

*“and now, for something completely different”
Monty Python’s*

7 ESTUDI D’ENANTIODIFERENCIACIÓ: COMPLEXOS DIASTEREOISOMÈRICS DE β -CICLODEXTRINA AMB CIZOLIRTINA I EL SEU CARBINOL PRECURSOR

7.1 INTRODUCCIÓ AL PROBLEMA

És conegut de fa temps que la complexació de ciclodextrines amb mescles racèmiques dóna lloc a la enantiodiferenciació⁷⁰. Tot i això, s’han realitzat pocs estudis teòrics per tal de comprendre el procés d’enantiodiferenciació. Lipkowitz⁷¹ ha realitzat un estudi per dinàmica molecular que indica que la cavitat macrocíclica de la ciclodextrina és el punt clau per a l’enantiodiferenciació. Però les forces responsables de les subtils diferències en les complexacions bimodals no són encara del tot compreses. Les dades experimentals no acostumen a ser suficients per determinar l’estructura tridimensional dels complexos i s’ha de recórrer a l’ajuda dels càlculs computacionals.

⁷⁰ a) Saenger, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **1980**, *19*, 344. b) Schneider, H.-J.; Hacket, F.; Rüdiger, V.; Ikeda, H. *Chem.Rev.*, **1998**, *98*, 1755. c) Harata, K. *Chem.Rev.* **1998**, *98*, 1803.

⁷¹ Lipkowitz, K.B.; Coner, R.; Peterson, M.A.; Morreale, A.; Shackelford, J. *J.Org.Chem.* **1998**, *63*, 732.

En un estudi realitzat als Laboratoris Esteve s'han utilitzat quatre ciclodextrines com a agents de solvatació quiral en RMN per tal de resoldre els enantiòmers de l'analgèsic (\pm)-cizolirtina, **2**, i el seu carbinol precursor, **1**⁷², Figura 24.

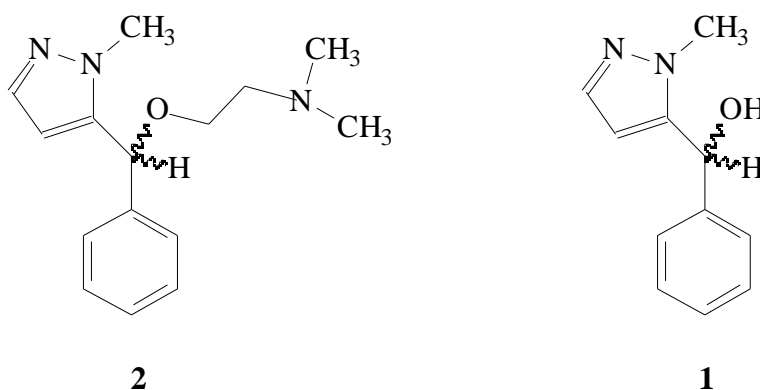


Figura 24 Analgèsic (\pm)-cizolirtina, **2**, i el seu carbinol precursor **1**.

La millor enantiodiferenciació observada per RMN es produeix quan s'utilitza la β -ciclodextrina com a agent complexant. S'observa una major enantiodiferenciació (desdoblament de senyals) en els complexos de la molècula **2** que en els de la **1**. En els estudis de nOe⁷³ (*nuclear Overhauser effect*) no s'han detectat diferències geomètriques notables entre els complexos diastereomèrics formats per una ciclodextrina i una mescla racèmica. Per tant, la no-equivalència magnètica induïda en els protons del *guest* per la complexació enantioselectiva ha de provenir de subtils diferències en la orientació o conformació dels enantiòmers complexats.

⁷² Torrens, A.; Castrillo, J.A.; Frigola, J.; Salgado, L.; Redondo, J. *Chirality* **1999**, *11*, 63.

⁷³ Redondo, J.; Blázquez, M.A.; Torrens, A. *Chirality* **1999**, *11*, 694.

En aquest capítol es presenta l'estudi per mètodes computacionals dels complexos formats per la β -ciclodextrina i les barreges racèmiques de **1** i **2**, per tal d'explicar l'enantiodiferenciació observada.

Els complexos s'han estudiat per dinàmica molecular solvatats amb molècules d'aigua explícites. La metodologia emprada i les condicions de càlcul es descriuen a l'apèndix.

7.2 RESULTATS DE DINÀMICA MOLECULAR

Els resultats experimentals mostren que els complexos presenten efectes nOe entre els protons del grup fenil del *guest* i els protons interns de la ciclodextrina, pel que confirmen que el fenil es troba inclòs en la β -CyD. Això ens porta a tenir que estudiar dues possibles orientacions d'inclusió, Figura 25. Tot i que els resultats experimentals descarten la inclusió de l'anell de cinc membres, també s'ha simulat aquesta inclusió per l'enantiòmer *R* de la molècula **1** i **2** en les dues orientacions possibles **A** i **B**.

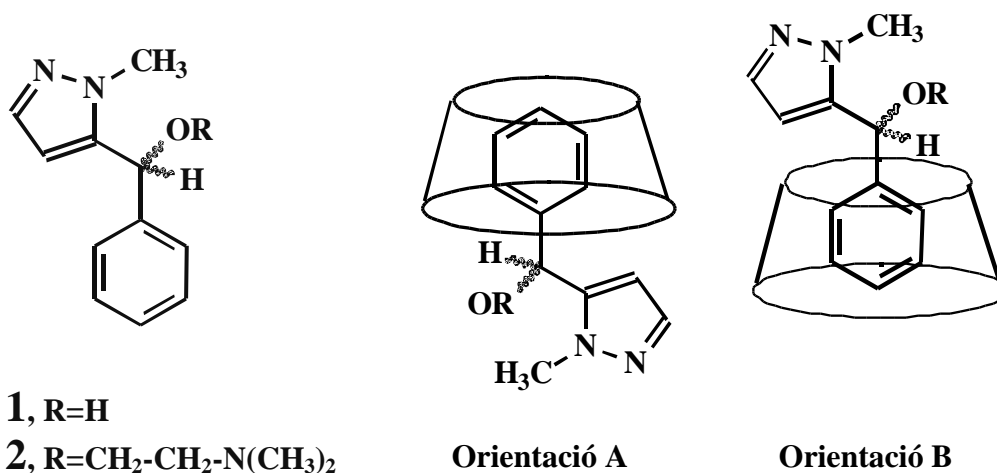


Figura 25 Molècules estudiades, **1** i **2**, i les dues orientacions d'inclusió del fenil.

Els resultats obtinguts per dinàmica molecular en la complexació de **1** i **2** amb la β -CyD es presenten a la **Taula 9** i a la **Taula 10** respectivament. Tant per al carbinol **1** com per a la cizolirtina, **2**, observem que (fixant-nos en l'energia potencial, EP_{tot}) les dues orientacions d'inclusió amb el fenil inclòs, **phA** i **phB**, tenen energia similar (de l'ordre de -7850 kcal/mol per a **1** i de -8000 kcal/mol per a **2**) i més favorable que la inclusió de l'anell de cinc membres (de -7769 i -7427 kcal/mol per a l'orientació **A** i **B** en **1**, i de -7745 i -7569 kcal/mol per a **A** i **B** en **2**), en concordança amb els resultats experimentals.

Enantiodiferenciació: carbinol i cizolirtina en β -ciclodextrina

Complex ^a	E_{tot}	EK_{tot}	EP_{tot}	E_{bond}	E_{ang}	E_{dih}	$E_{1-4 \text{ NB}}$	$E_{1-4 \text{ el}}$	E_{vdw}	E_{elec}
RphA	-6456.7	1692.5	-7849.1	39.0	107.0	95.5	55.0	855.2	1118.2	-10119.0
RphB	-6154.8	1692.7	-7847.5	38.9	106.2	95.9	54.7	855.8	1120.1	-10119.0
SphA	-6124.5	1684.3	-7808.8	39.0	105.8	100.3	54.5	858.4	1116.0	-10082.9
SphB	-6166.3	1691.6	-7857.9	39.5	109.2	88.9	53.7	857.3	1124.0	-10130.4
RpyrA	-6093.5	1675.6	-7769.2	38.6	106.4	100.5	54.7	850.7	1104.5	-10024.6
RpyrB	-5815.5	1611.3	-7426.7	39.4	107.8	94.5	54.3	850.9	1054.5	-9628.1

a) La primera lletra del nom indica la quiralitat (**R**, **S**), la segona i tercera lletra indiquen el grup que es troba inclòs (**ph**=fenil, **pyr**=anell de 5 membres), i l'última la orientació considerada (**A**, **B**).

Taula 9 Resultats energètics de la dinàmica molecular (energia total, E_{tot} , energia cinètica, EK_{tot} , i energia potencial, EP_{tot} , en kcal/mol) de les orientacions estudiades pel complex **1**/ -CyD, així com els termes que componen l'energia potencial (enllaç, E_{bond} , angle, E_{ang} , torsió, E_{dih} , 1-4 no-enllaçants, $E_{1-4 \text{ NB}}$, 1-4 electrostàtica, $E_{1-4 \text{ el}}$, van der Waals, E_{vdw} , i electrostàtica, E_{elec} , en kcal/mol).

Complex ^a	E _{tot}	EK _{tot}	EP _{tot}	E _{bond}	E _{ang}	E _{dih}	E _{1-4 NB}	E _{1-4 el}	E _{vdw}	E _{elec}
RphA	-6382.7	1754.1	-8136.8	41.0	116.4	89.6	57.4	823.5	1150.9	-10415.6
RphB	-6015.1	1668.0	-7683.1	41.2	117.4	90.5	56.3	818.9	1089.0	-9896.2
SphA	-6540.3	1793.5	-8333.8	40.2	112.3	102.7	57.8	825.7	1179.1	-10651.5
SphB	-6541.5	1793.8	-8335.4	40.7	112.9	102.6	57.8	825.9	1186.2	-10661.4
RpyrA	-6064.0	1681.0	-7744.9	40.8	112.8	100.2	56.7	815.0	1095.9	-9965.9
RpyrB	-5921.0	1647.7	-7568.7	40.4	114.4	96.1	57.6	818.2	1068.5	-9763.8

a) La primera lletra del nom indica la quiralitat (**R**, **S**), la segona i tercera lletra indiquen el grup que es troba inclòs (**ph**=fenil, **pyr**=anell de 5 membres), i l'última la orientació considerada (**A**, **B**).

Taula 10. Resultats energètics de la dinàmica de les orientacions estudiades pel complex **2**/ -CyD, així com els termes que componen l'energia potencial.

A la Figura 26 i a la Figura 27 es mostren les geometries promig que s'han obtingut de les simulacions de dinàmica molecular dels complexos amb **1** i **2**. La inclusió de l'anell de cinc membres (pyr) és menys favorable degut a que les molècules es troben menys incloses en la cavitat degut al grup metil de pyr, com s'observa en els complexos RpyrA i RpyrB de la **Figura 26** per **1** i de la **Figura 27** per **2**. A més, el nitrogen sp² (amb densitat de càrrega negativa important, consultar N11 a l'apèndix) del grup pyr interacciona molt millor amb les molècules d'aigua que no pas amb la cavitat poc polar de la ciclodextrina, desfavorint així també la inclusió de pyr. Tot i ser menys favorables, els complexos que contenen el pyr inclòs també es poden formar i són estabilitzats per enllaços d'hidrogen intermoleculars entre els hidroxils de la ciclodextrina i els grups polars de la molècula inclosa. La inclusió del fenil presenta una major preferència que la del pyr, i a més és la inclusió que s'evidencia en els resultats experimentals, així doncs la resta d'aquest capítol i els anàlisis posteriors fan referència exclusivament a la inclusió del fenil.

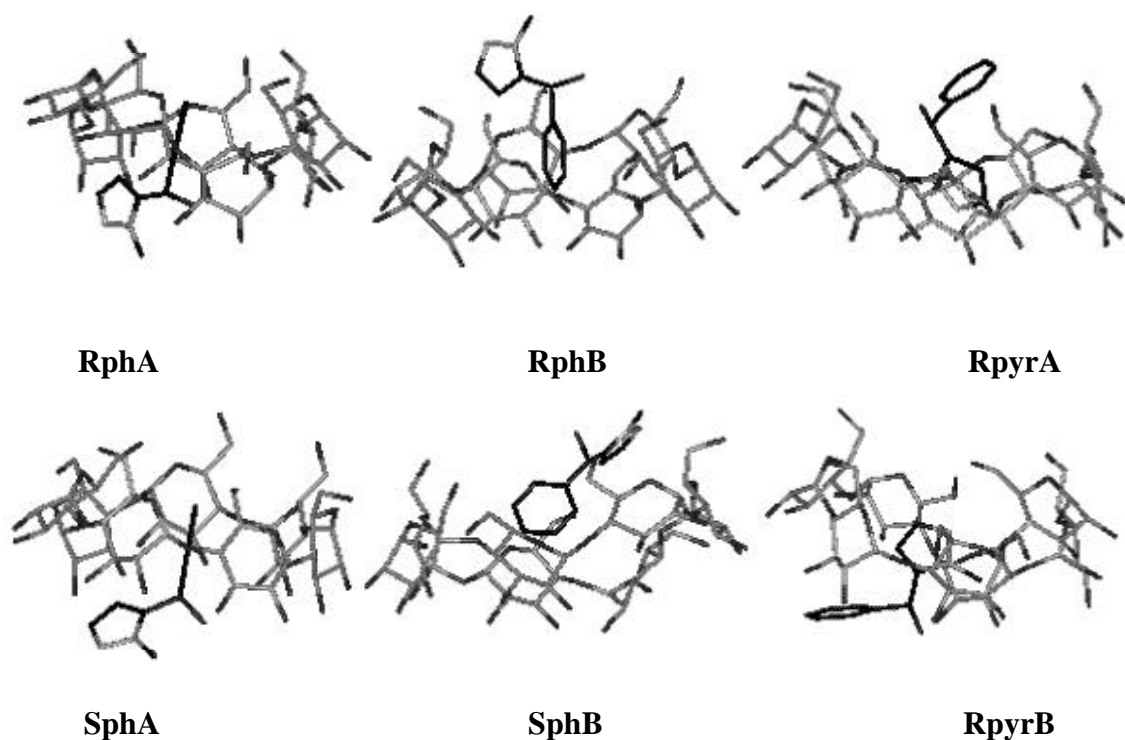


Figura 26. Estructures mitjanes obtingudes pels complexos 1/ β -CyD.

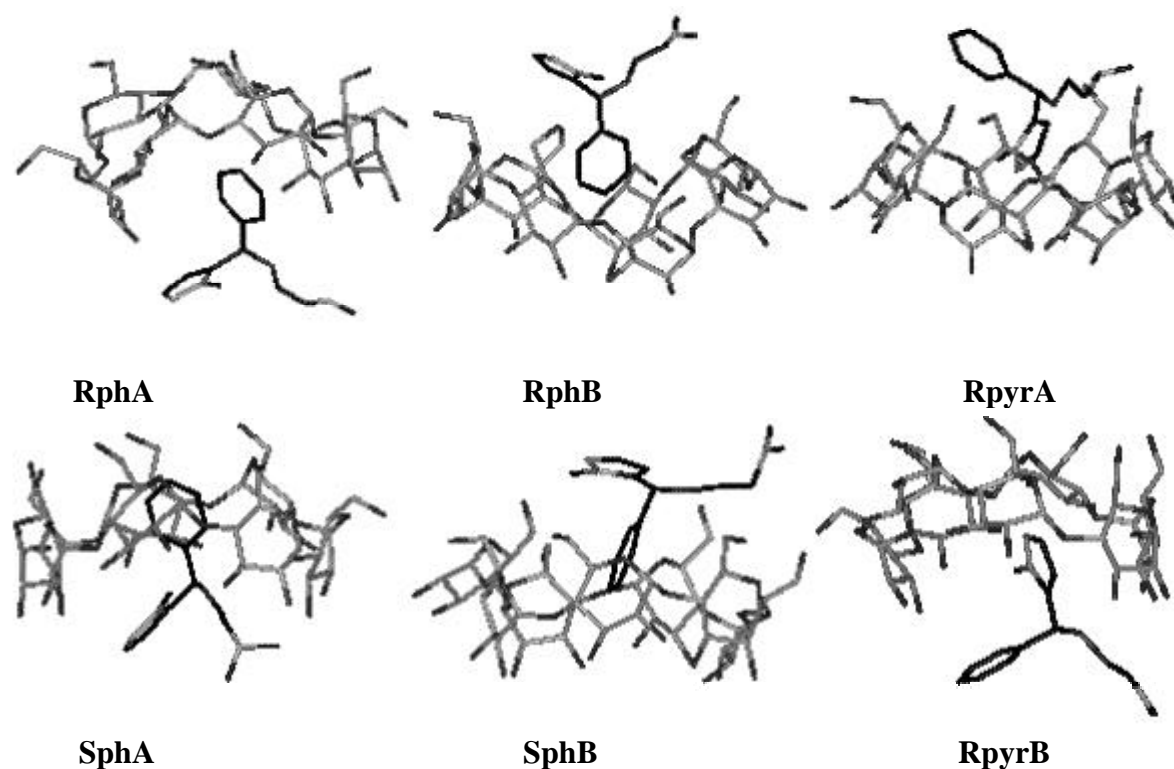


Figura 27. Estructures mitjanes obtingudes pels complexos 2/ β -CyD.

