [3] N. Arulsamy, D. S. Bohle, J. A. Butt, G. J. Irvine, P. A. Jordan, and E. Sagan. Interrelationships between conformational dynamics and the redox chemistry of s-nitrosothiols. *Journal of the American Chemical Society*, 121:7115–7123, 1999.
- [4] J. Mason. Trifluoromethyl thionitrite. *Journal of the Chemical Society A -Inorganic Physical Theoretical*, pages 1587–&, 1969.
- [5] D. L. H. Williams. The mechanism of nitric oxide formation from s-nitrosothiols (thionitrites). *Chemical Communications*, pages 1085–1091, 1996.
- [6] K. Wang, Y. C. Hou, W. Zhang, M. B. Ksebati, M. Xian, J. P. Cheng, and P. G. Wang. N-15 nmr and electronic properties of s-nitrosothiols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9:2897–2902, 1999.
- [7] B. Roy, A. D. Dhardemare, and M. Fontecave. New thionitrites - synthesis, stability, and nitric-oxide generation. *Journal of Organic Chemistry*, 59:7019–7026, 1994.
- [8] Y. C. Hou, J. Q. Wang, F. Arias, L. Echegoyen, and P. G. Wang. Electrochemical studies of s-nitrosothiols. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 8:3065–3070, 1998.
- [9] S. Oae, Y. H. Kim, D. Fukushima, and K. Shinhama. New syntheses of thionitrites and their chemical reactivities. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, pages 913–917, 1978.

- [10] J. M. Lu, J. M. Wittbrodt, K. Wang, Z. Wen, H. B. Schlegel, P. G. Wang, and J. P. Cheng. No affinities of s-nitrosothiols: A direct experimental and computational investigation of rs-no bond dissociation energies. *Journal of the American Chemical Society*, 123:2903–2904, 2001.
- [11] M. D. Bartberger, J. D. Mannion, S. C. Powell, J. S. Stamler, K. N. Houk, and E. J. Toone. S-n dissociation energies of s-nitrosothiols: On the origins of nitrosothiol decomposition rates. *Journal of the American Chemical Society*, 123:8868–8869, 2001.
- [12] D. J. Sexton, A. Muruganandam, D. J. Mckenney, and B. Mutus. Visible-light photochemical release of nitric-oxide from s-nitrosoglutathione - potential photochemotherapeutic applications. *Photochemistry and Photobiology*, 59:463–467, 1994.
- [13] S. C. Askew, D. J. Barnett, J. Mcaninly, and D. L. H. Williams. Catalysis by  $\text{Cu}^{2+}$  of nitric-oxide release from s-nitrosothiols (rsno). *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, pages 741–745, 1995.
- [14] A. P. Dicks, P. H. Beloso, and D. L. H. Williams. Decomposition of s-nitrosothiols: The effects of added thiols. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, pages 1429–1434, 1997.
- [15] A. P. Dicks, H. R. Swift, D. L. H. Williams, A. R. Butler, H. H. AlSadoni, and B. G. Cox. Identification of  $\text{Cu}^{+}$  as the effective reagent in nitric oxide formation from s-nitrosothiols (rsno). *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, pages 481–487, 1996.
- [16] J. Mcaninly, D. L. H. Williams, S. C. Askew, A. R. Butler, and C. Russell. Metal-ion catalysis in nitrosothiol (rsno) decomposition. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, pages 1758–1759, 1993.
- [17] G. Scorza, D. Pietraforte, and M. Minetti. Role of ascorbate and protein thiols in the release of nitric oxide from s-nitroso-albumin and s-nitroso-glutathione in human plasma. *Free Radical Biology and Medicine*, 22:633–642, 1997.
- [18] M. KashibaIwatsuki, K. Kitoh, E. Kasahara, H. Yu, M. Nisikawa, M. Matsuo, and M. Inoue. Ascorbic acid and reducing agents regulate the fates and functions of s-nitrosothiols. *Journal of Biochemistry*, 122:1208–1214, 1997.
- [19] K. Wang, Z. Wen, W. Zhang, M. Xian, J. P. Cheng, and P. G. Wang. Equilibrium and kinetics studies of transnitrosation between s-nitrosothiols and thiols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11:433–436, 2001.

- [20] S. P. Singh, J. S. Wishnok, M. Keshive, W. M. Deen, and S. R. Tannenbaum. The chemistry of the s-nitrosoglutathione glutathione system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:14428–14433, 1996.
- [21] P. S. Y. Wong, J. Hyun, J. M. Fukuto, F. N. Shirota, E. G. DeMaster, D. W. Shoeman, and H. T. Nagasawa. Reaction between s-nitrosothiols and thiols: Generation of nitroxyl (hno) and subsequent chemistry. *Biochemistry*, 37:5362–5371, 1998.
- [22] R. Clancy, A. I. Cederbaum, and D. A. Stoyanovsky. Preparation and properties of s-nitroso-l-cysteine ethyl ester, an intracellular nitrosating agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44:2035–2038, 2001.
- [23] B. S. Furniss, A. J. Hannaford, P. W. G. Smith, and A. R. Tatchell. *Vogel's textbook of practical organic chemistry*, volume Fifth. Longman, 1989.
- [24] E. C.; Annis A.; Barefield E. K.; Boatright D.; Doctorovich F.; Liotta C. L.; Neumann H.; Konda A.; Yao C. F. y. Zhang K. Ashby. *Synthetic Waste Chemical Mechanism Studies*. USA, 1994.
- [25] J. Yi, M. A. Khan, J. Lee, and G. B. Richter-Addo. The solid-state molecular structure of the s-nitroso derivative of l-cysteine ethyl ester hydrochloride. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, 12:261–266, 2005.
- [26] K. N. Houk, B. N. Hietbrink, M. D. Bartberger, P. R. McCarren, B. Y. Choi, R. D. Voyksner, J. S. Stamler, and E. J. Toone. Nitroxyl disulfides, novel intermediates in transnitrosation reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 125:6972–6976, 2003.
- [27] J. Li, G. P. Wang, and H. B. Schlegel. A computational exploration of some transnitrosation and thiolation reactions involving  $\text{ch}_3\text{sno}$ ,  $\text{ch}_3\text{ono}$  and  $\text{ch}_3\text{nhno}$ . *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4:1352–1364, 2006.
- [28] L. L. Perissinotti, A. G. Turjanski, D. A. Estrin, and F. Doctorovich. Transnitrosation of nitrosothiols: Characterization of an elusive intermediate. *Journal of the American Chemical Society*, 127:486–487, 2005.
- [29] A. P. Dicks, E. Li, A. P. Munro, H. R. Swift, and D. L. H. Williams. The reaction of s-nitrosothiols with thiols at high thiol concentration. *Canadian Journal of Chemistry- Revue Canadienne de Chimie*, 76:789–794, 1998.
- [30] T. Komiyama and K. Fujimori. Kinetic studies of the reaction of s-nitroso-l-cysteine with l-cysteine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7:175–180, 1997.



- [31] P. M. De Biase, A. G. Turjanski, D. A. Estrin, and F. Doctorovich. Mechanisms of NO release by N1-nitrosomelatonin: nucleophilic attack versus reducing pathways. *Journal of Organic Chemistry*, 70(15):5790–8, 2005.
- [32] R. E. Benesch and R. Benesch. The acid strength of the -sh group in cysteine and related compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 77:5877–5881, 1955.
- [33] W. Stricks and I. M. Kolthoff. Equilibrium constants of the reactions of sulfite with cystine and with dithiodiglycolic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 73: 4569–4574, 1951.
- [34] S. Srivastava, B. L. Dixit, K. V. Ramana, A. Chandra, D. Chandra, A. Zacarias, J. M. Petrash, A. Bhatnagar, and S. K. Srivastava. Structural and kinetic modifications of aldose reductase by s-nitrosothiols. *Biochemical Journal*, 358:111–118, 2001.
- [35] T. C. Owen and J. K. Leone. Synthesis of thiiirancarboxylic esters from cysteine and cystine esters. *Journal of Organic Chemistry*, 57:6985–6988, 1992.
- [36] C. D. Maycock and R. J. Stoodley. Studies related to thiiirans .1. synthesis of chiral thiiirancarboxylates. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, pages 1852–1857, 1979.
- [37] T. Schirmeister. (S)-Thiiirancarboxylic acid as a reactive building block for a new class of cysteine protease inhibitors. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 10(23): 2647–51, 2000.

## IV

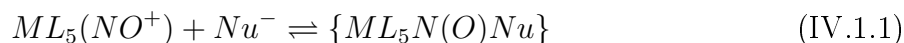
# Estabilización de *S*-nitrosotioles por coordinación a $[\text{IrCl}_5]^{2-}$



## IV.1

# Síntesis, aislamiento, y propiedades

En la introducción general (I.1.2), hemos hablado del NO y su unión a complejos metálicos para formar complejos de nitrosilo. Debido a que el  $\text{NO}^+$  se comporta como un electrófilo fuerte, el  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{HNO}_2$  se forman muy rápidamente y resultan ser las especies dominantes en solución acuosa, mientras que la concentración de  $\text{NO}^+$  es extremadamente baja [1]. Sin embargo, el  $\text{NO}^+$  es estabilizado al coordinarse a complejos metálicos, y este hecho otorga la posibilidad de explorar la reactividad del  $\text{NO}^+$  coordinado en diversas situaciones. Por ejemplo en el caso de la adición de un nucleófilo  $Nu$ :



La termodinámica y cinética asociada a la reacción mostrada en la Ec.IV.1.1 va a depender del metal (M), el ligando (L) y el nucleófilo (Nu). La reacción de nitrosilos metálicos con nucleófilos ha sido extensamente estudiada para diferentes metales y nucleófilos. En el caso particular que el nucleófilo es un tiolato ( $\text{RS}^-$ ) el complejo obtenido sería  $\{ML_5N(O)SR\}$ , este complejo puede ser pensado como un RSNO coordinado a un centro metálico y la pregunta que surge es: ¿Se estabiliza el RSNO por coordinación al centro metálico?

Los RSNOs libres, tal como hemos mencionado en la sección III.1, son muy inestables y se descomponen térmicamente con mucha facilidad. La estabilización de los RSNOs vía coordinación proporcionaría la posibilidad de estudiar RSNOs que debido a su inestabilidad son difíciles de caracterizar de modo de:

- Obtener información estructural.
- Inspeccionar los factores que condicionan su estabilidad y reactividad.

### IV.1.1. *S*-nitrosotioles coordinados a complejos metálicos: antecedentes

En las secciones III.1-2 hemos visto que los *S*-nitrosotioles se obtienen por reacción del tiol (RSH) con algún agente nitrosante[2]. Se conocen varios agentes nitrosantes[3], entre ellos podemos nombrar:

- NO, en presencia de aceptores de electrones.
- Sales del ión nitrosonio, Ej:NOBF<sub>4</sub>
- Ácido nitroso.
- Nitritos inorgánicos y orgánicos.
- Nitrosilos metálicos, etc.

En los casos en los que el agente nitrosante es un nitrosilo metálico, el tiol interacciona con el ligando nitrosilo dando como resultado un *S*-nitrosotiol (-N(O)SR) coordinado a un centro metálico, {M-N(O)SR}, donde M es el metal.

Un método ampliamente conocido que se ha utilizado para obtener *S*-nitrosotioles coordinados *in situ* [4, 5, 6, 7], consiste en hacer reaccionar el tiolato libre con el ligando NO<sup>+</sup> coordinado a un fragmento metálico, por ejemplo al [Fe(CN)<sub>5</sub>]<sup>-3</sup>. Este método se ha extendido a una gran variedad de complejos metálicos donde M=Fe<sup>II</sup>, Ru<sup>II</sup>, y Os<sup>II</sup>. En la mayoría de los casos estos complejos son inestables y se descomponen espontáneamente a los correspondientes complejos metálicos y disulfuros, siendo el tiempo de vida medio de los mismos fuertemente dependiente de la estructura del tiol [8]. Existe un gran número de trabajos publicados en lo referido a los complejos [Fe(CN)<sub>5</sub>NO]<sup>-2</sup>, su reacción con tioles para generar el aducto [Fe(CN)<sub>5</sub>N(O)SR]<sup>-3</sup>, y su posterior reactividad frente a nucleófilos. Los trabajos en esta área, que serán citados a lo largo de esta sección, fueron realizados en su mayoría por K. Szacilowski y Z. Stasicka, sin embargo se encuentran también trabajos realizados por F. Roncaroli y J. Olabe.

Surgió entonces la inquietud de explorar esta reacción para el pentacloronitrosiliridato(III) (K[IrCl<sub>5</sub>NO]), un nitrosilo metálico que presenta algunas diferencias y peculiaridades con respecto a los nombrados anteriormente, entre las que podemos citar:

1. Inercia (tercera serie de transición y mayor carga: M=Ir<sup>III</sup>).
2. Valor más alto medido para la frecuencia de estiramiento N-O:  $\nu_{N-O}=2006\text{ cm}^{-1}(\text{KBr})$ , [9] hecho que indica un fuerte carácter de nitrosonio (NO<sup>+</sup>).

3. Altamente influenciado por la naturaleza de los contraiones y el solvente.

Cuando M es iridio, en particular cuando se tiene el siguiente complejo:  $\text{K}[\text{IrCl}_5\text{NO}]$  y se lo hace reaccionar en acetonitrilo con diferentes tioles se obtienen los correspondientes S-nitrosotioles coordinados. A diferencia de lo que ocurre para los complejos metálicos nombrados anteriormente, se obtiene un *producto estable* y por *primera vez fue posible aislar nitrosotioles coordinados*.

## IV.1.2. Reacción de $\text{K}[\text{IrCl}_5\text{NO}]$ con tioles: aspectos generales

La reacción se realizó para un grupo de tioles que fueron seleccionados y sub-agrupados según el siguiente criterio:

- Tioles con grupos aromáticos: su elección radica en el hecho de que los S-nitrosotioles derivados de éstos son los más inestables conocidos.
- Tioles de relevancia biológica: este grupo está integrado por derivados de la cisteína solubles en el solvente de reacción, y glutatión. La cisteína junto con el glutatión son los referentes de los tioles en los sistemas biológicos.
- Ácido mercaptosuccínico y derivado metil ester: sus S-nitrosotioles resultan ser los que más se estabilizan al coordinarse a centros metálicos con  $\text{M}=\text{Fe}$ ,  $\text{Ru}$ , por lo que constituyen un punto de comparación con los complejos de iridio.

En todos los casos se encontró que cuando el tiol reacciona con el complejo de iridio en acetonitrilo, al resguardo de la luz, el complejo con el nitrosotiol coordinado se obtiene como un precipitado en forma inmediata, mas aún, el producto y el color del mismo dependen del tiol y la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción (Figura IV.1.1).

El solvente de reacción elegido resultó ser acetonitrilo, esta elección se apoya en el hecho de que el reactivo,  $\text{K}[\text{IrCl}_5\text{NO}]$  es soluble en el mismo y no se descompone ni reacciona con el solvente durante el tiempo en el cual ocurre la reacción con los tioles. Todas las reacciones se realizaron en ausencia de luz, debido a que el reactivo es extremadamente sensible a la misma. Como se puede observar en la Figura IV.1.1, los complejos tipo **b** tienen una molécula de acetonitrilo coordinada en la posición *trans*, esto ocurre debido a que se labiliza el cloruro *trans* y es sustituido por una molécula de solvente.

La mayoría de estos complejos se obtienen con excelentes rendimientos salvo algunas excepciones que luego discutiremos en detalle.

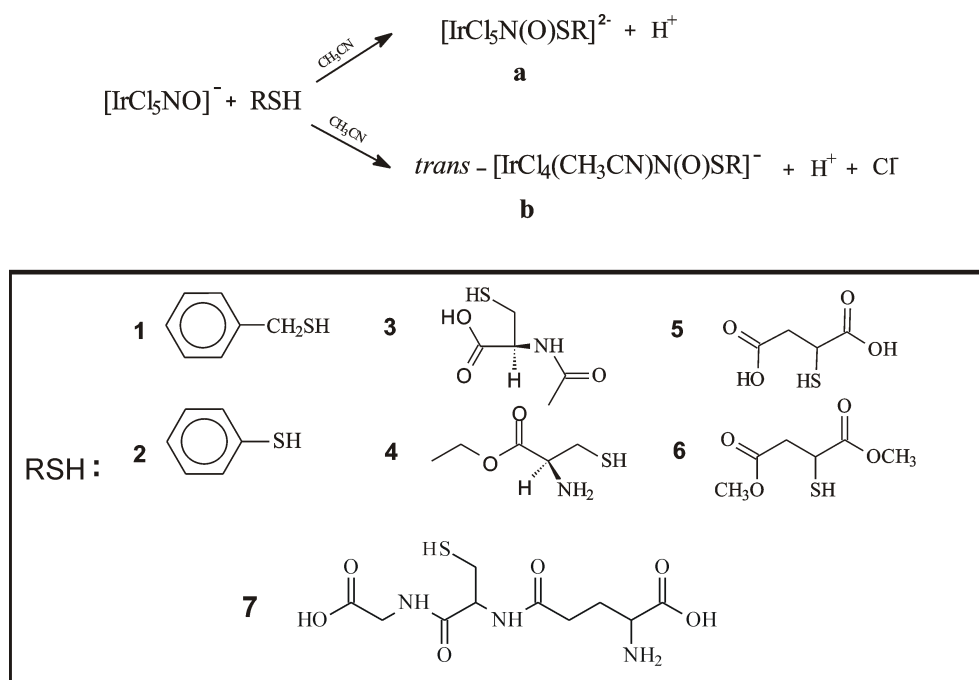


Figura IV.1.1: Reacción de  $\text{K}[\text{IrCl}_5\text{NO}]$  con tioles.

Tal como se muestra en la Figura IV.1.1, el nucleófilo que ataca al nitrosilo metálico es el tiol o tiolato. Si contemplamos la estructura de los tioles considerados, algunos de ellos tienen varios grupos funcionales por lo que podríamos preguntarnos si el nucleófilo es efectivamente el tiolato, alguno de los otros grupos funcionales, o ambos, comprometiendo de esta forma el rendimiento del producto esperado. Pasemos entonces a considerar qué sucede en cada grupo seleccionado:

- Grupo 1 ▷ Tioles aromáticos, aquí no queda duda que el nucleófilo es el tiol ya que no hay ningún otro grupo funcional capaz de reaccionar como nucleófilo.
- Grupo 2 ▷ Aquí tenemos varios grupos funcionales además del tiol: un grupo amino y uno carboxilo. Para estos últimos su carácter como nucleófilo se reduce dramáticamente al estar protonados. Por otro lado puede ser suprimido mediante la formación de algún derivado como un alquilester para el carboxilo o un N-acetil para el amino.
- Grupo 3 ▷ Aquí tenemos dos carboxilos además del tiol, lo expuesto para el grupo 2 se aplica también a este caso.

A continuación se mostrará el análisis y los resultados de las síntesis para cada grupo junto las estrategias abordadas para maximizar el rendimiento del producto que corresponde al *S*-nitrosotiol coordinado. En la Figura IV.1.2 se muestran todos los complejos preparados y que a continuación se describirán en detalle.

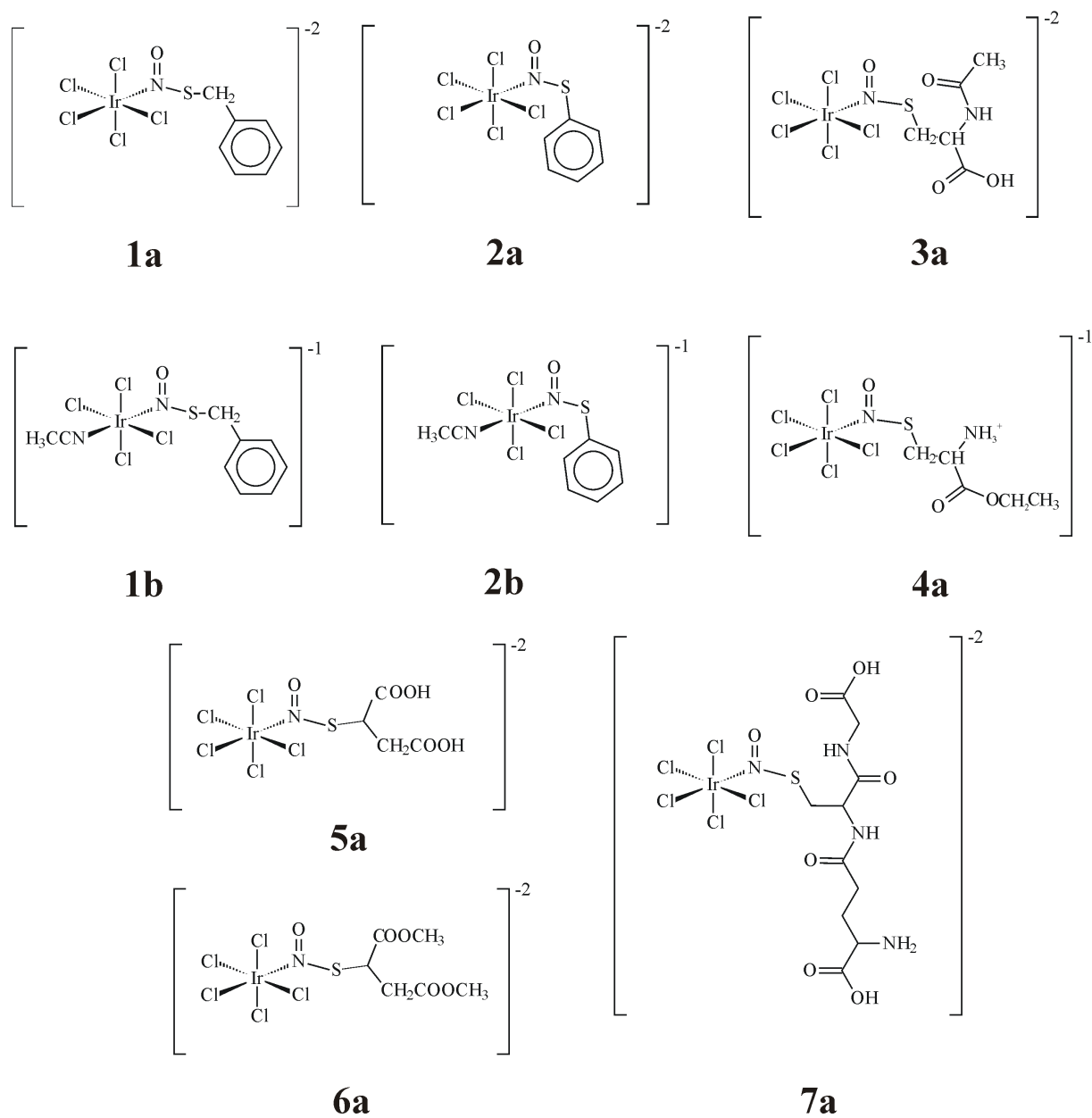


Figura IV.1.2: Complejos preparados en el presente trabajo. El contraión es  $\text{K}^+$  en todos los casos. En el caso del tiol **1** también se preparó el correspondiente complejo con  $\text{PPh}_4^+$  como contraión (**1c**).



### *Experimental*

**Reactivos.** El compuesto  $K[IrCl_5NO]$  fue obtenido de Sigma-Aldrich o Strem Chemicals y purificado por recristalización de acetonitrilo. El benciltiol y feniltiol fueron obtenidos de Fluka, el ácido mercaptosuccínico, la N-acetil-L-cisteína y el glutatión fueron obtenidos de Merk, la L-cisteína etilester fue obtenida de Sigma Aldrich. El derivado metil ester del ácido mercaptosuccínico fue sintetizado a partir del ácido mercaptosuccínico y metanol mediante procedimientos descritos en literatura [10]. Luego de su síntesis fue identificado mediante FTIR y RMN. El  $K[IrCl_5^{15}NO]$  se preparó a partir de  $Na^{15}NO_2$  mediante procedimientos descritos en literatura [9], al que se le realizaron algunas modificaciones. La principal modificación consistió en no realizar los lavados con metanol, en su lugar se disolvió en acetonitrilo y se precipitó con tolueno.

**Instrumentación.** Ver parte II.1, en metodología general.

**Procedimientos generales.** Los complejos se sintetizaron de acuerdo al siguiente procedimiento general:  $2.28 \times 10^{-2}$  mmoles del correspondiente tiol en 0.25 mL de acetonitrilo (para los complejos 3a y 4a se usó una mezcla de solventes: 0.25 mL de acetonitrilo +  $20 \mu L$  de metanol seco) fueron agregados bajo atmósfera de argón a 10 mg ( $2.28 \times 10^{-2}$  mmoles) de  $K[IrCl_5NO]$  disueltos en 0.25 mL de acetonitrilo. El producto precipita en forma inmediata, fue separado de la solución por centrifugación y secado bajo vacío. El complejo  $K[IrCl_5NO]$  es sensible a la luz, por lo que todos los procedimientos fueron efectuados al resguardo de la misma. Los complejos marcados fueron preparados de la misma forma usando  $K[IrCl_5^{15}NO]$ .

### *Simulación Computacional*

Todos los cálculos realizados fueron llevados a cabo utilizando el paquete Gaussian98 y Gaussian03, las geometrías fueron optimizadas utilizando DFT con el funcional PBE1PBE con la base SDD para todos los átomos. Con el objeto de tener en cuenta eventuales efectos asociados al tamaño del conjunto de funciones de base, sobre las estructuras optimizadas se realizó un cálculo de energía a geometría fija usando la base SDB-cc-pVDZ con el mismo funcional [11]. Cada punto estacionario encontrado sobre la superficie de energía potencial fue caracterizado a través de un cálculo de modos normales.

El solvente fue modelado como un continuo utilizando el método PCM, previamente descrito. Para información detallada ver parte II.2, en metodología general.

## IV.1.3. RSNOs con grupos aromáticos: complejos tipo a y tipo b

En el caso particular de tioles que contienen grupos aromáticos (benciltiol y feniltiol), se logró obtener los dos tipos de productos, **a** y **b**. El producto **a** resultó ser un precipitado verde muy insoluble en el solvente de reacción, el producto **b** resultó tener un color rojo y poca solubilidad en el solvente de reacción. Ambos productos resultaron ser muy solubles en agua.

La relación de productos obtenidos, **a** y **b**, resultó depender principalmente de la temperatura a la cual se desarrolla la reacción. Cuando la reacción se desarrolla a temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ C$ ) se obtiene el complejo **b** en su totalidad, mientras que a temperaturas bajas ( $-20^\circ C$ ) solo se obtiene el complejo **a**.

En el caso de la reacción con el benciltiol, el complejo, *trans*-K[IrCl<sub>4</sub>(CH<sub>3</sub>CN)N(O)SCH<sub>2</sub>Ph] (producto **1b**), resultó ser más fácil de obtener y caracterizar que el complejo K<sub>2</sub>[IrCl<sub>5</sub>N(O)SCH<sub>2</sub>Ph] (producto **1a**). De hecho el producto **1b** resultó ser fácilmente cristizable.

Similarmente a la reacción con el benciltiol, cuando la reacción se llevó a cabo con el feniltiol a temperatura ambiente se obtuvo el complejo *trans*-K[IrCl<sub>4</sub>(CH<sub>3</sub>CN)N(O)SPh] K<sub>2</sub> (producto **2b**) de color rojizo y el complejo K<sub>2</sub>[IrCl<sub>5</sub>N(O)SPh] (producto **2a**) de color verdoso a baja temperatura.

Con el objeto de tener una visión más profunda en lo que respecta a la estabilidad termodinámica de los diferentes productos, se realizaron cálculos de estructura electrónica, en particular DFT, tanto para el sistema aislado como en solución usando el modelo continuo de solvatación PCM (Tabla IV.1.1). En todos los casos se calculó el cambio energético asociado a las reacciones que se muestran a continuación (Ec. IV.1.2, Ec.IV.1.3):

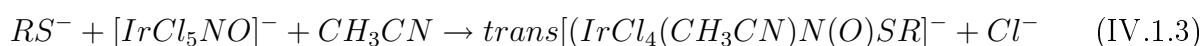
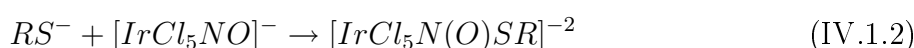


Tabla IV.1.1: Cambio energético (Kcal/mol) asociado a la reacción de formación (Ec. IV.1.2 y Ec. IV.1.3) de los complejos **1 a,b** y **2 a,b** aislados y en acetonitrilo (PCM). PBE1PBE/SDD//PBE1PBE/SDB-cc-pVDZ.

Complejo	Sistema aislado	Acetonitrilo
<b>1a</b>	15.4	-39.8
<b>1b</b>	-18.5	-44.1
<b>2a</b>	32.1	-31.6
<b>2b</b>	-3.8	-34.3

Las diferencias de energía para el complejo aislado y en solución (CH<sub>3</sub>CN) indican que para ambos casos el complejo más estable es el **b**. Ahora bien, mientras que para el complejo aislado la diferencia en energía es de 34 y 36 kcal/mol para **1** y **2** respectivamente, teniendo en cuenta el efecto de la solvatación a través del método PCM la diferencia en energía es mucho menor, resultando ser 4.3 y 2.7 kcal/mol respectivamente. Si bien la formación de ambos complejos está muy favorecida desde el punto de vista termodinámico, experimentalmente se observa que a temperaturas bajas sólo se forma **a**. En función de esto, podemos decir que la barrera asociada a la formación de los complejos tipo **b**, es seguramente mayor a la asociada a la formación de **a**. Esto es consistente con el hecho que la reacción de formación del complejo **b** involucra la ruptura de un enlace Ir-Cl, cosa que no ocurre en el caso del complejo **a**. De esta manera se explica que sea posible obtener uno u otro complejo sintonizando adecuadamente

las variables de trabajo, en particular la temperatura. Para finalizar, podemos decir entonces que a temperatura ambiente es posible obtener en forma pura los complejos tipo **b**, mientras que a temperaturas bajas y separando en forma inmediata el precipitado sólo se obtienen los complejos de tipo **a**; a temperaturas intermedias se obtienen mezclas.

### Experimental

**Preparación del complejo 1a.**  $\text{KH}[\text{IrCl}_5\text{N}(\text{O})\text{SCH}_2\text{Ph}]\cdot 1/3\text{CH}_3\text{CN}$ . La reacción se llevó a cabo a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , el producto precipita en forma inmediata como polvo verde. Rendimiento: 92 %.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta$  4.63 (s, 2H);  $\delta$  7.34-7.40 (m, 5H). Análisis Elemental: Informado (calculado): C, 15.9(15.9); N, 3.3(3.2); H, 1.6(1.5); S, 5.4(5.5). UV-Visible,  $[\lambda_{max}, \text{nm} (\epsilon, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})]$  : 328(2465), 397(4409), 511(876), 556(855). FTIR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_{\text{NO}}=1431$ ,  $\nu_{\text{SN}}=779$ .

**Preparación del complejo 1b.** *trans*- $\text{K}[\text{IrCl}_4(\text{CH}_3\text{CN})\text{N}(\text{O})\text{SCH}_2\text{Ph}]\cdot \text{CH}_3\text{CN}$ . La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, luego de unos minutos el producto precipita como cristales rojos. Rendimiento: 80.3 %.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta$  2.92 (s, 3H);  $\delta$  4.67 (s, 2H);  $\delta$  7.36-7.37 (m, 5H). Análisis Elemental: Informado (calculado): C, 21.6(21.7); N, 6.9(6.9); H, 2.1(2.1); S, 5.1(5.3). UV-Visible,  $[\lambda_{max}, \text{nm} (\epsilon, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})]$  : 325(1809), 387(3283), 475(1059), 525(919). FTIR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_{\text{NO}}=1432$ ,  $\nu_{\text{SN}}=794$ .

**Preparación del complejo 1c.** *trans*- $(\text{P}(\text{Ph})_4)[\text{IrCl}_4(\text{CH}_3\text{CN})\text{N}(\text{O})\text{SCH}_2\text{Ph}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en forma análoga a 1b. El complejo 1c se obtuvo como resultado de agregar una solución saturada del contraión en una mezcla etanol-agua al producto disuelto en agua. FTIR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_{\text{NO}}=1436$ ,  $\nu_{\text{SN}}=852$ .

**Preparación del complejo 2a.**  $\text{K}_2[\text{IrCl}_5\text{N}(\text{O})\text{SPh}]$  La reacción se llevó a cabo a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , el producto precipita en forma inmediata como polvo verde. Rendimiento: 98.8 %.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta$  7.49 (d, 2H);  $\delta$  7.65-7.76 (m, 3H). Análisis Elemental: Informado (calculado): C, 12.2(12.2); N, 2.5(2.4); H, 1.0(1.0); S, 5.4(5.4). UV-Visible,  $[\lambda_{max}, \text{nm} (\epsilon, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})]$  : 337(2967), 396(4054), 506(849), 556(822). FTIR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_{\text{NO}}=1438$ ,  $\nu_{\text{SN}}=763$ .

**Preparación del complejo 2b.** *trans*- $\text{K}[\text{IrCl}_4(\text{CH}_3\text{CN})\text{N}(\text{O})\text{SPh}]\cdot \text{CH}_3\text{CN}$ . La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, luego de unos minutos se obtiene el producto de apariencia cristalina verde-rojizo. Rendimiento: 84.5 %.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta$  2.95 (s, 3H);  $\delta$  7.49 (s, 2H);  $\delta$  7.65-7.76 (m, 3H). Análisis Elemental: Informado (calculado): C, 20.4(20.2); N, 7.0(7.1); H, 1.8(1.8); S, 5.3(5.3). UV-Visible,  $[\lambda_{max}, \text{nm} (\epsilon, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})]$  : 325(2821), 387(4728), 478(1174), 525(986). FTIR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_{\text{NO}}=1453$ ,  $\nu_{\text{SN}}=786$ .