Pels complexos 1/ β -CyD la molècula es troba més inclosa en l'orientació A (Figura 26). L'orientació A presenta més enllaços intermoleculars (el O i H del grup

hidroxílic del carbinol i el nitrogen sp^2 amb els hidroxils secundaris de la ciclodextrina) que l'orientació **B** (en la qual només el protó del grup hidroxílic del carbinol forma enllaços d'hidrogen amb els hidroxils primaris). Contràriament, la molècula presenta més enllaços d'hidrogen amb les molècules d'aigua en l'orientació **B** que en la **A**.

Els termes energètics pels complexos **2/** -CyD, **Taula 10**, mostren una major diferència entre els complexos *R* i *S* que no pas pels complexos **1/** -CyD. La complexació amb *S*-cizolirtina és més favorable que amb l'isòmer *R*. Aquesta major estabilització prové de l'energia electrostàtica més favorable que supera els termes menys favorables de torsió, 1-4 electrostàtica i van der Waals. L'estructura mitjana de la dinàmica, **Figura 27**, també ens mostra com la *S*-cizolirtina es troba més inclosa que l'isòmer *R*, el que explica els termes desfavorables d'aquest primer. Igual que s'observa en **1**, hi ha més enllaços d'hidrogen intermoleculars en l'orientació **A** que en la **B**. En ambdós complexos els enllaços d'hidrogen es formen preferentment amb els hidroxils secundaris de la ciclodextrina. I també com en **1**, s'observen més enllaços d'hidrogen amb les molècules d'aigua en l'orientació **B**. La complexació amb la *S*-cizolirtina es troba afavorida pel terme electrostàtic però presenta menys enllaços d'hidrogen intermoleculars que els complexos amb l'enantiòmer *R*, per tant l'estabilització del complex *S*-cizolirtina/ -CyD és deguda a interaccions electrostàtiques diferents de l'enllaç d'hidrogen.

Els complexos de la cizolirtina presenten menys enllaços d'hidrogen amb les molècules d'aigua que no els complexos del carbinol. Aquest fet és consistent amb els resultats experimentals, els quals mostren que la cizolirtina és menys soluble que el carbinol i per tant té més tendència a complexar-se i formar enllaços d'hidrogen intermoleculars amb la ciclodextrina.

7.3 CONSIDERACIONS GEOMÈTRIQUES

L'energia de les simulacions de dinàmica molecular ja ens indica la preferència de la inclusió del fenil front la inclusió de l'anell de cinc membres, igual que els experiments de ROE intermolecular realitzats amb el mètode ROESY⁷⁴ (*rotating-frame nuclear Overhauser Spectroscopy*). Per tal de justificar si les orientacions simulades s'adapten als experiments ROE s'ha realitzat una anàlisi de les distàncies, entre els protons del fenil i els protons interns de la ciclodextrina (Figura 28), al llarg de totes les simulacions, Taula 11.

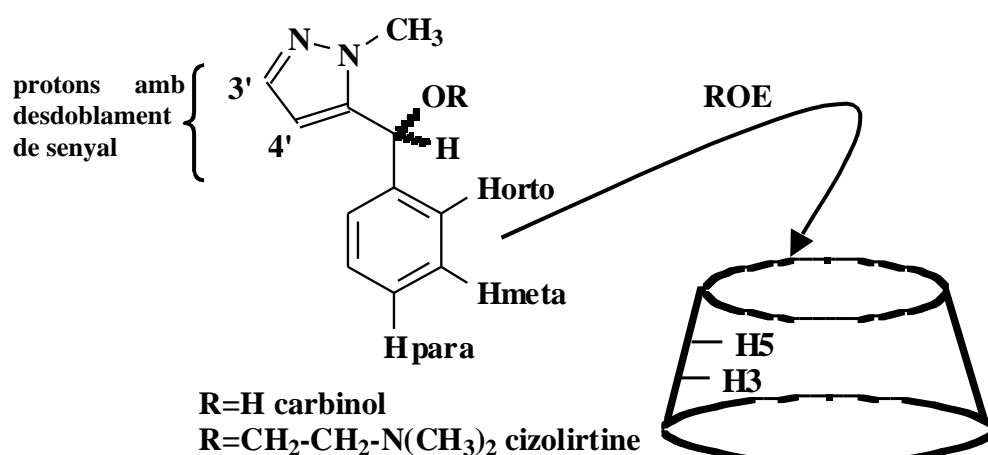


Figura 28. Protons que presenten desdoblament de senyal (H3' i H4') i protons que presenten nOe (protons del fenil) amb els protons interns de la ciclodextrina (H5 i H3) en ¹H-RMN i experiments de ROE intermolecular (veure referència 72 per a més detalls).

⁷⁴ Bothner-By, A.A.; Stevens, R.L.; Lee, J.T.; Warren, C.D.; Jeanloz, R.W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 811.

Les distàncies mitjanes obtingudes tenen valors inferiors a 4 Å, és a dir que poden presentar ROE, entre els protons del grup fenil del *guest* i els protons interns de la ciclodextrina, i per tant confirmen la inclusió del fenil. Però els valors de les distàncies obtingudes no ens permeten discriminar entre l'orientació d'inclusió **A** o **B** ja que en totes dues trobem distàncies menors de 4 Å, que poden presentar ROE.

1/ -CyD	<i>orto</i>	<i>meta</i>	<i>para</i>	2/ -CyD	<i>orto</i>	<i>meta</i>	<i>para</i>
RphA-H3	3.212	3.827	3.695	RphA-H3	3.720	3.236	3.853
RphA-H5	3.471	3.185	3.620	RphA-H5	5.220	3.316	2.903
RphB-H3	4.311	3.237	3.288	RphB-H3	5.034	3.211	3.100
RphB-H5	3.117	3.380	4.106	RphB-H5	3.136	3.088	4.070
SphA-H3	3.613	3.247	3.501	SphA-H3	3.162	4.428	5.761
SphA-H5	3.440	3.570	3.248	SphA-H5	3.349	3.139	3.774
SphB-H3	4.121	3.467	3.463	SphB-H3	4.514	3.465	3.629
SphB-H5	3.274	3.410	3.211	SphB-H5	3.329	3.386	3.748

Taula 11 Distàncies mitjanes entre els protons del fenil (*orto*, *meta* i *para*) de la molècula *guest* (**1** o **2**) i els protons interns de la -CyD (H3 i H5), en cada una de les simulacions dels complexos.

L'enantiodiferenciació s'observa pel desdoblament de les senyals dels protons H3' i H4', Figura 28. En els complexos **2/** -CyD, l'enantiodiferenciació és més clara que en els complexos **1/** -CyD. L'anàlisi energètic de les dinàmiques moleculars, veure Taula 9 i Taula 10, indica que les dues orientacions proposades són possibles i coexisteixen. Podem concloure que l'enantiodiferenciació prové de les diferències geomètriques entre els complexos *R* i *S*, que donen lloc a un entorn químic diferent. En

els complexos **2/** -CyD és més clar, les molècules *S* es troben més incloses en la cavitat que no l'enantiòmer *R*, Figura 27. D'altra banda, en els complexos **1/** -CyD aquesta diferència geomètrica és més difícil d'observar, Figura 26.

7.4 RESULTATS DE MM/PBSA

La comparació de les energies de dinàmica molecular ens ha revelat la preferència de la inclusió del grup fenil en cada una de les complexacions, **1/** -CyD i **2/** -CyD, donat que les energies de les diferents orientacions d'un mateix complex es poden comparar ja que contenen el mateix nombre de molècules d'aigua envoltant-lo. Però no podem comparar les energies dels complexos d'**1** amb els de **2** ja que contenen un nombre diferent d'àtoms. Per poder fer aquesta comparació necessitem realitzar una anàlisi MM/PBSA, tècnica que ens permet avaluar l'energia de complexació a partir de les estructures obtingudes en la dinàmica molecular estimant la influència del solvent amb un model continu. Aquesta tècnica es detalla en l'apartat de metodologia.

L'energia lliure total de complexació es calcula com l'energia del complex menys l'energia del *guest* i del *host*. Com a energia del *guest* s'ha considerat l'energia mitjana de cada molècula (**1** i **2**), i com a energia del *host* s'ha considerat l'energia mitjana de la -CyD en totes les simulacions, d'aquesta manera s'eviten les desviacions d'aquestes energies en cada simulació. Els resultats per a cada un dels complexos es presenten a la Taula 12.

L'energia total dels complexos **1/** -CyD mostra una clara preferència per l'orientació **B** en ambdós enantiòmers (RphB i SphB). Aquesta preferència prové de la contribució polar en la solvatació, E_{PB} , tot i que el terme electrostàtic i van der Waals mostren preferència per l'orientació **A**, ja que aquesta es troba estabilitzada per més

enllaços d'hidrogen intermoleculars, com s'explica en la part de dinàmica molecular. L'energia en fase gas, E_{gas} , mostra una major estabilització dels complexos amb l'enantiòmer *R* (afavorit pel terme electrostàtic i van der Waals), però al afegir els termes de solvatació es troba afavorida la complexació amb l'enantiòmer *S*.

1/ -CyD	RphA	RphB	SphA	SphB	2/ -CyD	RphA	RphB	SphA	SphB
E_{elect}	-13.57	-5.06	-4.67	1.37	E_{elect}	4.37	4.50	-9.49	-7.83
E_{vdW}	-23.96	-21.38	-20.29	-18.96	E_{vdW}	-23.26	-21.99	-26.99	-19.72
E_{int}	0.83	0.41	4.69	-2.96	E_{int}	-4.63	-2.10	4.85	6.34
E_{gas}	-36.70	-26.03	-20.28	-20.56	E_{gas}	-23.52	-19.59	-31.63	-21.21
E_{PB}	34.64	20.80	22.61	15.71	E_{PB}	21.55	14.19	30.01	19.38
E_{nonpolar}	-3.46	-3.22	-3.28	-3.21	E_{nonpolar}	-3.25	-3.49	-3.68	-3.34
E_{total}	-5.52	-8.45	-0.95	-8.06	E_{total}	-5.22	-8.88	-5.30	-5.17

Taula 12 Diferències energètiques de MM/PBSA (E_{total} en kcal/mol) així com els termes que la componen (electrostàtica $-E_{\text{elec}}$, van der Waals $-E_{\text{vdw}}$, interna [stretching+bending+torsional] $-E_{\text{int}}$, gas [interna+electrostàtica+van der Waals] $-E_{\text{gas}}$, Poisson-Boltzman $-E_{\text{PB}}$, i no-polar $-E_{\text{non-polar}}$ tot en kcal/mol) de totes les orientacions estudiades pels complexos **1/** -CyD(esquerra) i **2/** -CyD (dreta).

En la complexació amb *R*-cizolirtina (**2**), l'energia total mostra preferència per l'orientació **B**, però no s'observa cap preferència d'orientació en l'enantiòmer *S*. L'orientació **A** es troba afavorida pels termes electrostàtic i van der Waals però els termes de solvatació fan que sigui més favorable l'orientació **B**. Els complexos amb *S*-cizolirtina es troben més inclosos en la cavitat de la ciclodextrina, Figura 27, així tenen una energia electrostàtica més favorable però es troben més restringits i tenen una energia interna pitjor, així com una solvatació més desfavorable, E_{PB} .

En general, l'orientació preferent és la **B**, degut al terme polar de solvatació. Per a aquesta orientació, els complexos amb l'enantiòmer *R* (especialment en els complexos **2/** -CyD) són energèticament més favorables que amb l'enantiòmer *S*.

Termes de solvatació	1	2
E_{PB}	-18.50	-17.57
$E_{nonpolar}$	3.12	3.79
G_{solv}	-15.38	-13.77

Taula 13 Energia total de solvatació en aigua (G_{solv} , en kcal/mol), així com els termes energètics corresponents (Poisson-Boltzman, E_{PB} , i no-polar, $E_{non-polar}$, també en kcal/mol) per la molècula **1** (carbinol) i **2** (cizolirtina), obtinguda amb la metodologia MMPB/SA.

L'energia de solvatació per a la molècula **1** (carbinol) és major que per a la molècula **2** (cizolirtina), Taula 13, en concordança amb els valors de solubilitat en aigua que indiquen que la cizolirtina és menys soluble que el carbinol.

7.5 DISCUSSIÓ

Les petites diferències entre les complexacions amb els enantiòmers *R* i *S* són difícils de reproduir. S'han trobat diverses limitacions en aquest estudi, en primer lloc el temps de simulació ha de ser prou llarg com per a obtenir estructures convergides, i els resultats energètics analitzats per MM/PBSA es veuen molt afectats pels termes de solvatació, els quals provenen d'un model de solvatació continu que pot ser una font d'errors.

La inclusió del carbinol, **1**, i de la cizolirtina, **2**, en la -CyD ha estat observada experimentalment, revelant ROE entre els protons del fenil i els protons interns de la

ciclodextrina. Els nostres càlculs mostren que els complexos que tenen el fenil inclòs són més estables energèticament que els que tenen inclòs l'anell de cinc membres, i que les dues orientacions d'inclusió del grup fenil són possibles. Les forces electrostàtiques i de van der Waals són les responsables de l'estabilitat i la formació dels complexos. L'orientació **B** (el fenil inclòs i l'anell de cinc membres situat a l'extrem estret de la ciclodextrina) és la preferida. La complexació, en aquesta orientació, de l'enantiòmer *R* és energèticament més favorable que amb l'enantiòmer *S*.

Les distàncies promig, calculades al llarg de les simulacions, entre els protons interns de la ciclodextrina i els protons del fenil són consistents amb els ROE observats, justificant la inclusió del fenil però no ens mostren la orientació preferent. Els càlculs realitzats ens fan creure que l'enantiodiferenciació que s'observa experimentalment prové de les diferències en l'estructura mitjana dels complexos diastereomèrics amb els enantiòmers *R* i *S*, les quals condicionen l'entorn químic dels protons del *guest*. Això s'observa clarament en els complexos de cizolirtina on els enantiòmers *S* es troben més inclosos en la cavitat que els *R*. Les dues orientacions de complexació de *S* són similars en energia, i per tant coexisteixen; contràriament, l'enantiòmer *R* presenta una orientació preferent. L'estructura mitjana, per tant, és molt diferent en *R* i en *S*-cizolirtina. En el cas dels complexos amb el carbinol precursor, les simulacions de dinàmica molecular dels complexos amb l'enantiòmer *R* i *S*, mostren la mateixa orientació preferent (**B**) i les estructures mitjanes són similars, per tant presenten menor enantiodiferenciació, en concordança amb els resultats experimentals.

*“and now, for something completely different”
Monty Python's*

8 RECONeixEMENT MOLECULAR: COMPLEXOS D'ESTER I AMIDA AMB DíMER DE β -CICLODEXTRINES

1.1 INTRODUCCIÓ AL PROBLEMA

El procés de reconeixement molecular és la força conductora de molts processos biomoleculars⁷⁵. Els investigadors presenten gran interès en conèixer les bases del reconeixement molecular, però sovint les biomolècules són massa grans i complicades com per a ser estudiades i s'imposa l'ús de models més simples. D'entre aquests, les ciclodextrines són de les més emprades i es consideren bons models dels enzims degut a la seva capacitat de formar complexos d'inclusió amb molècules orgàniques, complexos que recorden les interaccions enzim-substrat^{76,77}.

En aquest capítol s'han estudiat substrats molt similars que formen complexos d'inclusió amb un dímer de β -ciclodextrina. Aquests complexos, tot i la similitud de les molècules que els formen, presenten constants de formació molt diferents, així, la nostra recerca es centra en determinar les interaccions responsables d'aquestes diferències, és a dir, del reconeixement molecular. Concretament, s'ha estudiat la complexació del *p*-*tert*-butilbenzoat de *p*-*tert*-butilfenil i del *N*-(*p*-*tert*-butilfenil)-*p*-*tert*-butilbenzamida

⁷⁵ Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH: Weinheim, **1995**.

⁷⁶ Cramer, F.; *Einschussverbindungen*, Springer: Berlin, **1954**.

⁷⁷ Bender, M.L.; Komiyama, M. *Cyclodextrin Chemistry*, Springer: Berlin, **1978**.

(d'ara en endavant anomenats l'èster i l'amida, respectivament) amb un dímer format per dues unitats de β -ciclodextrina unides per un pont disulfur sobre dos àtoms C6 (anomenat β -CyD dímer), Figura 29. Els mètodes utilitzats han estat la dinàmica molecular, les pertorbacions d'energia lliure i la metodologia MM/PBSA, utilitzant el camp de forces parm94 (per a més detalls consultar l'apèndix). Aquests complexos (amida/ β -CyD dímer i èster/ β -CyD dímer) han estat estudiats experimentalment per Breslow *et al.*⁷⁸, trobant que la constant de complexació de l'èster era més favorable que la de l'amida per quatre ordres de magnitud ($1 \cdot 10^8$ i $2.4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivament) tot i la seva elevada similitud estructural.

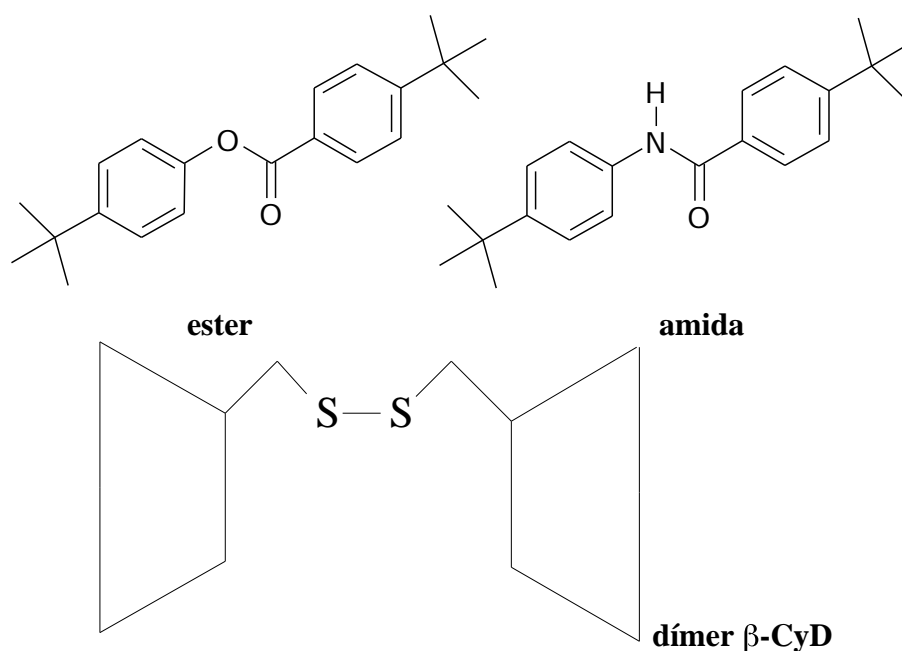


Figura 29 Molècules estudiades i dímer β -CyD.

La complexació més favorable per a l'èster s'explica, en part, degut a la seva menor solubilitat en aigua de manera que té més tendència a formar el complex que no pas l'amida. La diferència de solubilitat pot explicar parcialment (2-3 kcal/mol) la diferència de complexació de 4.9 kcal/mol entre l'èster i l'amida. Per tant, unes altres

⁷⁸ Breslow, R.; Greenspoon, N.; Guo, T.; Zarzycki, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 8296.

interaccions deuen intervenir en el procés de reconeixement; determinar quines són és el propòsit d'aquest estudi.

S'ha de destacar que aquest estudi consta de dues etapes ben diferenciades:

- En una primera etapa l'estudi es va realitzar considerant una orientació de partida per a cada complex en la dinàmica molecular, els resultats de l'anàlisi MM/PBSA ens van donar una bona explicació de la diferència d'energia de complexació entre ester i amida. Però les pertorbacions d'energia lliure, FEP, no van donar el resultat esperat, degut a que no es reproduïa tot l'equilibri conformacional que s'observava en les dinàmiques. Aquest primer estudi fou publicat⁷⁹, i mentrestant es van realitzar FEPs més llargues per millorar els resultats i veure si la nostra hipòtesi era correcta.
- En aquestes FEPs vam observar com en la transformació d'ester a amida el complex canviava la seva orientació, la molècula *guest* es situava desplaçada del centre del *host*, que era l'orientació considerada. Degut a aquest desplaçament vam decidir estudiar altres orientacions inicials del complex i totes ens van donar lloc a complexos estables i que es mantenien. Es va realitzar l'anàlisi MM/PBSA de totes les orientacions i els resultats ens proporcionaren una explicació més completa de la diferència entre l'energia dels complexos de l'ester i de l'amida. Les FEPs més llargues també van recolzar les mateixes conclusions. Aquest estudi també es vol publicar⁸⁰ ja que representa una ampliació i un major aprofundiment de l'anterior, amb conclusions més extenses i fiables.

Tots dos estudis es comenten en aquest capítol, fent especial reforç en el segon.

⁷⁹ Beà, I.; Cervelló, E.; Kollman, P.A.; Jaime, C. *Comb.Chem.High Throughput Screening*, acceptat.

⁸⁰ Beà, I.; Jaime, C.; Kollman, P.A. *J. Am. Chem. Soc.*, enviat per publicar.

8.2 RESULTATS DINÀMICA MOLECULAR

Les simulacions de dinàmica molecular s'han realitzat per a cada molècula *guest* (ester o amida) i per a cada complex, en el buit i en solució aquosa. Els complexos es mantenen formats en totes les simulacions, l'energia arriba ràpidament a l'equilibri i les estructures dels complexos no varien substancialment respecte l'estructura de partida. En la primera aproximació només es va considerar l'orientació central per a cada complex, però posteriorment es van considerar també les orientacions anomenades “amunt” i “avall” en vista als resultats d'una FEP llarga (20 ns), *vide infra*. Totes les orientacions van mostrar ser complexos estables. Les orientacions estudiades es mostren a la **Figura 30**.

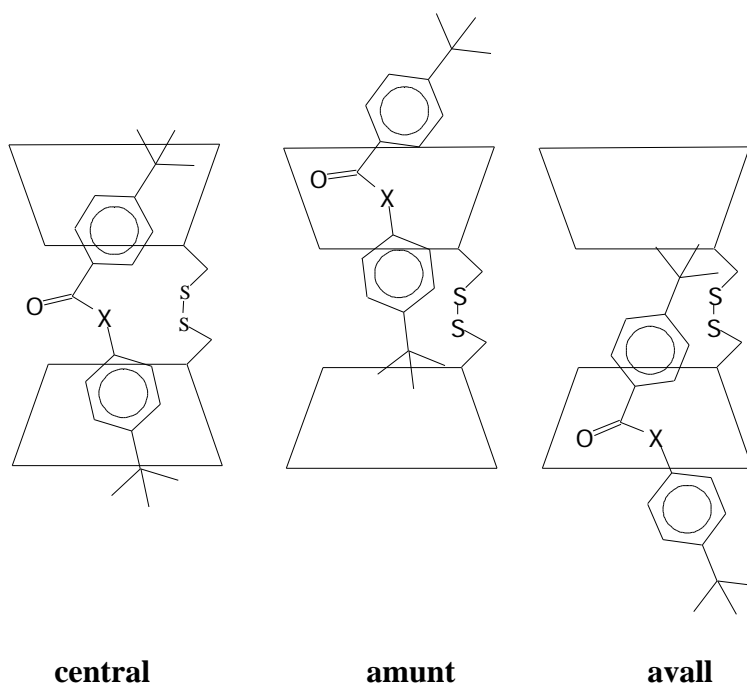


Figura 30 Orientacions inicials dels complexos estudiades. D'esquerra a dreta: central, amunt, avall. La molècula inclosa pot ser l'ester (si X=O) o l'amida (si X=NH).

Un cop realitzades les simulacions per als complexos en solució aquosa s'obtenen les estructures mitjanes que es presenten a la **Figura 31**. Tots els complexos es mantenen formats i estables al llarg de la simulació.

Per tal d'estudiar les interaccions solut-solvent, s'ha realitzat un anàlisi dels enllaços d'hidrogen presents mitjançant el mòdul CARNAL del programa AMBER. L'amida solvatada presenta enllaços d'hidrogen entre el protó de l'amida i els O de l'aigua, i entre l'oxigen carbonílic i els protons de l'aigua. Tal com s'esperava, l'àtom de N de l'amida no és capaç de formar enllaços d'hidrogen. L'ester solvatat mostra enllaços d'hidrogen entre els protons de l'aigua i els dos oxígens de l'ester.

Els resultats de l'anàlisi d'enllaços d'hidrogen pels complexos amida/ -CyD dímer i ester/ -CyD dímer es presenten a la **Taula 14**. Els números de la taula s'obtenen de la suma del número de contactes a curta distància entre àtoms especificats dividit pel nombre d'estructures considerades (500).

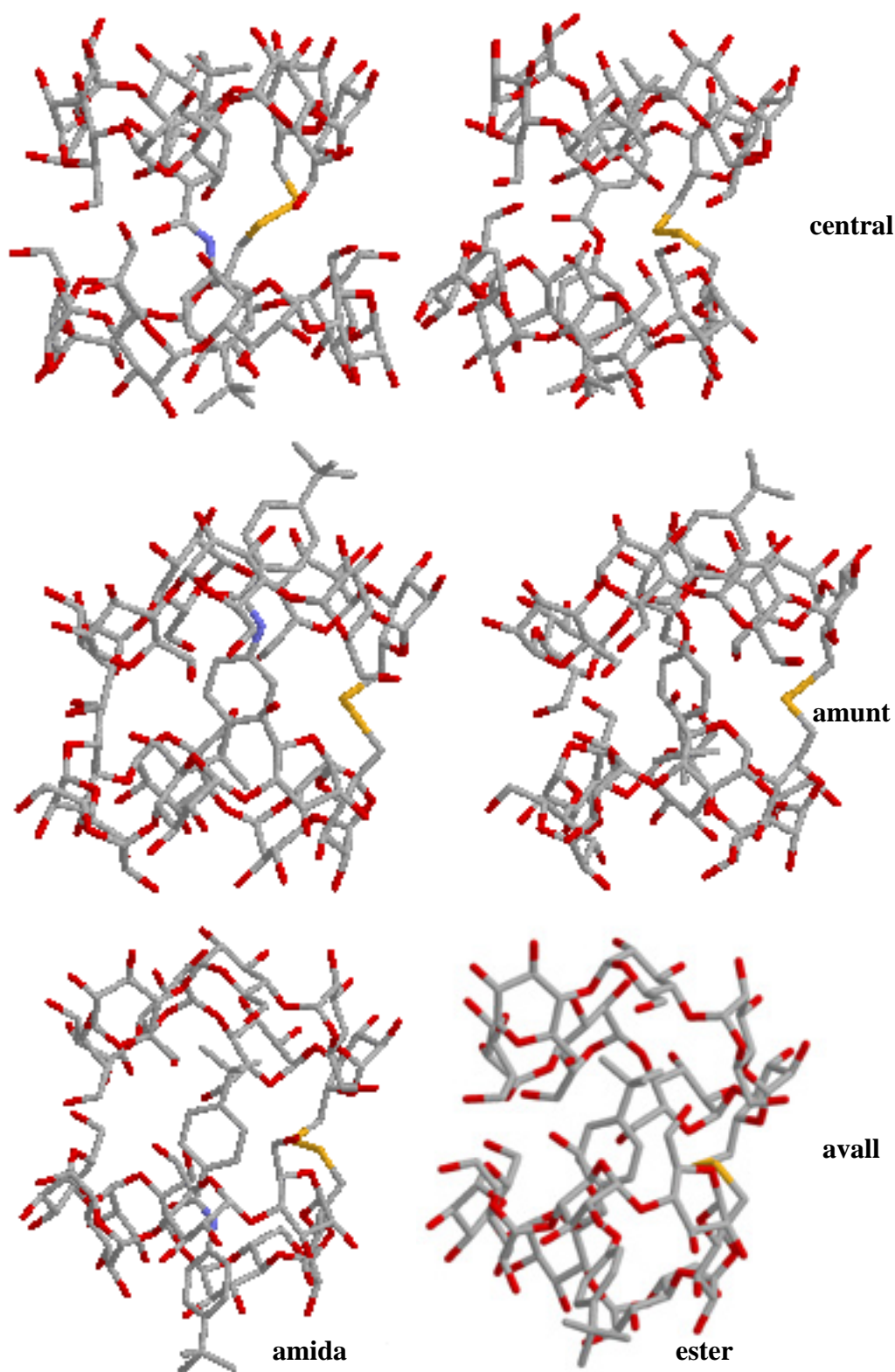


Figura 31 Estructures mitjanes dels complexos solvatats de l'amida (esquerra) i del ester (dreta). De dalt a baix, les orientacions són central, amunt i avall. Per facilitar la visió s'han omés les molècules d'aigua i els àtoms d'hidrogen.

amida	CDint	CDh-w	CD-hw	amih-CD	ami-hCD	amih-w	ami-hw	total
central	2372	4775	9335	135	99	0	42	16758
amunt	2539	4774	9302	38	28	0	95	16776
avall	2279	4796	9429	71	70	0	52	16697

ester	CDint	CDh-w	CD-hw	est-hCD	est-hw	total
central	2696	4797	9459	86	21	17060
amunt	2679	4587	9279	20	97	16662
avall	2337	4783	9379	76	59	16634

Taula 14 Anàlisi d'enllaços d'hidrogen per als complexos de l'ester i l'amida. S'han considerat tres orientacions; central, amunt i avall. Els enllaços d'hidrogen s'han dividit en tres grups: intermolecular *host* (CDint), protons del *host* amb els oxígens de l'aigua (CDh-w), oxígens del *host* amb els protons de l'aigua (CD-hw), hidrògens del *guest* amb els protons del *host* (amih-CD, només per l'amida és clar), oxígens del *guest* amb els protons del *host* (ami-hCD, est-hCD), protons del *guest* amb l'aigua (amih-w), oxígens del *guest* amb aigua (ami-hw, est-hw) i la suma de tots els termes en cada cas (total).

Desglossant l'explicació segons l'orientació considerada tenim:

El complex amida/ -CyD dímer en l'**orientació central** presenta enllaços d'hidrogen entre l'oxigen carbonílic de l'amida i els protons dels hidroxils primaris del *host* i els protons de l'aigua (ami-hCD i ami-hw). El protó de l'amida forma enllaços d'hidrogen amb els oxígens dels hidroxils primaris del *host* i els àtoms de sofre (amih-CD) però no amb l'aigua (amih-w). El complex ester/ -CyD dímer en l'orientació central presenta enllaços d'hidrogen entre els dos oxígens de l'ester i els protons dels hidroxils primaris del *host* i els protons de l'aigua (est-hCD i est-hw). De fet, el complex amb l'ester té menys enllaços d'hidrogen *guest-host* que els complex amb l'amida, de manera que aquest últim estarà més estabilitzat. D'altra banda, el complex

amb l'ester presenta més enllaços d'hidrogen intermoleculars en el *host* (entre les dues ciclodextrines que formen el dímer, CD_{int}) i també més interaccions *host*-aigua (CDh-w i CD-hw). Per tant, el complex de l'ester és més soluble que el complex de l'amida. Aquests efectes també s'observen en els resultats de MM/PBSA (*vide infra*).

El complex amida/ -CyD dímer en **l'orientació amunt** presenta enllaços d'hidrogen entre l'oxigen carbonílic de l'amida i els protons dels hidroxils secundaris del *host* i els protons de l'aigua (ami-hCD i ami-hw). El protó de l'amida només presenta enllaços d'hidrogen amb els oxígens glucosídics (amih-CD). El complex ester/ -CyD dímer en l'orientació amunt presenta enllaços d'hidrogen entre l'oxigen carbonílic de l'ester i els protons dels hidroxils secundaris del *host* i els protons de l'aigua (est-hCD i est-hw). El complex amb l'amida presenta més enllaços d'hidrogen *host-guest* (amih-CD i ami-hCD) i *host*-aigua (CD-hw i CDh-w) que el complex amb l'ester, però menys interaccions *host-host*.

El complex amida/ -CyD dímer en **l'orientació avall** presenta enllaços d'hidrogen entre l'oxigen carbonílic de l'amida i els protons dels hidroxils del *host* (secundaris i primaris) i els protons de l'aigua (ami-hCD i ami-hw). El protó de l'amida només presenta enllaços d'hidrogen amb els oxígens glucosídics (amih-CD). El complex ester/ -CyD dímer en l'orientació avall presenta enllaços d'hidrogen entre els dos oxígens de l'ester i els protons dels hidroxils, secundaris i primaris, del *host* i entre l'oxigen carbonílic de l'ester i els protons de l'aigua (est-hCD i est-hw).

Si observem els resultats pels complexos amb l'ester i l'amida en global, tenim:

- El complex amida/ -CyD dímer presenta més enllaços d'hidrogen *host-guest* (ami-hCD i amih-CD) que el complex amb l'ester, però menys *host-host* (CD_{int}). Els

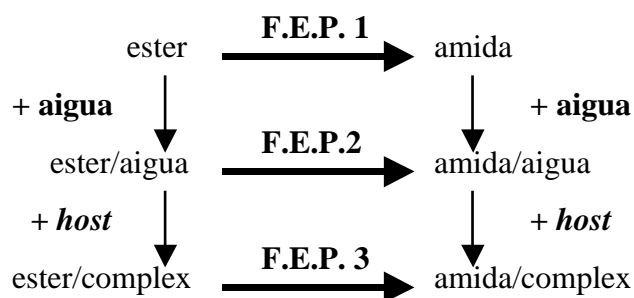
contactes *guest*-aigua (*ami/est-hw*) i *host*-aigua (*CDh-w* i *CD-hw*) són similars en ambdós complexos.

- El complex ester/ -CyD dímer presenta un major número total d'enllaços d'hidrogen (total) que el complex amida/ -CyD dímer només en l'orientació central. Les altres orientacions tenen un número total d'interaccions similar, tot i que són una mica majors en els complexos amb l'amida. En el primer estudi que vam realitzar⁷⁹ només consideràvem la orientació central, i per tant el complex amb l'ester estava sobrestabilitzat en vista d'aquests resultats; els enllaços d'hidrogen estableixen més el complex amb l'ester que amb l'amida només en l'orientació central (únic cas del primer estudi) i no en les altres.