## IV.1.4. RSNOs de relevancia biológica

Debido a la poca solubilidad de la cisteína en el solvente de reacción y con el objeto de maximizar el rendimiento del RSNO coordinado, se ha trabajado con derivados que se disponían en el laboratorio como lo son la L-cisteína etil ester y la N-acetil-L-cisteína. Las reacciones se realizaron tal como se detalla en la parte experimental. (pág. 118/121)

Para estos tioles tanto a temperatura ambiente como a bajas temperaturas se obtuvo el mismo producto y no se observó el efecto *trans* descrito para el caso de los tioles que contienen grupos aromáticos. Al realizar la reacción con los respectivos tioles los únicos productos obtenidos fueron,  $\text{KH}[\text{IrCl}_5\text{N}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)\text{COOH}]$  (producto **3a**)

y  $\text{H}[\text{IrCl}_5\text{N}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}(\text{COOCH}_2\text{CH}_3)\text{NH}_3]$  (producto **4a**) respectivamente. La L-cisteína etil ester se utilizó como clorhidrato por lo que el carácter nucleofílico del grupo amino es prácticamente nulo comparado con el del tiol, en este caso tanto a temperatura ambiente como a bajas temperaturas el rendimiento fue muy bueno. En el caso de la N-acetilcisteína el rendimiento a bajas temperaturas es excelente pero a temperatura ambiente disminuye, probablemente el carboxilo, a través de reacciones paralelas sea el responsable de este hecho (el carboxilato también puede actuar como ligando). Los productos resultaron ser muy solubles en agua e insolubles en el solvente de reacción ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ).

Se probó esta reacción para el glutatión, debido a su poca solubilidad se utilizó una mezcla de solventes (ver parte experimental, pág. 121). Al mezclar el tiol con el complejo, la solución se tornó verde pero al transcurrir unos pocos minutos el color se desvaneció. Esta observación era de esperar debido a la presencia de varios grupos funcionales con carácter nucleofílico, se repitió la reacción en presencia de un ácido orgánico (trifluoracético: TFA), en esta oportunidad debido a la disminución del carácter nucleofílico de los grupos amino/carboxilo el producto resultó formarse y la coloración verde no se desvaneció. Desafortunadamente el complejo coordinado resultó ser muy soluble en el solvente de reacción, hecho que complicó su aislamiento. Recientemente se ha encontrado una forma de poder aislarlo. El complejo **7a** se identificó mediante  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN y UV-visible en el solvente de reacción. Debido a las dificultades encontradas para su aislamiento no se muestra una caracterización completa para este complejo.

### *Experimental*

**Preparación del complejo 3a.**  $\text{KH}[\text{IrCl}_5\text{N}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)\text{COOH}]$ . La reacción se llevó a cabo a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , el producto precipita en forma inmediata como polvo verde. Rendimiento: 82.0%.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta$  2.0 (s, 3H);  $\delta$  3.78-3.98 (dd, 2H);  $\delta$  4.65-4.70. Análisis Elemental: Informado (calculado): C, 9.7(9.9); N, 4.4(4.6); H, 1.9(1.5); S, 5.0(5.3). UV-Visible,  $[\lambda_{max, nm} (\epsilon, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})]$  : 331(2246), 398(4375), 572(944). FTIR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_{\text{NO}}=1431$ ,  $\nu_{\text{SN}}=781$ .

**Preparación del complejo 4a.**  $\text{H}[\text{IrCl}_5\text{N}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}(\text{COOCH}_2\text{CH}_3)\text{NH}_3]$ . La reacción se llevó a cabo a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , el producto precipita en forma inmediata como polvo. Rendimiento: 78.9%.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta$  1.33 (t, 3H);  $\delta$  3.88-4.06 (dd, 2H);  $\delta$  4.36 (m, 2H);  $\delta$  4.5 (t, 1H). Análisis Elemental: Informado (calculado): C, 11.0(10.9); N, 4.9(5.1); H, 2.3(2.2); S, 5.6(5.8). UV-Visible,  $[\lambda_{max, nm} (\epsilon, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})]$  : 327(1836), 400(3235), 581(658). FTIR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_{\text{NO}}=1438$ ,  $\nu_{\text{SN}}=784$ .

**Preparación del complejo 7a.** La reacción se llevó a cabo a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , la solución se torna verde en forma inmediata. El tiol se disuelve en la mínima cantidad de agua necesaria, se agrega cantidad estequiométrica de ácido trifluoracético. Por otro lado, se disuelve el complejo de iridio en 0.25 mL de acetonitrilo, se enfría a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Sobre este último se agrega tiol. Se centrifuga, se observa que se separan 2 fases, en la fase acuosa queda disuelto el complejo en su totalidad, se separa esta fase y se agrega sobre acetona helada. El complejo precipita, se separa

el solvente y se seca bajo vacío.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$  ( $40\mu\text{l}$ ) +  $\text{CD}_3\text{CN}$  (0.5 ml), 500 MHz):  $\delta$  2.21 (m, 2H);  $\delta$  2.56 (m, 2H);  $\delta$  3.03-3.26 (dd, 2H);  $\delta$  3.78-3.97 (m, H),  $\delta$  4.014 (d, 2H),  $\delta$  4.83 (m, H). UV-Visible,  $[\lambda_{max}, \text{nm}]$ : 329, 398, 510, 573.

### IV.1.5. RSNOs del ácido mercaptosuccínico y derivados de éste

Tal como antes se mencionara, para tener un punto de comparación con el conocido y extensamente estudiado derivado del complejo pentacianonitrosilferrato(II),  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{3-}$  (complejo **5n**,  $\text{RS}^- = \text{mercaptosuccinato}$ ); se realizó la reacción con el ácido mercaptosuccínico. El complejo **5n** ha sido reportado como el más estable de todos los complejos derivados del pentacianonitrosilferrato(II), con una vida media de 36 horas [12].

En nuestro caso cuando se realizó la reacción del  $\text{K}[\text{IrCl}_5\text{NO}]$  con el ácido mercaptosuccínico, la misma resultó en un muy bajo rendimiento del complejo correspondiente (producto **5a**) obteniéndose otros productos no identificados. El producto impuro resultó ser parcialmente soluble en acetonitrilo. Es probable que los carboxilatos reaccionen formando complejos diméricos.

Para evitar posibles reacciones secundarias se decidió abordar como estrategia la esterificación de los grupos carboxilo y de esta forma bloquear las posibles reacciones a través de los carboxilos. Efectivamente, al realizar la reacción del derivado metilester del ácido mercaptosuccínico con el  $\text{K}[\text{IrCl}_5\text{NO}]$  se obtuvo en forma cuantitativa y limpia el complejo  $[\text{IrCl}_5\text{N}(\text{O})\text{SCH}(\text{COOCH}_3)\text{CH}_2\text{COOCH}_3]$  (producto **6a**), el cual al igual que los derivados de la cisteína, resultó ser muy soluble en agua e insoluble en el solvente de reacción.

En la Tabla IV.1.2 se muestran los cambios energéticos asociados a la formación de los complejos **5a** y **6a** a partir de  $\text{K}[\text{IrCl}_5\text{NO}]$  aislado y en acetonitrilo ((Ec. IV.1.2). Los valores muestran que desde el punto de vista termodinámico ambos complejos exhiben una estabilidad similar. Este resultado favorece nuestra hipótesis de que la derivatización bloquea la ocurrencia de reacciones paralelas indeseables en las que estarían involucrados los grupos carboxilo.

Tabla IV.1.2: Cambio energético (kcal/mol) asociado a la reacción de formación para los complejos (Ec. IV.1.2) **5a** y **6a** para el sistema aislado y acetonitrilo (PCM). PBE1PBE/SDD//PBE1PBE/SDB-cc-pVDZ.

Complejo	Sistema aislado	Acetonitrilo
<b>5a</b>	18.96	-37.29
<b>6a</b>	20.13	-37.17

*Experimental*

**Preparación del complejo 5a.**  $\text{KH}[\text{IrCl}_5\text{N}(\text{O})\text{SCH}(\text{COOH})\text{CHCOOH}]$ . La reacción se llevó a cabo a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , el producto precipita en forma inmediata como polvo verde e inmediatamente su color cambia a pardo-marrón rojizo.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 500 MHz):  $\delta$  2.65-2.72 (m, 2H);  $\delta$  4.57-4.59 (m, 1H). UV-Visible, [ $\lambda_{max, nm}$  ( $\epsilon, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )] : 332(2592), 401(5141), 581(1063). FTIR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_{\text{NO}}=1435$ ,  $\nu_{\text{SN}}=781$ .

**Preparación del complejo 6a.**  $\text{K}_2[\text{IrCl}_5\text{N}(\text{O})\text{SCH}(\text{COOCH}_3)\text{COOCH}_3] \cdot 1/2 \text{CH}_3\text{CN}$ . La reacción se llevó a cabo a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , el producto precipita en forma inmediata como polvo. Rendimiento: 80.1%.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 500 MHz):  $\delta$  2.76-2.95 (m, 2H);  $\delta$  3.65 (s, 6H);  $\delta$  4.77-4.78 (m, 1H). Análisis Elemental: Informado (calculado): C, 12.2(12.4); N, 2.9(3.1); H, 1.7(1.6); S, 5.0(4.7). UV-Visible, [ $\lambda_{max, nm}$  ( $\epsilon, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )] : 322(4801), 397(5674), 574(1358). FTIR (KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu_{\text{NO}}=1437$ ,  $\nu_{\text{SN}}=790$ .



## IV.2

# Estructura, caracterización espectroscópica y propiedades.

Los complejos de pentacloroiridato(III) con los *S*-nitrosotioles coordinados presentan espectros UV-visible, y FTIR característicos. Se pueden caracterizar fácilmente por espectroscopía RMN y también por espectrometría de masa. En algunos casos fue posible obtener monocristales y determinar las estructuras por difracción de rayos X. En esta sección se muestra una completa caracterización espectroscópica de estos compuestos, tarea fundamental para guiar todo estudio posterior.

### IV.2.1. Estructura: difracción de rayos X

Como es sabido, la difracción de rayos X proporciona una prueba estructural concluyente, sin embargo la obtención de cristales adecuados no siempre resulta ser una tarea sencilla. En este caso, se logró cristalizar uno de los complejos y un producto de su descomposición. El complejo **1b** se cristalizó con dos contraiones diferentes y en el intento por cristalizar **2b** se obtuvo un producto de su descomposición. Otros compuestos, como **3a** y **6a** tienen tendencia a cristalizar, pero hasta la fecha no se ha logrado obtener cristales adecuados.

El haber logrado cristalizar el complejo **1b** fue un hecho importante ya que además de ser la primera estructura cristalina de un RSNO coordinado reportada, el *S*-nitrosobenciltiol es el RSNO libre más inestable de todos los considerados y casualmente como se ha mencionado en la introducción general fue el primer *S*-nitrostiol sintetizado (Tasker y Jones, 1909). Por otro lado, la espectroscopía de rayos X proporcionó la prueba contundente de que había una molécula de acetonitrilo en la posición *trans* al ligando, hecho que en un primer momento no fue considerado y salió a la luz como resultado del intento de obtener cristales. De esta forma fue posible avanzar en la comprensión de las propiedades observadas.



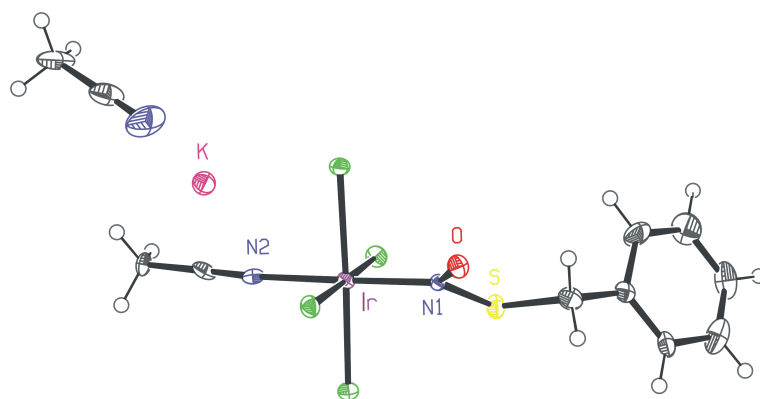


Figura IV.2.1: Estructura cristalina obtenida por difracción de rayos X para el producto **1b**. Además se observa el contraión  $K^+$  y una molécula de acetonitrilo como solvato.

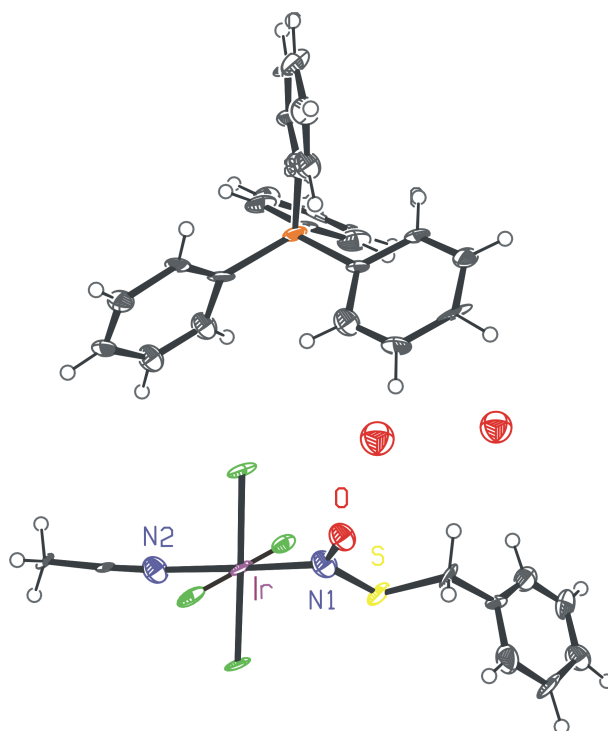


Figura IV.2.2: Estructura cristalina obtenida por difracción de rayos X para el producto **1c**. Además se observa el contraión y dos moléculas de agua.

## Efecto del contraión y curiosidades

El primer cristal se obtuvo al concentrar muy lentamente una solución del complejo **1b** en acetonitrilo. Los cristales obtenidos tenían un color rojo intenso, característico de los RSNOs <sup>1</sup>[13] (Figura IV.2.1). Luego se intentó otra vía de obtener cristales que consistió en preparar

<sup>1</sup>Datos de los cristales: fórmula mínima, Mr=608.40, prismas, tamaño del cristal 0.3 x 0.3 x 0.02 mm<sup>3</sup>, ortorrómbico, grupo espacial P2(1)n, a=17.548(4)Å, b=6.819(14)Å, c=18.261(4)Å, F(000)=1152,

una solución saturada del complejo en agua y agregarle un contraión voluminoso como el tetrafenilfosfonio ( $\text{PPh}_4^+$ ), de esta forma se obtuvieron cristales verdes<sup>2</sup> (Figura IV.2.2). Las estructuras cristalinas de ambos complejos muestran características estructurales prácticamente idénticas (ver Tabla IV.2.4, pág. 132) salvo por el hecho de que todas las distancias para el cristal de fosfonio son menores. El hecho curioso del cambio de color al cambiar el contraión denota que estos complejos son bastante sensibles al entorno. Más adelante en esta sección, se mostrarán otros resultados que evidencian esta misma particularidad.

*Algunas características a resaltar son:*

- Tal como se puede observar en la Figura IV.2.3, cuando el contraión es potasio, la red cristalina no se ve tan compactada como cuando el contraión es el tetrafenilfosfonio. El complejo **1c** (tetrafenilfosfonio) tiene simetría  $C_s$  mientras que el complejo **1b** tiene menor simetría.
- La diferencia de color se atribuye a la interacción donador-aceptor de dos de los cloruros con el  $\text{K}^+$  (distancia  $\text{Cl}^- - \text{K}^+$  :  $3.1\text{\AA}$ ) y en el otro caso uno de los cloruros con dos aguas presentes por celda unidad (distancia  $\text{Cl}^- - \text{OH}_2$  :  $3.2\text{\AA}$ ).
- En la Figura IV.2.4 se puede observar el apilamiento de los anillos aromáticos debido a la interacción de stacking  $\pi$ - $\pi$ , es interesante notar que los fosfonios interaccionan formando una hélice, lo que les permite también interaccionar con el anillo bencénico del ligando RSNO. En cambio, para el reactivo los contraiones se acomodan uno arriba del otro como planos apilados. (Figura IV.2.5)

Muy probablemente estas interacciones que resultan en el ordenamiento observado sean la fuerza impulsora para la cristalización en el caso del complejo **1b**.

---

$V=1972.8(7)\text{\AA}^3$ ,  $T=120(2)$  K,  $Z=4$ ,  $D_c=2.047\text{Mg/m}^3$ ,  $\mu=7.624\text{ mm}^{-1}$ .

<sup>2</sup>Datos de los cristales: fórmula mínima,  $\text{Mr}=899.67$ , prismas, tamaño del cristal  $0.6 \times 0.3 \times 0.1\text{ mm}^3$ , triclinico, grupo espacial P-1,  $a=20.053(2)\text{\AA}$ ,  $b=7.250(5)\text{\AA}$ ,  $c=26.738(3)\text{\AA}$ ,  $F(000)=1176$ ,  $V=3764.1(6)\text{\AA}^3$ ,  $T=120(2)$  K,  $Z=8$ ,  $D_c=1.178\text{Mg/m}^3$ ,  $\mu=7.393\text{ mm}^{-1}$ .

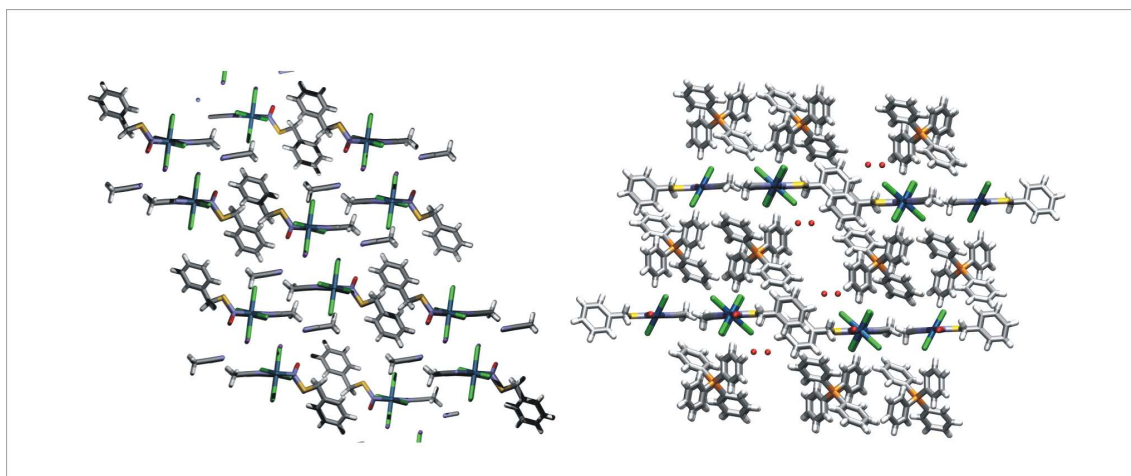


Figura IV.2.3: Vista de las redes cristalinas para **1b** y **1c**.

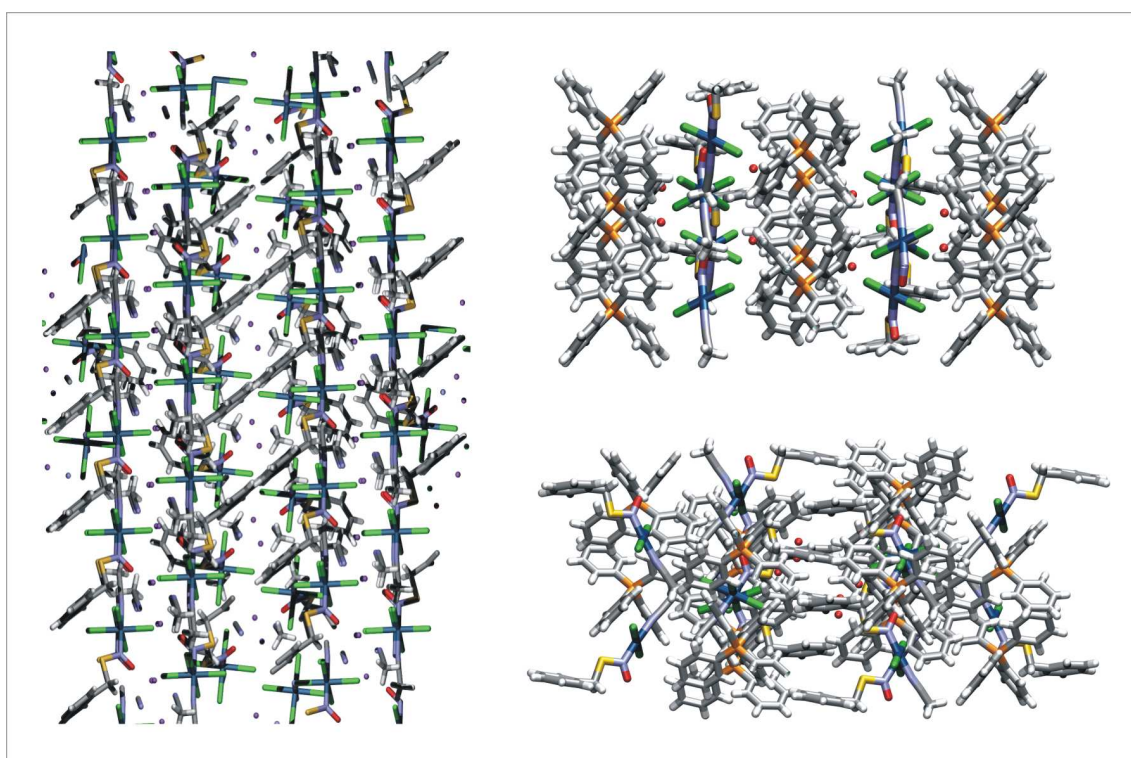


Figura IV.2.4: Vista de las redes cristalinas de **1b** y **1c**: se observa el  $\pi$ - $\pi$  stacking.

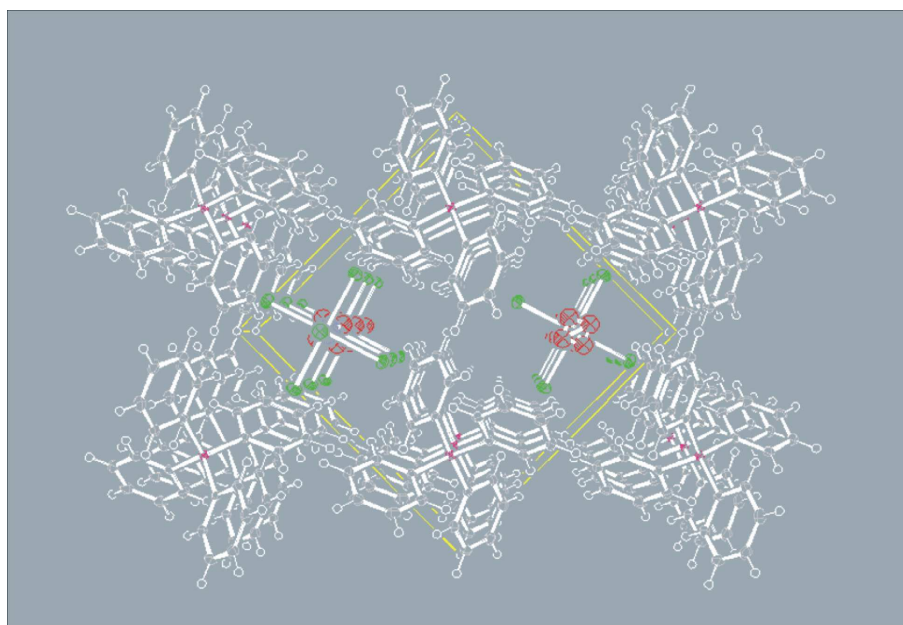


Figura IV.2.5: Red Cristalina para el  $[\text{IrCl}_5\text{NO}]\text{K}$  [14].

## Un producto de descomposición

Como resultado de los intentos por obtener cristales para el complejo **2** se obtuvo el producto *cis*-[IrCl<sub>4</sub>(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>][K·2CH<sub>3</sub>CN] (complejo **2\***)<sup>3</sup>, cuyo origen estaría en la descomposición del complejo **2** en acetonitrilo (Figura IV.2.6). El producto obtenido no deja de ser interesante, ya que muestra que el estado de oxidación permanece intacto, pero llamativamente no se obtiene el producto esperado que sería el *trans* bisacetonitrilo. Al igual que en el complejo **1b**, para el complejo **2b** sería de esperar que el acetonitrilo se encuentre en la posición *trans* al ligando. Como consecuencia de la pérdida del ligando RSNO se esperaría obtener entonces el *trans* bisacetonitrilo, sin embargo esto no ocurre. Este hecho lo podemos interpretar en términos de un mecanismo que involucre a la especie [IrCl<sub>4</sub>(CH<sub>3</sub>CN)]<sup>-</sup> como intermediario con una geometría de bipirámide trigonal.

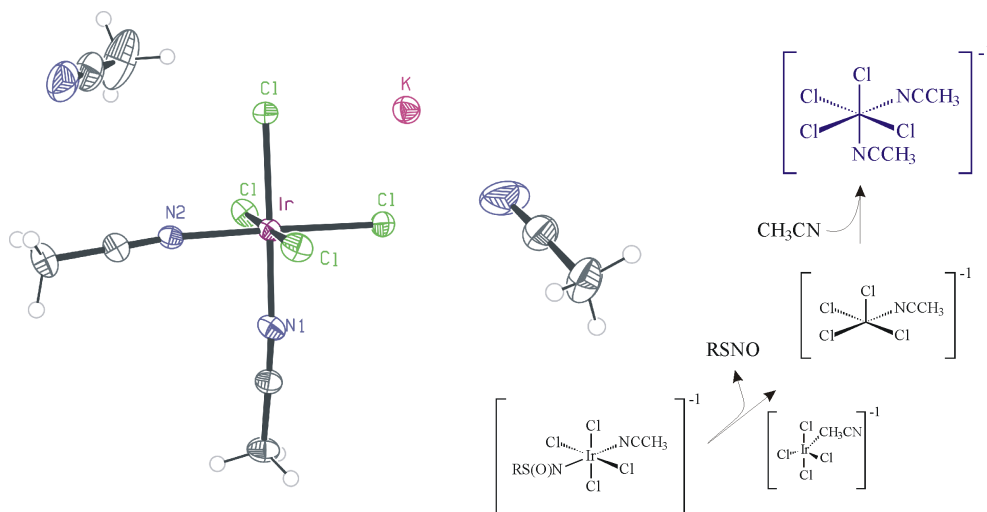


Figura IV.2.6: Estructura cristalina de un producto de descomposición originado a partir del complejo **2b** en acetonitrilo.

## IV.2.2. Espectroscopía UV-Visible

### Aspectos comunes y asignación de las bandas

En todos los casos, el espectro de absorción UV-Visible consiste en 4 bandas: dos de ellas en la región UV mientras que las otras dos se encuentran en la región visible. Las bandas de estos complejos son claramente diferentes a las que presenta el reactivo, en la Figura IV.2.7 b se muestra el espectro del reactivo junto con los espectros de los complejos **1a** y

<sup>3</sup>Datos de los cristales: fórmula mínima, Mr=537.32, prismas, tamaño del cristal 0.2 x 0.2 x 0.05 mm<sup>3</sup>, ortorrómbico, grupo espacial Pbc<sub>a</sub>, a=7.5310(2)Å, b=19.3820(6)Å, c=23.7470(7)Å, F(000)=2016, V=3466.25(17)Å<sup>3</sup>, T=120(2) K, Z=8, D<sub>c</sub>=2.059Mg/m<sup>3</sup>, μ=8.549 mm<sup>-1</sup>.

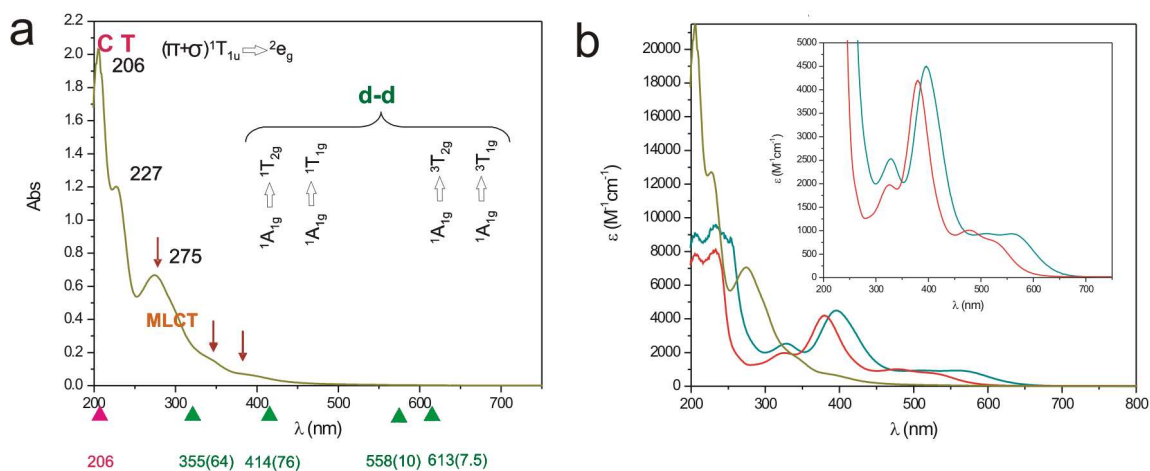


Figura IV.2.7: a-Espectro para el reactivo junto con la asignación espectroscópica para  $\text{IrCl}_6^{3-}$ , b-Espectros de los complejos **1a** (rojo) y **1b** (verde) junto con el reactivo (ocre) en escala de absorptividades molares.

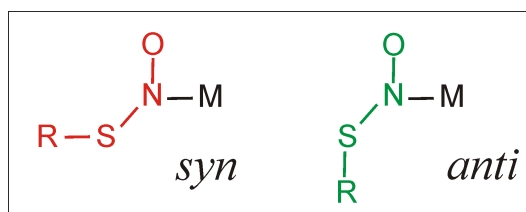


Figura IV.2.8: Isómeros conformacionales, *syn* y *anti*, M es el metal.

**1b** (en escala de absorptividades molares). En la Figura IV.2.7 a, se muestra la asignación espectroscópica de las bandas para  $[\text{IrCl}_6]^{3-}$ , que se incluye como referencia, junto con el espectro del reactivo.[15]

Tal como se puede ver en la Tabla IV.2.1 y Figura IV.2.7.b, todos los complejos exhiben características similares. Sus respectivos espectros UV-Visible presentan una banda intensa en  $\lambda_{max}=205\text{-}260$  nm ( $\epsilon: 10^4\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) que se asigna a la transición  $\pi\rightarrow\pi^*$  en el ligando y allí también aparece la banda que se asigna como Ir-Cl LMCT para el reactivo. La siguiente banda, ubicada en  $\lambda_{max}=325\text{-}330$  nm ( $\epsilon: 1800\text{-}4000$   $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) fue asignada a la transición permitida  $n_O\rightarrow\pi^*$  en el ligando. Las otras dos bandas ubicadas en la región visible, una en  $\lambda_{max}=380\text{-}400$  nm ( $\epsilon: 3000\text{-}5000$   $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y la otra en  $\lambda_{max}=470\text{-}580$  nm ( $\epsilon: 600\text{-}1000$   $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), ambas bandas asignadas a transiciones MLCT. La última banda es la responsable del color del complejo, la energía de esta transición es afectada por la estructura del tiol, el ligando *trans* y el solvente. Para algunos casos se observa un hombro para esta banda, para los *S*-nitrosotioles libres, como ya se ha mencionado (III.1.1, pág. 53,54), este hombro ha sido atribuido a la existencia de dos isómeros conformacionales *syn* y *anti* (ver Figura IV.2.8) [16].

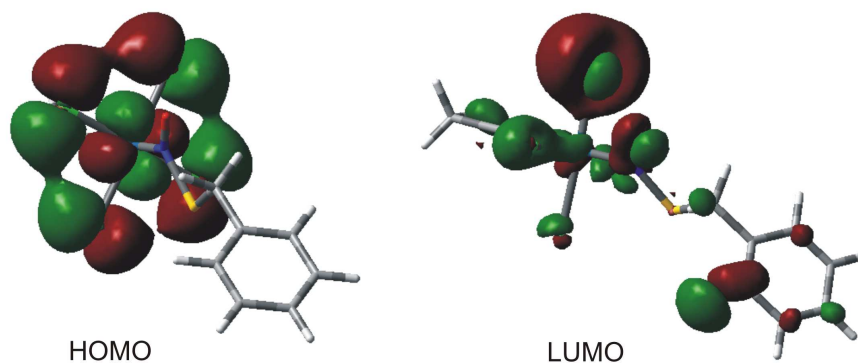


Figura IV.2.9: Orbitales HOMO y LUMO calculados para el complejo **1b**.

La asignación de esta última banda ( $\lambda_{max}=470-580$  nm) ha sido corroborada por medio de cálculos DFT. En la Figura IV.2.9, se ve que el HOMO calculado para el complejo **1b** está principalmente localizado en el metal pero tiene una importante contribución de los cloruros ecuatoriales ( $d_{xy}$ ,  $p(\text{Cl})$ ), hecho que explica la sensibilidad al solvente. El LUMO está principalmente localizado en el ligando con alguna contribución de los cloruros y el acetonitrilo *trans*.

Como bien puede observarse en la Tabla IV.2.1, la banda de menor energía y la responsable del color para los RSNOs libres aparece a longitudes de onda similares que los RSNOs coordinados pero con una diferencia importante en su intensidad, lo mismo se observa para el caso de los complejos derivados del pentacianonitrosilferrato(II) (**5n**)[17]. En la Figura IV.2.7 b, se muestran los espectros para los complejos **1a** y **1b**. Puede observarse que cuando se tiene una molécula de acetonitrilo en la posición *trans* todas las bandas están corridas hacia energías mayores, de esta forma por medio de la espectroscopía UV-Visible se pueden distinguir claramente ambos complejos. En la Figura IV.2.10, se muestra el complejo **7a**. Este complejo no se encuentra listado junto al resto debido a que al momento de escribir esta tesis no fue posible obtenerlo en forma pura (Tabla IV.2.1).

## Efecto solvatocrómico

El espectro del reactivo  $\text{K}[\text{IrCl}_5\text{NO}]$  ha sido determinado en varios solventes y se ha observado que no existe un gran corrimiento de la banda a 274 nm (acetonitrilo): 268 nm en metanol, 270 en THF, y 280 nm en HCl 2M<sup>4</sup>. Resulta llamativo que al cambiar de solvente cambia mucho la intensidad de esta banda, en particular al pasar de acetonitrilo a HCl 2M, esto podría estar relacionado con un cambio de simetría del complejo al cambiar de solvente.