Els enllaços d'hidrogen *guest-host* i *host-host* estableixen el complex, i les interaccions *guest*-aigua i *host*-aigua el fan més soluble (estabilitzant-lo també d'aquesta manera). Aquests termes tenen importància en el procés de complexació, però no representen l'única contribució. En l'apartat on es presenten els resultats de l'anàlisi MM/PBSA es discuteix la importància d'altres termes (energia interna i van der Waals), i s'observa una correlació entre el terme electrostàtic i de solvatació amb el nombre d'enllaços d'hidrogen presents en el complex (*guest-host* i *host-host*) i d'aquest amb l'aigua (*guest*-aigua i *host*-aigua), respectivament. Cal destacar que el protó de l'amida no presenta enllaços d'hidrogen amb les molècules d'aigua, això és pot explicar degut a que el dímer -CyD orienta l'aigua amb els hidrògens apuntant al complex i els oxígens apuntant enfora, per tant és més probable pel *guest* interactuar amb els protons de l'aigua que no amb els oxígens.

8.3 RESULTATS DELS CÀLCULS DE PERTORBACIÓ D'ENERGIA LLIURE (FEP)

Les perturbacions d'energia lliure, explicades en l'apartat de metodologia, s'han realitzat per tal d'avaluar la diferència d'energia lliure de solvatació i de complexació entre l'ester i l'amida. A la **Figura 32** es mostren les tres FEP considerades per tancar el cicle termodinàmic. Tots els àtoms de l'ester (i les corresponents càrregues i paràmetres) són mutats gradualment cap als de l'amida; la FEP1 muta l'ester a amida en el buit, la FEP2 en solució aquosa, i la FEP3 en el complex solvatat. Les diferències energètiques obtingudes per aquests processos de càlcul han de ser comparables amb les diferències d'energia lliure experimentals, com la diferència d'energia lliure de solvatació de l'amida i l'ester ($FEP2 - FEP1 = G_{\text{amida}} - G_{\text{ester}}$) i la diferència d'energia lliure de complexació ($FEP3 - FEP2 = G_{\text{amida}} - G_{\text{ester}}$).



$$FEP2 - FEP1 = G_{\text{amida}} - G_{\text{ester}} \text{ (solvatació)}$$

$$FEP3 - FEP2 = G_{\text{amida}} - G_{\text{ester}} \text{ (complexació)}$$

Figura 32 Cicles termodinàmics utilitzats per avaluar computacionalment les diferències d'energia lliure en la solvatació i complexació de l'ester i l'amida.

Inicialment les tres FEP es van realitzar mitjançant simulacions de 500 ps de llargària cada una⁷⁹ però els resultats, Taula 15, no foren totalment satisfactoris; aconseguíem reproduir la millor solubilitat de l'amida (-2.77 kcal/mol) però la complexació resultava favorable a l'amida (-0.09 kcal/mol) i no a l'ester. Per tal de millorar aquests resultats es van realitzar FEP més llargues. A la Taula 16 es mostren els resultats de totes les FEP realitzades. La FEP1 i FEP2 es van simular a 10 ns i no s'observaren diferències massa significatives amb les simulacions inicials de 500 ps, per tant les considerem convergides. D'altra banda, la FEP3 sí que mostra moltes diferències segons la llargària de la simulació, i hem arribat a realitzar una simulació de 20 ns, que potser tampoc és suficient però que ja ens acosta al límit de les nostres possibilitats de càlcul.

Primera aproximació	FEP1	FEP2	FEP3	FEP2-FEP1 $G_{\text{amida}} - G_{\text{ester}}$ (solvatació)	FEP3-FEP2 $G_{\text{amida}} - G_{\text{ester}}$ (complexació)
Longitud	500 ps	500 ps	500 ps		
Elec	-2.60	-5.60	-4.71	-3.00	0.89
Nonb	0.39	0.15	-0.13	-0.24	-0.28
14NB	0.97	0.97	0.86	0.00	-0.11
14EL	-21.65	-21.61	-21.57	0.04	0.04
BADH	-5.25	-4.67	-5.42	0.58	-0.75
Total	-28.11	-30.88	-30.97	-2.77	-0.09
Histèresi	0.005	0.016	0.00	---	---

Taula 15 Resultats de les pertorbacions d'energia lliure (kcal/mol) per a la mutació de l'ester a l'amida (FEP1, FEP2 i FEP3), totes de 500 ps, en la primera aproximació. La diferència FEP2-FEP1 representa la diferència de solubilitat, i FEP3-FEP2 és la diferència en l'energia de complexació.

Longitud	FEP1	FEP2	FEP3			FEP2-FEP1 $G_{\text{amida}} - G_{\text{ester}}$ (solvatació)	FEP3-FEP2 $G_{\text{amida}} - G_{\text{ester}}$ (complexació) FEP3 =
	10 ns	10 ns	500 ps	5 ns	20 ns		20 ns
Elec	-2.47	-5.61	-4.71	-3.73	-3.88	-3.14	1.73
Nonb	0.32	0.14	-0.13	-0.13	-0.19	-0.18	-0.33
14NB	0.88	0.97	0.86	1.00	1.02	0.09	0.05
14EL	-21.60	-21.68	-21.57	-21.69	-21.85	-0.08	-0.17
BADH	-5.85	-4.54	-5.42	-5.11	-2.50	1.32	2.04
Total	-28.72	-30.71	-30.97	-29.66	-27.40	-2.00	3.31
Histèresi	0.13	0.00	0.00	0.01	0.01	---	---

Taula 16 Resultats de les pertorbacions d'energia lliure (kcal/mol) per a la mutació de l'ester a l'amida (FEP1, FEP2 i FEP3), en la segona aproximació. La FEP3 s'ha realitzat en tres longituds de simulació diferents. La diferència FEP2-FEP1 representa la diferència de solubilitat, i FEP3-FEP2 és la diferència en l'energia de complexació.

Així, s'ha trobat una millor solubilitat (FEP2-FEP1) per a l'amida que per a l'ester, en concordança amb el que és coneix experimentalment⁸¹, amb una $G_{\text{solvatació}}$ de -2 kcal/mol afavorint la solvatació de l'amida. La major contribució prové del terme electrostàtic (Elec), on són comptades les interaccions amb el solvent. La diferència d'energia lliure de complexació, FEP3-FEP2, és gairebé zero si utilitzem la FEP3 de 500 ps (Taula 15), però utilitzant les més llargues (FEP3 de 20 ns i FEP2 de 10ns, Taula 16) s'obté una diferència de 3.31 kcal/mol afavorint la complexació de l'ester. La contribució més important prové de les forces internes (BADH: enllaç, angle, torsió) i

⁸¹ Unes 5 kcal/mol més favorable la solvatació de $\text{CH}_3\text{CONHCH}_3$ (amida) que de $\text{CH}_3\text{COOCH}_3$ (ester) Wolfenden, R. *Science*, **1983**, 222, 1087.

del terme electrostàtic (Elec). La diferència de complexació experimental, de 4.9 kcal/mol afavorint la complexació de l'ester, no s'ha aconseguit totalment, però els nostres càlculs també mostren una complexació més favorable per a l'ester.

En l'aproximació inicial, amb FEPs de 500 ps, vam suposar que la FEP3 no reproduïa bé les interaccions del complex amb les molècules d'aigua, especialment amb aquelles que entraven a la cavitat del complex per interaccionar amb el *guest*, aquest fenomen s'havia observat en les simulacions de dinàmica molecular però en les FEP no tenia prou temps per produir-se. Així, després es va realitzar la FEP3 a 5 ns (10 vegades més llarga) i s'observà que el canvi més notable era en l'energia electrostàtica, Elec en la Taula 16, és a dir la que té en compte les interaccions del complex amb l'aigua; amb aquesta FEP ja aconseguíem reproduir les interaccions del complex amb l'aigua. La diferència energètica resultant (FEP3 (5ns) – FEP2 (500ps) = 1.22 kcal/mol) ja era favorable al complex amb l'ester, però tot i això no estava d'acord amb la diferència experimental, indicant que existia algun altre efecte que no es tenia en compte. Al realitzar la FEP3 de 20 ns, al límit de les nostres possibilitats de càlcul (uns 50 dies ininterromputs), la millora en el terme electrostàtic es manté i el terme que sofreix més canvi és el de les forces internes (BADH). Així doncs, les interaccions amb les molècules d'aigua estan correctament reproduïdes en les FEP3 de 5 ns i 20 ns, però l'equilibri conformacional del complex (considerant la conformació del *guest* i del *host* i la seva orientació relativa) està molt millor reproduït amb la FEP3 de 20 ns.

La importància del terme de les forces internes (BADH) ens feu pensar en un possible canvi de conformació del complex en la pertorbació d'energia lliure. L'evolució de la geometria del complex durant la FEP3 de 20 ns, al passar d'ester a amida es mostra a la Figura 33. El complex parteix de la orientació que hem anomenat central i acaba amb l'orientació amunt. Això **no** indica que l'ester (estructura de partida)

prefereixi l'orientació central i que l'amida (estructura final) prefereixi l'orientació amunt, sinó que ens mostra la importància del mostreig (*sampling*) en aquests complexos on són possibles diverses orientacions. Per a tenir uns resultats convergits ens caldria realitzar una FEP3 encara més llarga, que ens reproduïxi, a cada finestra, totes les orientacions del complex (avall, amunt i central) i els equilibris que hi tenen lloc, però això s'escapa de les limitacions de CPU existents en aquests moments, en el nostre grup i, probablement, en qualsevol altre.

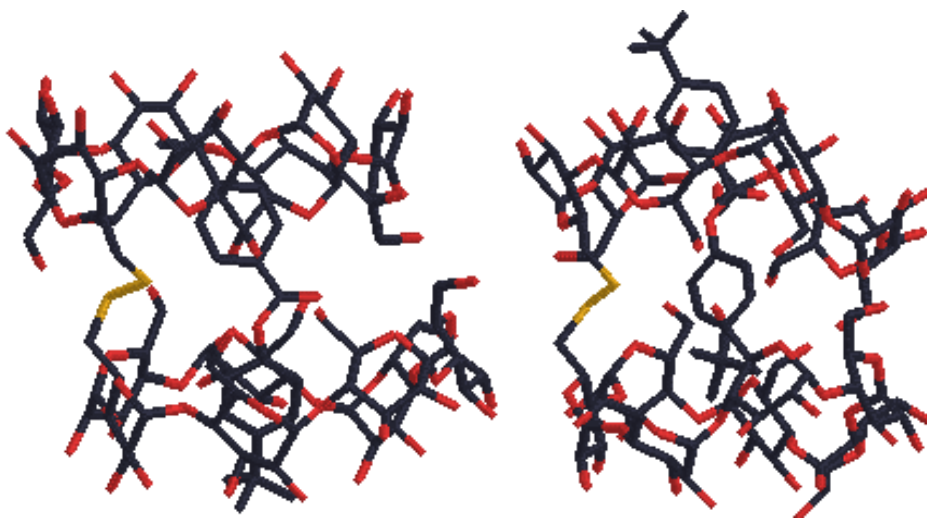


Figura 33 Estructura de partida per a la FEP3 de 20 ns (esquerra, complex ester/ -CyD-dímer en l'orientació central) i estructura final obtinguda (dreta, complex amida/ -CyD-dímer en orientació amunt).

Per cobrir totes les orientacions possibles es van realitzar les simulacions de dinàmica molecular (mostrades anteriorment) i per tal de poder comparar les diferents energies de complexació de l'ester i l'amida es va realitzar l'anàlisi MM/PBSA que tot seguit es mostra.

8.4 RESULTATS DE L'ANÀLISI MM/PBSA

L'anàlisi MM/PBSA s'ha aplicat a les 500 estructures (provinents de la DM en solució aquosa) de cada complex i de les espècies lliures en solució aquosa. Els resultats obtinguts per a l'ester i l'amida, mostrats a la Taula 17, indiquen que l'amida presenta una solubilitat en aigua major que l'ester, per 3.8 kcal/mol, com s'esperava.

	amida	ester	(amida-ester)
E_{nonpolar}	4.28	4.24	0.04
E_{PB}	-18.90	-15.08	-3.82
$E_{\text{solvatació}}$	-14.62	-10.84	-3.78

Taula 17 Termes energètics (kcal/mol) deguts a la solvatació (E_{nonpolar} , E_{PB} i la suma d'aquestes: $E_{\text{solvatació}}$) per a les molècules d'ester i d'amida en solució aquosa, així com la seva diferència, (amida-ester).

L'energia de complexació, $E_{\text{total,PB}}$, per a tots els complexos estudiats, Taula 18, ens mostra que la complexació amb l'ester està afavorida, en tots els casos, per unes 5-6 kcal/mol. Tant en el cas de la complexació de l'amida com de l'ester, l'orientació que es troba més afavorida és la amunt (mostra una diferència d'energia $E_{\text{total,PB}}$ més negativa), resultat que concorda amb el que s'ha observat en la FEP3 de 20 ns, que ha acabat convergint a aquesta orientació.

	Amida/ -CyD-dímer			Ester/ -CyD-dimer		
	central	amunt	avall	central	amunt	avall
E_{elec}	-24.01	-24.89	-26.02	-16.06	-29.83	-26.32
E_{vdW}	-31.96	-33.22	-26.56	-34.62	-33.46	-27.55
$E_{internal}$	14.63	11.31	8.07	15.23	5.40	5.75
E_{gas}	-41.34	-46.80	-44.51	-35.45	-57.89	-48.12
$E_{nonpolar}$	-4.65	-4.50	-4.16	-4.56	-4.50	-4.21
E_{PB}	38.75	41.64	39.76	27.92	45.31	37.53
$E_{solvatació}$	34.10	37.14	35.60	23.37	40.82	33.33
$E_{PB+elec}$	14.74	16.75	13.74	11.86	15.48	11.21
$\Delta E_{total,PB}$	-7.25	-9.66	-8.91	-12.09	-17.08	-14.79
Std. Dev.	2.72	2.55	2.65	2.88	2.69	2.65

Taula 18 Energia de complexació ($E_{total,PB}$, en kcal/mol) obtinguda de l'anàlisi MM/PBSA per a les tres orientacions (central, amunt i avall) dels complexos amida/ -CyD-dímer i ester/ -CyD-dímer. L'energia de complexació, $E_{total,PB}$, es desglossa en els seus components (també en kcal/mol): electrostàtic (E_{elec}), van der Waals (E_{vdW}), interna ($E_{internal}$), gas (E_{gas} és la suma dels tres termes anteriors), solvatació no-polar ($E_{nonpolar}$), solvatació polar (E_{PB}), solvatació ($E_{solvatació}$ és la suma dels dos termes anteriors), i la suma dels termes de solvatació polar i electrostàtic ($E_{PB+elec}$).

A la Taula 19 es mostra la diferència energètica, $E_{total,PB}$, entre la complexació de l'ester i de l'amida en cada orientació, i la contribució dels diferents termes que la conformen.

	central	amunt	avall	mitjana
E_{elec}	-7.95	4.94	0.30	-0.90
E_{vdW}	2.66	0.24	0.99	1.30
$E_{internal}$	-0.60	5.91	2.32	2.55
E_{gas}	-5.89	11.09	3.61	2.94
$E_{nonpolar}$	-0.10	-0.00	0.05	-0.02
E_{PB}	10.82	-3.67	2.23	3.13
$E_{solvatació}$	10.73	-3.67	2.27	3.11
$E_{PB+elec}$	2.88	1.27	2.52	2.22
$E_{total,PB}$	4.84	7.42	5.88	6.05

Taula 19 Diferències en l'energia de complexació (kcal/mol) entre els complexos amida/ -CyD-dímer i ester/ -CyD-dímer en les tres orientacions considerades (central, amunt i avall), així com la seva mitjana.

Els termes obtinguts per MM/PBSA es poden relacionar amb l'anàlisi d'enllaços d'hidrogen presentat en l'apartat de dinàmica molecular. Analitzant les diferències per orientacions tenim:

- L'orientació central afavoreix la complexació de l'ester per 4.8 kcal/mol. El terme electrostàtic afavoreix a l'amida (ja que aquesta presenta més enllaços d'hidrogen amb el *host*, com hem vist anteriorment) però el terme de solvatació polar, E_{PB} , afavoreix la complexació de l'ester (ja que aquest presenta més enllaços d'hidrogen *host*-aigua) compensant el terme anterior. La complexació de l'ester també es troba afavorida per les interaccions de van der Waals.
- L'orientació amunt afavoreix la complexació de l'ester per 7.4 kcal/mol. Els termes d'energia electrostàtica i interna afavoreixen la complexació de l'ester. El complex amb l'amida té més enllaços d'hidrogen *guest*-*host* però

menys *host-host*, resultant en una energia electrostàtica més desfavorable que la del complex amb l'ester. El dímer de ciclodextrina es troba tensionat intentant interactuar amb l'amida (presenta més interaccions que amb l'ester) produint així una pitjor energia interna. En el complex de l'ester, el dímer no es troba tan tensionat (menys interaccions *guest-host*) i té més interaccions *host-host* (millor energia electrostàtica). El terme de solvatació polar, en canvi, afavoreix la complexació de l'amida ja que aquesta presenta més interaccions *host-aigua*, però no arriba a contrarestar els termes que afavoreixen a l'ester.

- L'orientació avall afavoreix la complexació de l'ester per 5.9 kcal/mol. Els termes d'energia interna i solvatació polar afavoreixen la complexació de l'ester, però en menor grau que en les altres orientacions. Com en la complexació amunt, el dímer de ciclodextrines es troba deformat en el cas de l'amida resultant en una pitjor energia interna. El complex amb l'ester i amb l'amida presenten enllaços d'hidrogen *host-aigua* similars, la diferència en el terme de solvatació polar prové de la diferència de solvatació entre les molècules d'ester i d'amida.

Els resultats de les dinàmiques moleculars mostren complexos estables per a totes les orientacions considerades, i les energies de complexació d'aquests, $E_{\text{total,PB}}$ a la Taula 18, són prou similars per fer-nos presumir que totes les complexacions estudiades són possibles. Així doncs, totes han de ser tingudes en compte i poden coexistir donant lloc a un patró de comportament promitjat, que és el que es presenta a la última columna de la Taula 19. Amb aquesta mitjana, obtenim una preferència per la complexació de l'ester de 6 kcal/mol a $E_{\text{total,PB}}$. L'energia electrostàtica afavoreix a la complexació de

l'amida ja que aquesta presenta, en suma, més interaccions *guest-host*. La complexació de l'ester es veu afavorida per l'energia de van der Waals, per l'energia interna (en el cas de l'ester, el *host* no es troba deformat per interactuar amb el *guest*) i per la solvatació polar (degut a que la molècula d'amida és més soluble que la d'ester, com es mostra a la Taula 17).

La idea de partida d'aquest treball era "L'amida és més soluble que l'ester, però només aquest fet no pot explicar la millor complexació de l'ester". En aquest punt podem concloure que la complexació de l'ester es troba afavorida per la millor solubilitat de l'amida (3.1 kcal/mol en el terme de solvatació polar del complex mitjana Taula 19) i també per una millor energia interna en el complex de l'ester (2.5 kcal/mol en el terme d'energia interna). El terme electrostàtic desafavoreix la complexació de l'ester però es veu compensat pel terme de van der Waals que l'afavoreix. El paper de l'energia interna també l'hem pogut observar en la metodologia FEP (el terme BADH de l'última columna de la Taula 16 és el que més afavoreix la complexació de l'ester), fet que fa més plausible aquesta hipòtesi.

Tots els resultats presentats en la metodologia MM/PBSA no contenen el component entròpic. Per tal d'estimar el seu efecte, aquest s'ha calculat per a la complexació en l'orientació central de l'ester i l'amida, els resultats es mostren a la Taula 20.

	Complex amida	Complex ester	Diferència (amida – ester)
$E_{\text{total,PB}}$	-7.25	-12.09	4.84
$-T \ S$	21.27	20.09	1.18
G_{total}	14.02	8.00	6.02

Taula 20 Energia de complexació ($E_{\text{total,PB}}$ en kcal/mol), contribució entròpica ($-T \ S$ en kcal/mol), i energia lliure (G_{total} , la suma dels termes anteriors) per als complexos amida/ -CyD-dímer i ester/ -CyD-dímer en l'orientació central. La tercera columna ens mostra la diferència dels termes en cada complex.

L'efecte entròpic afavoreix la complexació de l'ester 1.18 kcal/mol. Això ho podem relacionar amb el fet que l'ester dins el complex es pot moure més lliurement que l'amida, ja que aquesta forma interaccions més fortes *guest-host* que la fixen. És important tenir en compte que l'entropia s'ha calculat per a les estructures del complex, del *guest* i del *host*, tot eliminant les molècules d'aigua. Per tant, el desordre de les molècules d'aigua no està considerat, i aquest serà diferent en els complexos de l'ester o de l'amida. Degut a que l'entropia es calcula de manera molt aproximada i té una contribució petita en la diferència de complexació (tan sols 1 kcal/mol), aquest terme només s'ha calculat per a la complexació en l'orientació central.

8.5 DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

La diferència energètica de 4.9 kcal/mol, observada experimentalment, en la complexació de l'ester i l'amida amb el dímer de α -CyD (afavorint la complexació de l'ester) ve donada per dos efectes:

- per la millor solvatació de l'amida en aigua. Al ser l'ester menys soluble té més tendència a formar el complex, aquest fet explica unes 3 kcal/mol afavorint la complexació de l'ester.
- Una energia interna desfavorable en el complex de l'amida, degut a les seves millors interaccions electrostàtiques *guest-host* que fan que el complex es trobi tensionat. D'aquesta manera, la millora que s'aconsegueix en l'energia electrostàtica es troba superada per l'empitjorament de l'energia interna. Aquest efecte explica unes 2.5 kcal/mol que afavoreixen la complexació de l'ester.

Tres mètodes han estat utilitzats per tal de demostrar aquestes interaccions. Les simulacions de dinàmica molecular ens mostren les estructures dels complexos i la seva evolució, així com els enllaços d'hidrogen presents. Les pertorbacions d'energia lliure, FEP, ens mostren la diferència energètica de solvatació i de complexació entre l'ester i l'amida. L'anàlisi MM/PBSA ens permet comparar totes els complexos obtenint les energies de complexació, i observar la contribució dels diferents termes energètics.

La metodologia FEP requereix molt temps CPU i s'han de realitzar simulacions prou llargues com per a reproduir tots el moviments moleculars (molècules d'aigua en el complex, orientacions i conformacions diferents). D'altra banda, la metodologia MM/PBSA ens dóna bons resultats qualitatius, tot i ser un mètode molt aproximatiu, en

un temps de càlcul molt inferior. Tots tres mètodes utilitzats ens porten a les mateixes conclusions i es suporten mútuament, reafirmant així la bondat de les explicacions donades per a la millor complexació de l'ester.

També és important ressaltar que l'estudi inicial ja s'havia donat per conclòs i havia estat publicat, però com que totes les metodologies ens haurien de donar el mateix resultat es va decidir realitzar pertorbacions d'energia lliure més llargues, ja que aquest era el mètode que ens donava uns valors més incoherents amb els experimentals. A partir d'aquests nous càlculs vam descobrir com altres orientacions del complex també havien de ser tingudes en compte, per tant vam refer tots els càlculs per aquestes orientacions i vam arribar a unes conclusions més acurades i fiables; ara tots els mètodes ens donaven el mateix resultat. Aquest estudi és un exemple de com un problema relativament senzill es pot convertir en un malson quan hi volem aprofundir, i també una advertència als investigadors per a què tinguem sempre present que els resultats dels càlculs inclouen una sèrie d'aproximacions i limitacions que poden esdevenir crucials en un problema determinat.

*“and now, for something completely different”
Monty Python’s*

9 EFECTE QUELAT EN DÍMERS DE β -CICLODEXTRINA: COMPLEXACIÓ AMB BISADAMANTIL-FOSFAT.

9.1 INTRODUCCIÓ AL PROBLEMA

En aquest capítol estudiarem la complexació de la molècula de bisadamantil-fosfat (en forma neutra i aniònica) amb una β -ciclodextrina, amb dues i amb un dímer de ciclodextrines unides per un pont disulfur (el mateix dímer que en el capítol de reconeixement molecular), **Figura 34**. A més de determinar quina és la geometria dels complexos formats i les causes de la complexació, també s’estudiarà l’efecte quelat, és a dir, la diferència de complexació de la molècula amb dues ciclodextrines o amb el dímer 2BCDS (aquest seria el quelat).

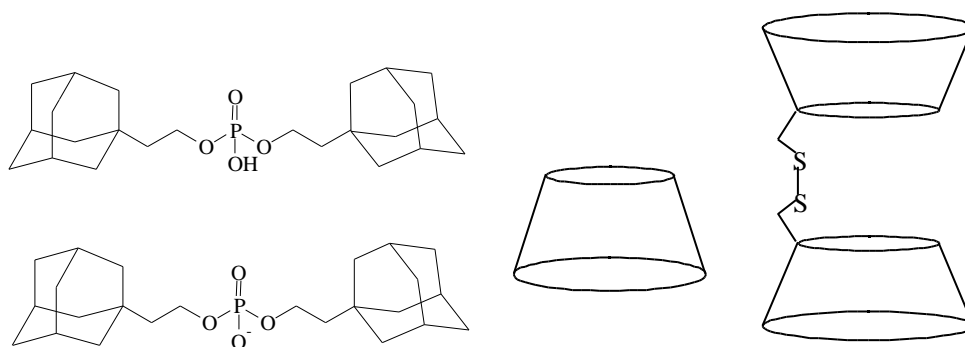


Figura 34 Molècula de bisadamantil-P en forma neutra (ADA) i aniònica (ADN), β -ciclodextrina (BCD) i dímer de β -ciclodextrina amb pont S-S (2BCDS).

S'anomena efecte quelat a la diferència de complexació d'una molècula *guest* amb un host que està compost de diverses unitats. A la Figura 35 es representa esquemàticament aquest efecte. La molècula *guest* (rectangle) es complexa amb dues unitats de la molècula cercle (*host*), les quals primer s'han d'orientar de la forma adient (i trobar-se totes tres molècules) per tal de formar el complex. En canvi, si s'utilitza com a *host* una molècula pre-ordenada (en aquest cas els dos cercles units), anomenada quelat, en resulta un complex molt similar però la complexació és més favorable que en el primer cas ja que les molècules no necessiten reordenar-se. Per tant, l'efecte quelat dóna una complexació més favorable degut a una millor entropia (no requereix tanta ordenació de les molècules com en el primer cas) de complexació.

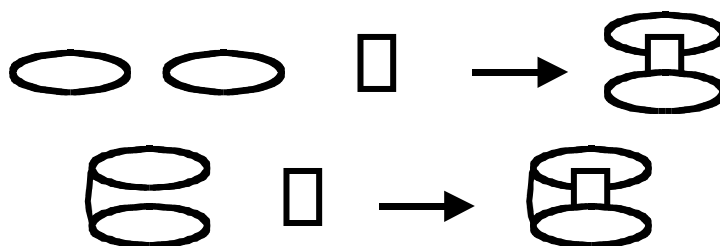


Figura 35 Representació esquemàtica de l'efecte quelat.

L'efecte quelat és clàssicament explicat pel terme entròpic⁸², però en un estudi experimental⁸³, examinant la termodinàmica de complexació, s'ha observat que l'efecte quelat es deu a una millora en l'entalpia de complexació que supera el canvi entròpic desfavorable. Aquest és el cas de la complexació estudiada en aquest capítol. Els resultats experimentals de complexació, Taula 21, mostren que la constant de complexació amb la primera molècula de ciclodextrina (ADA/BCD) és 50 vegades major que la complexació amb la segona unitat de ciclodextrina (ADA/2BCD(sec)), i es

⁸² Orgel, L.E. *An Introduction to Transition-Metal Chemistry: Ligand-Field Theory*; John Wiley & Sons: New York, **1960**; p 15.

⁸³ Zhang, B.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 9353.

suposa que la complexació amb la primera CyD interfereix geomètricament a l'aproximació de la segona unitat. Fixant-nos en l'efecte quelat observem que, l'entalpia de complexació del *guest* amb 2BCDS (-16.15 kcal/mol) és 4 kcal/mol més favorable que l'entalpia de complexació amb dues ciclodextrines (-10.84 kcal/mol), és a dir que l'efecte quelat és degut a una millora entàlpica. En canvi, l'entropia mostra un comportament contrari; és més desfavorable pel quelat 2BCDS que pel dímer 2BCD, i finalment resulta en una energia lliure de complexació del dímer (-12.27 kcal/mol) més favorable que amb el quelat (-9.89 kcal/mol). Per tant, és un comportament de l'efecte quelat completament a la inversa del clàssic, explicat anteriorment. Això es pot explicar per l'efecte de la solvatació; l'energia lliure de complexació es pot millorar amb una millor solvatació del complex (que comporta una millor entalpia a costa d'una pitjor entropia), i sembla ser que en aquest cas els canvis de solvatació són els que dominen la termodinàmica.

Complex	K_f (M^{-1})	G^0 (kcal/mol)	H^0 (kcal/mol)	$T S^0$ (kcal/mol)
ADA/2BCDS	$1.8 \cdot 10^7$	-9.89	-16.15	-6.26
ADA/BCD	$2.3 \cdot 10^5$	-7.30	-7.00	0.30
ADA/2BCD (sec)	$4.4 \cdot 10^3$	-4.97	-3.84	1.13
ADA/2BCD (tot)		-12.27	-10.84	1.43

Taula 21 Resultats experimentals obtinguts per la complexació de la molècula de bisadamantil-fosfat amb el dímer unit pel pont S-S (ADA/2BCDS), amb una - ciclodextrina (ADA/BCD), complexació amb la segona - ciclodextrina (ADA/2BCD (sec)) i el valor de complexació total amb les dues ciclodextrines (ADA/2BCD (tot)).

Per tal d'explicar aquests efectes s'han realitzat els càlculs presentats seguidament. Els detalls computacionals es detallen a l'apèndix, però hi ha detalls i aproximacions prèvies que és important tenir presents ja mateix:

- Tots els càlculs s'han realitzat amb dues formes de la molècula *guest*, el bisadamantil-fosfat, la forma neutra i la forma aniònica (anomenades ADA i ADN respectivament). La forma correcta és l'aniònica, degut a l'acidesa del grup fosfat en solució aquosa. No hem utilitzat cap contraió en els càlculs de la forma aniònica, ja que considerem que el protó estarà preferiblement interaccionant amb les molècules d'aigua de la solució enlloc de situar-se pròxim al complex.
- Els resultats MM/PBSA de les energies de complexació són utilitzats només com a valors qualitatius, proporcionant-nos una indicació de les contribucions més importants i les diferències en les complexacions. L'energia de complexació dels complexos estudiats, Taula 22, és en molts casos positiva (és a dir que la complexació no es produiria) o amb valors molt petits, si utilitzem l'energia del *host* (ciclodextrines) calculada de trajectòries independents. Recordem que en MM/PBSA l'energia de complexació ve donada per la diferència COMPLEX – GUEST – HOST. Les energies de complexació positives indicarien que els complexos no són estables però s'observa com en les dinàmiques moleculars els complexos es mantenen formats al llarg de les simulacions, amb diverses interaccions que els estableixen. El problema prové de calcular l'energia amb el mètode MM/PBSA, aquest presenta una divisió molt extrema entre energia en fase gas i energia de solvatació: ambdues acostumen a ser del mateix ordre, i al sumar-les s'obtenen valors petits que tant poden resultar en una energia de complexació positiva com negativa. Per tant, enlloc de fixar-nos en el valor absolut de l'energia

de complexació (que com hem dit pot ser positiu o negatiu), el que ens importa és la contribució de cada terme i les diferències energètiques entre diferents complexacions, les quals ens indiquen quines complexacions són més favorables. Per tal que les energies de complexació positives no ens despistin, s'ha optat per adaptar els valors del *host*, adaptats en tots els complexos per igual, de manera que el valor absolut per a cada complexació esdevé negatiu (complexació favorable), i els valors són visiblement més fàcils de comparar amb els experimentals. D'aquesta manera l'únic que varia és el valor absolut per a cada complexació, però les diferències energètiques entre els complexos (que és el que ens interessa) són les mateixes que sense l'adaptació.

Complexació del *guest* amb una ciclodextrina

	ADNB1	ADNB2	ADNB3	ADAB1	ADAB2	ADAB3
Eelectrostat	-35.28	-9.99	-9.81	-11.74	-22.82	-15.69
EvdW	-22.18	-24.35	-22.84	-19.94	-23.93	-19.66
Einternal	15.27	17.43	14.43	11.60	15.78	17.56
Egas	-42.20	-16.91	-18.22	-20.08	-30.98	-17.79
E(nonpolar)	-3.56	-3.31	-3.33	-3.12	-3.59	-3.23
E(PB)	42.72	19.63	21.50	21.62	32.06	27.90
E(solvatació)	39.17	16.33	18.17	18.50	28.47	24.67
E(PB+elect)	7.44	9.64	11.69	9.87	9.24	12.20
E(total,PB)	-3.03	-0.58	-0.04	-1.58	-2.51	6.87

Complexació del *guest* amb dues ciclodextrines, i amb el dímer unit per S-S

	ADN2BH	ADN2BT	ADN2BX	ADA2BH	ADA2BT	ADA2BX	ADN2BS	ADA2BS
Eelectrostat	-125.85	-19.84	-41.85	-80.24	-38.66	-34.53	-24.08	-21.39
EvdW	-58.82	-55.28	-50.85	-61.23	-57.18	-43.73	-47.44	-46.27
Einternal	38.91	38.98	30.91	36.97	37.27	16.24	15.24	18.57
Egas	-145.76	-36.14	-61.80	-104.50	-58.57	-62.02	-56.29	-49.09
E(nonpolar)	-8.37	-7.13	-7.27	-8.27	-7.53	-6.66	-4.77	-4.73
E(PB)	151.07	46.63	68.56	117.97	66.53	59.77	49.42	41.69
E(solvatació)	142.70	39.50	61.29	109.70	59.00	53.11	44.65	36.96
E(PB+elect)	25.22	26.79	26.70	37.73	27.87	25.24	25.34	20.30
E(total,PB)	-3.06	3.36	-0.51	5.20	0.43	-8.91	-11.64	-12.13

Taula 22 Resultats de MM/PBSA, en kcal/mol, obtinguts per la complexació de la molècula de bisadamantil-fosfat (aniònica ADN, i neutral ADA) amb una - ciclodextrina en tres orientacions inicials (taula de sobre). A la taula de sota, els resultats obtinguts en la complexació amb dues ciclodextrines (considerant tres orientacions; cap-cap (2BH), cua-cua (2BT) i cap-cua (2BX)) i amb el dímer unit per pont disulfur (2BS). Tots els resultats provenen de la diferència utilitzant trajectòries independents per a cada molècula.