En los espectros de todos los complejos se observó un marcado efecto solvatocrómico.

<sup>4</sup>Información extraída del trabajo de tesis doctoral de la Dra. Natalia Escola.

Tabla IV.2.1: Propiedades espectroscópicas UV-Visible para los complejos y los RSNOs libres.

Complejo	$\lambda_{max}$ ( $\epsilon$ , $M^{-1}cm^{-1}$ )	<i>S</i> -nitrosotiol	$\lambda_{max}$ ( $\epsilon$ , $M^{-1}cm^{-1}$ )
<b>1a</b>	328(2465), 397(4409), 511(876), 556(855)	<b>1</b>	340(1020), 530h(17), 560(26)[18]
<b>1b</b>	325(1809), 387(3283), 475(1059), 525h(919)		
<b>2a</b>	337(2967), 396(4054), 506(849), 556(822)	<b>2</b>	374(1776), 570(53)[19]
<b>2b</b>	325(2821), 387(4728), 478h(1174), 525(986)		
<b>3a</b>	331(2246), 398(4375), 572(944)	<b>3</b>	334(507), 545(16)[20]
<b>4a</b>	327(1836), 400(3235), 581(658)	<b>4</b>	343(1019), 544(36)[21]
<b>5a</b>	332(2592), 401(5141), 581(1063)	<b>5</b>	336(840), 546(13)[22]
<b>5n</b>	318(1320), 526(6000)[17]		
<b>6a</b>	322(4801), 397(5674), 574(1358)	<b>6</b>	

Todos los valores se informan en agua a excepción del complejo **5n** cuyos valores fueron medidos en acetonitrilo debido a su descomposición inmediata en agua.

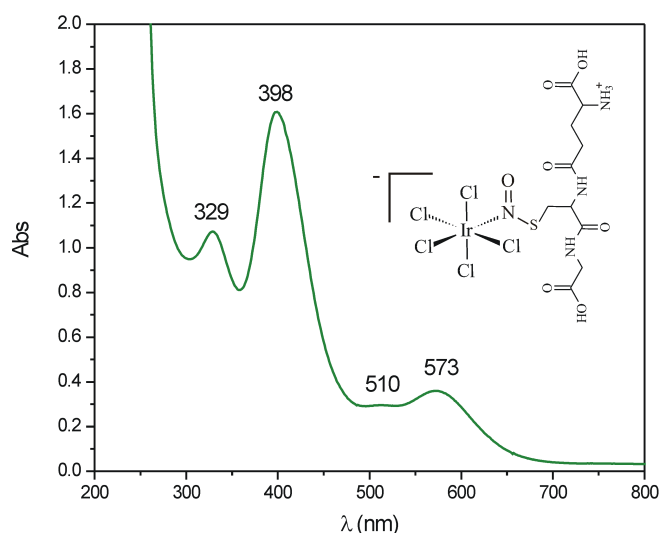


Figura IV.2.10: Espectro UV-visible para el complejo 7a. Se tomó una alícuota de la mezcla de reacción y se diluyó en agua MilliQ.



Dado que los complejos **1a,b**, **2a,b** son solubles en distintos solventes, fue posible examinar este efecto en varios solventes: agua, etanol, acetonitrilo, DMSO y acetona. Para los demás complejos, dada la marcada insolubilidad, sólo se pudo observar el efecto al pasar de agua a DMSO. En todos los casos las tres bandas informadas sufren corrimientos, siendo la más afectada la banda de menor energía. Para esta banda, en el caso de los complejos **1** y **2**, se observó un marcado corrimiento batocrómico: la solución acuosa resultó ser roja mientras que en acetonitrilo resultó tener un color verde. En lo que sigue se mostrará el estudio del efecto solvatocrómico para el complejo **1b**.

**Complejo 1b.** En el espectro se observa un corrimiento de las bandas 380-400 nm y 470-580 nm hacia longitudes de onda menores al pasar de acetonitrilo a agua. Siendo más sensible la banda de menor energía. Las bandas de más alta energía se corren en la misma dirección pero no tanto como lo hacen las bandas antes mencionadas. En la tabla IV.2.2 se muestran los valores que toma el número de onda de la banda de menor energía para distintos solventes y se incluye una columna con el número aceptor (NA)<sup>5</sup> conocido para cada solvente [23].

Tabla IV.2.2: Dependencia de la posición de banda visible de menor energía ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) con el solvente para el complejo **1b**.

Solvente	NA	$\nu(\text{cm}^{-1})$
Agua	54.8	19047.61
Etanol	37.1	18348.62
DMSO	19.3	17376.19
Acetonitrilo	18.9	17451.35
Acetona	12.5	17173.45

Al graficar  $\nu$  vs NA (Figura IV.2.11) se puede observar que la energía de esta banda disminuye al disminuir el número aceptor del solvente y mostrando una dependencia lineal. Esto probablemente se relacione con interacciones específicas donador/aceptor entre los cloruros de la esfera de coordinación y el solvente, en forma análoga a lo que ocurre con el pentacianonitrosilferrato(II) y el pentacloronitrosiliridato(III) [24]. Es decir, existe un efecto electrónico del entorno que modifica sustancialmente las características del *S*-nitrosotiol coordinado.

Una aproximación empírica que permite examinar las interacciones específicas soluto-solvente es la realizada por Gutman [25]. En esta aproximación se definen en forma relativa los números aceptores y donores de los solventes en base al carácter de ácido o base de Lewis. De esta forma, midiendo diferentes propiedades (energías de absorción, potenciales redox) y al graficarlas versus el número aceptor se obtienen gráficos lineales. La magnitud del efecto ocasionado por el solvente se puede expresar mediante la siguiente ecuación, Ec. IV.2.1:

<sup>5</sup>NA: parámetro empírico definido en función del desplazamiento relativo <sup>31</sup>P RMN para la trietilfosfina en el solvente de interés y relativo a la fuerza ácida. (NA=0 para Hexano y 100 para SbCl<sub>5</sub>).

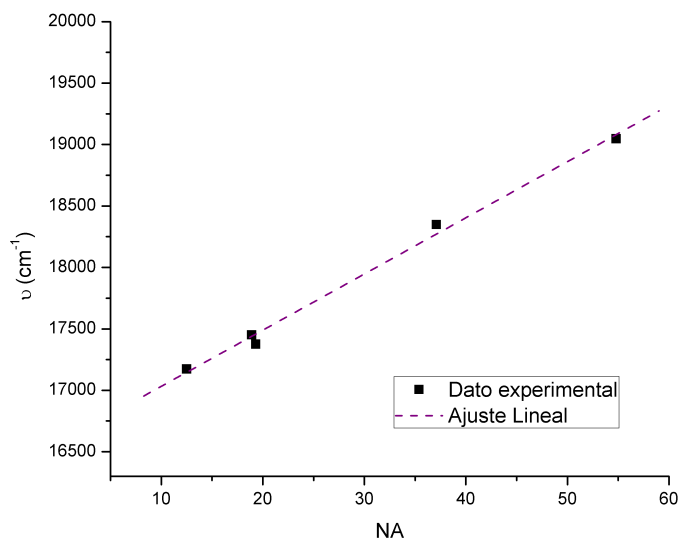


Figura IV.2.11: Gráfico de  $\nu$ (cm<sup>-1</sup>) versus NA (Escala de Gutman) para el complejo **1b**.

$$\nu_i^s = \nu_i^0 + a_i NA \quad (\text{IV.2.1})$$

donde  $\nu_i^s$  es el número de onda medido (Banda MLCT de menor energía) para el complejo  $i$  en el solvente  $s$ ,  $\nu_i^0$  es el número de onda extrapolado para un solvente de  $AN=0$ . El parámetro  $a_i$  mide la sensibilidad del complejo  $i$  frente a la capacidad aceptora del solvente. Para este caso, del análisis antes descrito y haciendo una regresión lineal para el gráfico que se muestra en la Figura IV.2.11. se obtiene un valor de  $a_i$  de 46 y un valor de  $\nu_i^0$  de 16575 cm<sup>-1</sup>; por ejemplo para el  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$  se obtuvo un valor para  $a_i$  de 41 [24]. Este valor se informa y se deja asentado dada su posible importancia para estudios futuros sobre este tema.

Si bien se muestra el estudio de este efecto en forma completa solo para **1b**, se verificó cualitativamente para todos los complejos analizados. Para los compuestos que resultaron ser sólo solubles en DMSO y agua se registraron los correspondientes espectros. Por ejemplo para los complejos **3a** y **4a** y **5a** las dos últimas bandas toman los valores que se muestran en la Tabla IV.2.3.

Tabla IV.2.3: Efecto del solvente sobre  $\lambda_{max}(nm)$  para los complejos **3a**, **4a**, **5a**.

Complejo	$\lambda_{max}(nm)$ , agua	$\lambda_{max}(nm)$ , DMSO	$\lambda_{max}(nm)$ , acetonitrilo
<b>3a</b>	398, 572	420, 641	
<b>4a</b>	400, 581	424, 652	
<b>5a</b>	397, 566		401, 581

Para finalizar, vale la pena mencionar que se pudo observar que el corrimiento de la banda de menor energía resulta ser de aproximadamente 50 nm para los complejos **1** y **2**, los complejos **3**, **4** y **6** son los más afectados con un corrimiento de alrededor de 70 nm, mientras que el complejo **5a** no se ve muy afectado.

### IV.2.3. Espectroscopía FTIR

Todos los complejos estudiados exhiben dos señales características,<sup>6</sup> una en el rango 1405-1408  $\text{cm}^{-1}$  y otra en la zona 761-794  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas fueron atribuidas a los estiramientos N-O ( $\nu_{NO}$ ) y S-N ( $\nu_{SN}$ ) respectivamente. Un detalle importante es la desaparición por completo de la señal a 2500-2600  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento S-H ( $\nu_{SH}$ ). Este hecho es consistente con la formación del complejo.

En la literatura, se encuentra muy escasa información acerca de la caracterización FTIR de los S-nitrosotioles libres, en algunos casos solo se informa una banda muy ancha asignada al estiramiento N-O ( $\nu_{NO}$ ). Este hecho se debe principalmente a la inestabilidad de muchos de los RSNOs y a la consecuente imposibilidad de ser aislados. En los casos donde podemos comparar, se observa que la frecuencia  $\nu_{NO}$  disminuye entre 70 y 200  $\text{cm}^{-1}$  al coordinarse al centro metálico. Esta tendencia es reflejada adecuadamente por los cálculos, éstos predicen un corrimiento de 60 a 157  $\text{cm}^{-1}$  en el mismo sentido, y un aumento en  $\nu_{SN}$  en 40-137  $\text{cm}^{-1}$ . Es importante mencionar que en la literatura no hay prácticamente información en lo que respecta a caracterización por FTIR de los RSNOs coordinados, salvo un único caso que informa un valor de 1380  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{NO}$ ) para el complejo que resulta de la reacción del etiltiol con el pentacianonitrosilferrato(II) [26].

Los complejos que contienen como ligando a **1** y **2** muestran algunas características particulares. Cuando el acetonitrilo está coordinado en la posición *trans* al ligando (complejo **1b**) se observa una señal que corresponde al estiramiento CN ( $\nu_{CN}$ ) en 2327  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que para el acetonitrilo libre esta señal aparece en 2254  $\text{cm}^{-1}$ . La frecuencia  $\nu_{NO}$  tiene aproximadamente el mismo valor para los complejos tipo **a** y **b**, mientras que  $\nu_{SN}$  se corre a valores menores al pasar del complejo **a** al **b**, indicando un fortalecimiento de la unión S-N al coordinarse un acetonitrilo en la posición *trans* al ligando. Este hecho es consistente con la mayor estabilidad termodinámica reflejada por los cálculos computacionales (IV.1.3, pág. 119).

Es interesante agregar que, las frecuencias vibracionales en las que están involucrados los estiramientos S-N y N-O muestran ser sensibles al cambio del contraíón, del mismo modo es

---

<sup>6</sup>Los espectros fueron medidos en pastillas de KBr, las señales debidas al grupo -SNO fueron asignadas por medio de la preparación de los correspondientes complejos marcados con el isótopo <sup>15</sup>N.

esperable que sean sensibles al cambio de solvente.<sup>7</sup> Tal como se puede observar en la Tabla IV.2.4, para el complejo **1c** (contraión:  $\text{PPh}_4^+$ ),  $\nu_{\text{SN}}$  y  $\nu_{\text{NO}}$  se corren hacia valores mayores tomando como referencia los complejos **1a** y **1b** (contraión:  $\text{K}^+$ ), hecho consistente con las distancias observadas en las estructuras cristalinas. Si el contraión es cesio (complejo **1d**),  $\nu_{\text{NO}}$  cambia sensiblemente con respecto a los valores de **1a** y **1b** mientras que  $\nu_{\text{SN}}$  no lo hace demasiado. (ver Tabla IV.2.4)

Tal como se puede observar en la Tabla IV.2.4 las distancias de enlace S-N medidas experimentalmente, resultan ser  $0.1 \text{ \AA}$  más cortas que las calculadas, mientras que la distancia de unión para el N-O resulta ser más larga. Esto es, al nivel de teoría usado para la optimización de geometría, PBE1PBE/SDD la interacción S-N-O es sobrestimada. Resulta interesante notar que cuando se agregan funciones de polarización, se obtienen peores parámetros geométricos que al no utilizarlas. Otro aspecto interesante a remarcar de esta tabla es que la distancia de unión N-O calculada en el complejo es  $1.17 \text{ \AA}$  y al adicionarse el  $\text{RS}^-$  pasa a valer  $1.24 \text{ \AA}$ . Por otro lado, la distancia de unión S-N aumenta llamativamente al formar los complejos tipo **a** pero disminuye al formar los complejos tipo **b**, comparando con la misma distancia en el RSNO libre, hecho que no se ve reflejado en los valores que toman las frecuencias vibracionales. Este resultado es razonable si se tiene en cuenta que al coordinarse el RSNO el modo de vibración que implica el estiramiento S-N ahora está muy mezclado con el estiramiento Ir-N(O). Como se puede ver en la tabla, la distancia Ir-N(O) es mayor para los complejos tipo **a** que para los **b** y como ya se ha mencionado, la tendencia es la opuesta para la distancia S-N.

---

<sup>7</sup>Debido a que la ventana que permiten los solventes utilizados no coincidía con la zona donde se ven estas señales no se analizó la dependencia con el solvente por FTIR.

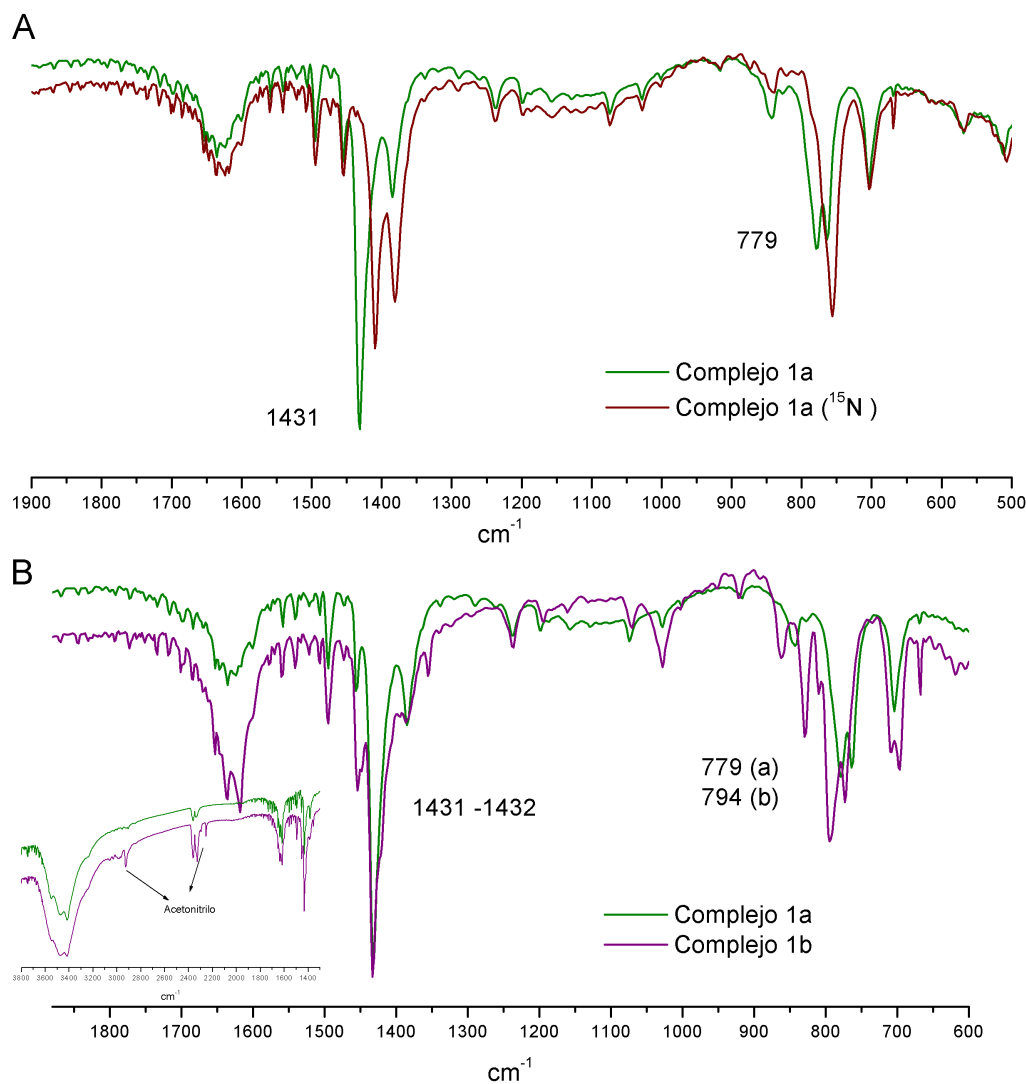


Figura IV.2.12: Espectros FTIR para el complejo **1a** y **1a**- $^{15}\text{N}$  (A), espectros FTIR para los complejos **1a** y **1b** (B).

Por último, los cálculos predicen que para los complejos **b**, la frecuencia de estiramiento del enlace C-N (acetonitrilo *trans*) se corre  $120\text{ cm}^{-1}$  hacia valores mayores al coordinarse y esta predicción es consistente con el corrimiento experimental observado de  $70\text{ cm}^{-1}$  en el mismo sentido.

En la Figura IV.2.12 se muestra el complejo **1a**, **1a** enriquecido en el isótopo  $^{15}\text{N}$ , y **1b**. Como se muestra en dicha Figura, los complejos tipo **a** y **b** pueden ser distinguidos mediante espectroscopía FTIR.

Tabla IV.2.4: Distancias y frecuencias FTIR para reactivos, complejos y RSNOs libres.\* PBE1PBE/SDD

Especie	Distancias (Å), <b>exp.</b> (calc.*)					Frecuencias IR (cm <sup>-1</sup> ) <b>exp.</b> (calc.*)		
	S1-N2	N2-O2	Ir-N1	Ir-N2	O1-N1-S-C	N-O	S-N	C-N
K[IrCl <sub>5</sub> NO]		<b>1.120</b> [14] (1.170)	<b>1.760</b> [14] (1.755)			<b>2006</b> (1627)[9]		
Na[IrCl <sub>5</sub> NO]		<b>1.153</b>	<b>1.750</b>			<b>1986</b> [9]		
1NO	(1.905)	(1.222)				<b>1500-1530</b> [18] (1548)	(647)	
Complejo 1a	(1.990)	(1.238)	(1.894)		(16.28)	1431(1491)	779(727)	
Complejo 1b	<b>1.734(8)</b> (1.855)	<b>1.219(10)</b> (1.242)	<b>1.963(8)</b> (1.625)	<b>2.032(10)</b> (1.990)	<b>-0.3(8)</b> (0.335)	<b>1432</b> (1479)	<b>794</b> (784)	<b>2327</b> (2446)
Complejo 1c	<b>1.659(13)</b>	<b>1.208(14)</b>	<b>1.944(12)</b>	<b>1.983(13)</b>	<b>1.7(13)</b>	<b>1436</b>	<b>852</b>	
Complejo 1d						<b>1405</b>	<b>787</b>	
2NO	(1.918)	(1.216)				<b>1580-1670</b> [18] (1560)	(649)	
Complejo 2a	(2.074)	(1.224)	(1.887)		(13.28)	<b>1438</b> (1453)	<b>763</b> (688)	
Complejo 2b	(1.917)	(1.229)	(1.923)	(1.989)	(0.644)	<b>1453</b> (1433)	<b>786</b> (756)	<b>2324</b> (2448)
3NO	(1.945)	(1.211)				(1527)	(622)	
Complejo 3a	(1.934)	(1.240)	(1.910)		(40.31)	<b>1431</b> (1483)	<b>781</b> (730)	
4NO	<b>1.769(3)</b> [27] (1.980)	<b>1.191(4)</b> [27] (1.206)				<b>1556</b> (1616)	<b>637</b> (649)	
Complejo 4a	(1.999)	(1.244)	(1.892)		(11.95)	<b>1438</b> (1459)	<b>784</b> (720)	
5NO	(1.921)	(1.218)				(1567)	(659)	
Complejo 5a	(2.007)	(1.239)	(1.886)		(33.82)	<b>1435</b> (1500)	<b>781</b> (732)	
6NO	(1.916)	(1.219)				(1562)	(664)	
Complejo 6a	(1.995)	(1.240)	(1.889)		(27.13)	<b>1437</b> (1493)	<b>790</b> (736)	
Acetonitrilo								<b>2254</b> (2326)

### IV.2.4. Espectroscopía $^1\text{H}$ RMN

La *S*-nitrosación produce cambios importantes en el desplazamiento químico para los hidrógenos alfa y beta con respecto a los tioles puros. De este modo, los RSNOs pueden ser bien caracterizados mediante  $^1\text{H}$  NMR. Por ejemplo, al nitrosarse, la señal que corresponde al hidrógeno en la posición alfa se corre hacia campos bajos aproximadamente 1 ppm, mientras que la influencia sobre el hidrógeno beta es menor (0.1-0.2 ppm) y depende más fuertemente del esqueleto carbonado. (Ver Tabla IV.2.5)

Tabla IV.2.5: Desplazamientos químicos. Tioles libres y S-nitrosotioles coordinados.

Especie	$\delta(\text{ppm})$	
	-CHX-S	$\text{CH}_3\text{CN}$
1	3.7	
Complejo 1a	4.63	
Complejo 1b	4.67	2.92
2	7.0-7.3	
Complejo 2a	7.49-7.76	
Complejo 2b	7.49-7.76	2.95
3NO	2.9	
Complejo 3a	3.78-3.98	
4	3.3-3.4	
Complejo 4a	3.88-4.06	
5	3.6	
Complejo 5a	4.57-4.59	
6	3.6	
Complejo 6a	4.77-4.78	
7	2.93-2.95	
complejo 7	3.03-3.30	
Acetonitrilo		2.06[28]

Para el caso de los complejos **1a-b**, **2a-b** y **3a** se obtuvieron espectros de RMN muy limpios en  $\text{D}_2\text{O}$ . Para los complejos **1b** y **2b** se observó claramente la señal correspondiente al acetonitrilo coordinado. Para el complejo **4a**, el espectro mostraba una pequeña cantidad de disulfuro (previamente identificado y caracterizado, ver sección III.2 pág. 64, 66) presunto producto de descomposición. Tal como fue mencionado en la sección IV.1, los complejos **5a** y **6b** resultaron ser los más inestables, al disolverlos en agua los productos de descomposición (no identificados en forma completa) aparecen en forma inmediata. Se obtuvo un espectro más limpio al realizarlo en  $\text{DMSO-d}_6$ , donde estos complejos resultan ser más estables. La asignación completa y detallada para cada complejo se muestra en la parte experimental de las respectivas secciones (IV.1.3-5).

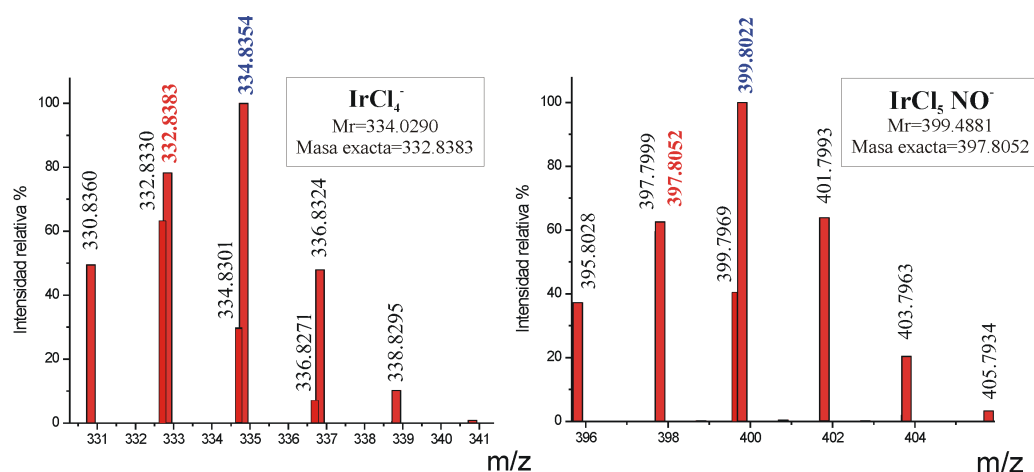


Figura IV.2.13: Patrón isotópico para las especies  $[\text{IrCl}_4]^-$  y  $[\text{IrCl}_5\text{NO}]^-$ .

## IV.2.5. Espectrometría de Masa

### Aspectos generales

En esta sección haremos uso de la técnica de espectrometría de masa y veremos su utilidad para la identificación y el análisis estructural de compuestos complejos. La naturaleza detallada de cada espectro depende fundamentalmente de las propiedades de la molécula, para la serie de complejos que hemos preparado veremos:

- Características comunes a todos ellos.
- El ión molecular, cuya masa es un parámetro importante en la identificación. Además, para un conjunto dado de condiciones, la intensidad de este pico constituye una estimación de la estabilidad del fragmento ionizado.
- Pico base.

Los espectros ESI-MS de alta resolución fueron adquiridos en modo negativo. En algunos casos también se realizó ESI-MS/MS para algunos iones relevantes. En la Tabla IV.2.6 se listan los iones diagnósticos para los complejos **1a,b** y **2a,b** y **4a**. En la Figura IV.2.13 se muestra el patrón isotópico para los iones  $[\text{IrCl}_4]^-$  y  $[\text{IrCl}_5\text{NO}]^-$ .

Como antecedente podemos mencionar que con esta técnica previamente se lograron detectar aductos de corta vida para la reacción del pentacianonitrosilferrato(II) ( $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ ) y mercaptosuccinato [29]. En dicho trabajo el ión  $\{\text{M}_3^+[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4\text{S})]^{4-}\}^-$ , donde M representa a diferentes contraiones, es identificado a través de la detección de sus productos de descomposición. A diferencia de lo recién mencionado, en nuestro caso el complejo no es un aducto inestable sino un producto estable, y en lo que sigue veremos que por medio



Tabla IV.2.6: Iones diagnósticos detectados por ESI-MS en modo negativo para los complejos **1 a,b**; **2 a,b**; y **4**.  $[\text{IrCl}_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{2-} = \text{M}$ ;  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ =contraiones (complejos **a**);  $[\text{Ir}(\text{CH}_3\text{CN})\text{Cl}_4\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{2-} = \text{M}$ ;  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ =contraiones (complejos **b**). Experimental (Calculado, error en ppm)

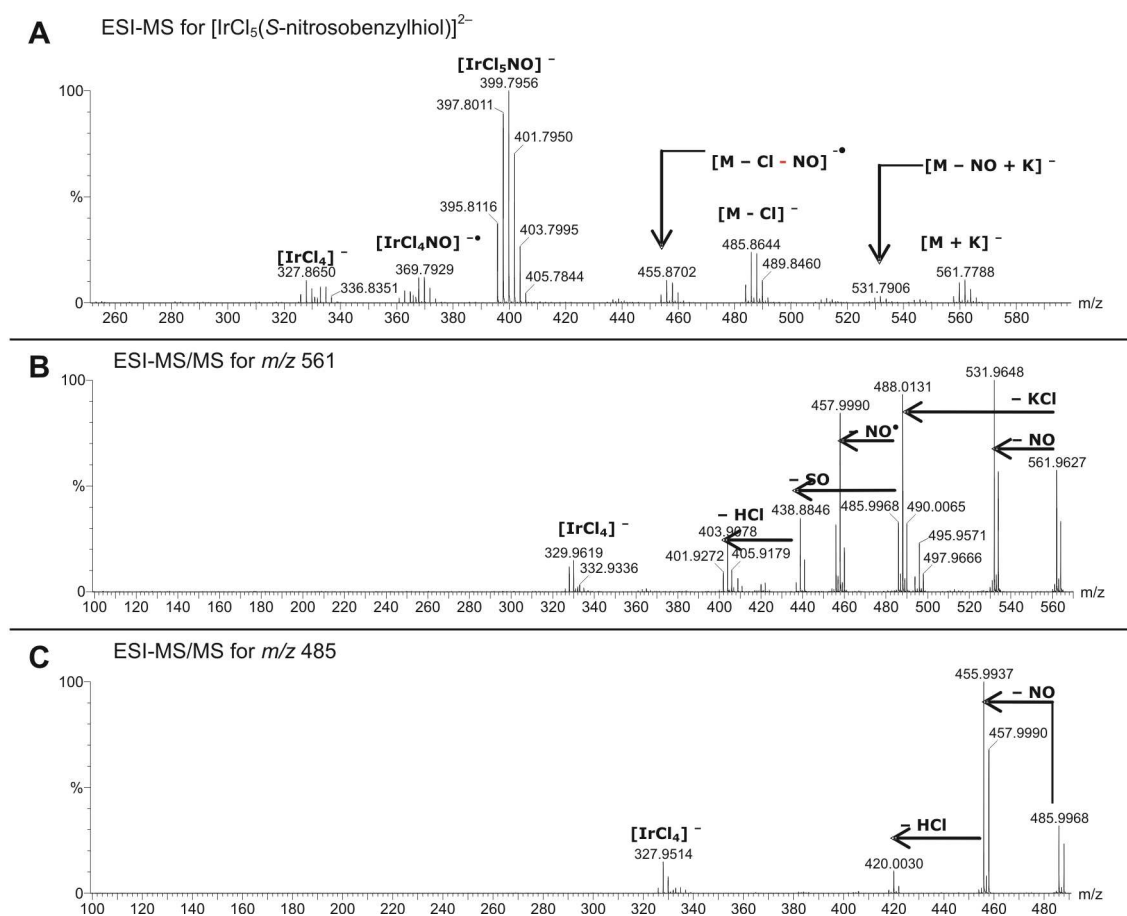
R	Iones diagnósticos, MS (m/z)	MS/MS (m/z)
1a	$[\text{M}+\text{K}]^-$ : 561.779 (561.7789,1) $[\text{M}-\text{Cl}]^-$ : 487.853 (487.8590,12) $[\text{M}-\text{Cl}-\text{NO}]^{\bullet-}$ : 457.999(458.0049,13)	de $[\text{M}-\text{Cl}]^-$ : $[\text{M}-\text{Cl}-\text{NO}]^{\bullet-}$ . de $[\text{M}+\text{K}]^-$ : $[\text{M}-\text{Cl}]^-$ , $[\text{M}-\text{NO}+\text{K}]^{\bullet-}$ : 531.965; $[\text{M}-\text{KCl}-\text{NO}]^{\bullet-}$ : 458.000
1b	$[\text{M}]$ : 528.854 (528.8534, 1) $[\text{M}-\text{NO}-\text{CH}_3\text{CN}]$ : 457.804(457.8034,1)	
2a	$[\text{M}+\text{K}]^-$ : 547.750 (547.7438,11) $[\text{M}-\text{Cl}+\text{K}]^{\bullet-}$ : 512.696(512.7086,24) $[\text{M}-\text{Cl}]^-$ : 473.831 (473.8434,26) $[\text{M}-2\text{Cl}+\text{H}]^-$ : 438.766 (438.7438,37)	de $[\text{M}-\text{Cl}]^-$ y $[\text{M}-2\text{Cl}+\text{H}]^-$ : $[\text{M}-2\text{Cl}-\text{NO}]^{\bullet-}$ : 408.00 de $[\text{M}-\text{Cl}+\text{K}]^{\bullet-}$ : $[\text{M}-2\text{Cl}+\text{H}]^-$
2b	$[\text{M}-\text{CH}_3\text{CN}]$ : 469.8413(469.8398,3) $[\text{M}-\text{NO}-\text{CH}_3\text{CN}]$ : 443.845 (443.8437,3)	
4a	$[\text{M}-\text{Cl}]^-$ : 512.884(512.8772,13) $[\text{M}-\text{Cl}-\text{NO}]^{\bullet-}$ : 482.889(482.8822,14)	de $[\text{M}-\text{Cl}]^-$ : $[\text{M}-\text{Cl}-\text{NO}]^{\bullet-}$ : 483.020 $[\text{M}-\text{NO}-2\text{Cl}+\text{H}]^{\bullet-}$ : 445.031

de esta técnica podemos detectar varios iones diagnósticos derivados de estos complejos de iridio, los que claramente confirman la identidad de los mismos.

### Complejos tipo a: $[\text{IrCl}_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{2-} = \text{M}$ ; $\text{K}^+$ , $\text{H}^+$ = contraiones

Para todos los complejos, el ión  $[\text{IrCl}_5\text{NO}]^-$  o  $[\text{M}-(\text{SR}^-)]^-$  (m/z 399.800) y otros iones derivados de él como  $[\text{IrCl}_4]^-$  (m/z 332.850) fueron observados como los iones mayoritarios. Los iones diagnósticos mayoritarios, es decir aquellos que confirman la identidad del complejo fueron,  $[\text{M}-\text{Cl}]^-$ ,  $[\text{M}-\text{Cl}-\text{NO}]^{\bullet-}$  y  $[\text{M}+\text{K}]^-$ . Los espectros para los complejos **1** y **2** claramente evidencian la sola presencia de **a**, ver Figura IV.2.14.A para **1a**. De acuerdo con lo que muestran los espectros, los complejos **1a** y **2a** resultan ser más estables en fase gaseosa que el complejo **4a**, para este complejo la intensidad de la señal que corresponde al ión diagnóstico o molecular ( $[\text{M}+\text{K}]^-$ ) es muy baja, lo mismo ocurre con la intensidad de la señal para  $[\text{M}-\text{Cl}-\text{NO}]^{\bullet-}$ .

En todos los casos los espectros masa-masa (Figura IV.2.14.B y C) de estos complejos muestran pérdida de  $\text{NO}^\bullet$  y  $\text{Cl}^-$ . Un detalle importante es que para los complejos **1a** y **2a** la intensidad de la señal para  $[\text{IrCl}_4]^-$  es casi imperceptible pero para **4a** tiene una intensidad considerable. Este hecho también es consistente con la menor estabilidad de **4a** en fase gaseosa.

Figura IV.2.14: Espectro ESI-MS para el complejo **1a**.

### Complejos tipo **b**: $\text{trans-}[\text{Ir}(\text{CH}_3\text{CN})\text{Cl}_4\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{2-} = \text{M}; \text{K}^+, \text{H}^+ = \text{contraiones}$

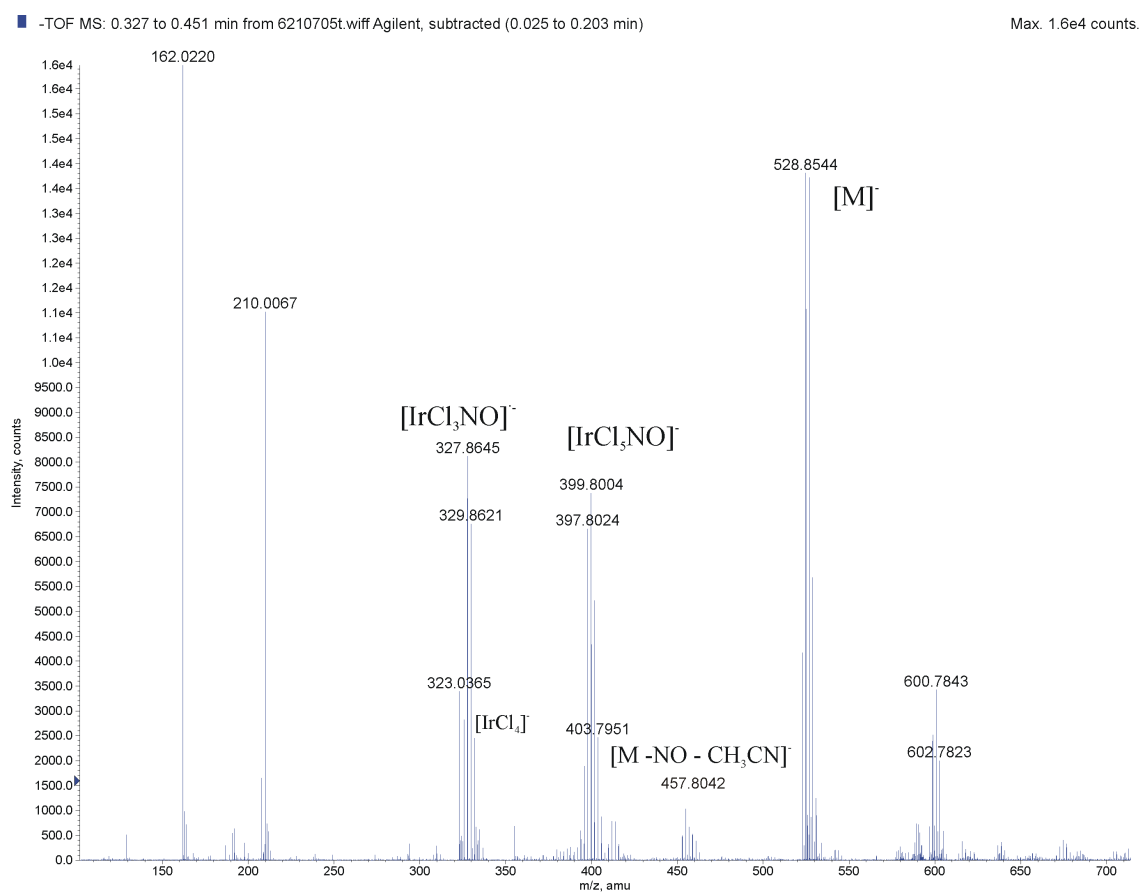
Para los complejos tipo **b**, en contraposición con lo observado para los complejos tipo **a**,  $[\text{M}]^-$  y  $[\text{M-CH}_3\text{CN}]^-$  resultaron ser los iones observados con mayor intensidad (Figura IV.2.15). Los iones  $[\text{Ir}(\text{CH}_3\text{CN})\text{Cl}_4\text{N}(\text{O})]^-$  ( $m/z$  403.797),  $[\text{IrCl}_5\text{NO}]^-$  y otros iones derivados como  $[\text{IrCl}_4]^-$ , fueron observados como iones minoritarios.

Consistentemente con las predicciones de los cálculos DFT, el análisis de los resultados de la espectrometría de masa sugiere que los complejos tipo **b** son más estables en fase gaseosa.

#### Experimental

**Reactivos.** Los complejos fueron preparados tal como fue descrito en la sección anterior. Los solventes deuterados fueron obtenidos de Sigma Aldrich.

**Instrumentación y Medidas.** Las diferentes medidas fueron realizadas utilizando la instrumentación descrita en la metodología general (II.1).

Figura IV.2.15: Espectro ESI-MS para el complejo **1b**.

*Simulación Computacional*

Todos los cálculos realizados fueron llevados a cabo utilizando el paquete Gaussian03, las optimizaciones de geometría se realizaron, al igual que la sección anterior utilizando el funcional PBE1PBE junto con la base SDD. Se calcularon los modos normales para las estructuras optimizadas obtenidas para los diferentes complejos.



## IV.3

# Estabilidad térmica: estudio teórico - experimental

Una vez invertido el tiempo en caracterizar los complejos preparados, tarea que antes se ha mencionado fundamental como punto de partida para el estudio de aspectos más íntimamente relacionados con la vida y existencia de estas moléculas, vamos a pasar ahora al estudio de algunos aspectos sobre su reactividad. En particular en esta sección evaluaremos la estabilidad de estos compuestos tanto en fase gaseosa, sólida como en solución. Si bien cubriremos muy poco en cuanto a reactividad concierne, su estabilidad térmica es sumamente relevante debido a la importancia de estos complejos como potenciales moléculas almacenadoras de RSNOs.

### IV.3.1. Estabilidad en fase sólida

Todos los compuestos preparados resultaron ser sumamente estables como sólidos, en todos los casos fueron almacenados bajo atmósfera de nitrógeno o argón dentro de un desecador y protegidos de la luz. En estas condiciones los compuestos pueden almacenarse por períodos muy largos de tiempo sin perder ninguna de sus propiedades. De esta forma estos complejos constituyen un excelente medio para almacenar y preservar la función de los RSNOs.

### IV.3.2. Estimación de vidas medias en agua

Es una cuestión obvia el querer saber qué pasa con estos complejos una vez disueltos en agua. Se sabe que los RSNOs libres viven extremadamente poco una vez disueltos en agua. En algunos casos, incluso tomando todos los cuidados posibles como: resguardo de la luz, ausencia total de oxígeno, viven apenas unos minutos. En la Tabla IV.3.1 se muestran

estimaciones del orden de magnitud para las vidas medias de RSNOs libres. Como ya se ha mencionado en las secciones anteriores, los RSNOs son muy sensibles a trazas de metales, es importante tener en cuenta que el agregado de EDTA aumenta notablemente el tiempo de vida media de los S-nitrosotioles, por ejemplo para *S*-nitrosocisteína con el agregado de EDTA (0.5 mM) su tiempo es del orden de los 30 minutos mientras que sin el complejante es 20 a 30 segundos [2].

Tabla IV.3.1: Tiempos de vida medio de RSNOs libres

S-nitrosotiol	tiempo de vida medio ( $t_{\frac{1}{2}}$ ) <sup>11</sup>		
	segundos a minutos	minutos a horas	horas a días
<i>SNO</i> -benciltiol	+		
<i>SNO</i> -feniltiol	+		
<i>SNO</i> -acetil-L-cisteína			+
<i>SNO</i> -L-cisteína etil ester		+	
<i>SNO</i> -mercaptosuccinato		+	

<sup>1</sup>Los tiempos de vida media fueron medidos en buffer fosfato pH=7.4, 25 C, EDTA (0.5mM)

Se midieron los tiempos de vida media para los complejos sintetizados. En todos los casos excepto para los complejos **1b** y **2b**, las cinéticas de descomposición ajustaron a una cinética de primer orden. Para los complejos **1b** y **2b** se estimó gráficamente el tiempo de vida medio sin aplicar ningún modelo cinético. En la Tabla IV.3.2 se muestran los valores medidos y también los reportados para los complejos  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{3-}$ .

Tabla IV.3.2: Tiempos de vida media medidos para los RSNOs coordinados en agua, M=Ir o Fe; Ir= $[\text{IrCl}_5]^{-2}$ , Fe= $[\text{Fe}(\text{CN})_5]^{2-}$ .

Complejo	$\tau$ (minutos), M=Ir a/b <sup>a</sup>	$\tau$ (minutos), M=Fe <sup>b</sup>
M- <i>SNO</i> -benciltiol	<b>1a:</b> 15992.3	—
	<b>1b:</b> 19894.8	—
M- <i>SNO</i> -feniltiol	<b>2a:</b> 1636.7	—
	<b>2b:</b> 5551.4	—
M- <i>SNO</i> -N-acetil-L-cisteína	<b>3a:</b> 7757.4	<b>3n:</b> 7.5 [30]
M- <i>SNO</i> -L-cisteína etil ester	<b>4a:</b> 215.8	<b>4n:</b> 1.16 [30]
M- <i>SNO</i> - mercaptosuccínico	<b>5a:</b> 6.14	<b>5n</b> $\geq$ 2160 [30]
M- <i>SNO</i> -mercaptosuccínico metil ester	<b>6a:</b> 9.60	

<sup>a</sup>Complejo aislado en agua MilliQ; pH=5 (1, 2 y 3); pH=4 (4, 5 y 6). T=25 °C,  $[\text{IrCl}_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{2-} \sim 3 \times 10^{-4}\text{M}$ .

<sup>b</sup>Complejo generado *in situ* a partir de  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-} = 2.5 \times 10^{-3}\text{M}$ , tiolato:  $1.25 \times 10^{-2}\text{M}$ , buffer  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{H}_3\text{BO}_3$ , pH=10.

Tal como puede observarse en la Tabla IV.3.2, los complejos **1a** y **1b**, resultaron ser los más estables. Incluso, una vez disueltos en agua pueden almacenarse a baja temperatura y en ausencia de luz durante meses. Los complejos **2a**, **2b** y **3a** resultaron ser también muy estables una vez disueltos en agua. Para el caso particular de los complejos **3a** y **4a** es importante

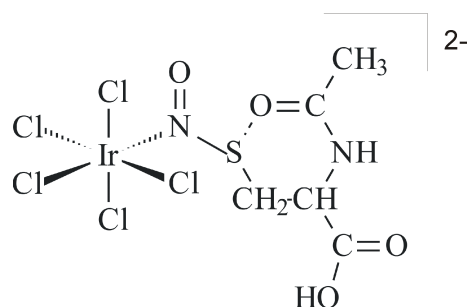


Figura IV.3.1: Ciclo intramolecular postulado para el complejo **4a**.

resaltar el enorme incremento en la estabilidad del RSNO coordinado con respecto a los respectivos complejos  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{3-}$ . Otro detalle interesante es que a pesar que los complejos **3a** y **4a** tienen coordinados RSNOs derivados de la cisteína la estabilidad de éstos es muy diferente siendo **3a** mucho más estable que **4a**, esta misma tendencia se observa para los complejos derivados del pentacianonitrosilferrato(II). Por ejemplo para el complejo **4n** se ha sugerido que su mayor estabilidad respecto a **3n** radica en el hecho de que para este tiol la posibilidad de formar un ciclo intramolecular de 6 átomos le confiere una estabilidad adicional respecto a **4n** (Figura IV.3.1). La misma situación es probable que tenga lugar en este caso. Para los casos **1** y **2** los complejos **b** resultan ser más estables que los **a**, probablemente este hecho esté relacionado con el ligando *trans* que contienen los complejos **b** a diferencia de los **a**.

Los complejos **5** y **6** demandan un tratamiento especial, contrariamente a lo que fue observado para los complejos derivados del pentacianonitrosilferrato(II) (**5n**), los complejos de iridio que contienen este tiol coordinado como RSNO resultaron ser los más inestables, acusando los menores tiempos de vida medios.

Al no encontrar cálculos sobre los complejos de S-nitrosotioles derivados del pentacianonitrosilferrato(II) en bibliografía, se decidió realizar cálculos para el complejo correspondiente (**5n**). Curiosamente encontramos que este complejo aislado, no existe, de hecho durante la optimización el enlace S-N se rompe dando como resultado el tiolato y el pentacianonitrosilferrato(II). Esta situación cambia si se agregan una o más moléculas de agua solvatando los grupos ciano (Figura IV.3.2).

La distancia S-N calculada acercando 3 moléculas de agua fue de 2.17 Å mientras que la misma distancia para los complejo de pentacloroiridato(III) resultó ser 2.00 y 1.99 (**5a** y **6a**, ver tabla IV.2.4). Esta evidencia apunta al hecho de que el solvente desempeña un papel fundamental en lo que concierne a la estabilidad de estos complejos. En la literatura se ha sugerido que la interacción de cationes con el complejo **5n** fortalece la unión S-N cambiando de alguna forma la distribución electrónica [30, 17].

Una vez más, tal como ya se hiciera en la parte III.3, se realizaron cálculos usando el



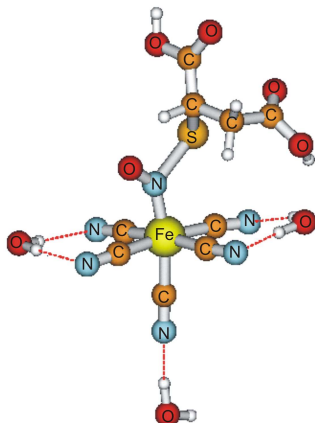


Figura IV.3.2: Geometría optimizada para  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{3-}$  (complejo **5n**,  $\text{RS}^- = \text{mercaptosuccinato}$ ) aislado, con tres moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  solvatando los cianuros coordinados.

metiltiol como modelo simple de tiol coordinado al nitrosilo metálico, para el pentaciano-nitrosilferrato(II) (complejo **8n**) y para el iridio (complejos **8a** y **8b**). Tal como se puede observar en la tabla IV.3.3, los parámetros optimizados muestran que la distancia S-N disminuye unos 0.3-0.4 Å al pasar de **8n** a **8a** y **8b**. Por otro lado las cargas NBO sobre el átomo de azufre nos indican que el tiol está formando un S-nitrosotiol coordinado para los casos **8a** y **8b** mientras que tiene carácter de tiolato para el caso **8n**.

Tabla IV.3.3: Parámetros geométricos seleccionados y cargas NBO. PBE1PBE/SDD//PBE1PBE/SDB-cc-pVDZ.

Complejos	distancias (Å)			Cargas NBO (e)		
	S-N	N-O	Fe/Ir-N	S	O	N
8n	2.244	1.220	1.759	-0.109	-0.318	0.289
8a	1.939	1.243	1.901	0.263	-0.308	0.035
8b	1.854	1.240	1.920	0.403	-0.269	0.014

Para el caso de **5n** la presencia de un grupo carboxilo, el cual ejerce un efecto atractor de la densidad electrónica estabiliza al ligando RSNO haciendo que sea menos proclive a la oxidación. A diferencia de esto, en el caso de **5a** el efecto atractor del grupo carboxilo compete con el carácter electrófilo del pentacloroiridato(III) produciendo como resultado neto la desestabilización del RSNO coordinado.

### Descomposición: cambios espectrales y estado de oxidación del iridio.

En todos los casos los cambios espectrales son similares a los que se muestran en la Figura IV.3.3. Mientras transcurre la descomposición, el estado de oxidación del iridio no parece

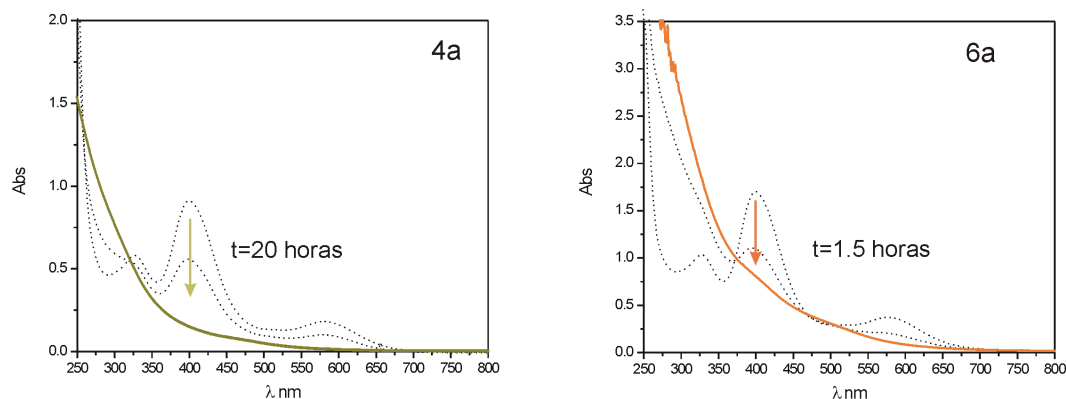


Figura IV.3.3: Espectro UV-Visible al inicio y al cabo de un determinado tiempo para los complejos **4a** y **6a**.

cambiar, ya que se sabe por datos informados en bibliografía que si esto ocurriera el aspecto de los espectros UV-Visible finales sería muy diferente. Los complejos de Ir(IV) presentan colores muy intensos, característica que los diferencia claramente de los complejos de Ir(III) [31].

Si bien en este trabajo no fueron estudiados en forma exhaustiva los productos de descomposición, las evidencias encontradas sugieren que los productos resultantes como consecuencia de ésta son principalmente el disulfuro y complejos del tipo  $[\text{IrCl}_{5-n}\text{X}_n\text{Solv}]^{-(2-n)}$  donde el estado de oxidación para el iridio permanece inalterado (Ver Figura IV.2.6). La evidencia experimental proporcionada por la espectroscopía  $^1\text{H}$  RMN demuestra que para todos los complejos, luego de la descomposición completa, se detecta únicamente la formación de disulfuro como compuesto orgánico. Cabe destacar que el disulfuro en general es poco soluble en agua y dependiendo del tiol hasta puede llegar a ser insoluble. A continuación se describen dos ejemplos:

1. Caso **4a**) El disulfuro es bastante soluble en agua. Al disolver **4a** en agua se observó una apreciable cantidad de disulfuro desde el primer espectro adquirido hasta llegar a ser el único producto observado vía esta técnica.
2. Caso **2b**) El disulfuro es muy insoluble en agua. Al disolver **2b** lo que se observó con el correr del tiempo fue una disminución de la intensidad para la señal del complejo y abundante aparición de precipitado. Se separó el precipitado, se redisolvió en DMSO y resultó ser el disulfuro, identificado por espectroscopía  $^1\text{H}$  RMN.

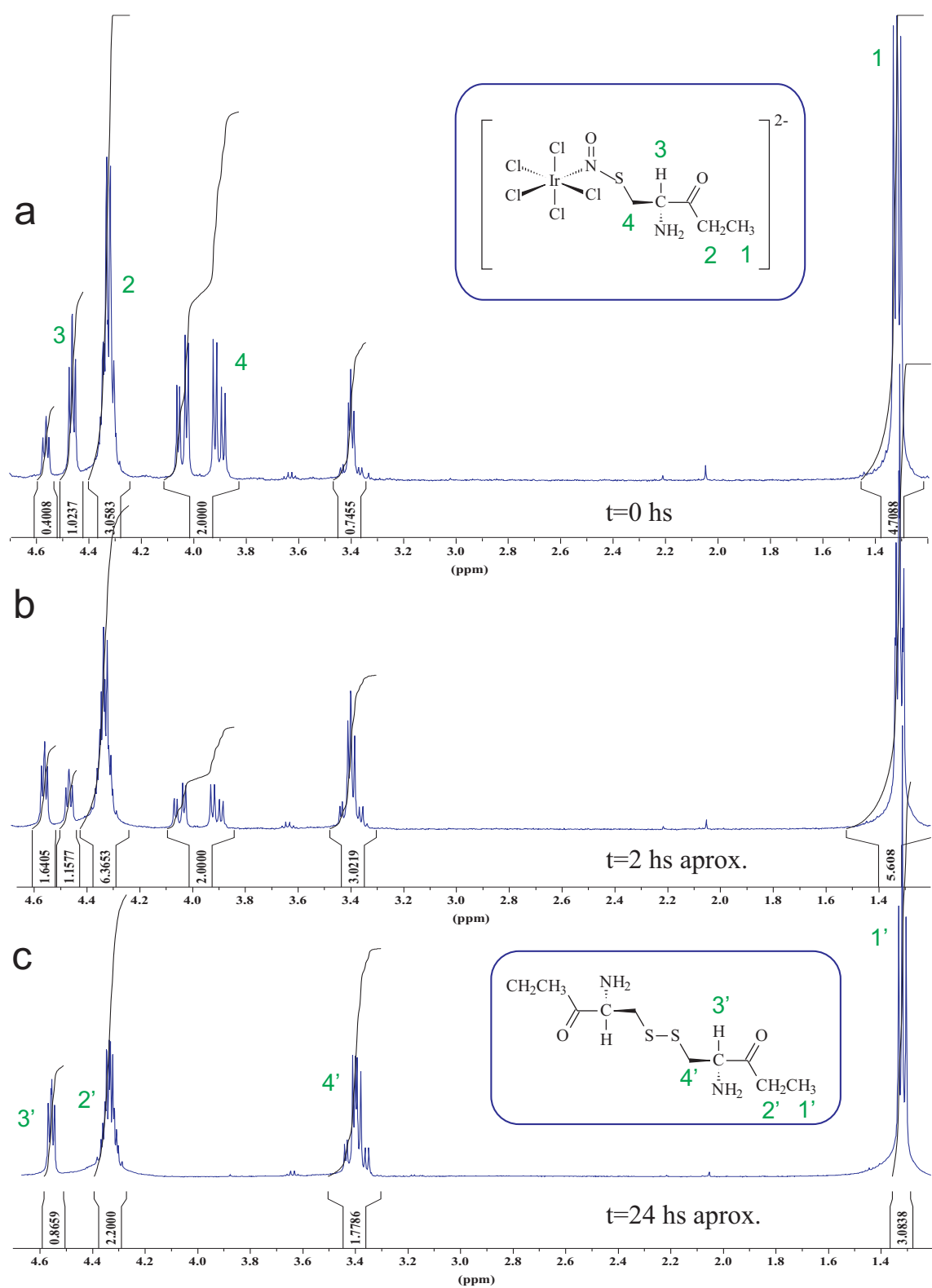


Figura IV.3.4: Secuencia de espectros  $^1\text{H}$  RMN para el complejo 4a. 500 MHz, solvente:  $\text{D}_2\text{O}$ , referencia:  $\text{CH}_3\text{CN}$  agregado (2.06 ppm).

Más allá de estos dos casos mostrados, en todos los casos se observa la aparición del disulfuro. En los casos para los cuales resultó ser insoluble como por ejemplo **1a-b** y **2a-b**, este producto fue extraído, redisolto en DMSO-d<sub>6</sub> y así detectado.

*Caso 4a).* En la figura IV.3.4 se observan los espectros tomados para el complejo **4a** disuelto en agua, el espectro inicial (a) muestra una relación de 70 %:30 % complejo-disulfuro, en el siguiente espectro, adquirido 2 horas después, esta relación se invierte y el espectro final, adquirido al día siguiente, muestra como único producto el disulfuro.<sup>2</sup> Notar que en este caso se ve claramente cómo se consume el complejo para dar lugar a la formación del disulfuro, el mismo resulta ser soluble pero a medida que aumenta la concentración, la solución alcanza la saturación y se observa turbidez y precipitado blanco.

*Caso 2b).* En la Figura IV.3.5 se pueden observar los espectros para el proceso de descomposición del complejo **2b** en agua. Las señales del reactivo (**2b**) y el disulfuro pueden ser distinguidas claramente debido a su diferente patrón y desplazamiento químico. En la Figura IV.3.5 a se muestra el espectro para el complejo recién disuelto. Luego de varias semanas (Figura IV.3.5 b) se observa que no han aparecido señales nuevas pero la intensidad de la señal correspondiente al complejo sufrió una gran disminución a esto debemos sumarle la aparición de un precipitado blancuzco. Al extraer el precipitado y redisolverlo en DMSO-d<sub>6</sub> (Figura IV.3.5 c) se observa que aparecen señales diferentes las que hemos asignado al disulfuro, ver comparación con los espectros para el tiol libre y disulfuro, Figura IV.3.6 a y b, y Tabla IV.3.4.

En la Figura IV.3.5 también se muestra en menor tamaño otra zona relevante del espectro en la que aparece la señal que corresponde al acetonitrilo coordinado. Se puede observar que esta señal desaparece y aparece otra señal a campos más altos, que podría asignarse a  $[\text{IrCl}_4(\text{CH}_3\text{CN})_2]^-$ . De igual modo también se pueden observar señales pequeñas en aproximadamente 7.7 ppm que parecen ser restos del complejo.

Como comentario final, es importante notar la diferente escala de tiempo en la que transcurre la descomposición para estos dos complejos, para el caso **4a**) la descomposición se completa al cabo de un día, en cambio para **2b**) lo mismo ocurre al cabo de varias semanas, hecho consistente con la evidencia aportada por la espectroscopía UV-visible.

---

<sup>2</sup>La asignación de las señales para el tiol y el disulfuro se muestran en la parte III.2.2, pág. 64-66.

Tabla IV.3.4: Desplazamientos químicos ( $\delta(\text{ppm})$ ) para el complejo 2b, fenil tiol y disulfuro.

$^1\text{H}$ RMN				$^{13}\text{C}$ RMN			
H	tiol <sup>a</sup>	disulfuro <sup>b</sup>	2b <sup>c</sup>	C	tiol <sup>a</sup>	disulfuro <sup>b</sup>	2b <sup>c</sup>
				(1)	130.75	136.97	137.36
(2)	7.25(m)	7.50(m)	7.70(m)	(2)	129.32	128.97	134.07
(2')	-	7.50(m)	7.70(m)	(2')	129.32	128.97	132.97
(3)	7.25(m)	7.27(m)	7.70(m)	(3)	128.99	127.45	129.76
(3')	-	7.27(m)	7.50(m)	(3')	128.99	127.45	129.46
(4)	7.12(t)	7.20(c)	7.50(m)	(4)	125.48	127.06	129.46
(5)	3.93(s)	-	-				

<sup>a</sup>medido en  $\text{CD}_3\text{CN}$ , <sup>b</sup>SDBS ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz), <sup>c</sup>medido en  $\text{D}_2\text{O}$ .

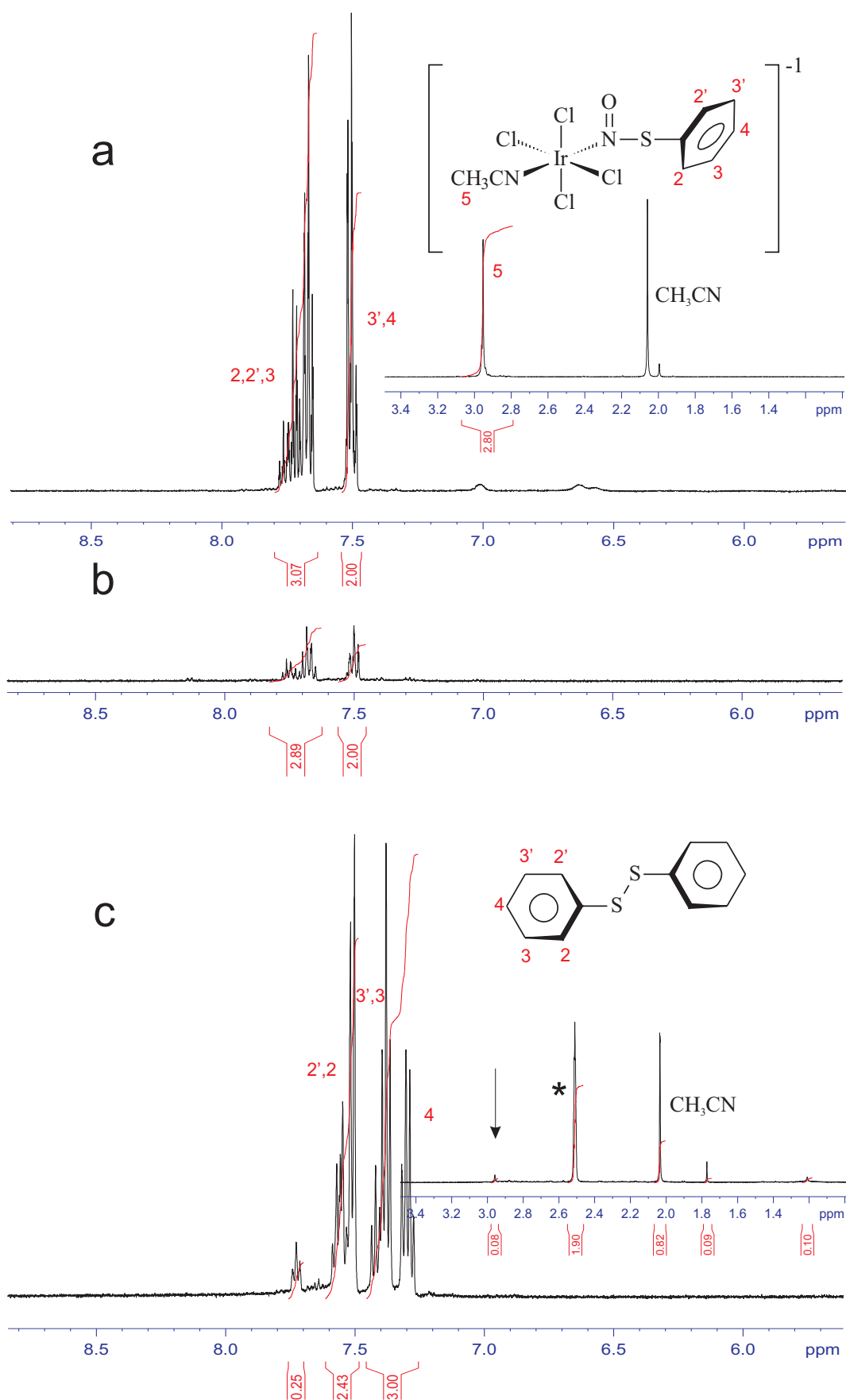


Figura IV.3.5: Secuencia de espectros  $^1\text{H}$  RMN para el complejo 2b. 500 MHz, (a y b) solvente:  $\text{D}_2\text{O}$ , referencia:  $\text{CH}_3\text{CN}$  agregado (2.06 ppm), (c) solvente: DMSO, referencia:  $\text{CH}_3\text{CN}$  agregado (2.07 ppm)

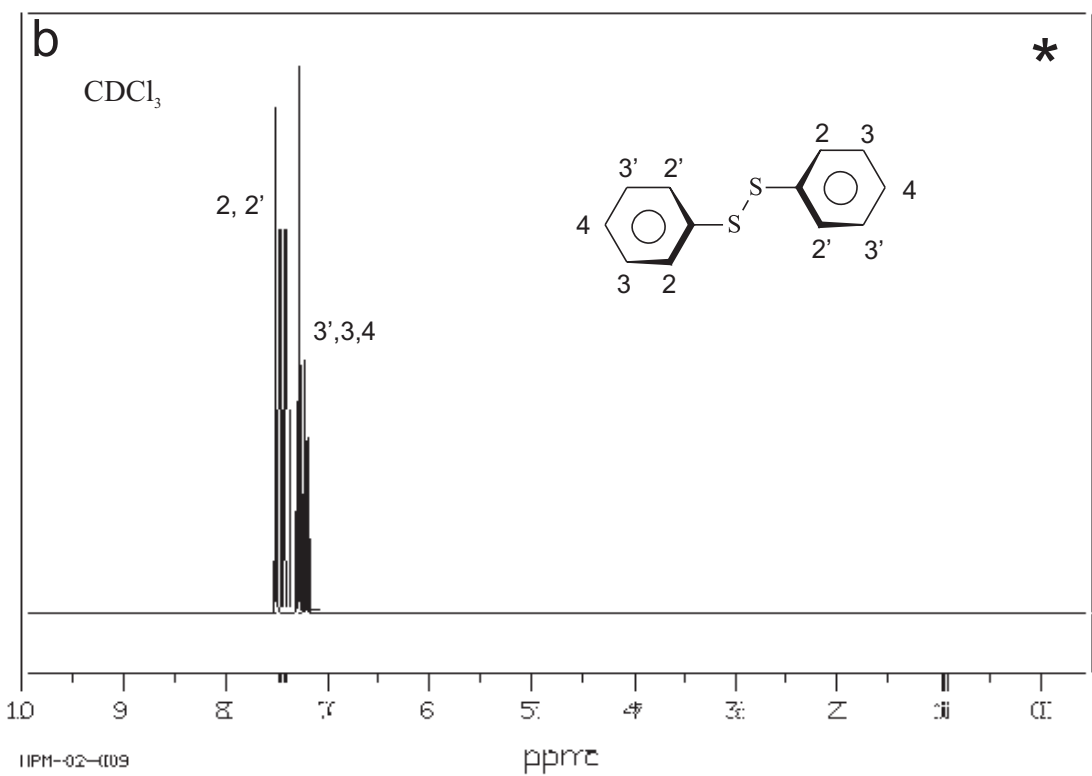
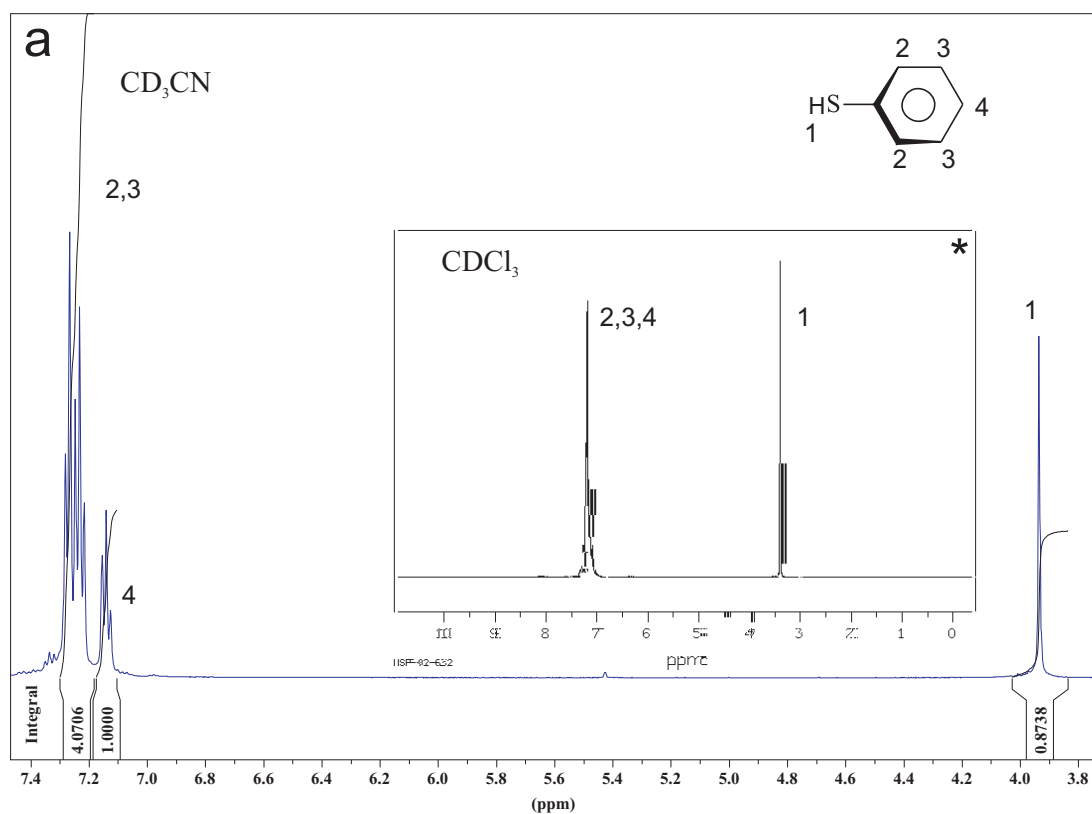