	BCD indep	BCD complex	BCD usada	2BCDS indep	2BCD complex	2BCDS usada
Eelectrostat	205.10	200.89	204.05	385.37	386.27	385.59
EvdW	11.83	19.78	13.82	8.61	19.20	11.26
Einternal	207.65	223.89	211.71	437.19	452.32	440.97
Egas	424.59	444.56	429.58	831.17	857.80	837.83
E(nonpolar)	6.88	7.43	7.02	10.85	11.35	10.97
E(PB)	-149.97	-153.17	-150.77	-269.48	-276.83	-271.32
E(solvatació)	-143.09	-145.74	-143.75	-258.63	-265.48	-260.34
E(PB+elect)	55.13	47.72	53.28	115.89	109.44	114.28
E(total,PB)	281.50	298.83	285.83	572.54	592.32	577.48

Taula 23 Energia MM/PBSA, en kcal/mol, de la β -ciclodextrina utilitzant una trajectòria independent (BCD indep) i utilitzant el promig de l'energia que té en tots els complexos 1:1 (BCD complex). Els valors utilitzats en tots els càlculs següents, BCD usada, provenen d'escalar 0.75 de BCD indep i 0.25 de BCD complex. Per al dímer unit pel pont disulfur (2BCDS) s'ha realitzat la mateixa aproximació 0.75 – 0.25 per a obtenir el valor usat en tots els càlculs següents.

A la Taula 23 es pot observar el canvi realitzat en l'energia del *host*. Per a cada *host* tenim dues energies diferents, la que prové de dinàmiques independents i la que prové de l'energia que té en els complexos. Com observem, l'energia s'estabilitza molt al realitzar dinàmiques independents i d'aquesta manera l'energia de complexació resulta menys favorable, i en alguns casos positiva. Com a energia del *host* hauríem d'utilitzar la que prové de trajectòries independents, però aquesta és molt estable i resulta en energies de complexació desfavorables, positives. Per tant, s'ha aplicat un factor d'escalatge; com a energia del *host* emprarem el resultat d'utilitzar 0.75 de l'energia de la dinàmica independent i 0.25 de l'energia que té en els complexos. D'aquesta manera l'energia del *host* no esdevé tan estable i les complexacions adopten uns valors similars als experimentals. Aquest escalatge s'ha aplicat en tots els *hosts* (-

ciclodextrina i el dímer unit pel pont disulfur) i l'energia de resultant és la que s'ha utilitzat en tots els càlculs d'energia de complexació següents.

9.2 ESPÈCIES ISOLADES EN SOLUCIÓ

Les simulacions de dinàmica molecular en solució aquosa del *guest*, en forma neutra i aniònica, mostren que la molècula es plega, Figura 36, per tal d'esdevenir més soluble. Els grups adamantil, poc polars, es situen propers per tal de no interaccionar tant amb l'aigua, en canvi el grup fosfat (molt més polar) queda exposat al solvent per formar enllaços d'hidrogen amb l'aigua.

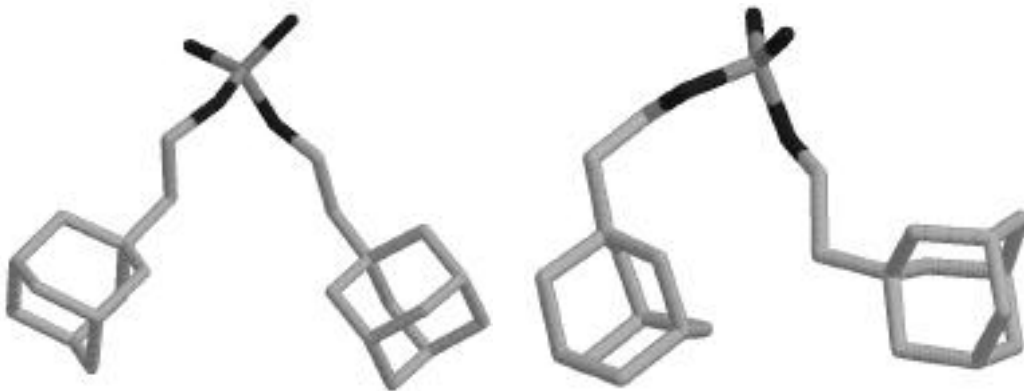


Figura 36 Conformació plegada de la molècula de bisadamantil-fosfat en solució aquosa. En forma neutra i aniònica.

Les simulacions de dinàmica molecular realitzades sobre la β -ciclodextrina i el dímer unit per pont disulfur mostren una diferència clara: el dímer 2BCDS es troba bastant tensionat degut a que l'enllaç S-S força a les dues ciclodextrines a situar-se properes, en canvi, la BCD es troba prou lliure en solució, com s'observa en les estructures promig que es mostren a la Figura 37. Aquest fet ja ens permet estipular que

la 2BCDS tindrà més tendència a formar el complex (ja té la forma adient) que no dues unitats de ciclodextrina (que s'haurien de trobar i desolvatar-se).

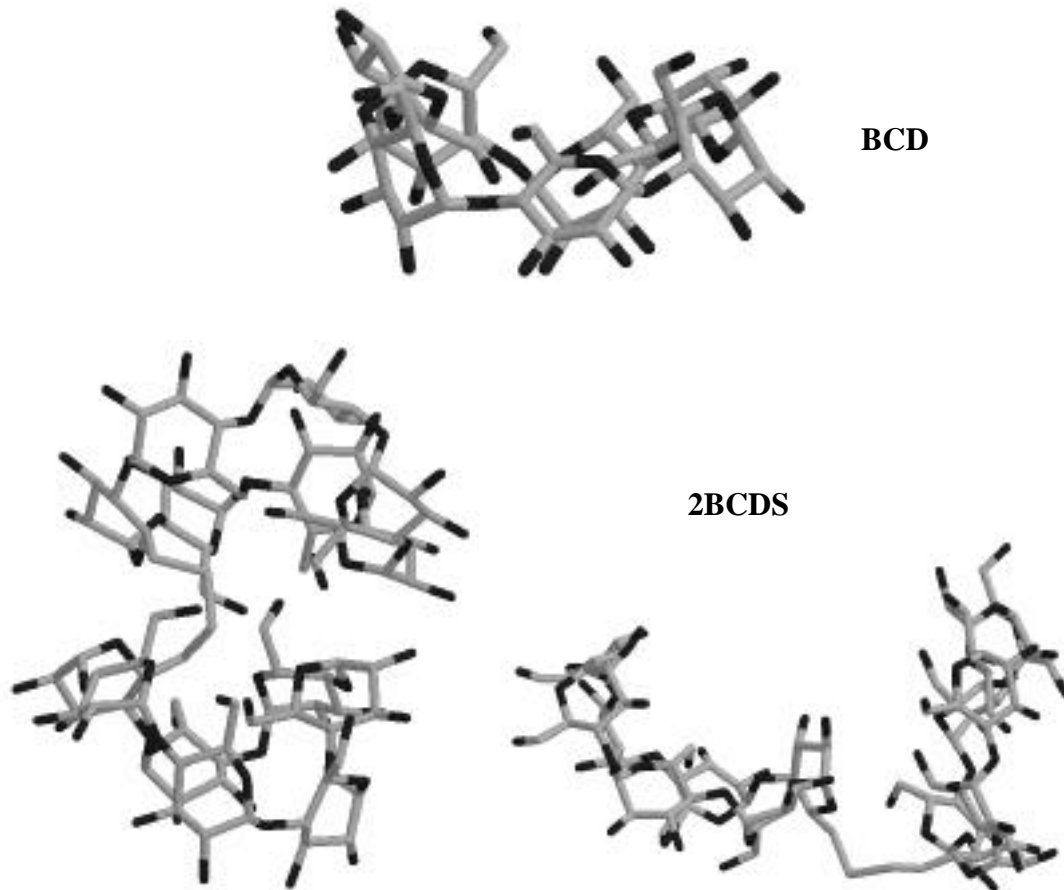


Figura 37 Estructura promig de la simulació de DM per a la β -ciclodextrina (BCD, a sobre) i el dímer unit per pont disulfur (2BCDS, a sota) en dues orientacions diferents.

El 2BCDS es manté amb les ciclodextrines molt properes durant tota la simulació, però aquestes podrien adoptar altres conformacions. Per tal de cobrir tot l'espai conformacional, hem avaluat també la possibilitat que el *host* 2BCDS es trobi en una conformació més extesa, amb les ciclodextrines separades. L'estructura promig obtinguda és la última de la Figura 37, i la seva energia calculada per MM/PBSA és similar a l'obtinguda per a l'altra orientació: presenta millor energia de solvatació polar

(els hidroxils més lliures per interaccionar amb l'aigua) i millor energia interna (menys tensionada) però aquestes millores es veuen compensades per la pitjor energia electrostàtica (menys interaccions entre els hidroxils de les dues unitats de ciclodextrina) i la pitjor energia de van der Waals (les ciclodextrines menys properes). Així doncs, l'energia resultant del *host* en qualsevol de les dues orientacions és equivalent i no canvia els resultats energètics presentats en aquest treball. Els càlculs que segueixen s'han realitzat considerant com a estat lliure del *host* l'orientació que manté les ciclodextrines juntes.

9.3 COMPLEXOS 1:1

La complexació del *guest* amb una ciclodextrina s'ha estudiat en tres orientacions inicials per tal de cobrir totes les possibilitats, aquestes orientacions es mostren a la **Figura 38**. Els complexos resultants es mostren a la **Figura 39** en les seves estructures promig al llarg de les dinàmiques.

S'ha realitzat també un anàlisi dels enllaços d'hidrogen presents en cada complexació, presentat al final del capítol (pàgina 139) a la **Taula 27**, ja que engloba totes les complexacions estudiades. És recomanable consultar-la cada volta que es mencionin els enllaços d'hidrogen dels complexos al llarg del capítol.

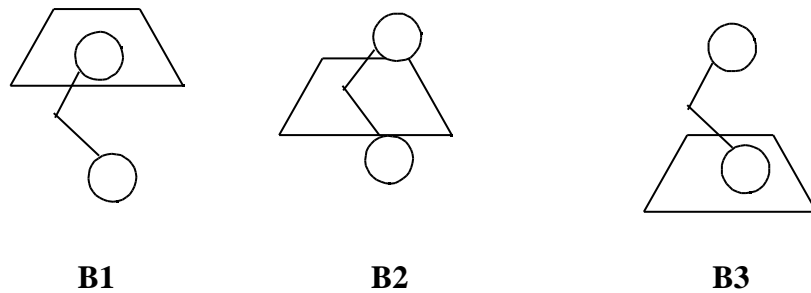


Figura 38 Les tres orientacions considerades per a la complexació de bisadamantil-P amb una ciclodextrina. Els complexos s'anomenen amb el prefix ADA o ADN per la forma neutra o aniònica del *guest* i amb el prefix B1, B2 o B3 que indica l'orientació inicial del complex.

L'energia de complexació s'ha calculat pel mètode MM/PBSA, **Taula 26**. Si ens fixem amb l'energia total, $E(\text{total}, \text{PB})$, observem que en la complexació amb el *guest* aniònic ADN es prefereix l'orientació B1 (-7.37 kcal/mol), i amb el *guest* neutre la B2 (-6.84 kcal/mol). Ara bé, si ens fixem amb l'estructura promig d'aquestes complexacions preferents, enquadrades a la **Figura 39**, observem com totes dues (aniònica i neutra) presenten una geometria similar: el *guest* es troba plegat amb un grup adamantil inclòs a la cavitat de la ciclodextrina, els oxígens del fosfat interaccionen amb els hidroxils secundaris de la CyD, i l'altre grup adamantil es troba situat fora de la cavitat. Totes les complexacions 1:1 estudiades es troben estabilitzades per interaccions electrostàtiques, $E_{\text{electrostat}}$, i de van der Waals, E_{vdW} . Les complexacions preferents, ADNB1 i ADAB2, presenten una interacció electrostàtica molt millor (més enllaços d'hidrogen *guest-host*) que supera el terme de solvatació més desfavorable (al haver més enllaços d'hidrogen *guest-host* hi ha menys complex-aigua).

guest orientació	aniònic (ADN)			neutre (ADA)		
	B1	B2	B3	B1	B2	B3
Eelectrostat	-34.23	-8.94	-8.76	-10.69	-21.77	-14.64
EvdW	-24.17	-26.34	-24.83	-21.92	-25.92	-21.65
Einternal	11.21	13.37	10.37	7.54	11.72	13.50
Egas	-47.19	-21.90	-23.21	-25.08	-35.98	-22.79
E(nonpolar)	-3.69	-3.44	-3.46	-3.26	-3.73	-3.37
E(PB)	43.52	20.43	22.30	22.42	32.86	28.70
E(solvatació)	39.83	16.99	18.84	19.16	29.13	25.33
E(PB+elect)	9.29	11.49	13.54	11.73	11.09	14.06
E(total,PB)	-7.37	-4.91	-4.38	-5.92	-6.84	2.54

Taula 26 Resultats energètics (kcal/mol) obtinguts pels complexos 1:1 emprant la metodologia MM/PBSA.

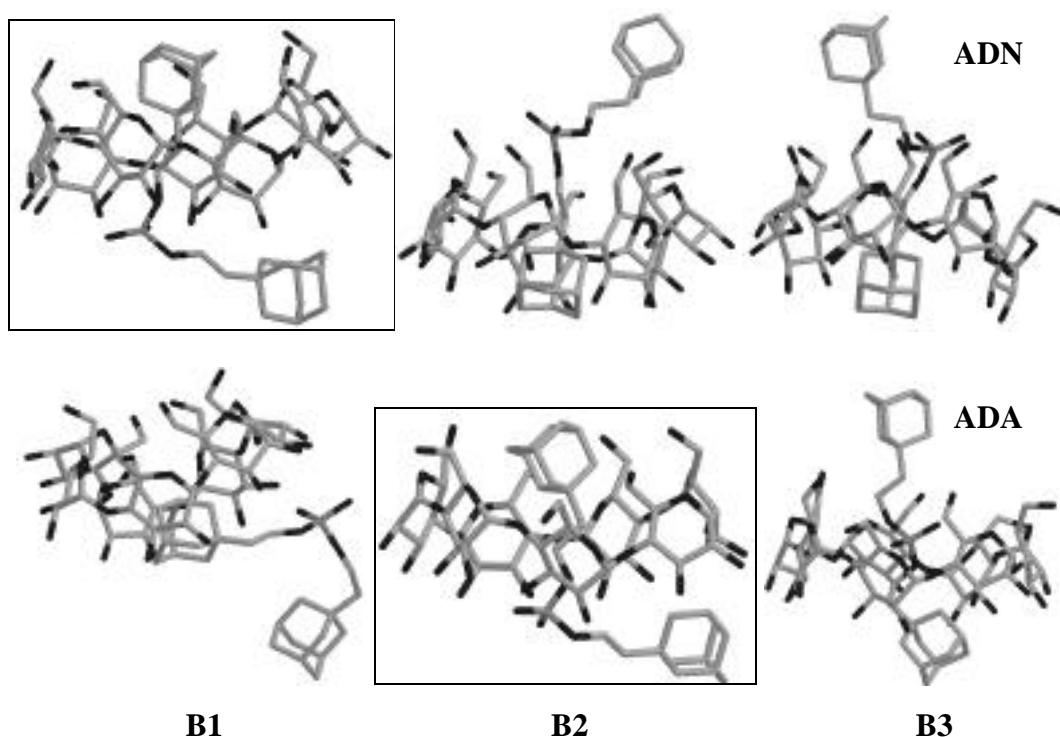


Figura 39 Estructures promig obtingudes en la dinàmica molecular dels complexos 1:1: ADN B1, ADN B2 i ADN B3 per a la forma aniònica (les tres figures de sobre), ADA B1, ADA B2 i ADA B3 per a la forma neutra (les tres figures de sota).

9.4 COMPLEXOS 2:1

La complexació del *guest* amb dues ciclodextrines s'ha estudiat en les tres possibilitats diferents esquematitzades a la Figura 41.

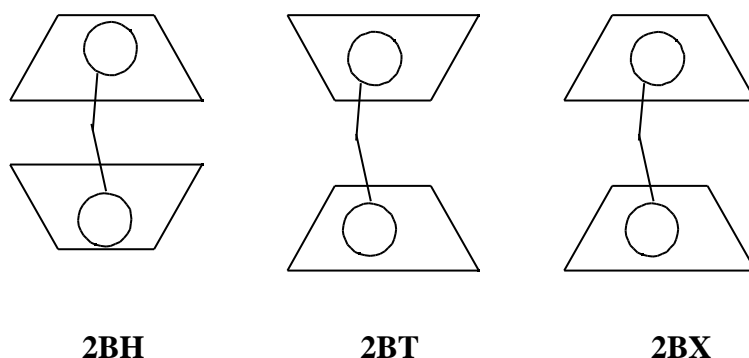


Figura 41 Les tres orientacions inicials considerades per als complexos 2:1. Orientació de les ciclodextrines cap-cap (2BH), orientació cua-cua (2BT) i orientació cap-cua (BX). Els complexos s'anomenen amb el prefix ADA o ADN (pel *guest* neutre o aniònic) i el sufix 2BH, 2BT o 2BX que indica l'orientació inicial de les ciclodextrines en el complex.