Figura IV.3.6: Espectros <sup>1</sup>H RMN para el feniltiol y el disulfuro del feniltiol. (a) 500 MHz, solvente: CD<sub>3</sub>CN referencia: pico residual del solvente (1.94 ppm). Recuadro (a) y (b) \*SDBS-Databank (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

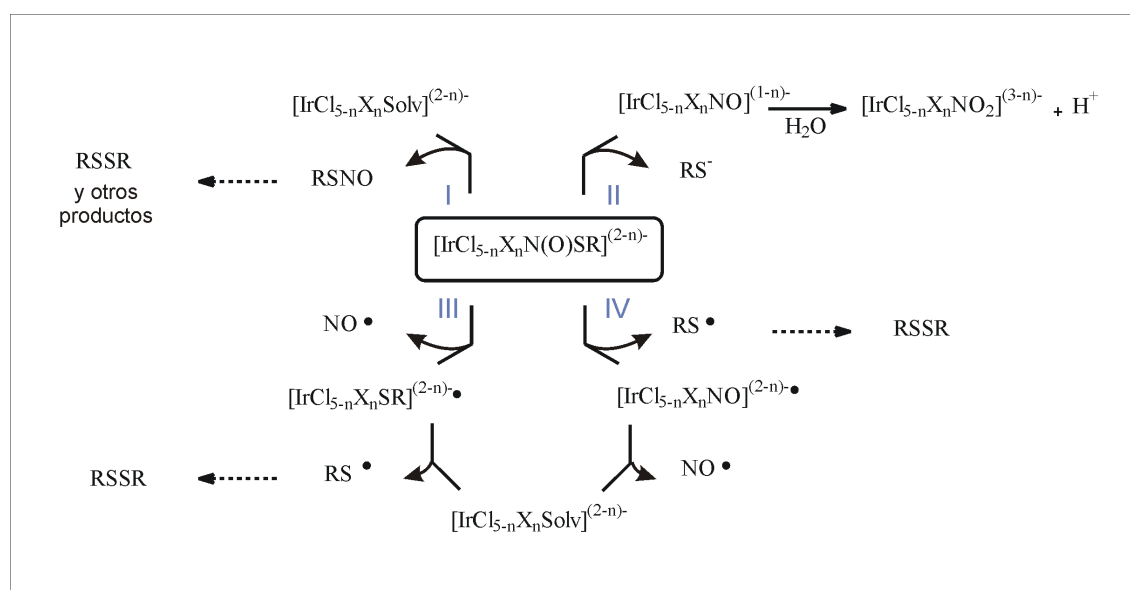


Figura IV.3.7: Esquema de posibles mecanismos para la reacción de descomposición de  $[\text{IrCl}_{5-n}\text{X}_n\text{N}(\text{O})\text{SR}]^{(2-n)-}$  ( $n=0,1$ ;  $\text{X}=\text{CH}_3\text{CN}$ ).

### IV.3.3. Evaluación de posibles mecanismos de descomposición : fase gaseosa y solución.

Una vez presentadas las evidencias experimentales encontradas para la descomposición de estos compuestos pasemos a interpretarlas en términos de algún mecanismo. Si bien, como ya antes se ha mencionado, éste no fue el objetivo principal de este trabajo, se propondrán algunos mecanismos basados en las evidencias experimentales y en cálculos computacionales.

Aparentemente la descomposición del RSNO coordinado se asemeja bastante a la de los RSNOs libres pudiendo ocurrir tanto la ruptura homolítica como la heterolítica de la unión S-N (Figura IV.3.7). En el caso de la ruptura heterolítica (mecanismos I y II) ésta conduciría a la formación del tiolato y el complejo  $[\text{IrCl}_{5-n}\text{X}_n\text{NO}]^{-(2-n)}$  (I), o el RSNO y el complejo  $[\text{IrCl}_{5-n}\text{X}_n\text{Solv}]^{-(2-n)}$  (II). Mientras que la ruptura homolítica lleva a diferentes posibilidades, tal como se puede observar en la Figura IV.3.7.

En la Tabla siguiente se muestran los parámetros energéticos calculados para los mecanismos planteados en el caso del complejo **1a-b**.

Como puede observarse en la Tabla IV.3.5, para el caso de los complejos tipo **a** aislados, los cálculos indican que muy probablemente lo que ocurra sea la ruptura heterolítica de la unión S-N, mientras que en solución lo que resulta más factible sería la ruptura Ir-N dando como resultado la formación de RSNO. Para los complejos tipo **b**, los cálculos parecen indicar que tanto en fase gaseosa como en solución lo que ocurriría sería la ruptura heterolítica de la unión Ir-N.



Tabla IV.3.5: Parámetros energéticos para los distintos mecanismos para el complejo **1a-b**. PBE1PBE/SDD//PBE1PBE/SDB-cc-pVDZ.

I			II		
	Fase Gaseosa	PCM(agua)	Fase Gaseosa	PCM(agua)	
1a	16.55	8.93	-15.31	39.79	
1b	2.09	4.91	74.99	65.11	
III			IV		
	Fase Gaseosa	PCM(agua)	Fase Gaseosa	PCM(agua)	
1a	19.71	19.81	34.80	36.85	
1b	21.62	25.41	33.71	33.71	

Los resultados proporcionados por la espectroscopía ESI-MS muestran que en fase gaseosa operan las dos vías de descomposición, homolítica y heterolítica. La señal que corresponde al complejo  $[\text{IrCl}_5\text{NO}]^{-2}$  resulta ser muy intensa para los complejos **1a**, **2a**, y **4a**, mientras que no ocurre lo mismo para los complejos **1b** y **2b**, hecho que es consistente con los cálculos realizados previamente. Todos los complejos tipo **a** pierden NO dando origen a los complejos tiol-Iridio observados como  $[\text{M-NO-Cl}]^{\bullet-}$ . La pérdida del radical tiol lleva a la formación de iones del tipo  $[\text{IrCl}_4\text{NO}]^{\bullet-}$  (362.82 m/z) (complejos tipo **a**) y  $[\text{IrCl}_3\text{NO}]^{\bullet-}$  (327.86 m/z) (complejos tipo **b**). En fase gaseosa, todas las posibles vías parecen ser operativas mientras que en solución la situación aparenta ser bastante diferente. Como antes se ha mencionado, una vez disueltos en agua, los complejos se descomponen dando como resultado la formación de disulfuro y complejos del tipo  $[\text{IrCl}_{5-n}\text{X}_n\text{Solv}]^{-(2-n)}$ . Es importante mencionar que si bien como antes hemos dicho, la vía más probable de descomposición sería la ruptura heterolítica de la unión Ir-N, no hemos logrado detectar por medios espectroscópicos RSNOs libres. Probablemente esto esté relacionado con que una vez formado el RSNO se descomponga en forma inmediata. Es evidente que hacen falta muchos más experimentos para poder discernir el mecanismo a través del cual ocurre la descomposición.

### Experimental

**Reactivos.** Los complejos fueron preparados tal como fue descrito en la sección anterior. Los solventes deuterados  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CD}_3\text{CN}$  y  $\text{DMSO-d}_6$  fueron obtenidos de Sigma Aldrich.

**Instrumentación y Medidas.** Las diferentes medidas fueron realizadas utilizando la instrumentación descrita en la metodología general (II.1). Las cinéticas fueron medidas en agua MilliQ sin agregado de buffers ni de EDTA. Se midió el pH una vez disuelto y al final de la medición.

## IV.4

# Conclusiones y preguntas abiertas

A lo largo de esta segunda parte de los resultados (IV), hemos mostrado la forma de preparar RSNOs coordinados al complejo  $[\text{IrCl}_5]^{2-}$ , lo cual constituye una alternativa para estabilizar RSNOs. Hemos mostrado una caracterización completa y un estudio sistemático de sus propiedades, abordando finalmente algunos aspectos de su reactividad, en particular su estabilidad en agua.

Este trabajo, que conforma la segunda parte de los resultados de esta tesis, muestra que la reacción entre tioles y el complejo  $\text{K}[\text{IrCl}_5\text{NO}]$  da origen a una química de coordinación muy rica y vasta. Todos los complejos preparados resultaron ser muy estables en fase sólida pudiendo ser almacenados durante meses, con la sola precaución de mantenerlos en atmósfera libre de humedad y protegidos de la luz. Al ser disueltos en agua muestran un amplio rango de vidas medias, indicando esto, una diferente reactividad y una fuerte dependencia con la estructura del tiol en cuestión.

La naturaleza del grupo R es de crucial relevancia en lo que respecta al tipo de complejo obtenido (**a** o **b**), las propiedades y la estabilidad del mismo. Como consecuencia de esto, surge el hecho de que pequeños cambios en la estructura del tiol se traducen en sustanciosos cambios en sus propiedades. Todos los complejos resultaron ser muy sensibles a efectos del medio. Por ejemplo el complejo **1 a** o **b**, cristaliza como cristales verdes o rojos dependiendo del contraión y el solvente donde se lleva a cabo la cristalización. Del mismo modo las distancias de unión muestran ser sensibles al cambio del contraión. Otro hecho interesante es el efecto solvatocrómico que muestran todos los complejos.

Resulta ser de interés particular la obtención de los complejos de tipo **b** (con el acetonitrilo coordinado en la posición *trans*), siendo el caso de tioles con grupos aromáticos el único que da origen a los mismos. Para estos tioles, se ha logrado mediante el control de variables de trabajo como la temperatura, obtener los dos complejos (**a** y **b**). La labilización del cloruro *trans* luego de la coordinación del tiol como S-nitrosotiol podría ser de utilidad en lo que

concierno a propósitos sintéticos. También podría ser la clave para sintonizar la estabilidad del RSNO coordinado a través de la selección adecuada del ligando *trans* al mismo.

Pasemos ahora a reunir las evidencias mostradas hasta el momento y tratar de encontrarles una explicación. Para ello comencemos pensando en los RSNOs libres; si le permitimos a nuestra imaginación describir su estructura electrónica como la combinación de dos estructuras resonantes (Figura IV.4.1 (a)), una (1) de ellas sería la estructura convencional con un doble enlace para la unión N-O y un simple enlace para la unión S-N, mientras que la otra (2) sería algo parecido a una estructura zwitteriónica con un doble enlace en la unión S-N y uno simple en la unión N-O. Como consecuencia, de este esquema surge que, una distribución electrónica semejante a la descrita por (2) será favorecida por aquellos sustituyentes donores de densidad electrónica, reforzándose la unión S-N respecto la unión N-O. El efecto opuesto será ocasionado por sustituyentes atractores de densidad electrónica.

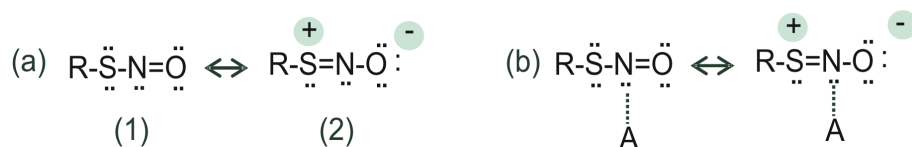


Figura IV.4.1: Esquema de estructura de resonancia para (a) RSNOs libres y (b) complejos con un ácido de Lewis que en nuestro caso sería el metal.

Ahora sumemos a nuestro esquema mental la interacción de los RSNOs con un ácido de Lewis, que a los fines prácticos llamaremos A. Si A se coordina al átomo de nitrógeno, el efecto electrónico será similar que el producido por un sustituyente donador de densidad electrónica unido al átomo de azufre. Entonces, al coordinarse A al átomo de nitrógeno se inducirá un desplazamiento de la densidad electrónica del azufre hacia A, generándose de esta forma una densidad de carga positiva sobre el azufre, reforzando el enlace S-N (Tabla IV.3.3, pág 150). El incremento observado en la estabilidad de los RSNOs coordinados se puede explicar entonces en el marco del esquema propuesto, donde A sería ahora un complejo metálico, y en nuestro caso particular  $[\text{IrCl}_5]^{2-}$ .

Volvamos ahora sobre el tema de la estabilidad de estos complejos en agua, los resultados obtenidos demuestran que no es posible generalizar y explicar la estabilidad en términos de una familia de complejos ya que cada uno de ellos presenta un comportamiento particular. Este hecho, como ya hemos mencionado es consistente con la fuerte influencia de la estructura del tiol. Un resultado sobre el que vale la pena detenerse unos instantes y discutir, es que nuestro complejo derivado de la reacción con el ácido mercaptosuccínico resulta ser el más inestable de todos mientras que lo opuesto se encuentra reportado en literatura para el complejo derivado de la reacción del pentacianonitrosilferrato(II) con el mismo tiol. Este hecho, a primera vista sorprende ya que para el pentacianonitrosilferrato(II) resulta ser el más

estable de todos. Ahora bien, si lo pensamos en términos de lo expuesto anteriormente, esta diferencia probablemente se deba a que en nuestro caso para ese complejo en particular existe una competencia entre el carácter electrofílico del iridio y el efecto atractor de los grupos carboxilato cuyo resultado neto resulta ser la desestabilización del RSNO coordinado. En el caso del pentacianonitrosilferrato(II) los carboxilatos se llevan gran parte de la densidad electrónica sobre el azufre e inhiben el desplazamiento de densidad electrónica al hierro estabilizando el complejo. De esta forma podríamos decir que aquellos sustituyentes sobre el átomo de azufre que ayudan a la estabilización de los complejos de iridio no lo hacen para los respectivos complejos de hierro.

Continuando en lo que se refiere a estabilidad, en literatura se ha sugerido que la flexibilidad conformacional estaría involucrada, en particular en lo que hace a impedimentos estéricos e interacciones que conduzcan a la formación del disulfuro, principal producto de la descomposición. Por ejemplo al pasar de *syn* a *anti* la distancia S-N pasa por un máximo y la diferencia de energía entre las conformaciones *syn* y *anti* es función de los impedimentos estéricos que existan para el cambio del ángulo diedro involucrado (O-N-S-C). Cualquier desvío de la planaridad para este ángulo se traduce en una desestabilización del fragmento y una mayor tendencia a la ruptura de la unión S-N [32]. Llamativamente, se puede observar que el ángulo de torsión calculado es casi cero para los complejos **1b** y **2b**, entre 11 y 16 grados para los complejos **1a**, **2a** y **3a**, mientras que para los otros complejos toma un valor entre 27 y 40 grados (ver Tabla IV.2.4) indicando mayor flexibilidad. Como conclusión, es posible que la flexibilidad conformacional desempeñe algún papel en la estabilidad de estos complejos.

***Resumiendo:***

- Se encontró una forma de estabilizar una gran variedad de RSNOs, algunos de los cuales son muy inestables en su forma libre.
- Se obtuvo por primera vez la estructura cristalina por difracción de rayos X de un RSNO coordinado a un metal de transición.
- Estos novedosos complejos fueron caracterizados exhaustivamente.
- Se estudiaron y explicaron propiedades de los mismos por medio de métodos espectroscópicos.
- Se estudiaron y explicaron algunos aspectos sobre su reactividad.

En lo que respecta a preguntas abiertas, creo que son muchas, de hecho creo que lo que más hemos hecho es abrir preguntas, pero hemos sentado las bases y herramientas para poder responderlas en el futuro con la ayuda de posteriores experimentos.

***Estudios futuros.***

1. Una cuestión que nos interesaría estudiar *a posteriori* está relacionada con la parte **III** de esta tesis, es decir con la reacción de transnitrosación. La idea sería trasladarlo a los complejos, es decir estudiar la reacción del complejo frente al tiol. ¿Existirá una especie intermedia, como de la que se habló en la parte **III**, coordinada al complejo metálico?. En este campo se han encontrado resultados interesantes para los complejos con el pentaciano-nitrosilferrato(II) [33].

2. Estudiar la reducción química y electroquímica de estos complejos. Para RSNOs libres se han medido los potenciales de reducción tal como se muestra en la parte **III**. La reducción por un electrón de los RSNO conduce a la generación de NO, el mecanismo a través del cual esto ocurre aún no se ha elucidado, pero se propone que podría existir una especie intermedia:



El estudio de este mecanismo es importante ya que constituye una forma de recuperar al NO y todas sus funciones, y nos da una idea de qué reductores son necesarios para que esto ocurra.

# Bibliografía

- [1] P. C. Ford and I. M. Lorkovic. Mechanistic aspects of the reactions of nitric oxide with transition-metal complexes. *Chemical Reviews*, 102:993–1017, 2002.
- [2] S. Oae and K. Shinhama. Organic thionitrites and related substances - a review. *Organic Preparations and Procedures International*, 15:165–198, 1983.
- [3] K. Szacilowski and Z. Stasicka. S-nitrosothiols: Materials, reactivity and mechanisms. *Progress in Reaction Kinetics and Mechanism*, 26:1–58, 2001.
- [4] A. R. Butler, A. M. Calsyharrison, C. Glidewell, and P. E. Sorensen. The pentacyanonitrosylferrate ion .5. the course of the reactions of nitroprusside with a range of thiols. *Polyhedron*, 7:1197–1202, 1988.
- [5] M. D. Johnson and R. G. Wilkins. Kinetics of the primary interaction of pentacyanonitrosylferrate(2-) (nitroprusside) with aliphatic thiols. *Inorganic Chemistry*, 23:231–235, 1984.
- [6] D. Mulvey and W. A. Waters. Reduction of alkaline aqueous disodium pentacyanonitrosylferrate(2-) (sodium nitroprusside) and kinetic features of its color-reaction with thiols. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, pages 951–959, 1975.
- [7] K. Szacilowski, J. Oszejca, G. Stochel, and Z. Stasicka. Photochemistry of the [fe(cN)(5)no](2-)-thiolate system. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, pages 2353–2357, 1999.
- [8] K. Szacilowski, A. Wanat, A. Barbieri, E. Wasielewska, M. Witko, G. Stochel, and Z. Stasicka. Reactions of the [fe(cN)(5)no](2-) complex with biologically relevant thiols. *New Journal of Chemistry*, 26:1495–1502, 2002.
- [9] F. Bottomley, S. G. Clarkson, and S. B. Tong. Electrophilic behavior of coordinated nitrosyl cation - reactions of pentahalogenonitrosyliridate(1-). *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, pages 2344–2346, 1974.

- [10] B. S. Furniss, A. J. Hannaford, P. W. G. Smith, and A. R. Tatchell. *Vogel's textbook of practical organic chemistry*, volume Fifth. Longman, 1989.
- [11] M. M. Quintal, A. Karton, M. A. Iron, A. D. Boese, and J. M. L. Martin. Benchmark study of dft functionals for late-transition-metal reactions. *Journal of Physical Chemistry A*, 110:709–716, 2006.
- [12] K. Szacilowski, A. Chmura, and Z. Stasicka. Interplay between iron complexes, nitric oxide and sulfur ligands: Structure, (photo)reactivity and biological importance. *Coordination Chemistry Reviews*, 249:2408–2436, 2005.
- [13] L. L. Perissinotti, D. A. Estrin, G. Leitun, and F. Doctorovich. A surprisingly stable s-nitrosothiol complex. *Journal of the American Chemical Society*, 128:2512–2513, 2006.
- [14] F. Di Salvo, N. Escola, D.A. Scherlis, D.A. Estrin, C. Bondia, D. Murgida, J.M. Ramallo-Lopez, F.G. Requejo, L. Shimon, and F. Doctorovich. Electronic perturbation in a molecular nanowire of [ircl(5)(no)](-) units. *Chemistry-A European Journal*, 13: 8428–8436, 2007.
- [15] A. B. Lever. *Inorganic Electronic Spectroscopy*, volume Second. 1984.
- [16] J. Barrett, D. F. Debenham, and J. Glauser. Electronic spectrum and photolysis of s-nitrosotoluene-alpha-thiol. *Chemical Communications*, pages 248–&, 1965.
- [17] K. Szacilowski, G. Stochel, Z. Stasicka, and H. Kisch. Reaction of sodium pentacyanonitrosylferrate(2-) with aliphatic thiolates. synthesis and properties of the [fe(cn)(5)n(o)sr](3-) products. *New Journal of Chemistry*, 21:893–902, 1997.
- [18] S. Oae, Y. H. Kim, D. Fukushima, and K. Shinhama. New syntheses of thionitrites and their chemical reactivities. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry*, pages 913–917, 1978.
- [19] R. P. Patel, J. McAndrew, H. Sellak, C. R. White, H. J. Jo, B. A. Freeman, and V. M. rley Usmar. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1411:385–400, 1999.
- [20] H. A. Moynihan and S. M. Roberts. Preparation of some novel s-nitroso compounds as potential slow-release - agents of nitric-oxide in-vivo. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry*, pages 797–805, 1994.

- [21] R. Clancy, A. I. Cederbaum, and D. A. Stoyanovsky. Preparation and properties of s-nitroso-l-cysteine ethyl ester, an intracellular nitrosating agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44:2035–2038, 2001.
- [22] K. Szacilowski, J. Oszejca, A. Barbieri, A. Karocki, Z. Sojka, S. Sostero, R. Boaretto, and Z. Stasicka. Photochemistry of the  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{N}(\text{O})\text{SR}](3-)$  complex - a mechanistic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*, 143:99–108, 2001.
- [23] Y. Marcus. Thermodynamics of solvation of ions .6. the standard partial molar volumes of aqueous ions at 298 15-k. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*, 89:713–718, 1993.
- [24] D. A. Estrin, O. Y. Hamra, L. Paglieri, L. D. Slep, and J. A. Olabe. Structure and bonding in pentacyano(l)ferrate(ii) and pentacyano(l)ruthenate(ii) complexes (l=pyridine, pyrazine, and n-methylpyrazinium): A density functional study. *Inorganic Chemistry*, 35:6832–6837, 1996.
- [25] P. Chen and T. J. Meyer. Medium Effects on Charge Transfer in Metal Complexes. *Chemical Reviews*, 98(4):1439–1478, 1998.
- [26] J. D. Schwane and M. T. Ashby. FTIR investigation of the intermediates formed in the reaction of nitroprusside and thiolates. *Journal of American Chemical Society*, 124(24):6822–3, 2002.
- [27] J. Yi, M. A. Khan, J. Lee, and G. B. Richter-Addo. The solid-state molecular structure of the s-nitroso derivative of l-cysteine ethyl ester hydrochloride. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, 12:261–266, 2005.
- [28] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, and A. Nudelman. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *Journal of Organic Chemistry*, 62(21):7512–7515, 1997.
- [29] G. A. Lawrance, M. Maeder, Y. M. Neuhold, K. Szacilowski, A. Barbieri, and Z. Stasicka. An electrospray ionization mass spectrometry study of the nitroprusside-cation-thiolate system. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, pages 3649–3655, 2002.
- [30] K. Szacilowski. Molecular logic gates based on pentacyanoferrate complexes: From simple gates to three-dimensional logic systems. *Chemistry-A European Journal*, 10: 2520–2528, 2004.



- [31] J. C. Chang and C. S. Garner. Kinetics of aquation of aquopentachloroiridate(3) and chloride anation of diaquotetrachloroiridate(3) anions. *Inorganic Chemistry*, 4:209–&, 1965.
- [32] N. Arulsamy, D. S. Bohle, J. A. Butt, G. J. Irvine, P. A. Jordan, and E. Sagan. Interrelationships between conformational dynamics and the redox chemistry of s-nitrosothiols. *Journal of the American Chemical Society*, 121:7115–7123, 1999.
- [33] F. Roncaroli and J. A. Olabe. The reactions of nitrosyl complexes with cysteine. *Inorganic Chemistry*, 44:4719–4727, 2005.

## V

La reacción entre la desoxi-hemoglobina humana (desoxi-Hb) y nitrito para generar óxido nítrico (NO) en ausencia de oxígeno: estudio teórico de los posibles mecanismos de reacción



## V.1

# Antecedentes sobre mecanismos de generación de NO

Habiendo ya analizado y estudiado algunos aspectos relacionados con el transporte y almacenamiento del NO, esta última parte (V) será dedicada al estudio de mecanismos de generación del mismo en condiciones de anoxia. En condiciones de falta de oxígeno, la presencia y acción del NO es de suma importancia. Recordemos que la biosíntesis de NO catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS) requiere de oxígeno, por lo que la pregunta que surge de forma inmediata es ¿quién suministra el NO y a través de qué mecanismo, cuando no hay oxígeno?. En lo que a esto concierne, dos hipótesis han sido propuestas [1, 2] :

1. Una de ellas propone que la S-nitroso-hemoglobina a través de la *S*-nitrosación de la cisteína 93 (subunidad beta) y la albúmina son las fuentes de almacenamiento del NO intravascular. En el caso de la S-nitroso-hemoglobina el transporte y liberación de NO estaría regulado alostéricamente[2][3].
2. La otra propone que es el anión nitrito, presente en abundantes cantidades en sangre y tejidos, quien sería reducido por la desoxi-hemoglobina (desoxi-Hb) generando NO. En sangre, el nitrito es mucho más estable que el NO o los *S*-nitrosotioles, por lo que sería la molécula ideal para almacenar NO en condiciones normales y liberarlo cuando se lo requiera por reacción con la desoxi-Hb [4].

En literatura se encuentra mucho material que discute ambas hipótesis, de la lectura del mismo se llegó a la conclusión de que la segunda hipótesis es más fuerte y relevante fisiológicamente. Se decidió entonces, estudiar esta segunda hipótesis. A lo largo de esta sección se presentarán los antecedentes y una breve introducción, así como también los resultados del estudio de esta reacción abordado en forma teórica mediante simulación computacional.

### V.1.1. desoxi-Hb y nitrito

La reacción del nitrito con la desoxi-Hb sería entonces una fuente biosintética de NO, de hecho podría decirse que sería la contraparte anaeróbica de la síntesis oxígeno-dependiente de NO catalizada por la NOS. (Figura I.1.2, introducción general). La reacción de la que se está hablando es la que se muestra en la siguiente ecuación:



Los estudios más antiguos de la interacción de nitrito con la hemoglobina datan del año 1868[5], por ese entonces el interés de esta reacción estaba asociado a la generación de metHb y no tanto a los productos derivados de la reducción del nitrito. Pasaron más de cien años hasta que se vinculó esta reacción con la capacidad de producir óxido nítrico en ausencia de oxígeno. Gran variedad de estudios han mostrado que tanto la desoxi-Hb como la desoxi-mioglobina (desoxi-Mb) poseen actividad nitrito reductasa y la consecuente capacidad de generar NO a partir de su reacción con nitrito en ausencia de oxígeno [6, 7, 8]. Se ha propuesto que esta reacción ocurre a través de un complejo mecanismo que aún no ha sido completamente elucidado, los estudios más antiguos datan de los 80' [9, 10].

El anión nitrito se encuentra en sangre en una concentración que va desde 0.5 a 1  $\mu\text{mol/L}$  y alrededor de 10  $\mu\text{mol/L}$  en los tejidos [11, 12, 13, 14, 15], mientras que la concentración medida para *S*-nitroso hemoglobina (primera hipótesis) es menor a 40 nmol/L [14]. Como antes se mencionara, el anión nitrito es estable tanto a la oxidación como reducción comparado con el NO y los RSNOs (Figura I.1.4, introducción general) .

La hemoglobina (Figura V.1.1) se puede considerar como un tetrámero donde cada subunidad es similar a la mioglobina. La hemoglobina está formada por dos subunidades denominadas alfa ( $\alpha$ ) y dos subunidades denominadas beta ( $\beta$ ), contiene cuatro grupos hemo, uno en cada subunidad. El grupo hemo es un grupo prostético, está formado por hierro y un anillo de porfirina que es un tetrapirrol cíclico. En el caso particular de la hemoglobina, la porfirina que forma el hemo es la protoporfirina IX. El hemo se encuentra coordinado a través del hierro al átomo de nitrógeno de un grupo histidina en la cadena proteica, no hay un sexto ligante que complete la esfera de coordinación del hierro, lo cual suministra un sitio vacante para la coordinación de diferentes ligandos.

El grupo hemo se encuentra en una cavidad esencialmente hidrofóbica, las dos cadenas laterales de propionato de la protoporfirinaIX interactúan con las aguas y con residuos cercanos mediante puentes salinos. En la hemoglobina el hierro se encuentra en estado de oxidación +2, la forma oxidada que contiene hierro en estado de oxidación +3 recibe el nombre de methemoglobina (metHb). La hemoglobina contiene hierro(II) de alto espín cuando

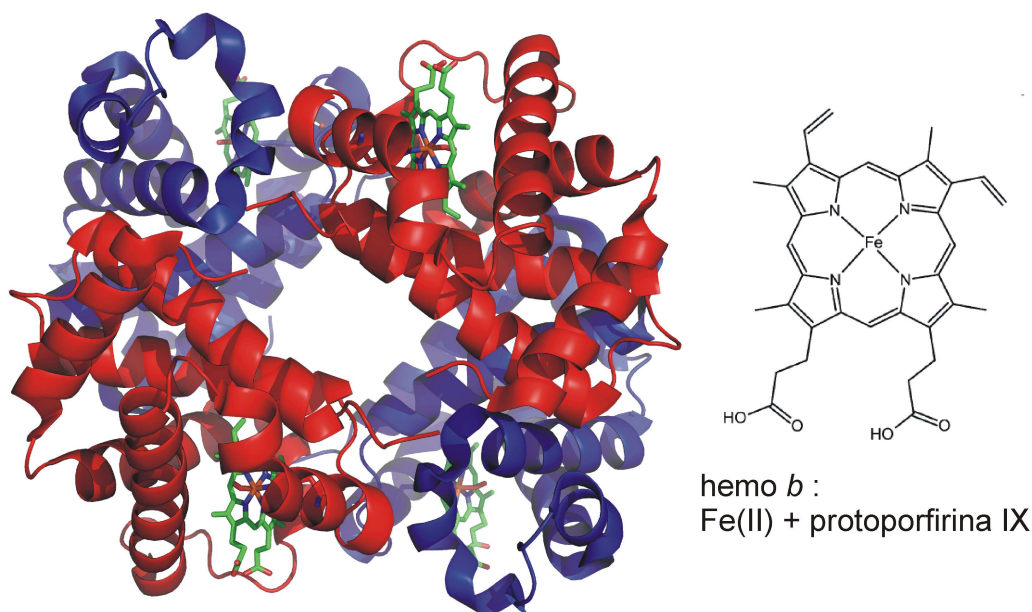


Figura V.1.1: Hemoglobina humana, en azul se muestran las subunidades alfa y en rojo las beta.

no presenta un sexto ligando, al coordinar el ligando pasa a ser de bajo espín.

La estructura cuaternaria de la desoxi-Hb se denomina forma T (tensa o tirante) y la oxi-Hb (oxígeno coordinado) forma R (relajada). Las formas T y R de la hemoglobina presentan ligeras diferencias en su estructura cuaternaria. Esta variación de estructura entre un estado y otro tiene que ver con las peculiaridades del transporte de oxígeno, y explican el comportamiento alostérico de la hemoglobina. Los estados R y T difieren en los enlaces salinos que se forman entre las subunidades. Estos enlaces son más fuertes en la desoxi-Hb que en la oxi-Hb.

Recientemente se ha encontrado que la actividad NIR de la hemoglobina aparentemente está relacionada con la conformación que adopta la misma, resultando que la reacción estaría favorecida cuando la misma está parcialmente oxigenada [16, 17].

## V.1.2. Actividad nitrito reductasa (NIR) : comparación con NIRs de bacterias

Las nitrito reductasas (NIRs) forman parte de una vasta clase de enzimas que desempeñan importantes pasos en el ciclo del nitrógeno llevado a cabo por bacterias (Figura I.1.3, introducción). En dicho ciclo el nitrito es reducido por dos tipos de NIRs:

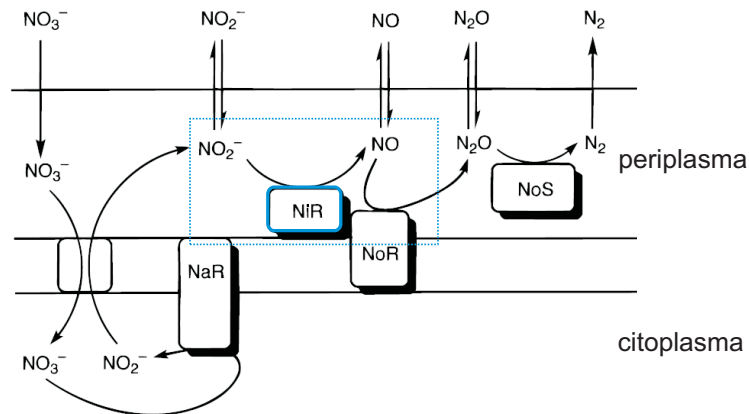
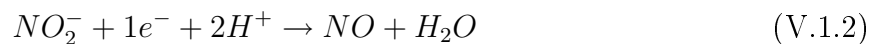


Figura V.1.2: Arreglo de enzimas involucradas en el proceso de desnitrificación en una bacteria. NIR (nitrito reductasa), NaR (nitrato reductasa), NoR (óxido nítrico reductasa) y NoS (óxido nitroso reductasa).

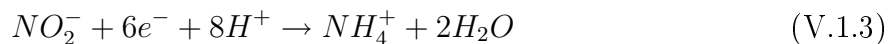
Reducción disimilatoria: estas NIRs asociadas a otras enzimas forman parte del proceso de desnitrificación (ver figura V.1.2).

La reacción que catalizan es la siguiente:



Estas enzimas pueden a su vez subdividirse en dos grupos, aquellas que contienen cobre y aquellas que contienen como grupo prostético un hemo. NIRs que contienen grupos hemo *c* y *d1* (Figura V.1.3) se han aislado de un gran número de bacterias: *Pseudomonas Aeruginosa*, *Thiobacillus denitrificans*, *Ps. Stutzeri*, *Ps. Halodenitrificans*, *Paracoccus denitrificans*, etc.

Reducción asimilatoria: catalizan la reducción de nitrito a amoníaco, luego usado en la síntesis de aminoácidos. Estas enzimas generalmente contienen varios grupos prostéticos hemo o sirohemos. (Figura V.1.3)



Entre estas enzimas podemos mencionar:

- NAD(P)H- Nitrito reductasa
- Ferredoxin-Nitrito Reductasa
- Cyt *c* - Nitrito Reductasa

Claramente, la actividad NIR de la desoxi-Hb es semejante a las NIRs disimilatorias en lo que concierne a la clasificación realizada para bacterias.

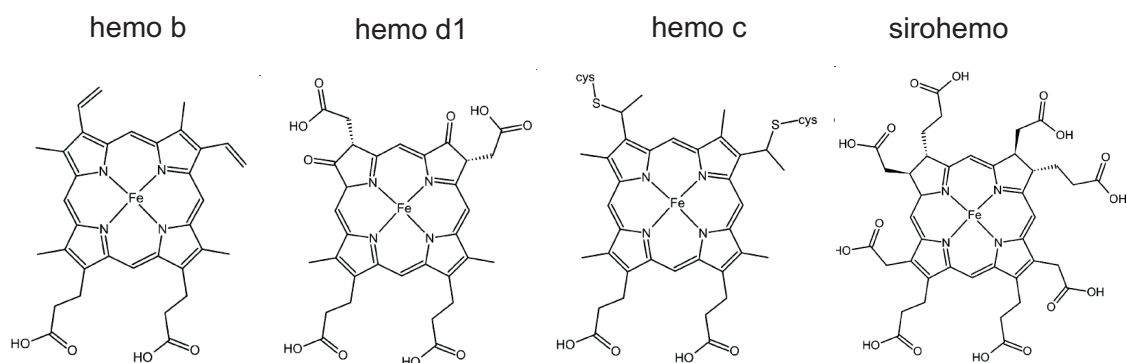


Figura V.1.3: Distintos tipos de hemos que forman parte de distintas NIRs.

### V.1.3. Posibles mecanismos propuestos

Pasemos ahora a considerar los distintos mecanismos propuestos para esta reacción. Para ello veamos primero el ciclo catalítico propuesto para bacterias que llevan a cabo la reducción disimilatoria (Figura V.1.4).

Según se puede observar por espectroscopía de difracción de rayos X para las NIRs de bacterias, el anión nitrito se coordina por el átomo de nitrógeno al hierro(II) [18, 19] (Figura V.1.5).

Tal como se puede observar en el ciclo catalítico lo que ocurre es una transferencia electrónica acoplada a una transferencia protónica. La protonación de alguno de los oxígenos del nitrito conduce a la posterior liberación de una molécula de agua, formando el complejo Fe(III)NO, el que luego decae vía liberación del NO [20].

Algunos detalles importantes:

1. Todas las NIRs muestran dos histidinas distales altamente conservadas (ver Figura V.1.5), lo que indica un rol importante de las mismas en estas enzimas. Estas histidinas se encuentran localizadas en el lugar ideal para proveer los protones necesarios. Al ser mutadas cualesquiera de ellas, la actividad enzimática se ve seriamente comprometida [19].
2. Las transferencias protónicas no son limitantes, pruebas recientes de efecto isotópico para un modelo correspondiente a una NIR de cobre corroboran esta afirmación [21].
3. Si bien en principio se postuló que el paso limitante sería la liberación del NO del complejo Fe(III)NO [22, 23], recientemente se midió que para hemos tipo *cd1* la ruptura de dicha unión no demandaría mucha energía pudiendo no ser el paso limitante [24]. En este tipo de enzimas el paso limitante tal vez se encuentre en la transferencia electrónica puesto que implica la interacción de distintas unidades proteicas.



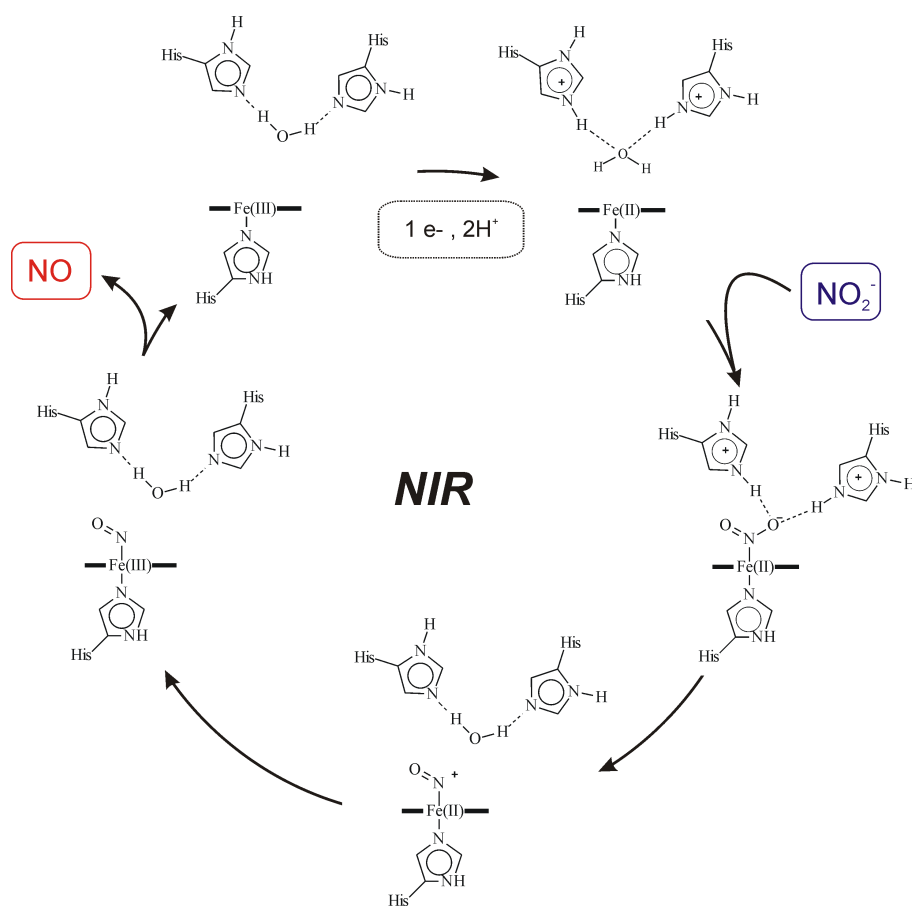


Figura V.1.4: Ciclo catalítico para NIRs de bacterias.

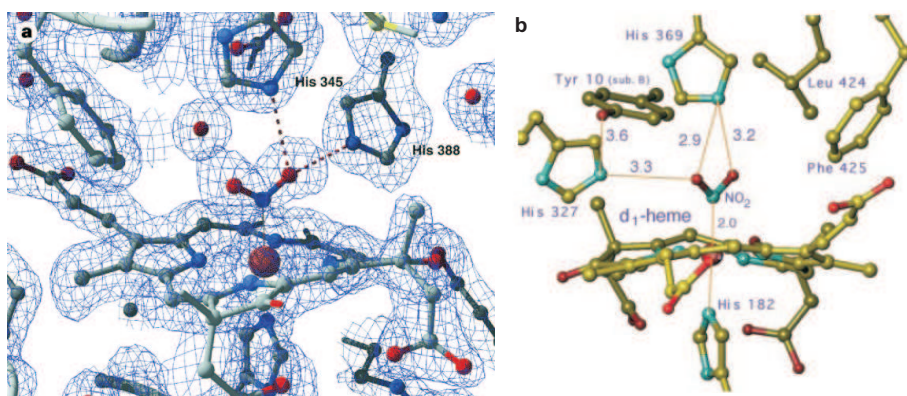


Figura V.1.5: Estructuras por rayos X para *Thiosphaera Pantotropha* (a) y *Pseudomonas Aeruginosa* (b) con nitrito como ligando.

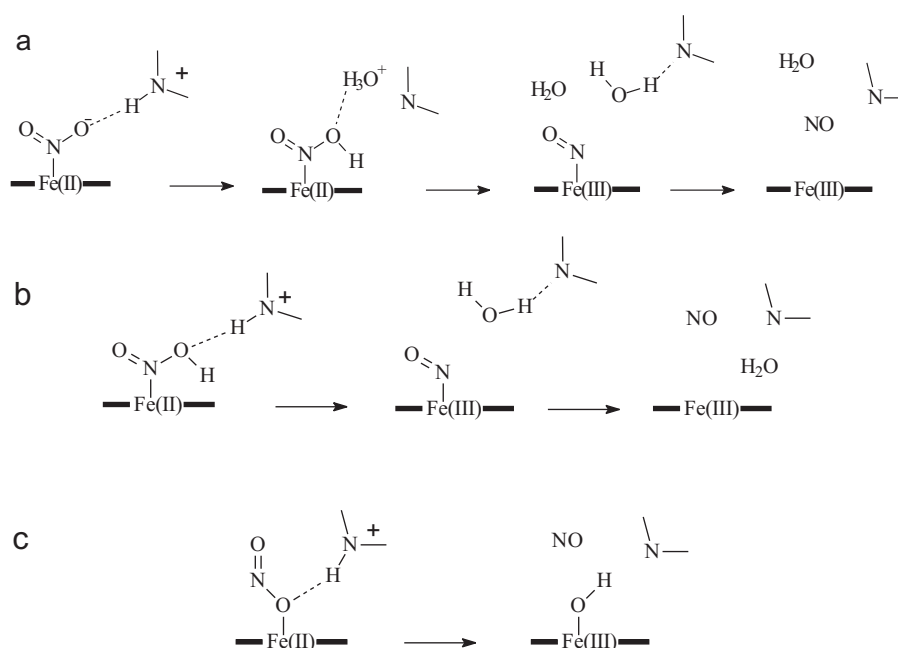


Figura V.1.6: Mecanismos propuestos para la reducción del nitrito catalizada por la desoxi-Hb.

Volviendo ahora a la reacción que nos interesa, una primera pregunta es: *¿Cómo es el sitio activo en la hemoglobina humana comparado con las NIRs de bacterias?*

Características del sitio activo de la Hemoglobina Humana:

- Contiene un hemo tipo *b*
- Contiene una sola histidina (His E7)
- La cavidad es hidrofóbica

Estas tres características que la diferencian bastante de las NIRs de bacterias son responsables de que esta reacción sea particularmente interesante de estudiar.

*¿Cuáles mecanismos se proponen para esta reacción?*

Como ya se verá en la próxima sección la evidencia experimental es escueta y en algunos casos poco concluyente. Los mecanismos que se plantean en este trabajo y que posteriormente serán evaluados mediante técnicas de simulación son los que se muestran en la Figura V.1.6.

*Mecanismo a-* Por analogía a lo que ocurre con bacterias, podría considerarse que el nitrito se une por el átomo de nitrógeno, la histidina cede los dos protones reprotonándose secuencialmente. Siendo en este caso el paso limitante la liberación del NO o bien la etapa de reprotonación de la histidina. Esto podría ser consistente con medidas realizadas en metMb que dan un  $\Delta H_{off}^1 = 15.5$  kcal/mol [25].

<sup>1</sup>Cambio de entalpía para la reacción de liberación de NO a partir de hemoFe(III)NO.

*Mecanismo b-* Se une ácido nitroso, la histidina cede el único protón necesario y el paso limitante sería la liberación de NO.

*Mecanismo c-* Si bien se sabe que entre los distintos modos de coordinación del nitrito a metales, el predominante y termodinámicamente favorecido para el caso de porfirinas de hierro(II) es el modo  $\eta^1$ -N, la coordinación por oxígeno a través de una isomerización de unión no debe ser descartada y mas aún en un sitio de unión donde la disponibilidad de donores de protones puede afectar el balance entre estas dos formas de coordinación. De hecho, si bien la mayoría de los aductos cristalizados con hemoproteínas exhiben coordinación por N, recientemente ha sido publicada una estructura de rayos X mostrando unión por O para la metMb [26]. Previo a este hallazgo, por medio de cálculos DFT para modelos del citocromo cd1 NIR se mostró una diferencia de energía de 4 y 6 kcal/mol para estos dos isómeros (favorecida la coordinación por N) para Fe(III) y Fe (II) respectivamente [27].

El último mecanismo correría con la ventaja de que no requiere la ruptura de la unión Fe(III)-NO, pero a su vez presenta la desventaja de que termodinámicamente, al menos para modelos, está favorecida la coordinación por N.

#### V.1.4. Datos experimentales

Esta reacción se presume que ocurre a través de un complejo mecanismo el cual aún no ha sido completamente elucidado.



Doyle y colaboradores[9], por medio de medidas cinéticas concluyeron que la reacción es de segundo orden, y la constante de velocidad derivada de la  $k$  observada para el paso de la Ec. V.1.4, toma un valor de  $0.8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a  $\text{pH}=7.4$  y  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . La reacción 2 (Ec. V.1.5) es extremadamente rápida  $k \approx 4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , el paso 3 (Ec. V.1.6) representa una velocidad residual que sólo cuenta en medio básico. Los productos observados en mayor cantidad fueron metHb y HbNO, también encontraron que la velocidad de reacción dependía en forma lineal con la concentración de protones en un rango de  $\text{pH}$  6 a 8. Estas evidencias fueron atribuidas a un mecanismo que involucraba la interacción de ácido nitroso con la desoxi-Hb. A esta evidencia se le debe añadir que el valor del  $\text{pK}_a$  para el ácido nitroso es 3.15 lo que indica

que a pH 7.4 la relación  $[\text{HONO}]/\text{ONO}^-$  es del orden de  $10^{-4}$ . Esta dependencia del pH para el rango dado bien podría deberse a la protonación de la histidina distal. La estequiometría final observada por Doyle y colaboradores era de 70 % metHb y 30 % HbNO y no la relación esperada de 1:1, observada previamente por Brooks [10].

Recientemente, Gladwin propuso que la actividad NIR de la desoxi-Hb estaría vinculada con la conformación de la misma y que ocurriría a mayor velocidad para hemoglobina parcialmente oxigenada [16, 28]. Estos investigadores informan un valor de  $0.12 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a pH=7.4 y  $25^\circ\text{C}$  para la desoxi-Hb. Informan que esta constante bimolecular aumenta su valor en 50 veces durante el transcurso de la transición conformacional T a R, y que el valor promedio medido sería entonces  $0.35 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . También agregan que si bien a tiempos iniciales se obedece una cinética de segundo orden, luego no ajusta a segundo orden. En cuanto a la relación de productos encontrados es efectivamente 1:1, pero varía muy sensiblemente ante trazas de oxígeno. Esta última evidencia sugiere que los experimentos realizados por Doyle probablemente estaban contaminados por trazas de oxígeno, lo que explica la relación de productos observada y el valor de constante de velocidad elevado comparado con el informado por Gladwin.

Otro hecho que se debe tener en cuenta y que también es sugerido por Gladwin es que las propiedades redox del hemo podrían modular la reducción de un electrón del anión nitrito, de hecho, se ha mostrado que el potencial de reducción  $\text{Fe(III)}/\text{Fe(II)}$  para el hemo(R) es menor que para el hemo(T) [29, 30].

Un análisis de la literatura reciente muestra que la cinética de esta reacción es un tema de estudio actual, aún no elucidado, esto explica la poca claridad y la falta de resultados concluyentes sobre el tema.

Para finalizar, habiendo presentado el marco teórico-experimental de forma tal que pretende ser la más completo posible, en las secciones siguientes adoptaremos una visión microscópica de esta reacción y por medio de la simulación computacional se tratará de responder algunas de las preguntas planteadas.



## V.2

# Nitro vs Nitrito: Cálculos de estructura electrónica en sistemas modelo

Con el objeto de evaluar la estabilidad intrínseca de los posibles modos de coordinación del ligando ( $\text{NO}_2^-$ ) al sitio activo, se realizaron cálculos de estructura electrónica utilizando como modelo de sitio activo una porfirina muy simple de hierro coordinada a un imidazol, tal como se muestra en la Figura V.2.1. Todos los cálculos realizados corresponden a sistemas modelo aislados.

### V.2.1. Coordinación del ligando por N, por O y posibles isómeros

En lo que sigue, se llamará *nitro* al ligando coordinado por el átomo de nitrógeno mientras que se denominará *nitrito* al coordinado por el átomo de oxígeno.

Para el caso del nitrito, dos orientaciones son posibles dando origen a dos isómeros: B y C, resultando ser B más estable que el último por unas 0.9 kcal/mol (Figura V.2.2). La distancia N-O para el nitro es 1.27 Å, ambas iguales. Para el nitrito las distancias Fe(II)O1-N no son iguales resultando ser mayores (1.32 Å (B)- 1.35 Å (C)), y menores para N-O2 (1.25 Å). Este hecho sugiere que el nitrito se halla más activado hacia la ruptura de la unión Fe(II)O1-N conduciendo a la liberación de NO. La Tabla V.2.1 muestra que la formación del isómero nitro está termodinámicamente favorecida sobre la del nitrito.

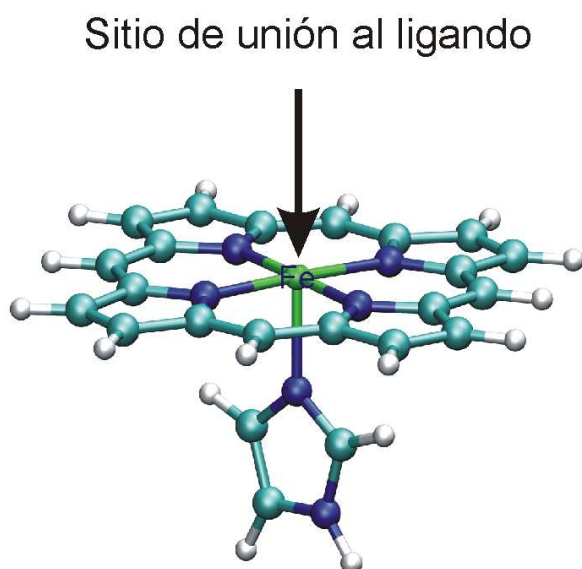


Figura V.2.1: Modelo de porfirina utilizado.

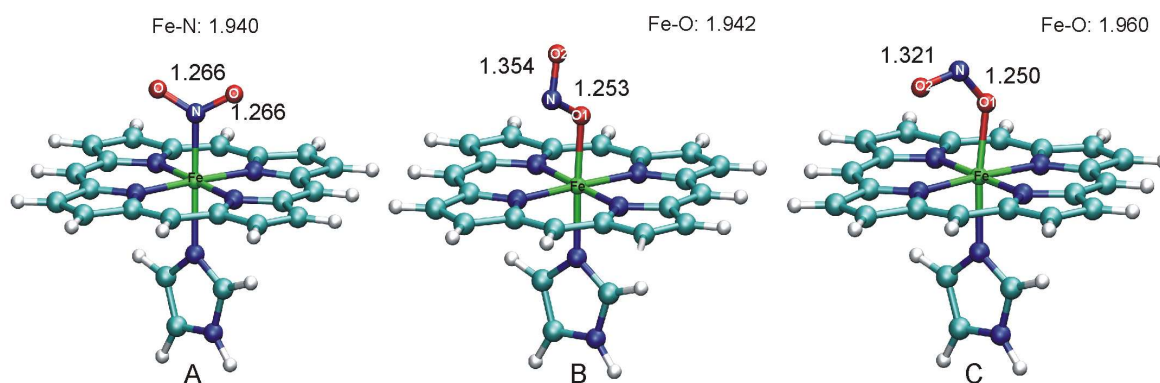


Figura V.2.2: Unión por N:nitro (A); unión por O: nitrito (B y C). Distancias en Å.

Tabla V.2.1: Energías relativas en kcal/mol para los modelos coordinados a nitrito y nitro.

	$\Delta E = E_{\text{nitrito}} - E_{\text{nitro}}$
PBE/bases numéricas (SIESTA)	10.11
PBE/SDB-ccpVDZ (g03)	5.28
BP86/DN** bases numéricas (Spartan 5.0)[27]	6.00

DN\*\*: tamaño comparable a 6-31G\*\*

B3LYP/LACPV\*\*, B3LYP/6-31G\*\* (Jaguar o Gaussian98)  $\Delta E = 2-3$  kcal/mol.

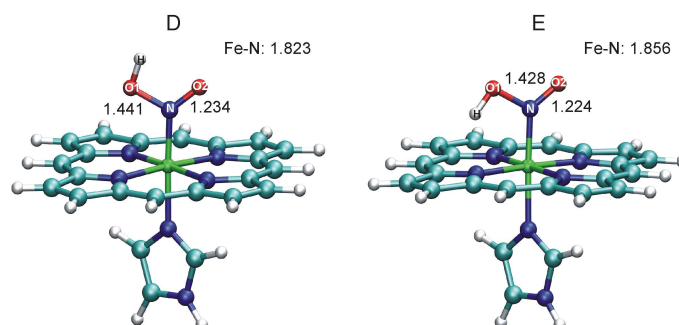


Figura V.2.3: Coordinación del ácido nitroso y posibles isómeros. Distancias en Å.

## V.2.2. Coordinación de ácido nitroso

Si se considera la unión del ácido nitroso por el átomo de nitrógeno, aquí nuevamente la orientación de la unidad O-H da origen a dos posibles isómeros (Figura V.2.3), D resulta ser más estable que E por 2.12 kcal/mol. La distancia de unión para N-O2 (1.22-1.23 Å) es similar a la optimizada para el modelo con el nitro (1.27 Å, Figura V.2.2 A), mientras que la distancia N-O1(H) aumenta notablemente (1.43-1.44 vs 1.27 Å). En consecuencia, la protonación del nitro en cualquiera de sus oxígenos favorece la activación hacia la ruptura de la unión N-O1. De hecho, si se adiciona un segundo protón, la ruptura ocurre en forma inmediata conduciendo a la liberación de una molécula de agua y el complejo Fe(III)NO.

Para terminar, también se considera la situación del ácido nitroso coordinado por el átomo de oxígeno (Figura V.2.4). Esto es análogo a estudiar la protonación del nitrito en cualquiera de sus oxígenos:

1. Protonación en O1: la estructura optimizada (Figura V.2.4) muestra un alargamiento de la distancia N-O1 (1.63 Å) y un acortamiento de la distancia N-O2 (1.20 Å), esto indica que una protonación en este sitio conduciría fácilmente a la liberación de NO y la formación del complejo Fe(III)OH. Lo mismo ocurre con el isómero C.
2. Protonación en O2: en este caso la estructura optimizada muestra una distancia N-O1 de 1.25 Å y N-O2 1.42 Å lo que indica que estaría más activada ahora la ruptura de la unión N-(O2H), seguramente una segunda protonación sobre O2, al igual que sucede para el ácido nitroso coordinado por N, conduzca a la liberación de una molécula de agua y formación del complejo Fe(III)NO.



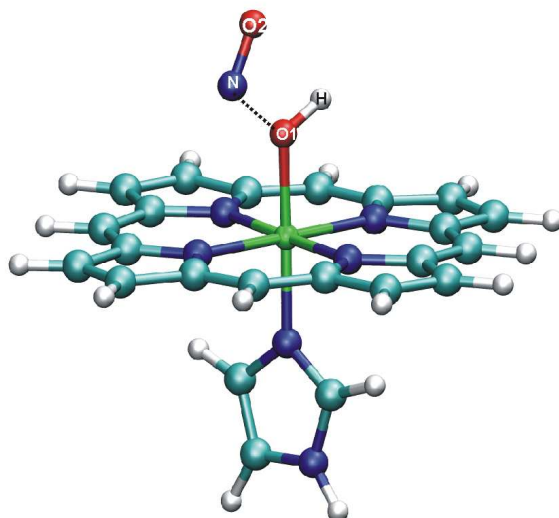


Figura V.2.4: Acido nitroso unido por el átomo de oxígeno.

### V.2.3. "Nitro" versus "Nitrito"

Hasta aquí, en esta sección se ha visto que mediante el uso de un modelo simple, hemos logrado extraer algunas peculiaridades sobre los distintos modos de coordinación:

- En lo que a la termodinámica se refiere, distintos métodos de cálculo indican que el nitro es más estable que el nitrito por un valor que está comprendido entre 6-10 kcal/mol. Esta diferencia de energía no es muy grande y nos da la pauta que podría ser revertida fácilmente en un entorno proteico donde las interacciones con los residuos próximos podrían disminuir esta diferencia o favorecer aún más a alguno de los dos isómeros.
- La protonación sobre O1 u O2 del nitro, activa la ruptura de la unión N-O, pero para que esto ocurra necesita de un segundo protón sobre dicho oxígeno. De esta forma se libera una molécula de agua y se forma el complejo Fe(III)NO.
- La protonación sobre el O1 del nitrito, prácticamente induce la ruptura de la unión O1-(NO), conduciendo a la liberación de NO y a la formación del complejo hidroxilo.
- La protonación sobre el O2 del nitrito, conduce a una situación análoga a la protonación en cualquiera de los oxígenos del nitro.

En base a estas evidencias se podría decir que la protonación sobre el nitrito parecería ser más efectiva, la misma requiere un solo protón y el NO es liberado automáticamente, pero no se debe olvidar que por lo menos para los modelos aislados el nitro es más estable termodinámicamente.

Tabla V.2.2: Afinidades calculadas para distintos ligandos de relevancia biológica en sistemas modelo aislados (Fe(II)) evaluados con el método SIESTA.

Ligando	Energía de unión (kcal/mol)
$\text{NO}_2^-$ (A)	-60.66
$\text{NO}_2\text{H}$ (D)	-32.73
$\text{NO}_2\text{H}$ (E)	-34.84
$\text{ONO}^-$ (B)	-50.55
$\text{ONO}^-$ (C)	-51.49
$\text{ONOH}$ (O1)	-15.71
$\text{ONOH}$ (O2)	-15.95
$\text{O}_2$	-21.04
$\text{CO}$	-43.90
$\text{NO}$	-46.31
$\text{CN}^-$	-61.74

Con el objeto de comparar la afinidad del presente modelo por el nitro/nitrito con la afinidad por otros ligandos de relevancia biológica, en la Tabla V.2.2 se muestran las energías de afinidad calculadas para todos ellos.

### *Simulación Computacional*

Todos los cálculos realizados fueron llevados a cabo utilizando el paquete Gaussian98, y el código SIESTA previamente descritos en la metodología (II.2). Para los casos en los que se usó el esquema de bases Gaussianas, las geometrías fueron optimizadas utilizando DFT con el funcional PBE con la base SDDall para todos los átomos. Con el objeto de tener mejores valores para la energía, sobre las estructuras optimizadas se realizó un cálculo de energía a geometría fija usando la base SDB-cc-pVDZ con el mismo funcional. En los casos en los que se utilizó el código SIESTA, se utilizaron bases numéricas definidas en una grilla tridimensional finita y el funcional PBE. Se utilizó una base de calidad doble z con polarización,  $\Delta PAO=25$  meV y un radio de corte para la grilla de 150 Ry. El hemo ferroso pentacoordinado sin el ligando se trató como estado quintuplete de alto espín, que es sabido es el estado fundamental para este sistema. El hemo ferroso o férrico hexacoordinado se trató como bajo espín.



## V.3

# El ligando en el sitio activo: dinámica molecular clásica

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular para las distintas subunidades y los posibles modos de coordinación del ligando, con el fin de visualizar aspectos estructurales de la coordinación del ligando a la hemoglobina. En la hemoglobina, como ya se ha mencionado, existe una sola histidina en el sitio distal (E7) rodeada de residuos hidrofóbicos. Debido a que la protonación de dicha histidina es crucial para la actividad NIR de la hemoglobina, las simulaciones se realizaron para los dos estados de protonación; neutra (protonada en  $N\epsilon$ ) y cargada (protonada en  $N\epsilon$  y  $N\delta$ ), ver Figura V.3.1. En todos los casos se obtuvieron trayectorias estables, hecho que fue verificado por medio de la inspección de la energía y el desvío cuadrático medio de la posición de los carbonos  $\alpha$  del esqueleto proteico respecto a la estructura inicial en el tiempo. Se observó que las simulaciones que se realizaron para la histidina cargada condujeron a interacciones más favorables con el ligando. En la mayoría de las NIRs, es comúnmente aceptado que las dos histidinas distales están cargadas (protonadas en ambos nitrógenos) cuando la enzima tiene al ligando [31]. En lo que sigue se mostrarán los resultados para el caso de la histidina distal cargada.

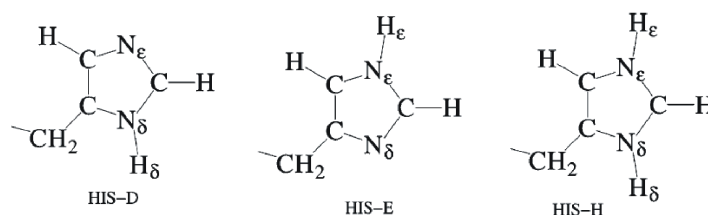


Figura V.3.1: Estados de protonación de la histidina.

### V.3.1. Subunidad $\alpha$

#### Nitro vs Nitrito

Cuando el ligando se une como nitro, las distancias O1 y O2 al protón de la histidina ( $N\epsilon H$ , capaz de formar uniones de H) muestran un rango más amplio de valores que cuando éste se une como nitrito (Figura V.3.2).

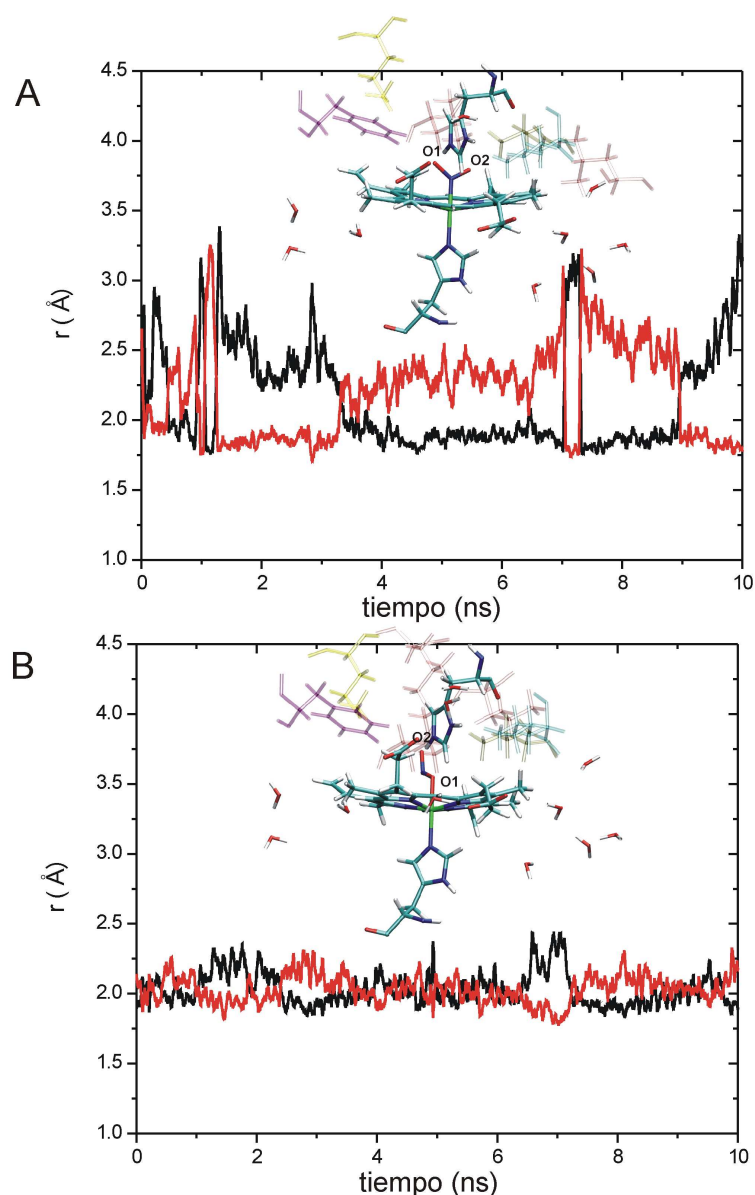


Figura V.3.2: Coordinación tipo nitro (A) y nitrito (B) en la subunidad alfa de la desoxi-Hb. Se muestran los residuos cercanos : Phe43 (violeta), Met32 (amarillo), Leu101 y Leu66 (rosa), Val62 (ocre), Lys61 (cian). Las distancias O1-H (His58) y O2-H (His58) se muestran en negro y rojo respectivamente.