Al realitzar les simulacions de dinàmica molecular s'obtenen les estructures promig de la Figura 42. Observem que en totes les complexacions la molècula de bisadamantil-fosfat (tant en forma neutra com aniònica) es troba desplegada per tal de formar el complex i poder interaccionar amb totes dues ciclodextrines. Totes les complexacions es mantenen estables llevat de les que tenen les ciclodextrines en orientació cap-cua (ADNB2X i ADAB2X), en aquesta orientació les ciclodextrines no interaccionen prou bé i s'allunyen una de l'altra, d'aquesta manera el que obtenim és la complexació del *guest* amb una sola ciclodextrina mentre l'altra s'allunya, per tant,

aquesta complexació es descarta com a complex 2:1, tot i que els valors energètics també es presenten a les taules.

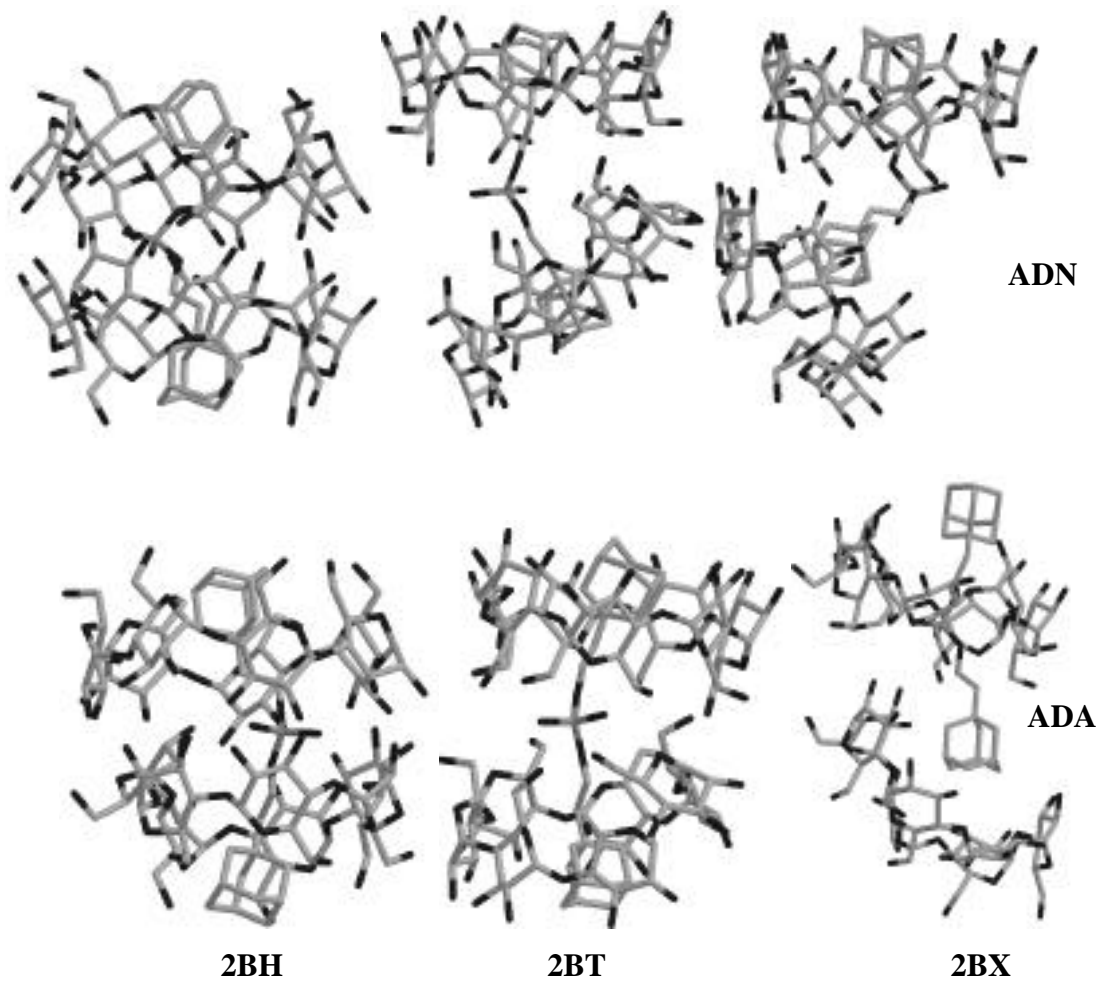


Figura 42 Estructures promig obtingudes en la dinàmica molecular dels complexos 2:1; ADN2BH, ADN2BT i ADN2BX per a la forma aniònica (les tres figures de sobre); ADA2BH, ADA2BT i ADA2BX per a la forma neutra (les tres de sota).

L'energia de complexació de la segona ciclodextrina es presenta a la Taula 27, i és calculada com l'energia del complex 2:1 menys l'energia d'una ciclodextrina i menys l'energia del complex 1:1 (ADNB1 en el cas del *guest* aniònic i ADAB2 en el neutre, ja que aquests són els complexos 1:1 més estables). Si ens fixem amb l'energia de complexació gas (sense tenir en compte el solvent), E_{gas} , observem que l'orientació

preferida és la cap-cap degut a les millors interaccions de van der Waals (el complex és més compacte) i electrostàtiques (els 14 hidroxils secundaris de cada ciclodextrina es troben enfrontats, i els oxígens del fosfat també hi poden interaccionar). Però al afegir la solvatació aquesta orientació es veu desafavorida per la mateixa raó: els hidroxils no interaccionen tant amb l'aigua ja que es troben enfrontats i interaccionant fortament per estabilitzar el complex. En el cas de tenir el *guest* neutre, aquests dos termes oposats, E_{gas} i $E(PB)$, resulten en que el complex més estable és el que té les ciclodextrines orientades cua-cua (ADA2BT), ja que en el cap-cap (ADAB2H) la pitjor solvatació sobrepassa l'estabilització electrostàtica. En canvi, amb el *guest* aniònic la complexació preferent és la cap-cap (ADNB2H) ja que la pitjor solvatació es veu sobrepassada per les interaccions electrostàtiques estabilitzants: el oxígens del grup fosfat tenen més densitat de càrrega negativa i per tant les seves interaccions electrostàtiques *guest-host* són més fortes que en el cas de la molècula neutra.

<i>guest</i> orientació	aniònic (ADN)			neutre (ADA)		
	2BH	2BT	2BX	2BH	2BT	2BX
Eelectrostat	-89.51	16.50	-5.52	-56.36	-14.78	-10.65
EvdW	-38.63	-35.08	-30.66	-39.29	-35.23	-21.79
Einternal	19.58	19.66	11.58	17.14	17.43	-3.59
Egas	-108.56	1.07	-24.59	-78.51	-32.58	-36.03
E(nonpolar)	-4.95	-3.71	-3.85	-4.81	-4.07	-3.21
E(PB)	109.14	4.70	26.63	86.71	35.27	28.51
E(solvatació)	104.20	0.99	22.78	81.89	31.19	25.30
E(PB+elect)	19.63	21.20	21.12	30.35	20.49	17.86
E(total,PB)	-4.36	2.06	-1.81	3.38	-1.39	-10.73

Taula 27 Resultats energètics (kcal/mol) obtinguts per la complexació amb la segona molècula de β -ciclodextrina, emprant la metodologia MM/PBSA.

Considerant que la molècula *guest* es troba en forma aniónica en solució, la complexació 2:1 es realitzarà en l'orientació cap-cap ADN_B2H (que també és més estable que la complexació amb el *guest* neutre). Comparant-la amb la complexació de la primera molècula de ciclodextrina observem que: l'energia de complexació amb la segona molècula (-4.36 kcal/mol) és menys favorable que la complexació amb la primera (-7.37 kcal/mol). Tot i que la segona complexació presenta interaccions electrostàtiques i de van der Waals més estabilitzants que la complexació amb la primera molècula, l'energia de solvatació és molt desestabilitzant i fa que la segona complexació sigui menys favorable.

Així doncs, no és que la complexació amb la primera molècula de CyD interfereixi geomètricament a l'acostament de la segona (com suposen a l'article experimental), sinó que és la pèrdua de solvatació del complex resultant que fa la segona complexació menys favorable. En la complexació amb la primera CyD hi havia una solvatació desfavorable (43.52 kcal/mol) però en la complexació amb la segona és molt més desfavorable (109.14 kcal/mol) degut a que la segona ciclodextrina passa d'interaccionar amb l'aigua a interaccionar fortament amb l'altra ciclodextrina ocupant així els seus grups hidroxil i els de l'altra ciclodextrina, els quals no poden interaccionar tant amb l'aigua.

9.5 ESTUDI DEL QUELAT

Per estudiar l'efecte quelat s'ha tingut en compte només una orientació de complexació del *guest* (neutre i aniónic) amb el dímer de ciclodextrines unit pel pont disulfur, Figura 43. Les estructures promig obtingudes al llarg de la dinàmica es presenten a la Figura 44; el complex es manté format al llarg de la simulació amb la molècula *guest* desplegada i les dues unitats de ciclodextrina enfrontades interaccionant entre sí.

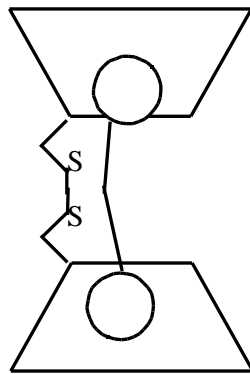


Figura 43 Orientació inicial per a la complexació amb el dímer unit per pont disulfur. ADAB2S i ADN2S amb el *guest* neutre i aniónic respectivament.

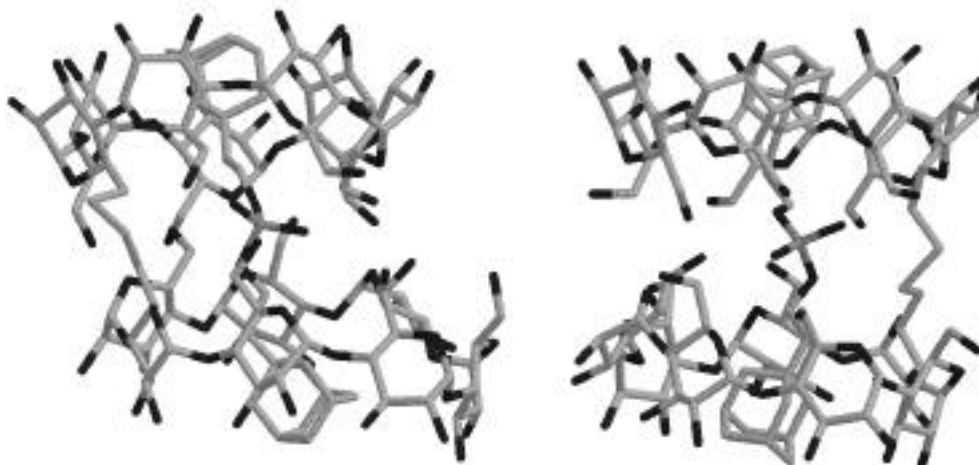


Figura 44 Conformació promig obtinguda de la dinàmica molecular del complex amb el dímer de ciclodextrines unit pel pont disulfur: ADN2BS (forma aniònica, esquerra) i ADA2BS (forma neutra, dreta).

orientació	Aniònic (ADN)			Neutre (ADA)			QUELAT	
	2BH	2BT	2BX	2BH	2BT	2BX	ADN2BS	ADA2BS
Eelectrostat	-123.75	-17.74	-39.75	-78.13	-36.55	-32.42	-24.31	-21.61
EvdW	-62.80	-59.25	-54.83	-65.21	-61.15	-47.70	-50.09	-48.91
Einternal	30.79	30.86	22.79	28.85	29.15	8.12	11.45	14.78
Egas	-155.75	-46.13	-71.79	-114.49	-68.55	-72.01	-62.95	-55.75
E(nonpolar)	-8.64	-7.41	-7.54	-8.54	-7.80	-6.94	-4.90	-4.85
E(PB)	152.67	48.23	70.16	119.57	68.13	61.37	51.26	43.52
E(solvatació)	144.02	40.82	62.61	111.03	60.33	54.43	46.36	38.67
E(PB+elect)	28.92	30.49	30.41	41.44	31.58	28.95	26.95	21.91
E(total,PB)	-11.73	-5.30	-9.17	-3.46	-8.23	-17.57	-16.59	-17.08

Taula 28 Resultats energètics (kcal/mol) obtinguts per la complexació amb dues ciclodextrines i amb el dímer unit pel pont disulfur, amb la metodologia MM/PBSA.

Per tal de comparar la complexació del *guest* amb dues ciclodextrines i amb el dímer unit per pont disulfur s'ha calculat l'energia de complexació com a [Complex – *guest* – 2BCDS] pel dímer unit i com a [Complex – *guest* – 2*BCD] pels complexos amb dues unitats de ciclodextrina, resultant els valors presentats a la Taula 28. Fixant-

nos en les complexacions amb el *guest* aniònic (ADN) observem que la complexació amb el quelat 2BCDS és més favorable ($E_{\text{(total,PB)}} = -16.59$ kcal/mol) que la complexació amb dues ciclodextrines (-11.73 kcal/mol en el complex més estable ADN2BH), en concordança amb els resultats experimentals (amb l'entalpia de complexació, Taula 21). L'orientació de les dues ciclodextrines en 2BCDS és comparable a l'orientació cua-cua (tenen els hidroxils primaris enfrontats) i així, també són comparables els complexos corresponents (ADN2BS i ADN2BT): ambdós presenten similar energia electrostàtica, de van der Waals i de solvatació, la diferència es troba en que en ADN2BS l'energia interna és menys desfavorable que en qualsevol de les complexacions amb dues ciclodextrines, i aquest terme és el que finalment ens porta a una complexació del quelat més favorable. La molècula quelat 2BCDS té les dues ciclodextrines enllaçades i al estar tan pròximes es troben tensionades (com ja hem comentat). La complexació no modifica gaire aquesta tensió; en canvi, en les complexacions amb dues ciclodextrines, aquestes s'han d'acostar per tal de formar el complex i així al complexar-se es troben més tensionades que quan estan en solució separades. Aquesta és la causa de la seva pitjor energia interna que fa la complexació del quelat més favorable.

Efecte quelat en dímers de β -CyD: complexació amb bisadamantil-fosfat

Molècula neutra	CDint	CDh-w	CD-hw	Adah-CD	Ada-hCD	Adah-w	Ada-hw	Total
ADAB1	1175.0	2594.6	5112.6	22.2	108.4	126.6	584.4	9795.8
ADAB2	1308.0	2401.6	4792.6	4.0	246.2	152.2	400.0	9304.6
ADAB3	1279.3	2500.0	5137.3	34.3	131.4	93.5	140.8	9316.6
ADAB2H	4132.0	3616.4	7880.4	180.4	454.6	0.2	62.8	16326.8
ADAB2T	2940.6	5071.4	9597.2	120.6	33.6	32.2	204.8	18000.4
ADAB2X	2610.4	5055.4	10033.8	10.8	122.8	106.8	159.6	18099.6
ADAB2S	2776.6	4741.8	9590.0	24.4	195.4	84.9	38.6	17456.2
ADA						143.9	737.9	881.8
Molècula aniònica	CDint	CDh-w	CD-hw		Adn-hCD		Adn-hw	Total
ADNB1	1272.6	2345.2	5277.0		298.6		872.4	10065.8
ADNB2	1225.2	2716.2	5456.4		87.8		901.4	10387.0
ADNB3	1189.6	2594.2	5625.8		161.4		765.2	10336.2
ADNB2H	4203.0	3233.0	8478.8		875.0		167.4	16957.2
ADNB2T	2847.8	5109.2	10691.8		234.6		745.4	19628.8
ADNB2X	2900.4	4668.6	10202.0		408.2		645.8	18825.0
ADNB2S	2964.0	4432.6	9974.0		270.2		283.4	17924.2
ADN							1286.2	1286.2

Taula 27 Enllaços d'hidrogen presents en cada complex. Dividits en els interns de la ciclodextrina (CDint), els protons de la CD amb l'aigua (CDh-w), els oxígens de la CD amb aigua (CD-hw), el protó del *guest* amb la CD (Adah-CD, només pel cas del neutre, és clar), els oxígens del *guest* amb la CD (ada/Adn-hCD), el protó del *guest* amb l'aigua (Adah-w), els oxígens del *guest* amb l'aigua (ada/Adn-hw) i el total d'enllaços d'hidrogen presents.

9.6 CANVIS ENTRÒPICS

En l'apartat anterior hem pogut explicar els valors d'entalpia trobats experimentalment en aquests complexos. Però, què passa amb l'entropia? Segons els valors experimentals, Taula 21, l'entropia en la complexació del quelat és desfavorable (unes 6 kcal/mol), en contrast amb l'entropia de complexació amb dues ciclodextrines (1.4 kcal/mol afavorint la complexació), i això fa que l'energia lliure de complexació del quelat sigui menys favorable que la complexació amb dues ciclodextrines.

L'entropia s'ha avaluat amb el mòdul NMODE del programa AMBER, tal com es descriu a l'apèndix, per a totes les complexacions estudiades, resultant en els valors presentats a la Taula 30. Totes les complexacions estudiades presenten una entropia molt desfavorable que provoca que l'energia lliure de complexació sigui també desfavorable. S'ha de remarcar que és només una estimació de l'entropia, és a dir, són valors qualitatius.