En el primer caso el ligando nitro gira estableciendo de esta forma alternativamente puentes de hidrógeno con la HisE7 a través de O1 y O2. Para el caso del nitrito esto no sucede, pero en cambio, la HisE7 se acomoda de forma tal que establece interacciones de puente de hidrógeno con ambos oxígenos en forma simultánea. De esta forma las distancias correspondientes a la interacción con NεH están restringidas a un rango más angosto de valores.

## Ácido nitroso

Cuando se incluye como ligando el ácido nitroso (N-coordinación), se observa que establece interacciones de puente de hidrógeno con los oxígenos O1 y O2, y al igual que lo observado para el nitro, el ligando gira estableciendo las interacciones a través del O1 y O2 en forma alternada. (Figura V.3.3)

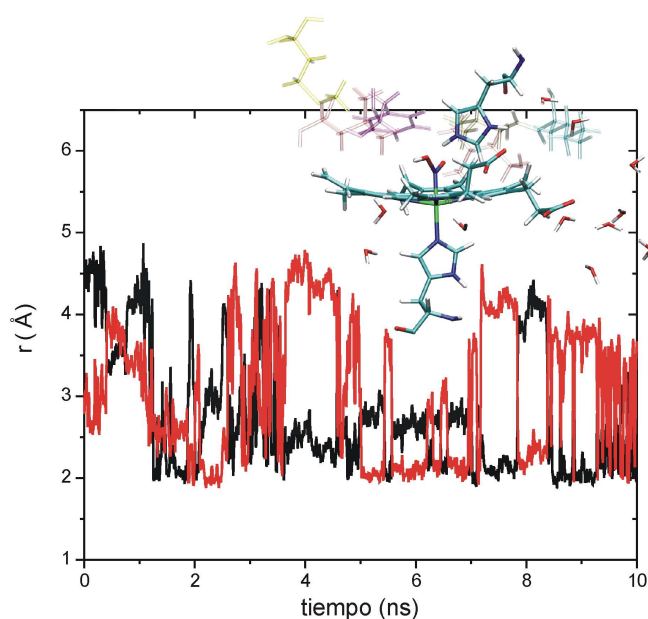


Figura V.3.3: N-coordinación de ácido nitroso en la subunidad alfa de la desoxi-Hb. Se muestran los residuos cercanos : Phe43 (violeta), Met32 (amarillo), Leu101 y Leu66 (rosa), Val62 (ocre), Lys61 (cian). Las distancias O1-H (His58) y O2-H (His58) se muestran en negro y rojo respectivamente.

## V.3.2. Subunidad $\beta$

La subunidad beta es esencialmente igual a la subunidad alfa salvo por algunos residuos, tiene un total de 142 residuos, 4 menos que la alfa. En la cavidad distal se encuentra una sola histidina His63, también rodeada de residuos hidrofóbicos. Previo al análisis de las dinámicas se debe comentar que por inspección de la estructura de rayos X para la desoxi-Hb, la cavidad

distal de la subunidad beta resulta ser bastante más cerrada que aquella correspondiente a la subunidad alfa.

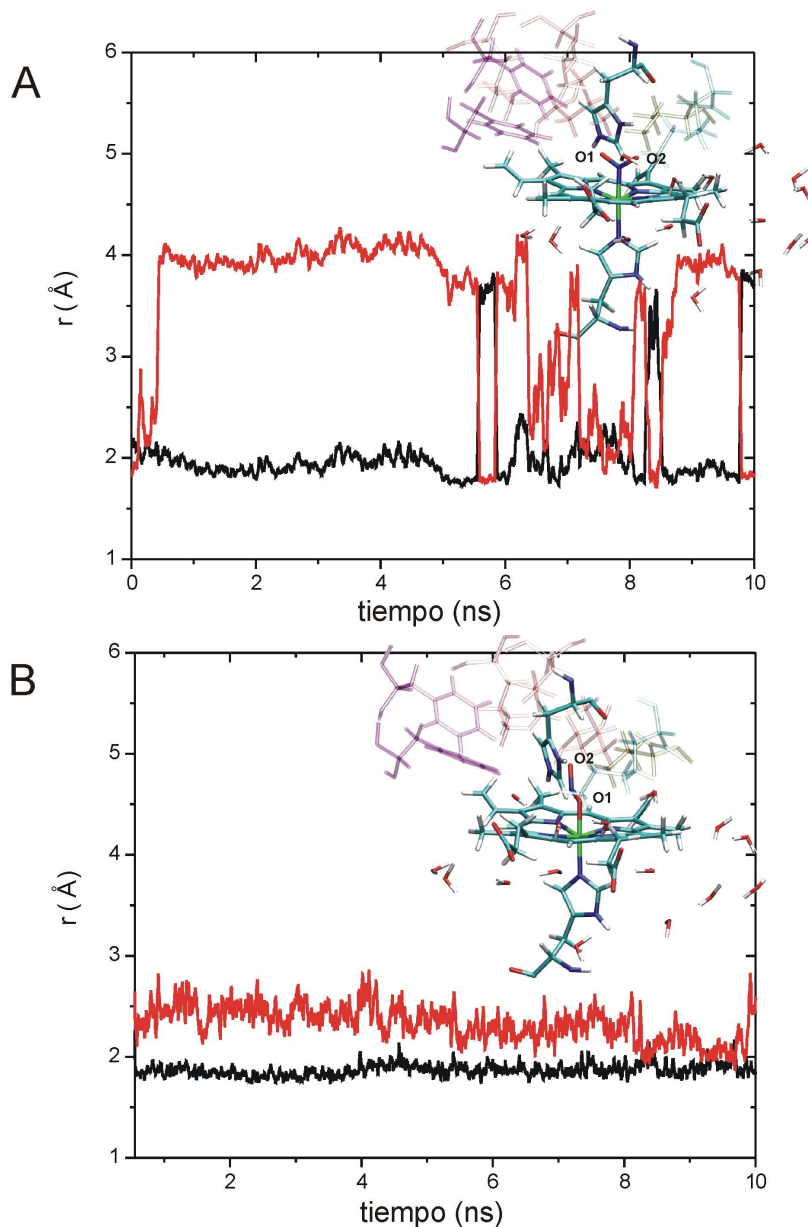


Figura V.3.4: Coordinación tipo nitro (A) y nitrito (B) en la subunidad beta de la desoxi-Hb. Se muestran los residuos cercanos : Phe42 y Phe45 (violeta), Leu28 y Leu31 (rosa), Val87 (ocre), Lys66 (cian). Las distancias O1-H (His63) y O2-H (His63) se muestran en negro y rojo respectivamente.

## Nitro vs Nitrito

Debido a lo mencionado anteriormente en lo referido al tamaño de la cavidad, el nitro ahora se encuentra más limitado, hecho que se refleja en las dinámicas, ya que gira con menos

frecuencia, estableciendo de esta forma interacciones de puente de hidrógeno con O1 o con O2 alternativamente (Figura V.3.4). Este efecto no es tan aparente en el caso del nitrito donde O1 se encuentra un poco más cerca que O2 de N $\epsilon$ H.

### Ácido nitroso

En este caso, se encontró que el ácido nitroso no disponía de suficiente espacio para acomodarse dentro del sitio distal, al colocar el ligando los residuos próximos (Phe42, Phe45, Leu28, Leu31, Leu106, Val67 y Lys66) fueron desplazados, y el ligando no logró establecer interacciones de puente de hidrógeno con la His63 a lo largo de la trayectoria considerada. (Distancia promedio O1- HN $\epsilon$ : 7.2 Å)

### V.3.3. Aspectos estructurales de la unión del ligando

Las simulaciones de dinámica molecular reflejan los siguientes hechos:

- La unión del ligando como nitro o nitrito en la subunidad alfa da como resultado la formación de interacciones estables de puente de hidrógeno.
- Lo mismo se observa para la subunidad beta, con la salvedad de que hay mayor restricción en el movimiento por ser la cavidad distal más cerrada.
- En lo que respecta a la coordinación "Nitro" versus "Nitrito", se puede decir que cuando el ligando se coordina como nitrito tiene la posibilidad de establecer puentes de hidrógeno por O1 y O2 en forma simultánea, mientras que cuando se coordina como nitro lo hace por uno u otro oxígeno. En la Tabla V.3.1 se muestran las distancias promedio, donde se refleja este hecho. Por otro lado, los valores para el caso de la coordinación como nitro (alfa y beta), muestran que para el caso de la subunidad beta el ligando interacciona con la histidina distal a través de uno de sus oxígenos prácticamente durante toda la dinámica, hecho que no sucede para la subunidad alfa donde el ligando gira y se acomoda mejor. De modo que, la presencia de la histidina E7 parecería favorecer la coordinación por nitrito; dado que las interacciones de puente de hidrógeno son más favorables que en el caso de la coordinación por nitro.

Tabla V.3.1: Distancias promedio (Å) O1/O2-H(His58) y O1/O2-H(His63).

	Subunidad $\alpha$		Subunidad $\beta$	
	-NO <sub>2</sub>	-ONO	-NO <sub>2</sub>	-ONO
O1-H(His)	2.145	2.031	2.061	1.870
O2-H(His)	2.195	2.030	3.448	2.328



- Tanto en la subunidad alfa como en la beta, cuando el ligando se une como nitrito adopta la conformación del isómero B y no la del C mostrada para el sistema aislado.
- El ácido nitroso en la subunidad alfa establece interacciones puentes de hidrógeno con la histidina distal, mientras que no se acomoda adecuadamente ni establece interacciones de puente de hidrógeno en la subunidad beta debido a impedimentos estéricos.

#### *Simulaciones de Dinámica molecular*

Todas las simulaciones se llevaron a cabo sobre la desoxi-Hb humana (código pdb: 1KD2 [32]), solvatada con aguas explícitas. La estructura de los dos homodímeros fue cortada y las simulaciones se hicieron sobre cada subunidad por separado. La histidina HisE7 fue considerada neutra (protonada sobre N $\epsilon$ ) o cargada (protonada en ambos nitrógenos: N $\epsilon$  y N $\delta$ ). El sistema fue solvatado con aguas TIP3P [33] hasta una distancia de 30 Å del grupo hemo. Se utilizó un radio de corte de 10-12 Å para los términos de no unión y la temperatura se ajustó utilizando el termostato de Berendsen. Para la integración numérica de las ecuaciones de Newton se utilizó un paso de tiempo de 2 fs. Se utilizó el algoritmo SHAKE con el fin de mantener las uniones que involucran al átomo de hidrógeno en sus distancias de equilibrio[34]. Las cargas del anión nitrito y el ácido nitroso con el hemo se obtuvieron del cálculo de las cargas RESP (B3LYP/6-31G(d)) para el sistema aislado. Los parámetros de Van der Waals se extrajeron del campo de fuerzas de Wang y colaboradores. En primer lugar se realizó una optimización con el fin de relajar la estructura inicial, luego el sistema fue calentado y equilibrado a 300K durante 50 ps. La estructura equilibrada se usó como punto de partida para la dinámica corrida de un total de 10 ns. Todas las simulaciones de dinámica molecular fueron realizadas utilizando el paquete Amber99.

## V.4

### La reacción: Cálculos híbridos

Con el fin de explorar la factibilidad de los distintos mecanismos propuestos (Figura V.1.6) en el sitio activo dentro de la proteína, se recurrió a las metodologías híbridas ya previamente descritas en la metodología general (II.2.3). En este contexto, se seleccionó a la porfirina, la histidina distal, proximal y el ligando como el sitio reactivo, y por lo tanto sobre éste se hicieron los cálculos de estructura electrónica, mientras que el resto de la proteína y las aguas de solvatación fueron tratadas de forma clásica.(Figura V.4.1)

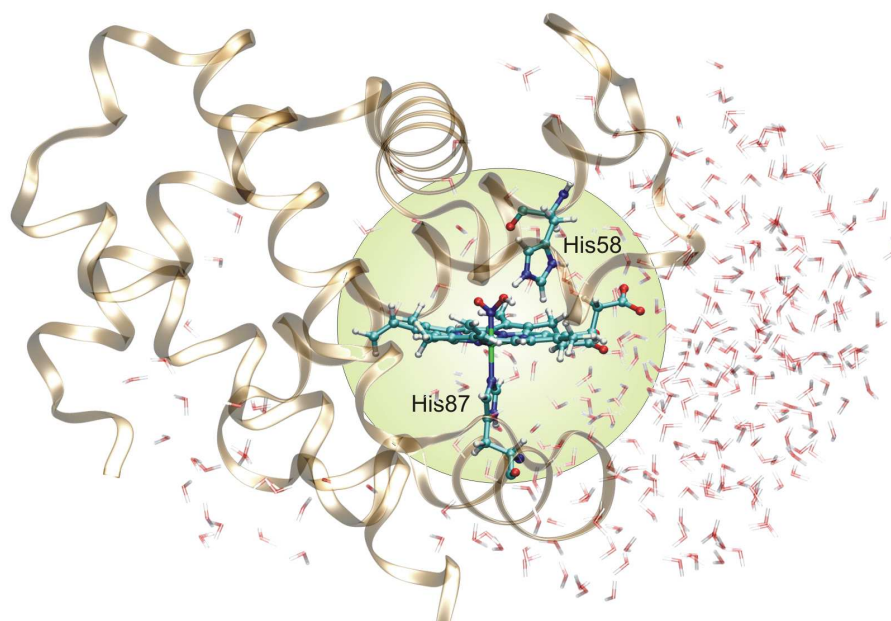


Figura V.4.1: Ácido nitroso unido a la subunidad alfa, en verde se señala el subsistema cuántico.

Tabla V.4.1: Parámetros geométricos seleccionados derivados de la optimización QM-MM.

distancia (Å)	Ácido nitroso	nitro		nitrito (B)		nitrito (C)	
	$\alpha$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$
Fe-X	1.812	1.846	1.891	2.011	1.986	2.062	2.020
O1-H(His)	2.322	1.062	1.029	1.501	1.411	1.109	1.148
N-O1	1.458	1.387	1.407	1.365	1.370	1.464	1.447
N-O2	1.225	1.236	1.233	1.245	1.248	1.203	1.210

X: representa oxígeno o nitrógeno.

### V.4.1. Optimizaciones en el sitio activo

Optimizaciones QM-MM para ambas subunidades fueron realizadas en primer lugar para el nitro. Tanto para la subunidad alfa como para la beta el protón de la His58 (alfa) o His63(beta) fue transferido al átomo de oxígeno O1 durante la optimización, sugiriendo esto que una vez unido el nitro adquiere el protón de la histidina en forma inmediata, dando como resultado ácido nitroso coordinado. Si se compara con el modelo aislado (ver figura V.2.2), la longitud de la unión N-O1 es apenas menor (1.39 vs 1.44 Å, ver Tabla V.4.1). Cuando se optimizó la estructura para el ácido nitroso coordinado, se obtuvo un intermediario estable en el que el átomo de oxígeno O1 interacciona por puente de hidrógeno con la histidina protonada. (O1- HN $\epsilon$ : 2.32 Å, ver Tabla V.4.1)

Las optimizaciones QM-MM para el nitrito, muestran en el caso del isómero C (Figura V.2.2) que el protón de la histidina se transfiere al O1 durante la optimización, del mismo modo que ocurre para el nitro. Una vez transferido el protón, la distancia N-O1 resulta ser 1.46 Å, hecho que indica activación para la ruptura de dicha unión. Sin embargo, el efecto no es tan marcado como se encontró para el modelo aislado (ver Figura V.2.3) donde la distancia N-O1 resulta ser 1.63 Å. Esta diferencia la podemos explicar en términos de los impedimentos estéricos ocasionados por los residuos hidrofóbicos cercanos con los cuales no se genera ninguna interacción favorable, estos impedimentos se hacen cada vez mayores a medida que la distancia O-N1 se alarga y probablemente por ello la distancia no incrementa más allá de 1.46 Å y prefiere estabilizarse en una situación intermedia. Esta transferencia de protón, no sucedió cuando la optimización se realizó para el isómero B del nitrito (Figura V.2.2), aquí los efectos estéricos son aún más importantes, y además en este caso está presente la interacción del O2 con el protón de la histidina, interacción que no se observa para el isómero C como consecuencia de su orientación.

#### Estimación de la diferencia de afinidad del "Nitro" y "Nitrito" por el sitio activo.

Dado que en algunos casos el protón de la histidina fue transferido durante la optimización, para poder calcular la afinidad del ligando (-NO<sub>2</sub>, -ONO) por el sitio activo en los

distintos casos y separar este efecto de la reacción en si misma, se realizaron optimizaciones QM-MM modelando la histidina distal clásicamente. El sistema QM, quedó entonces constituido por el hemo, la histidina proximal y el ligando, mientras que el subsistema clásico fue constituido solamente por la histidina distal. Se eligió esta alternativa de empleo de un sistema activo extendido en lugar de la proteína completa para investigar el efecto del entorno proteico en la afinidad del ligando. Se procedió de esta forma para evitar inconvenientes que surgen cuando se realizan optimizaciones de geometría en sistemas con elevado número de grados de libertad. Es sabido que en esos casos, y en especial, cuando se trata de encontrar efectos energéticos pequeños puede ocurrir que movimientos en la proteína en zonas alejadas al sitio activo introduzcan ruido numérico muy difícil de evitar [35, 36].

La energía de unión del ligando se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta E = E_{\text{ligando+sitio activo}} - (E_{\text{ligando}} - E_{\text{sitio activo}}) \quad (\text{V.4.1})$$

Donde  $E_{\text{ligando+sitio activo}}$  corresponde a la energía del ligando unido al sitio activo,  $E_{\text{sitio activo}}$  a la del sitio activo y  $E_{\text{ligando}}$  es la energía del ligando aislado.

Procediendo de esta forma se encontró lo siguiente:

- *Subunidad alfa*: si bien sigue estando termodinámicamente favorecida la coordinación como Nitro frente a Nitrito (isómero B), la diferencia de energía entre los dos modos de coordinación disminuyó con respecto al sistema aislado (SIESTA: 10.11 kcal/mol, Tabla V.2.1).

$$\Delta E_{\alpha} = E_{\text{nitrito}} - E_{\text{nitro}} = 5,31 \text{ kcal/mol}$$

- *Subunidad beta*: los resultados indican que estaría favorecida la coordinación como Nitrito (isómero B).

$$\Delta E_{\beta} = E_{\text{nitrito}} - E_{\text{nitro}} = -2,35 \text{ kcal/mol}$$

Los resultados encontrados son consistentes con los arrojados por las dinámicas clásicas. En la subunidad alfa cuando el ligando se une como nitro, debido al mayor espacio logra acomodarse y orientarse mejor, de esta forma se estabiliza como consecuencia de la interacción con la histidina distal. En la beta el espacio es menor, no logra orientarse de manera óptima por lo que sólo le es posible establecer puentes de hidrógeno a través de uno de sus oxígenos. Cuando se coordina como nitrito, tanto en la subunidad beta como en la alfa, el ligando puede establecer puentes de hidrógeno en forma simultánea por los dos oxígenos, aunque sólo en el caso de la beta la estabilización ganada logra revertir la preferencia por la coordinación como nitro (ver Tabla V.4.2).

Tabla V.4.2: Distancias optimizadas por QM-MM (Å) O1/O2-H(His58) y O1/O2-H(His63).

	Subunidad $\alpha$		Subunidad $\beta$	
	-NO <sub>2</sub>	-ONO	-NO <sub>2</sub>	-ONO
O1-H(His)	1.85	1.78	1.88	1.77
O2-H(His)	2.49	2.24	3.96	2.51

## V.4.2. Perfiles de energía

### Nitro

Los resultados precedentes muestran que la barrera asociada a la transferencia protónica en el caso del nitro tanto para la subunidad alfa como la beta es tan baja que el intermediario ácido nitroso coordinado se formaría en forma inmediata. Una vez formado este intermediario ocurre la segunda transferencia protónica y la consecuente generación de NO. Con el fin de evaluar la energía de la barrera involucrada en este proceso se realizaron optimizaciones restringidas para obtener el perfil de reacción para la segunda transferencia protónica. En la realidad esto supone que una vez transferido el primer protón la histidina de alguna forma debe reprotonarse, por ejemplo a través de un giro e interacción con el solvente. Una vez reprotonada se consideraron dos posibilidades para la transferencia protónica, esto también basado en el hecho que las dinámicas con el ácido nitroso mostraban interacciones de ambos oxígenos (O1 y O2) con la histidina. (Ver Figura V.3.3)

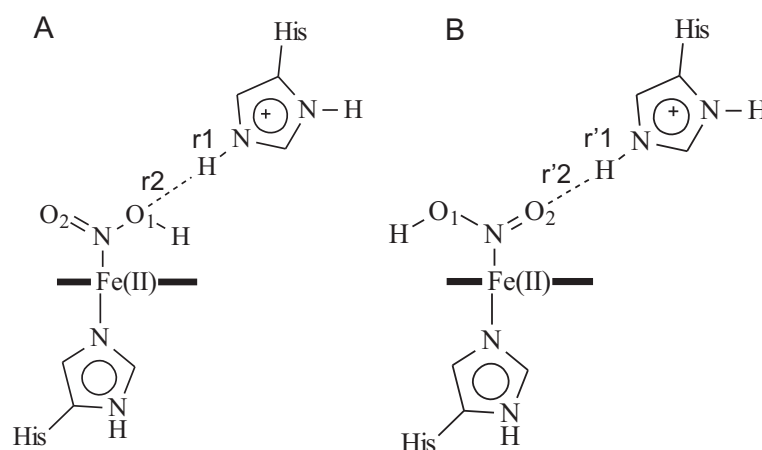


Figura V.4.2: Transferencia protónica a O1 u O2.

Para poder calcular el perfil de energía correspondiente a la transferencia protónica a O1, se seleccionó como coordenada de reacción  $\xi = (r_2 - r_1)$  (Figura V.4.2 A). En la Figura V.4.3 se muestra el correspondiente perfil de energía, se puede observar que la transferencia ocurre

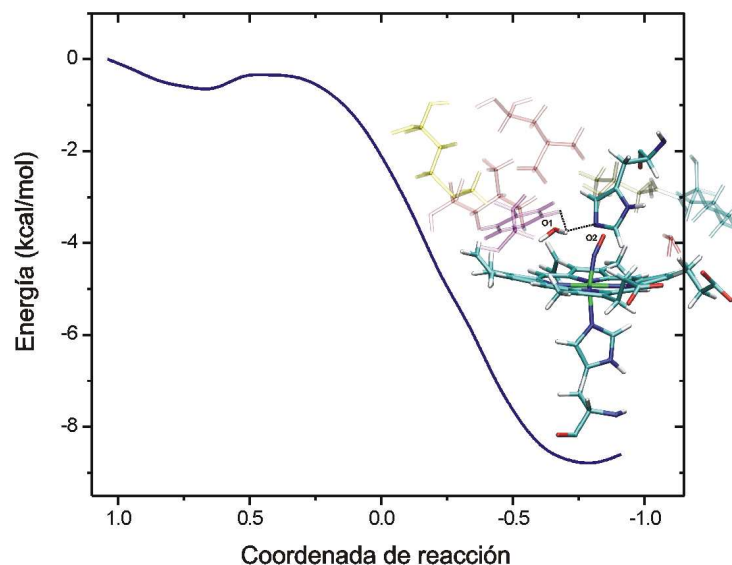


Figura V.4.3: Perfil de energía para la segunda transferencia protónica a O1 en la subunidad alfa. Se muestran los residuos cercanos : Phe43 (violeta), Met32 (amarillo), Leu101 y Leu66 (rosa), Val62 (ocre), Lys61(cian).

sin barrera (0.7 kcal/mol), y conduce directamente al complejo Fe(III)-NO y una molécula de agua, no se observa ninguna especie intermedia coordinada al igual que se observa para el modelo aislado.

La estructura optimizada para el reactivo (ácido nitroso en el sitio activo) se puede observar en la Figura V.4.1 donde solo se muestra el sitio activo y los residuos próximos. Los parámetros relevantes para el reactivo y producto se encuentran listados en la Tabla V.4.3. El ácido nitroso unido, está orientado favorablemente para que se lleve a cabo la reacción, esto es, con el oxígeno O1 formando puente de hidrógeno con la histidina. El ángulo que resulta de esta interacción es 107.1 grados, valor cercano al del agua. En el producto la molécula de agua queda a una distancia de 2.0 Å de la histidina y 2.6 Å de la Phe44. (ver Figura V.4.3)

El ángulo (Fe-N-O2) en el complejo producto resulta ser 162.5 grados y el grupo NO posee una carga neta de 0.26 e, reflejando esto de alguna forma una especie tipo  $\{\text{FeNO}\}^6$  de acuerdo con el formalismo de Enemark y Feltham [37](Figura I.1.5, introducción general), un poco distorsionada. Estos resultados nuevamente apuntan hacia una distorsión debida a los efectos estéricos en el sitio activo. El hecho de que el producto no adquiera una conformación óptima para una especie del tipo  $\{\text{FeNO}\}^6$  probablemente favorezca la liberación del NO. Los mismos resultados fueron observados por medio de cálculos QM-MM para la reducción de nitrito por la *NIR* de *Pseudomonas aeruginosa* [38].

Como se mencionó anteriormente, se calculó el perfil de energía para la transferencia al O2, se eligió como coordenada de reacción  $\xi=(r'_2- r'_1)$  (ver Figura V.4.2 B). El perfil de

Tabla V.4.3: Parámetros estructurales (d:Å, <: grados) relevantes para las especies reactivas y productos (modo de coordinación: nitro).

Parámetro	reactivo	producto	Complejo libre*
NO (carga)	-	0.26	0.26
d Fe-N <sub>NO</sub>	1.812	1.653	1.660
d N <sub>NO</sub> -O1	1.458	2.744	-
<Fe-N <sub>NO</sub> -O2	131.3	162.5	178.0
d O1-H <sub>His58</sub>	2.322	0.988	-
d H <sub>His58</sub> -N <sub>His58</sub>	1.006	1.996	-
<H1-O1-H <sub>His58</sub>	107.1	105.5	-

\*complejo aislado.

reacción (Figura V.4.4) muestra que la transferencia protónica a O2, cuesta como mínimo 20 kcal/mol. Resultados similares se observaron para el sistema aislado en fase gaseosa. Esto indica que el proceso no sería factible

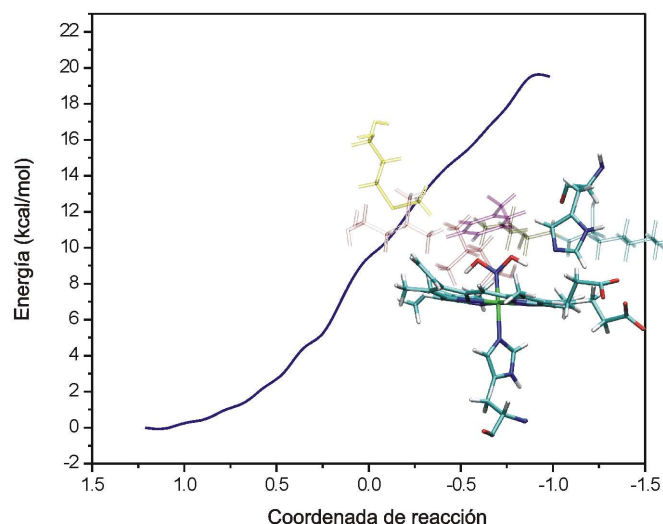


Figura V.4.4: Perfil de energía para la segunda transferencia protónica a O2 en la subunidad alfa. Se muestran los residuos cercanos : Phe43 (violeta), Met32 (amarillo), Leu101 y Leu66 (rosa), Val62 (ocre), Lys61 (cian).

## Nitrito

Ahora pasaremos a la coordinación del ligando como nitrito. Debido a que las diferencias de energías entre el nitro y nitrito no son muy grandes, de hecho la coordinación como nitrito estaría favorecida para la subunidad beta, este modo de coordinación también fue considerado. Para este caso la coordenada de reacción elegida fue nuevamente  $\xi=(r_2- r_1)$  (ver Figura V.4.6). Se consideraron ambos isómeros para el nitrito (B y C). Para ambos

isómeros la transferencia no tiene barrera asociada con la salvedad de que sólo está favorecida termodinámicamente para el isómero C (hecho discutido en la pág. 192). Para el isómero B los productos se encuentran 2.5-3.7 kcal/mol sobre los reactivos para la subunidad alfa y beta respectivamente (Figura V.4.5). Las distancias finales para N-O1 y N-O2 son similares a las obtenidas para el complejo C. La distancia O1-N resulta ser 1.46-1.48, se podría decir que el NO se libera parcialmente.

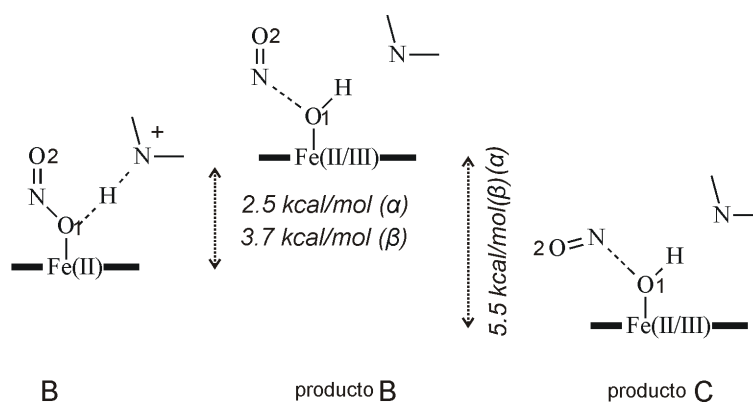


Figura V.4.5: Optimización QM-MM para el nitrito C y B.

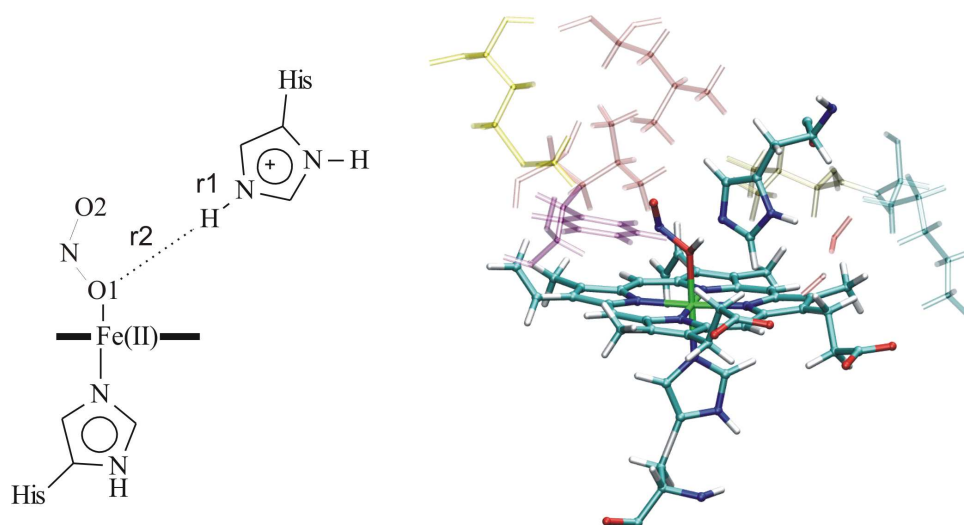


Figura V.4.6: Representación esquemática de la coordenada de reacción para el nitrito. Se muestran los residuos cercanos : Phe43(violeta), Met32(amarillo), Leu101 y Leu66 (rosa), Val62(ocre), Lys61(cian).



Tabla V.4.4: Parámetros estructurales relevantes para las especies reactivas y productos (modo de coordinación: nitrito).

Distancia (Å)	reactivo		producto		complejo aislado*
	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	
Fe-O1	2.011	1.986	2.015	1.978	1.828
N-H <sub>His</sub>	1.132	1.142	1.655	1.577	
O1-H <sub>His</sub>	1.501	1.411	1.043	1.043	0.986
N-O1	1.365	1.370	1.481	1.481	
N-O2	1.245	1.248	1.210	1.210	

\*Complejo aislado.

### Cálculos híbridos QM-MM

La estructura inicial para las optimizaciones QM-MM fue tomada de fotos seleccionadas a lo largo de las dinámicas clásicas. El sistema fue enfriado a 0 K. A partir de la estructura a 0 K se realizó una optimización de geometría QM-MM usando el algoritmo de gradiente conjugado con el programa SIESTA. En todos los cálculos QM-MM sólo los átomos localizados a menos de 10 Å del sitio activo (hemo, histidina distal, proximal y nitrito) fueron libres de moverse. El resto de los átomos de la proteína o el solvente se mantuvieron fijos. El sistema cuántico consistió en 56-60 átomos, mientras que el sistema clásico estuvo compuesto por alrededor de 15900 átomos. El hemo ferroso pentacoordinado sin el ligando se trató como estado quintuplete de alto espín, que es sabido es el estado fundamental para este sistema [39]. El hemo ferroso o férrico hexacoordinado se trató como bajo espín [39]. Para todos los átomos se utilizaron bases de calidad doble zeta con polarización y se utilizó el funcional PBE. Las uniones entre el sistema cuántico y clásico fueron tratadas con el método del "Link atom" ya mencionado en la parte metodológica. En este caso se utilizaron 10 link atoms, 8 en el núcleo de la porfirina y uno por cada anillo imidazólico y el esqueleto de la histidina (His proximal y distal: 2 link atoms en total)

*Cálculo de la energía a lo largo de una coordenada de reacción.* Una vez seleccionada la coordenada de reacción, se realizó en cada paso una optimización de geometría QM-MM restringida a lo largo de la coordenada seleccionada.

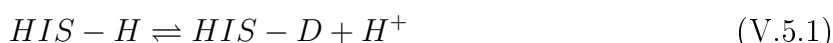
## V.5

# Conclusiones y preguntas abiertas

Tomando los resultados en conjunto, éstos muestran lo siguiente:

### Coordinación como nitro.

Cuando el ligando se une como nitro (Figura V.5.1), directamente (a) conduce a la formación del aducto que corresponde al ácido nitroso coordinado. Este aducto, luego de una segunda transferencia protónica (c) y en un proceso prácticamente sin barrera conduce a la formación del complejo Fe(III)NO y una molécula de agua. Sin embargo, para que ocurra la segunda transferencia protónica, la histidina distal debe reprotonarse, si bien el sitio es accesible a la entrada de moléculas de agua, el pKa asociado a la protonación de la histidina (Ec. V.5.1, notación: ver Figura V.3.1) se estima en un valor de 6, lo que implica que un 10 % de la misma estaría protonada a pH=7.