Complexacions amb la molècula aniònica (ADN)							
	B1	B2	B3	2BH	2BT	2BX	2BS
E(total,PB)	-7.37	-4.91	-4.38	-11.73	-5.30	-9.17	-16.59
T S	-19.97	-16.73	-17.83	-42.66	-36.98	-37.25	-21.19
G	12.61	11.81	13.46	30.93	31.68	28.07	4.61

Complexacions amb la molècula neutra (ADA)							
	B1	B2	B3	2BH	2BT	2BX	2BS
E(total,PB)	-5.92	-6.84	2.54	-3.46	-8.23	-17.57	-17.08
T S	-15.86	-18.94	-17.01	-40.55	-36.05	-34.74	-18.15
G	9.95	12.09	19.55	37.09	27.82	17.17	1.08

Taula 30 Energia lliure (G, kcal/mol) obtinguda per totes les complexacions estudiades, incloent la contribució entròpica (T S, kcal/mol).

L'entropia de complexació amb dues ciclodextrines és més desfavorable (de l'ordre de 35-40 kcal/mol) que amb una ciclodextrina (de l'ordre de 15-20 kcal/mol). L'entropia de complexació amb dues ciclodextrines és més desfavorable que la complexació amb el dímer unit pel pont disulfur; totalment al contrari dels resultats experimentals però en concordança amb l'explicació clàssica de l'efecte quelat.

És important ressaltar que l'entropia s'ha calculat pels complexos i les molècules que el formen ELIMINANT les molècules d'aigua, és a dir que l'ordenació o desordenació de les molècules d'aigua durant la complexació no es té en compte. Per tant, els resultats reproduïxen l'efecte quelat clàssic: més favorable ajuntar dues molècules (quelat) que tres (guest + dues ciclodextrines), però en el cas estudiat els canvis de solvatació són els que dominen la termodinàmica i són justament aquests els que no es tenen en compte en el càlcul entròpic (i sí en el càlcul entàlpic per MM/PBSA). Ara per ara és molt difícil i costós calcular els canvis entròpics de tot el sistema (les molècules que formen el complex i les aigües que l'envolten poden arribar a 5000 àtoms i s'haurien d'avaluar diferents configuracions al llarg de la dinàmica molecular), per tant, només es possible aventurar hipòtesis. En aquest cas, l'entropia que desfavoreix el quelat en front del dímer pot ser explicada per raons de solvatació: en la complexació amb dues ciclodextrines (ADN2BH) hi ha una gran pèrdua de solvatació que ens portaria a una entropia més favorable, però no en el cas de la complexació del quelat (ADN2BS) on la pèrdua de solvatació és gairebé nul·la.

Podem obtenir una idea més clara i global dels processos de complexació estudiats en l'esquema simplificat, presentat seguidament:

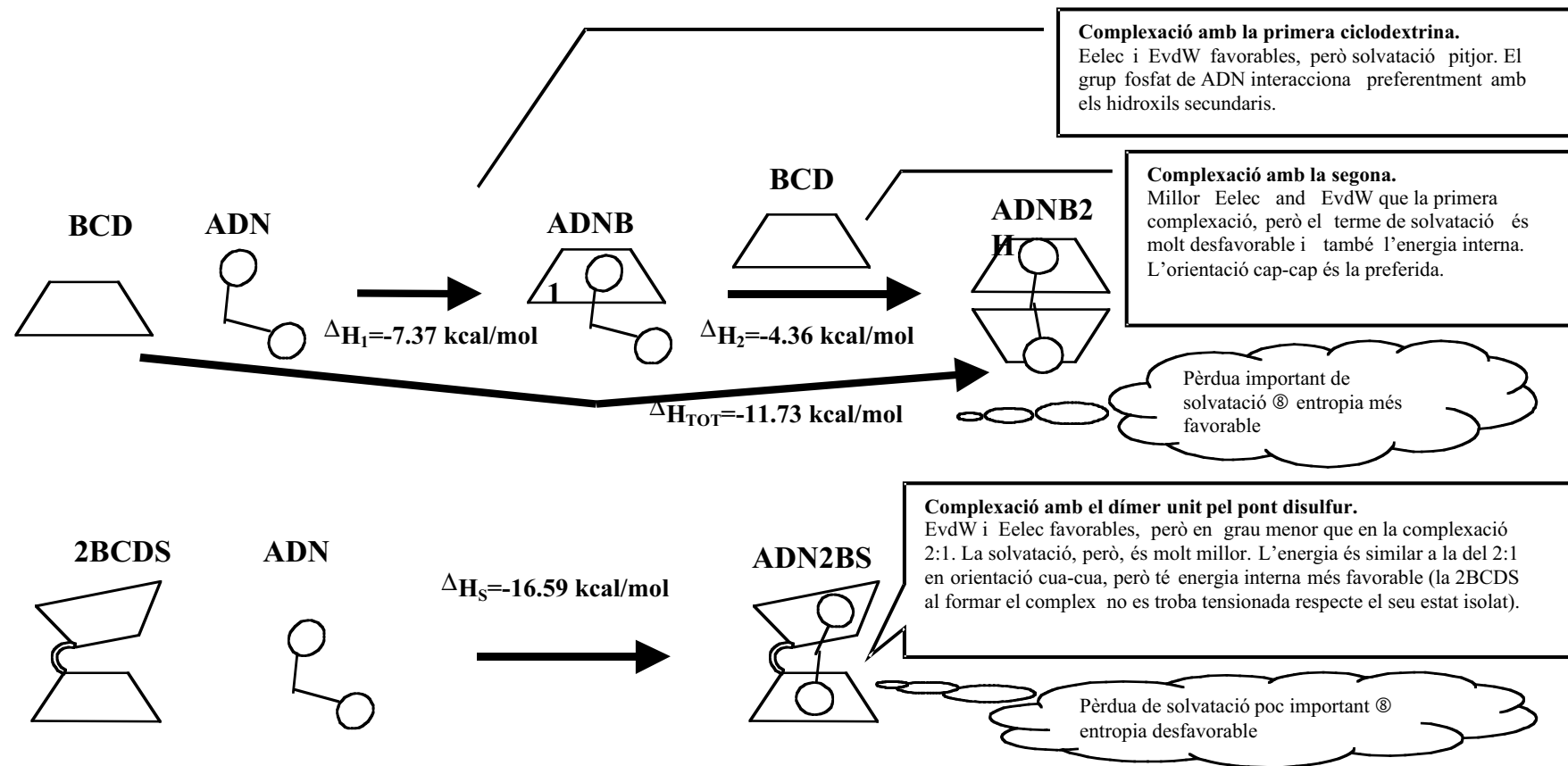


Figura 44 Esquema dels resultats obtinguts en les complexacions estudiades. Comentaris sobre entalpia en rectangles, i hipòtesi sobre entropia en núvols.

9.7 DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

S'ha estudiat la complexació del bisadamantil-fosfat amb una o dues unitats de β -CyD i amb un dímer d'aquestes unitat per un pont disulfur, com a quelat. Les constants de complexació es coneixen experimentalment, però no es coneix la geometria dels complexos.

S'ha determinat una geometria de complexació preferent per a tots els complexos estudiats. La complexació amb la segona ciclodextrina és més favorable que la complexació amb la primera, degut a l'important pèrdua de solvatació del complex resultant i també per una energia interna desfavorable. En el complex amb el quelat, l'entalpia és més favorable que no en el complex amb dues ciclodextrines degut a que la pèrdua de solvatació no és tan important i l'energia interna també és més favorable. Els resultats obtinguts corroboren i expliquen els resultats experimentals.

L'entropia de complexació experimental és més favorable pel complex amb dues ciclodextrines que pel quelat. Aquest efecte no s'ha pogut reproduir i només es poden aventurar hipòtesis, suposem que és degut a que en el càlcul no s'inclou l'efecte de les molècules d'aigua presents que han de tenir molta importància en un cas tan regit per la solvatació com aquest.

La metodologia MM/PBSA conté moltes aproximacions (sobretot la separació entre energia en fase gas i en solució) i per tant ens prenem els valors resultants com a qualitius i no quantitius. Tot i això, els valors resultants guanyen en fiabilitat al veure's contrastats i confirmats pels estudis de dinàmica molecular (geometria i estabilitat dels complexos) i els anàlisis d'enllaços d'hidrogen (que es poden relacionar amb els termes d'energia electrostàtica i de solvatació en MM/PBSA). Igual que en el

capítol anterior, la validesa de la metodologia MM/PBSA per l'estudi de complexos es veu confirmada, sempre i quan es suportin els resultats amb altres estudis i anàlisis.

*“and now, for something completely different”
Monty Python’s*

10 ESTUDI ESTRUCTURAL DE LES CICLOAMILOSES

S’han realitzat molts estudis sobre els complexos d’inclusió de les ciclodextrines i aquest treball, així com altres del nostre grup, en són un exemple. Però per tal de poder interpretar bé les dades dels complexos d’inclusió abans s’ha de conèixer el comportament de les ciclodextrines, i d’aquests estudis no n’hi ha tants. Es pren com a idea de partida, tant en estudis experimentals com en teòrics, l’estructura de con truncat de les cicloamiloses (CA), però aquesta és certa en l’estructura cristal·lina però no en solució, com revelen estudis recents on ja s’observen deformacions i molt dinamisme. Així com la seva estructura en solució, també es coneix poc la seva capacitat de formar agregats. Un estudi teòric relativament nou, realitzat per Pascal Bonnet en el nostre grup de treball, indica que les ciclodextrines comunes (α -, β - i γ -ciclodextrina) formen dímers en solució i proposa l’orientació relativa preferent d’aquests.

Per tal de poder avaluar el comportament de les CA de més de vuit unitats de glucosa, abans hem de conèixer, per les mateixes tècniques, el comportament de les CA comunes i així establir si s’observen diferències significatives. Per tant s’han estudiat tant les CA comunes, CA6, CA7 i CA8, com les de més unitats: CA9, CA10, CA11, CA12, CA13, CA14, CA26 i CA28.

L’estudi estructural de les cicloamiloses, aquí presentat, es troba en un estadi inicial; es pretén obtenir una visió global del tema i no pas ser exhaustiu ni molt concret. Es vol avaluar si hi ha canvis estructurals accentuats i clars, si aquests es poden determinar per modelització molecular, i quin o quins paràmetres energètics són els responsables.

Totes les ciclodextrines han estat estudiades mitjançant la metodologia AMBER. S'han construït utilitzant un número diferent del mateix residu de glucosa, i amb els mateixos paràmetres i condicions de càlcul. S'han realitzat simulacions de dinàmica molecular en fase gas i en solució aquosa per a cada CA, d'una durada de 5000 ps a temperatura ambient (consultar apèndix per a més detalls).

10.1 RESULTATS PROMIG OBTINGUTS EN CADA CICLOAMILOSA

S'han analitzat diferents paràmetres geomètrics i energies de les CA, els quals es presenten seguidament. Els resultats promig obtinguts dels anàlisis realitzats es debatan en més detall en el capítol 10.11.

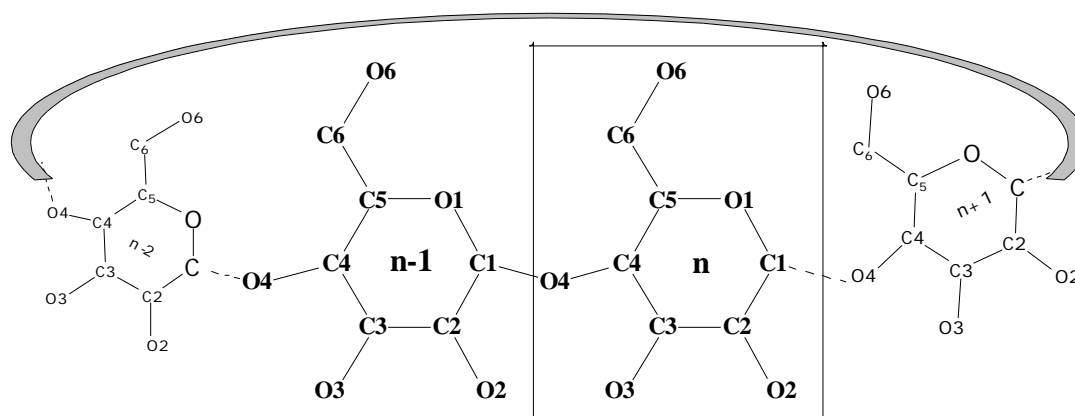


Figura 45 Representació esquemàtica d'una cicloamilosa. Es divideix en residus, unitats de glucosa (n , $n+1$, $n-1$, ...), i cada àtom s'identifica per un nom (C1, C2, C3...).

En referència als noms dels àtoms de la Figura 45, els paràmetres analitzats han estat els següents:

Distàncies:

O4(n)···O4(n+1) distància entre oxígens glucosídics.

O2(n)···O3(n-1) distància entre els hidroxils secundaris de glucoses adjacents.

Angles:

C1(n)···O4(n-1)-C4(n-1) angle de l'enllaç glucosídic entre dues glucoses.

O4(n)···O4(n+1)···O4(n+2) angle entre els oxígens glucosídics.

Diedres:

C1(n)···O4(n-1)-C4(n-1)-C3(n-1) diedre .

O1(n)-C1(n)···O4(n-1)-C4(n-1) angle . Aquest diedre i l'anterior defineixen la orientació relativa d'una glucosa respecte la del seu costat.

O4(n)···O4(n+1)···O4(n+2))···O4(n+3) angle diedre format pels oxígens glucosídics.

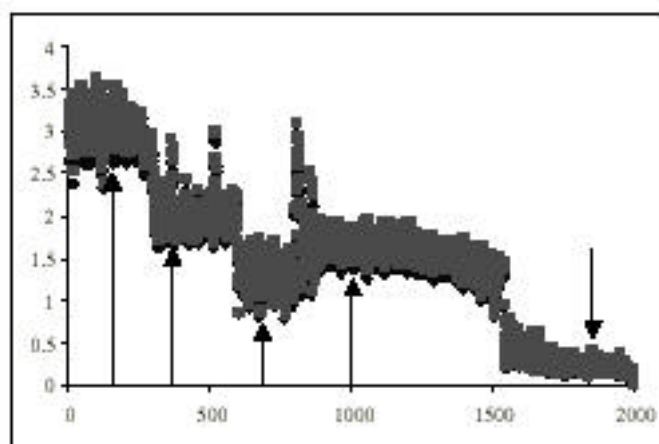
O3(n)···C4(n)···C1(n+1)···O2(n+1) diedre *flip* entre els hidroxils secundaris de glucoses adjacents.

S'han analitzat aquests paràmetres ja que defineixen l'estructura de la CA i es disposa de dades experimentals de raigs X, de les quals ja s'ha parlat a la introducció.

S'ha avaluat també, per a cada CA, la seva energia MM/PBSA i s'ha dividit pel nombre de glucoses que la conformen per veure si s'observa variació d'energia per glucosa (i quin/s terme/s en són responsables) en les diferents CAs.

Els valors obtinguts en els càlculs es comenten més endavant, a l'apartat 10.11. Podem avançar que tan en els valors dels paràmetres estructurals com en els resultats MM/PBSA no s'observen diferències clares depenent del tamany de la cicloamilosa, i les desviacions estàndard són grans: això ens indica que no ens enfrontem pas a unes estructures estàtiques i ben definides si no que són molt canviants i adopten

conformacions diferents al llarg de la dinàmica. Això ho podem comprovar realitzant l'anàlisi RMS durant la dinàmica de cada cicloamilosa: es pren com a referència l'estructura final de la simulació i s'hi comparen totes les altres estructures generades (consultar l'apèndix per a més detalls). Aquest anàlisi ens indicarà les variacions en l'estructura que tenen lloc.



Gràfica 2 Variació del RMS al llarg de la dinàmica (2000 ps) en la CA9 en fase gas.

Així per exemple, en la cicloamilosa de nou unitats de glucosa en fase gas, CA9, obtenim la Gràfica 2. Aquesta presenta diferents salts en el RMS, per tal d'observar les estructures representatives n'extraurem unes quantes (indicades per fletxes a la gràfica): la que hi ha a 200 ps, a 400, a 700, a 1000 i a 1800 ps. D'aquesta manera enlloc de quedar-nos amb valors mitjans podem veure l'evolució de l'estructura i els seus canvis més representatius.

L'anàlisi RMS s'ha fet per a totes les cicloamiloses estudiades en fase gas i en solució aquosa. A partir de la forma de la gràfica s'han triat unes quantes estructures com a representatives, que són les que es mostren als capítols següents.

Les estructures de les CA es presenten en forma simplificada: boles vermelles representen els oxígens O2 i O3 (hidroxils secundaris) i les boles blanques els carbonis C6 (que suporten els hidroxils primaris), per a les CA de major tamany també es representa la cadena principal (C1-O4-C4) com a boles de color més fosc. En els casos en què s'ha considerat adient, s'han dibuixat línies que mostren els girs de la cadena o fletxes per indicar cap on apunten certes glucoses.

També s'ha realitzat un anàlisi dels enllaços d'hidrogen presents en cada CA, que es comentarà en cada capítol després de presentar les estructures representatives.