Por lo tanto, existirá una barrera asociada a la protonación de la HIS-D (b), como estimación de la energía mínima asociada podemos considerar el valor del  $\Delta G^0$ ;  $\Delta G^0 = -RT(\ln Ka) \sim 11 \text{ kcal/mol}$ . Dado que el pKa, además de ser una función de la temperatura, también lo es de la fuerza iónica y el microentorno, el verdadero valor del pKa dentro de la proteína puede variar sustancialmente. Por ejemplo, en entornos hidrofóbicos como el de la hemoglobina, éste será menor, implicando mayor energía para la protonación.

De lo anterior se desprende que, para este mecanismo las barreras más costosas, serían la que está asociada a la reprotonación de la histidina (b), y la que describe la ruptura de la unión Fe(III)-(NO) (c). Estudios previos por Laverman y colaboradores [40] informan un valor de  $k_{off}$  de  $24 \text{ s}^{-1}$ , a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  el cual corresponde a un valor de  $\Delta H_{off}=15.5 \text{ kcal/mol}$  (Mioglobina).

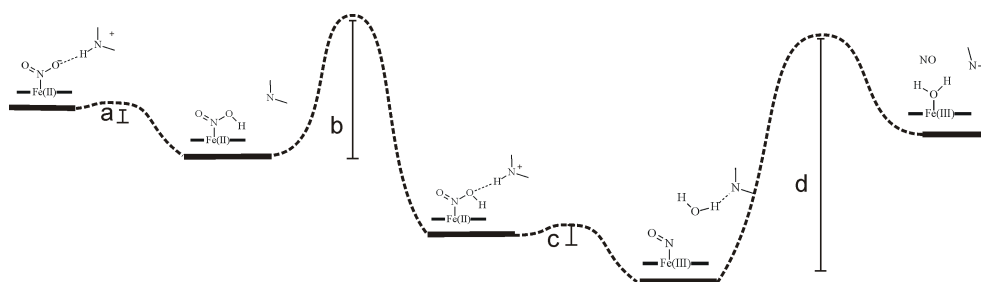


Figura V.5.1: Esquema del mecanismo de reducción de nitrito a óxido nítrico para la coordinación como "nitro".

### Coordinación como ácido nitroso.

Para el caso del ácido nitroso (Figura V.5.2), luego de una transferencia protónica (a) y en un proceso prácticamente sin barrera se forma el complejo  $\text{Fe(III)NO}$  y una molécula de agua. El último paso (b), al igual que para el caso anterior sería el proceso más costoso, energéticamente hablando, sin embargo no se debe olvidar que este mecanismo supone que se coordina el ácido nitroso cuyo  $\text{pK}_a$  es 3.15, lo que indica que la cantidad presente del mismo a  $\text{pH}=7$  es mínima (1/10000). Por otro lado, los efectos estéricos presentes en la subunidad beta serían los responsables de que esta subunidad no contribuya a la actividad NIR según reflejan los resultados de la dinámica.

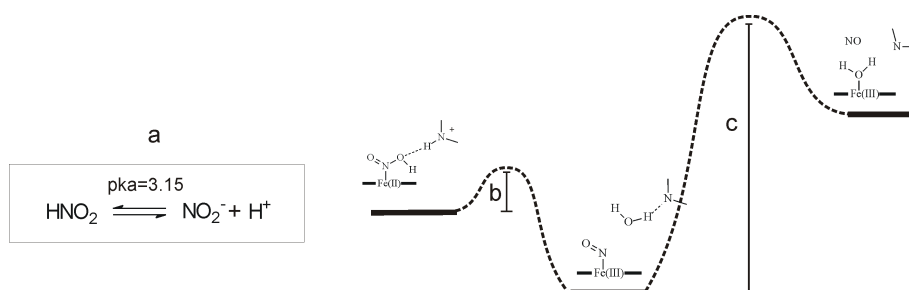


Figura V.5.2: Esquema del mecanismo de reducción de nitrito a óxido nítrico para la coordinación como ácido nitroso.

### Coordinación como nitrito.

Cuando el ligando se une como nitrito, la reacción transcurre prácticamente sin barrera originando parcialmente la formación de NO y el complejo  $\text{Fe(III)OH}$  (b). Si bien no parecería tener barrera, se debe tener en cuenta que según sea el caso (subunidad alfa o beta) existiría una barrera efectiva (a) para la isomerización del nitro en nitrito, relacionada con el hecho que en la subunidad alfa es más estable la coordinación como nitro. Por otro lado para obtener como producto el agua coordinada al sitio activo, al igual que ocurre para los mecanismos

anteriores, existirá una barrera donde es probable que esté involucrada la protonación de la HIS-D.

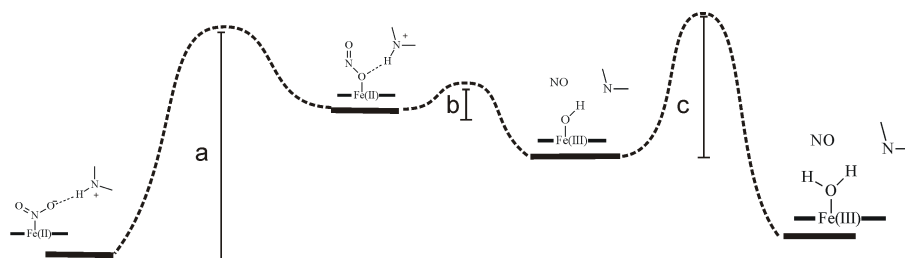


Figura V.5.3: Esquema del mecanismo de reducción de nitrito a óxido nítrico para la coordinación como "nitrito".

De lo anterior se desprende que, un punto importante que debe ser tenido en cuenta independientemente del mecanismo, es la protonación/reprotonación de la histidina distal. Por lo tanto el pH y también el acceso de protones al sitio distal son factores claves en la eficiencia de la reacción.

### desoxi-Hb y NIRs de bacterias.

En lo referido a los distintos pasos de los mecanismos propuestos:

- Los resultados aquí presentados, al igual que la evidencia experimental encontrada para el modelo de NIR de cobre [21] (V.1. pág.), indican que las transferencias protónicas no serían procesos limitantes.
- Un punto interesante para comparar con las NIRs de bacterias es el hecho que éstas tienen dos histidinas en el sitio distal, mientras que la Hb y Mb tienen sólo una. En la Tabla V.5.1, se puede observar que la velocidad es mucho mayor para la NIR de *Ps. Aeruginosa*, comparada con la correspondiente a la Mb y Hb. Esto denota que la presencia de dos histidinas (las que en presencia del ligando cargado estarían protonadas) en el sitio activo facilita la reacción (Figura V.1.4). Por otro lado si alguna de las histidinas es mutada por alanina, tal como se ve en la Tabla V.5.1, la velocidad disminuye apreciablemente aunque sigue siendo mayor que para la Hb y Mb, esto probablemente esté relacionado con el tema de la reprotonación de la histidina y el microentorno generado por el sitio activo, el que en el caso de la NIR de *Ps. Aeruginosa* es menos hidrofóbico que el de la Hb/Mb. Por último también se muestra en la Tabla V.5.1 que la reacción resulta ser más rápida cuando se utiliza un fragmento de la Mb, esto es consistente con lo discutido anteriormente, el entorno será menos hidrofóbico y la HIS-D estará más expuesta al solvente.

Tabla V.5.1: Valores cinéticos para la desoxi-Hb y otras NIRs.

	Km (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )
Mb[44]	-	0.004
Mb (fragmento:V17-K46)	-	0.018
desoxi-Hb*	-	0.0054
<i>P. Aeruginosa</i> [19]	6000	8
H327A o H369A	-	0.08

\*derivado del valor de Doyle y colaboradores.

- Tal como se discutió en V.1 para las NIRs de bacterias, actualmente se ha puesto en duda que el paso limitante sea la ruptura de la unión Fe(III)-NO. Con respecto a esto, se debe tener en cuenta que el tipo de hemo y el ligando proximal está demostrado que influyen fuertemente. Por ejemplo, las constantes de velocidad medidas para la disociación del NO para el hemo d (Ej: Ps. *Aeruginosa*) resulta ser entre 4 y 6 órdenes de magnitud mayor que para hemos ferrosos tipo b de una gran variedad de proteínas [41, 42, 24]. Esto último indica que el mecanismo de funcionamiento de la desoxi-Hb sería bastante diferente al planteado para las NIRs de bacterias.

## Mecanismos y datos experimentales.

*¿Cómo podemos relacionar los resultados aquí presentados con la evidencia experimental presentada ?*

*Parámetros cinéticos:*

Previamente se informó un valor de  $0.8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  medido por Doyle y colaboradores, a su vez Gladwin informó una constante promedio que surgía de hecho de considerar un control alostérico ante pequeñas cantidades de oxígeno. De la aplicación de un modelo que considera distinta reactividad para las conformaciones R y T surge un valor de  $0.064 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para la constante, mientras que resulta ser diez órdenes de magnitud mayor para la conformación R. Aplicando la teoría del estado de transición a estos valores se obtiene una estimación para la barrera ( $\Delta G^\ddagger$ ) de 19.1 y 11.9 kcal/mol respectivamente.

*A favor del nitrito:*

1. La evidencia experimental muestra que durante la reacción del nitrito con la desoxi-Hb (T) solo están presentes, metHb, HbNO, el aducto ( $\text{Hb}[\text{Fe}(\text{II})\text{NO}_2]^{2+}$ ). Notoriamente, las especies MetHbNO/Fe(II)NO<sup>+</sup> no han sido aún observadas.
2. Recientemente Copeland y colaboradores [26] han agregado ditionito a cristales de metMb con el ligando como nitrito y por espectroscopía de rayos X han logrado ver la estructura de la Mb donde el ligando unido por O se conservó en un 85 %.

Respecto a la dependencia con el pH, observada por Doyle, bien podría estar asociada a la protonación de la histidina distal, ya que a pH=7 sólo un 10 % está protonada.

## Resumiendo.

*¿Qué se puede decir hasta aquí respecto a los diferentes mecanismos evaluados?*

Teniendo en cuenta que el valor para la disociación del NO de la metMb es 15.5 kcal/mol [40] y la estimación de la energía mínima involucrada en la reprotonación de la histidina distal ( $\sim 11$  kcal/mol), los valores de constantes informados son consistentes con que el paso limitante sea la ruptura de Fe(III)-NO en el caso de la coordinación como nitro. Sin embargo la falta de evidencia acerca de la presencia de especies como MetHbNO/Fe(II)NO<sup>+</sup> va contra este mecanismo.

En cuanto a la unión del ligando, según muestran los resultados, dentro de la proteína la diferencia de energía entre un modo y otro se ve reducida e incluso se invierte para la subunidad beta. Evidencia experimental muestra que es posible la coordinación como nitrito para Mb, pero dependiendo del entorno distal este modo de coordinación involucraría una barrera asociada con la isomerización de un modo en otro y probablemente este sea el paso limitante para un mecanismo de este tipo. La isomerización de estos modos de coordinación es un hecho que se ha estudiado para distintos modelos [43].

Por último, es poco probable que el ligando sea directamente el ácido nitroso debido a su poca cantidad presente a pH=7, y además los resultados aquí presentados indican que solo la subunidad alfa sería activa.

En resumen, llegado a este punto se puede decir que los mecanismos propuestos son consistentes con los datos experimentales disponibles. Ambos modos de coordinación son energéticamente posibles y capaces de explicar los hechos experimentales observados. Este estudio sugiere que más experimentos son necesarios para aclarar y develar el mecanismo a través del cual ocurre esta reacción para hemoglobinas como la Hb y Mb que tienen una sola histidina distal, por ejemplo experimentos orientados a:

- Detección de Fe(III)NO-desoxi-Hb.
- Detección de Hb-NO<sub>2</sub> o Hb-ONO.
- Protonación-reprotonación de la histidina.



# Bibliografía

- [1] M. T. Gladwin and A. N. Schechter. No contest - nitrite versus s-nitroso-hemoglobin. *Circulation Research*, 94:851–855, 2004.
- [2] J. S. Stamler, O. Jaraki, J. Osborne, D. I. Simon, J. Keaney, J. Vita, D. Singel, C. R. Valeri, and J. Loscalzo. Nitric-oxide circulates in mammalian plasma primarily as an s-nitroso adduct of serum-albumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89:7674–7677, 1992.
- [3] L. Jia, C. Bonaventura, J. Bonaventura, and J. S. Stamler. S-nitrosohaemoglobin: A dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*, 380:221–226, 1996.
- [4] K. Cosby, K. S. Partovi, J. H. Crawford, R. P. Patel, C. D. Reiter, S. Martyr, B. K. Yang, M. A. Waclawiw, G. Zalos, X. L. Xu, K. T. Huang, H. Shields, D. B. Kim-Shapiro, A. N. Schechter, R. O. Cannon, and M. T. Gladwin. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nature Medicine*, 9:1498–1505, 2003.
- [5] A. Gamge. *Phil.Pr.Roy.Soc.*, pages 589–599, 1868.
- [6] V. P. Reutov. Biochemical predetermination of the no synthase and nitrite reductase components of the nitric oxide cycle. *Biochemistry-Moscow*, 64:528–542, 1999.
- [7] V. P. Reutov and E. G. Sorokina. No-synthase and nitrite-reductase components of nitric oxide cycle. *Biochemistry-Moscow*, 63:874–884, 1998.
- [8] V. P. Reutov, Y. I. Azhipa, and L. P. Kayushin. Oxygen as the inhibitor of hemoglobin nitrite-reductase activity. *Izvestiya Akademii Nauk Sssr Seriya Biologicheskaya*, pages 408–418, 1983.
- [9] M. P. Doyle, R. A. Pickering, T. M. Deweert, J. W. Hoekstra, and D. Pater. Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites. *Journal of Biological Chemistry*, 256:2393–2398, 1981.



- [10] J. Brooks. The action of nitrite on haemoglobin in the absence of oxygen. *Proceedings of the Royal Society of London B Biol.Sci.*, 123:368–382, 1937.
- [11] M. T. Gladwin, J. H. Shelhamer, A. N. Schechter, M. E. Pease-Fye, M. A. Waclawiw, J. A. Panza, F. P. Ognibene, and R. O. Cannon. Role of circulating nitrite and s-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97:11482–11487, 2000.
- [12] N. S. Bryan, T. Rassaf, R. E. Maloney, C. M. Rodriguez, F. Saijo, J. R. Rodriguez, and M. Feelisch. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:4308–4313, 2004.
- [13] T. Rassaf, M. Feelisch, and M. Kelm. Circulating no pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free Radical Biology and Medicine*, 36:413–422, 2004.
- [14] T. Rassaf, N. S. Bryan, M. Kelm, and M. Feelisch. Concomitant presence of n-nitroso and s-nitroso proteins in human plasma (vol 33, pg 1590, 2002). *Free Radical Biology and Medicine*, 34:283–283, 2003.
- [15] J. Rodriguez, R. E. Maloney, T. Rassaf, N. S. Bryan, and M. Feelisch. Chemical nature of nitric oxide storage forms in rat vascular tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:336–341, 2003.
- [16] J. Huang, S. Basu, Z. Huang, J. Hill, H. Shields, L. Azarov, K. T. Huang, N. Hogg, S. B. King, A. T. Gladwin, and D. B. Kim-Shapiro. Nitrosothiol formation in the reaction of nitrite and hemoglobin. *Free Radical Biology and Medicine*, 39:S100–S100, 2005.
- [17] Z. Huang, A. L. Wong, K. S. Partovi, A. N. Schechter, and M. T. Gladwin. The oxygen-dependent nitrite reductase/oxidase activity of hemoglobin. *Blood*, 102:758A–758A, 2003.
- [18] P. A. Williams, V. Fulop, E. F. Garman, N. F. W. Saunders, S. J. Ferguson, and J. Hajdu. Haem-ligand switching during catalysis in crystals of a nitrogen-cycle enzyme. *Nature*, 389:406–412, 1997.
- [19] F. Cutruzzola, K. Brown, E. K. Wilson, A. Bellelli, M. Arese, M. Tegoni, C. Cambillau, and M. Brunori. The nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*: Essential role of

- two active-site histidines in the catalytic and structural properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98:2232–2237, 2001.
- [20] J. N. Rodriguez-Lopez, L. G. Fenoll, P. A. Garcia-Ruiz, R. Varon, J. Tudela, R. N. F. Thorneley, and F. Garcia-Canovas. Stopped-flow and steady-state study of the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry*, 39:10497–10506, 2000.
- [21] M. Kujime and H. Fujii. Spectroscopic characterization of reaction intermediates in a model for copper nitrite reductase. *Angewandte Chemie-International Edition*, 45:1089–1092, 2006.
- [22] S. J. George, J. W. A. Allen, S. J. Ferguson, and R. N. F. Thorneley. Time-resolved infrared spectroscopy reveals a stable ferric heme-no intermediate in the reaction of paracoccus pantotrophus cytochrome cd(1) nitrite reductase with nitrite. *Journal of Biological Chemistry*, 275:33231–33237, 2000.
- [23] G. Ranghino, E. Scorza, T. Sjogren, P. A. Williams, M. Ricci, and J. Hajdu. Quantum mechanical interpretation of nitrite reduction by cytochrome cd(1) nitrite reductase from paracoccus pantotrophus. *Biochemistry*, 39:10958–10966, 2000.
- [24] S. Rinaldo, A. Arcovito, M. Brunori, and F. Cutruzzola. Fast dissociation of nitric oxide from ferrous pseudomonas aeruginosa cd1 nitrite reductase - a novel outlook on the catalytic mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 282:14761–14767, 2007.
- [25] A. Wanat, J. Gdula-Argasinska, D. Rutkowska-Zbik, M. Witko, G. Stochel, and R. van Eldik. Nitrite binding to metmyoglobin and methemoglobin in comparison to nitric oxide binding. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 7:165–176, 2002.
- [26] D. M. Copeland, A. S. Soares, A. H. West, and G. B. Richter-Addo. Crystal structures of the nitrite and nitric oxide complexes of horse heart myoglobin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100:1413–1425, 2006.
- [27] R. Silaghi-Dumitrescu. Linkage isomerism in nitrite reduction by cytochrome cd(1) nitrite reductase. *Inorganic Chemistry*, 43:3715–3718, 2004.
- [28] Z. Huang, S. Shiva, L. A. Ringwood, and M. T. Gladwin. Novel function of myoglobin as a nitrite reductase modulates mitochondrial respiration. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, 14:A72–A72, 2006.
- [29] K. M. Faulkner, C. Bonaventura, and A. L. Crumbliss. A spectroelectrochemical method for differentiation of steric and electronic effects in hemoglobins and myoglobins. *Journal of Biological Chemistry*, 270:13604–13612, 1995.

- [30] K. M. Faulkner, C. Bonaventura, and A. L. Crumbliss. A spectroelectrochemical method for evaluating factors which regulate the redox potential of hemoglobins. *Inorganica Chimica Acta*, 226:187–194, 1994.
- [31] I. M. Wasser, S. de Vries, P. Moenne-Loccoz, I. Schroder, and K. D. Karlin. Nitric oxide in biological denitrification: Fe/Cu metalloenzyme and metal complex NO(x) redox chemistry. *Chemical Reviews*, 102(4):1201–34, 2002.
- [32] F. A. Seixas, W. F. de Azevedo, Jr, and M. F. Colombo. Crystallization and x-ray diffraction data analysis of human deoxyhaemoglobin A(0) fully stripped of any anions. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 55(Pt 11):1914–6, 1999.
- [33] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics*, 79:926–935, 1983.
- [34] J. P. Ryckaert, G. Ciccotti, and H. J. C. Berendsen. Numerical-integration of cartesian equations of motion of a system with constraints - molecular-dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 23:327–341, 1977.
- [35] F. Claeysens, K. E. Ranaghan, F. R. Manby, J. N. Harvey, and A. J. Mulholland. Multiple high-level QM/MM reaction paths demonstrate transition-state stabilization in chorismate mutase: correlation of barrier height with transition-state stabilization. *Chemical Communications (Camb)*, (40):5068–70, 2005.
- [36] A. J. Mulholland. Chemical accuracy in QM/MM calculations on enzyme-catalysed reactions. *Chemistry Central Journal*, 1:19, 2007.
- [37] J. H. Enemark and R. D. Feltham. Principles of structure, bonding, and reactivity for metal nitrosyl complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 13:339–406, 1974.
- [38] M. A. Marti, A. Crespo, S. E. Bari, F. A. Doctorovich, and D. A. Estrin. Qm-mm study of nitrite reduction by nitrite reductase of pseudomonas aeruginosa. *Journal of Physical Chemistry B*, 108:18073–18080, 2004.
- [39] D. A. Scherlis and D. A. Estrin. Hydrogen bonding and o-2 affinity of hemoglobins. *Journal of the American Chemical Society*, 123:8436–8437, 2001.
- [40] L. E. Laverman, A. Wanat, J. Oszejca, G. Stochel, P. C. Ford, and R. van Eldik. Mechanistic studies on the reversible binding of nitric oxide to metmyoglobin. *Journal of American Chemical Society*, 123(2):285–93, 2001.

- 
- [41] F. Azizi, J. E. Kielbasa, A. M. Adeyiga, R. D. Maree, M. Frazier, M. Yakubu, H. Shields, S. B. King, and D. B. Kim-Shapiro. Rates of nitric oxide dissociation from hemoglobin. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(2):145–51, 2005.
- [42] V. G. Kharitonov, V. S. Sharma, D. Magde, and D. Koesling. Kinetics of nitric oxide dissociation from five- and six-coordinate nitrosyl hemes and heme proteins, including soluble guanylate cyclase. *Biochemistry*, 36(22):6814–8, 1997.
- [43] H. Seki, K. Okada, Y. Iimura, and M. Hoshino. Photochemical reactions of nitrocobalt(III) tetraphenylporphyrin and its pyridine complex studied by laser flash photolysis. *Journal of Physical Chemistry A*, 101:8174–8178, 1997.
- [44] K. Suruga, K. Murakami, Y. Taniyama, T. Hama, H. Chida, T. Satoh, S. Yamada, W. Hakamata, R. Kawachi, Y. Isogai, T. Nishio, and T. Oku. A novel microperoxidase activity: methyl viologen-linked nitrite reducing activity of microperoxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315:815–822, 2004.



# VI

## Conclusiones Generales



## Conclusiones generales y perspectivas

A lo largo de este trabajo se ha presentado el estudio de distintos tipos de sistemas. Se partió del estudio de una reacción química en solución en la que están involucradas moléculas de RSNO pequeñas como la SNO-CEE. Luego se estudió la coordinación de estas moléculas (RSNOs) a un complejo metálico ( $[\text{IrCl}_5]^{-2}$ ), y finalmente se abordó el estudio de una reacción química dentro de una proteína. El sistema químico en estudio, fue creciendo en tamaño y complejidad a lo largo del estudio aquí mostrado. Resumiremos en esta última parte algunas conclusiones relevantes que se desprenden de este trabajo:

- *El rol de los S-nitrosotioles en el transporte del NO por medio de la conocida reacción de transnitrosación.*

En la parte III (3-4) se estudió ampliamente esta reacción, se midió la constante cinética de velocidad para la reacción entre la CEE/SNO-CEE y por primera vez la energía correspondiente a su barrera junto con los parámetros de activación. Parámetros importantes a la hora de evaluar la relevancia biológica de esta reacción frente a otras como por ejemplo la descomposición de los RSNOs y reacción con otras moléculas blanco. Por otro lado, se identificó y detectó por primera vez en solución, el intermediario propuesto para esta reacción.

- *Las propiedades de los S-nitrosotioles como moléculas almacenadoras de NO.*

En la parte III (1-2) se discutieron las propiedades de estas moléculas (RSNOs) libres, y todos los cuidados a tener, al manipularlas. Por otro lado en la parte IV (1-4) se mostró una forma de estabilizarlas mediante la unión a un complejo de un metal de transición ( $[\text{IrCl}_5]^{2-}$ ). Así surgió de este trabajo, una nueva y única familia de complejos de RSNOs coordinados, los que fueron por primera vez aislados y caracterizados. La estabilización ganada mediante la coordinación fue y seguirá siendo de suma ayuda para el estudio de las propiedades y reactividad de estas moléculas.

- *Mecanismos alternativos de generación de NO en ausencia de oxígeno, situación en la cual la NOS no sería operativa.*



En la parte V (2-4), se estudió desde un punto de vista microscópico una reacción recientemente propuesta para la generación de NO en ausencia de oxígeno. Reacción en la que están involucrados el nitrito, y la desoxi-Hb. Si bien en bibliografía existía abundante material experimental, se desconoce el mecanismo a través del cual ocurre esta reacción. En vista de esto, se propusieron y evaluaron distintos mecanismos. Se mostraron algunos aspectos sobre el modo de coordinación del ligando al sitio activo. Se encontró, tal como se presume, que las barreras para la transferencia protónica son mínimas, se enfatizó en el rol de la histidina distal (E7), dejando aún sin elucidar cual sería el paso limitante; salida del NO, isomerización, o reprotonación de la histidina E7.

### ***Perspectivas Futuras:***

Si bien, en las distintas partes en las que se han presentado los resultados, se ha señalado la proyección de los respectivos estudios, se hará énfasis en los siguientes items, los que ameritan un estudio ulterior:

- El fuerte efecto de la solvatación para la reacción de transnitrosación.
- El efecto del oxígeno en la reacción de transnitrosación y la aparición de productos como acrilatos y episulfuros.
- La reactividad de los RSNOs coordinados frente a tioles y otras moléculas.
- Estudio electroquímico de los RSNOs coordinados.
- Obtención de evidencia experimental concluyente en lo referido a aspectos cinéticos, modo de coordinación del ligando nitrito/nitro al sitio activo de la desoxi-Hb, y paso limitante de la reacción.

### ***Reflexiones...***

El objeto de esta última parte fue integrar los diferentes temas abordados en este trabajo de tesis resaltando las conclusiones más relevantes. Sin embargo, también es importante evaluar si consideramos que se han cumplido los objetivos que nos hemos propuesto a lo largo de este trabajo,

En primer lugar recordemos el título seleccionado para este trabajo de tesis:

**"Estudio de reacciones químicas de relevancia biológica involucradas en el transporte, almacenamiento y generación de óxido nítrico".**

Si ahora volvemos al título, luego de haber leído este trabajo de tesis, debería leerse entre líneas:

**"Estudio de reacciones químicas de relevancia biológica (reacción de transnitrosación, reducción de nitrito a NO por la desoxi-Hb) involucradas en el transporte (nitrosotioles, transnitrosación), almacenamiento (nitrosotioles, nitrosotioles coordinados, nitrito) y generación de óxido nítrico (nitrosotioles, actividad nitrito reductasa de la desoxi-Hb)".**

Si así ocurre, creo que nos podemos dar por satisfechos, en cuanto al cumplimiento de los objetivos más generales. En lo que se refiere a la forma de encarar el estudio y la metodología empleada; se pretendió abordar de la forma más completa y rigurosa posible, los diferentes temas presentados. El estudio realizado fue llevado a cabo utilizando un conjunto de herramientas provistas por la parte experimental y por la simulación computacional. Estas herramientas se han complementado adecuadamente en lo referido a la información proporcionada y estableciéndose como una guía importante a la hora de tomar decisiones.

A nivel personal, a lo largo de este trabajo de tesis, considero que he aprendido en demasía, y sobre todo en los momentos difíciles, en los que las cosas no se mostraban sencillas. Aprendí el uso de muchas y variadas técnicas experimentales, el uso de varias metodologías computacionales, el hecho de cómo encarar el estudio de un problema, etc.. En fin, ha sido un privilegio aprender y trabajar bajo estas condiciones y confío en que los resultados aquí expuestos resulten útiles para poder esclarecer e interpretar resultados actuales y futuros.

*"No basta con ser estudioso, activo y perseverante, si se carece de un principio sólido y de base concreta, si el entusiasmo inmoderado ciega la razón, si el orgullo tiraniza el buen criterio, si la avidez se desarrolla bajo el brillo intenso de un astro de oro.*

*La ciencia misteriosa requiere mucha precisión, exactitud y perspicacia en la observación de los hechos; un espíritu sano, lógico y ponderado; una imaginación viva sin exaltación; un corazón ardiente y puro. Exige, además, una gran sencillez y una indiferencia absoluta frente a teorías, sistemas e hipótesis que, fiando en los libros o en la reputación de sus autores, suelen aceptarse sin comprobación. Quiere que sus aspirantes aprendan a pensar más con el propio cerebro y menos con el ajeno. Les pide, en fin, que busquen la verdad de sus principios, el conocimiento de su doctrina y la práctica de sus trabajos en la Naturaleza, nuestra madre común."*

*Fulcanelli, El Misterio de las catedrales.*







# Publicaciones Científicas

A continuación se enumeran las publicaciones científicas realizadas durante el trabajo de tesis y aquellas en preparación:

1. **Transnitrosation of Nitrosothiols: Characterization of an Elusive Intermediate.** Perissinotti, L.L; Turjanski, A. G.; Estrin, D. A.; Doctorovich, F.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2005**; 127:2; 486-487.
2. **Solvent Effects on Peroxynitrite Structure and Properties from QM/MM Simulations.** Gonzalez Lebrero, M. C.; Perissinotti, L. L; Estrin D. A; *J. Phys. Chem. A.*; **2005**; 109:42;9598-9604.
3. **A Surprisingly Stable S-Nitrosthiole complex.** Perissinotti, L.L; Estrin, D. A.; Leitun, G; Doctorovich, F.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2006**, 128:8; 2515-2513.
4. **Modeling heme proteins using atomistic simulations.** Bikiel, D. E.; Boechi, L.; Capece, L.; Crespo, A.; De Biase P.; Di Lella, S.; Gonzalez Lebrero, M.; Marti, M.; Nadra, A. D.; Perissinotti, L. L; Sherlis, D. A; Estrin D. A; *Phys. Chem, Chem. Phys.*, **2006**, 8:48; 5611-5628.
5. **Electrospray Ionization Mass Spectrometry of a Novel Family of Complexes in which various Nitroso Compounds are stabilized via coordination to  $[\text{IrCl}_5]^{2-}$ .** Escola, N.; Di Salvo, F.; Hadda, R.; Perissinotti, L.L.; Nogueira Eberlin, M.; Doctorovich, F. *Inorg. Chem.* **2007**, 46:12, 4827-4834.
6. **A unique family of water soluble coordinated S-nitrosothiols complexes.** Perissinotti L. L; Leitun, G.; Shimon, L.; Estrin D. A.; Doctorovich, F. A. *Enviado Septiembre 2007*.
7. **The mechanism of nitrite reduction to NO by deoxy-hemoglobin investigated by computer simulation.** Perissinotti, L. L.; Marti, M.; Doctorovich, F.; Luque, J.; Estrin D. A.; *en preparación*.



# Agradecimientos

Mi más sincero reconocimiento a todas las personas e instituciones que han hecho posible la elaboración de este trabajo de tesis. Sin ningún orden de prioridades, y tal como se me viene a la memoria:

A Darío, mi director, por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis acá en Bs. As., en la UBA. Por todo lo que me ha enseñado, por ser una excelente persona, científico y docente. A Fabio, mi otro director, por confiar en mí, por haberme dado la oportunidad de aprender tanto. A ambos, por haberme brindado la posibilidad de viajar y conocer lugares magníficos como Israel y Barcelona.

A los chicos del grupo y los Marceca, un grupo de amigos super divertido. Por nuestros almuerzos diarios en masa en el pabellón 1. A mis compañeros de oficina, Vero, mi amiguita de oficina; Nano y su buena predisposición y humor diario; Damián S., Cristian y Ezequiel. Leo, el gran hablador; Santi (el tucumano amarillista...); Damiancito B., vecino de mesada en el labo y compañero de estados de ánimo. Lula, la organización personificada; Marce, un auténtico ejemplo de capacidad, practicidad y buena gente. A Matias y el cluster (Heman y Hulk). A los nuevitos y a los visitantes; Charly, Martín, Damián Omega (¡gracias por darme a conocer la existencia del Lyx, y al Lyx por ayudarme a aprender Latex) , Diego M., Diego G., Ariel (el pseudotucumano) , Pau y Peter. A los que se han ido, Lucas, Adrián y Ale. A todos ellos sin ninguna excepción.

A los chicos del tercero, del labo, A Juanito, un gran amigo; a Cari, también por su amistad y su buen humor; Nati una gran amiga que ya no está en el labo, que me ha enseñado y me ha hecho reír tanto...¡cómo te extraño!, Yoshi, ¡un grande!, Seba, Estefi, Ana, ¡una dulce!; y Florencia.

A Sara Bari, una persona que aprecio mucho; por las primeras épocas en el labo T17.

A todos aquellos que me cruzo por los pasillos o con los que he compartido cursadas y turnos en docencia.

Si, Si, ... A Gernot, por su paciencia para tomar los espectros de RMN, por las mermeladas caseras, las galletitas, alfajores, etc.

A Alejandra, que muy amablemente me ayudó con mi desorden burocrático.



A mis amigas de siempre, la Mary, fuente inagotable de mi risa; la Uru, por los cafecitos del sábado en casa, a ambas por su nobleza y autenticidad, a las "chicas" Andre y Vivi. A Marina, mi gran amiga del cole.

A mi Pablo, mi querido esposo, la razón de mi vida, mi complemento ideal, ¡ gracias por aguantarme estos últimos días, por tus buenas sugerencias y por ayudarme tanto! .

A mi familia, mis cimientos. A mamá y papá por haber fomentado siempre mi curiosidad y haberme enseñado a disfrutar aprendiendo, por estar siempre. Por ser el ejemplo viviente de cómo quisiera ser algún día. A mis hermanos Jorgi, Pali y Ari, lo que más quiero en este mundo, por ser mis amigos (los mejores), compañeros de juego y de la vida.

A toda mi familia completa, Abu Marité y sus riquísimas comidas, Mario, Guille, Marce, Meli y el Tobi por los domingos divertidos en casa de la abuela, los Perissinotti, los De Biase y Pellicciari, y especialmente a Enri y al nono Gino.

A mi país, la universidad pública, al departamento de química e INQUIMAE.

A Dios, por darme el privilegio de disfrutar de todo esto.