



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Estudio conformacional de la Norepinefrina

Autor: Ángela Abengochea Sánchez

Tutor/es: Víctor Rayón

ÍNDICE

1. RESUMEN-ABSTRACT	5
2. INTRODUCCIÓN	7
3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	10
3.1. OBJETIVOS.....	10
3.2. PLAN DE TRABAJO	11
4. METODOLOGÍA	12
4.1. ECUACIÓN DE SCHRÖDINGER INDEPENDIENTE DEL TIEMPO	12
4.2. APROXIMACIÓN DE BORN-OPPENHEIMER	13
4.3. SUPERFICIES DE ENERGÍA POTENCIAL	14
4.4. MÉTODOS DE LA QUÍMICA CUÁNTICA	16
4.5. TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD	18
4.6. FUNCIONES DE BASE	20
4.7. MODELOS DE DISOLVENTE: MÉTODOS IMPLÍCITOS DE CONTINUO	21
4.8. TEORÍA DE ÁTOMOS EN MOLÉCULAS DEL PROF. RICHARD BADER	22
4.9. ANÁLISIS CINÉTICO: LA ECUACIÓN DE EYRING	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE LA (R)-NOREPINEFRINA EN FASE GAS.....	24
5.1.1. <i>Análisis inicial mediante Mecánica molecular</i>	<i>24</i>
5.1.2. <i>Análisis comparativo de las diferentes metodologías teóricas.....</i>	<i>25</i>
5.1.3. <i>Análisis geométrico de las conformaciones más estables</i>	<i>27</i>
5.1.4. <i>Termoquímica y poblaciones relativas.....</i>	<i>30</i>
5.1.5. <i>Análisis topológico de la densidad electrónica de carga</i>	<i>31</i>
5.2. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE LA NOREPINEFRINA EN DISOLUCIÓN.....	35
5.2.1. <i>Energías de solvatación.....</i>	<i>35</i>
5.2.2. <i>Geometrías de equilibrio en disolución</i>	<i>36</i>
5.2.3. <i>Poblaciones de los confórmeros en disolución.....</i>	<i>38</i>
5.3. ESTUDIO CINÉTICO	40
6. CONCLUSIONES.....	45

7. BIBLIOGRAFÍA	47
8. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	48
8.1. LISTADO DE TABLAS	48
8.2. LISTADO DE FIGURAS.....	49

1. RESUMEN-ABSTRACT

El neurotransmisor natural conocido como (R)-norepinefrina se encuentra en su forma protonada en el tejido fisiológico, debido a que su pH es 7,4. Con el fin de comprender mejor cómo interviene y se acopla a sus receptores la norepinefrina, tanto al actuar en la sinapsis como en su función como hormona; se ha realizado un estudio conformacional sobre la molécula protonada, que investiga la estabilidad de los posibles conformeros de este neurotransmisor tanto en fase gas como en disolución. Para realizar este estudio teórico se han utilizado diversas metodologías computacionales, desde métodos que emplean la mecánica molecular hasta métodos basados en la función de onda. Por último se ha realizado un estudio cinético para estimar si podría darse la interconversión entre los conformeros más estables en disolución.

The natural neurotransmitter known as (R)-norepinephrine takes the monocationic form at the physiological tissue pH of 7,4. In order to better understand how the norepinephrine operate and is coupled to its receptors, both acting on the synapse and its function as hormone, a conformational analysis of the protonated form has been performed, that investigates the stability of the possible conformations of this neurotransmitter, both in gas phase and in aqueous solution, and set up a conformational preference.

In order to perform this theoretical study, different computational methodologies have been used ranging from molecular mechanics to wave function based methods. Finally we completed this work with a kinetic study to estimate the values of the rate constant for the interconversion of most stable conformers in aqueous solution.

2. INTRODUCCIÓN

La norepinefrina es una molécula que nuestro organismo produce de manera natural y que tiene una doble funcionalidad en el organismo: como neurotransmisor y como hormona.

Junto con la dopamina y la adrenalina, pertenece a la familia de las catecolaminas, sustancias que generalmente se asocian con el estrés físico o emocional.

Su principal función fisiológica es como neurotransmisor: el funcionamiento cerebral se realiza mediante un procedimiento denominado sinapsis, que consiste en la transmisión de información de una neurona a otra para activarla o inhibirla. Los efectos finales observables en la conducta o en algún proceso fisiológico son el resultado de varias neuronas excitadas e inhibidas a lo largo de un circuito neuronal.

Las sinapsis pueden ser eléctricas (transmisión bidireccional de corriente eléctrica entre dos neuronas directamente) o químicas, donde se requieren unos intermediarios denominados neurotransmisores.

La sinapsis química se da en neuronas adyacentes con un espaciado entre ellas de unos 20 nm, este hueco es la hendidura sináptica. En ella se liberan los neurotransmisores, cuando se ha liberado una cantidad suficiente, éste ejerce sus efectos sobre las neuronas adyacentes y una vez finalizado su cometido se elimina a través de mecanismos de degradación, inactivación o recaptación. (García, R., 2014)

La norepinefrina tiene múltiples funciones. Se ha relacionado tradicionalmente con la

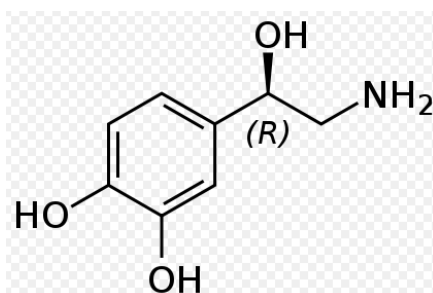


Figura 1. Estructura de la
(R)-norepinefrina

motivación, el estado de alerta y vigilia, el nivel de conciencia, apetito, conducta sexual y agresiva, la regulación del sueño... Así como la supervisión de los mecanismos de aprendizaje, memoria y recompensa.

(Redolar, D., 2013)

Como hormona del estrés, parece afectar a zonas del cerebro donde se controlan la atención y las reacciones a estímulos. Junto con la adrenalina, es responsable de la respuesta de lucha o huida, que nos prepara ante los sucesos de nuestro entorno.

Así, permite que el organismo responda adecuadamente a situaciones de estrés a través del aumento del ritmo cardíaco y presión sanguínea, dilatación de las pupilas y ensanchamiento de las vías respiratorias. También provoca el estrechamiento de los vasos sanguíneos en los órganos no esenciales, reduciendo el flujo de sangre al sistema gastrointestinal e inhibiendo el vaciamiento de la vejiga. Esto sucede porque el propio organismo establece prioridades ante un peligro (Carlson, N.R., 2006).

Es posible detallar aún más los efectos de esta sustancia según la parte del sistema nervioso en el que actúe (Cox, S.):

- Es el principal neurotransmisor del sistema nervioso simpático, y consta de una serie de ganglios situados en el pecho, abdomen y junto a la médula espinal. Éstos establecen conexiones con una gran variedad de órganos (como ojos, corazón, pulmones, vejiga...), cuya actividad se ve modificada por la norepinefrina para propiciar una reacción rápida del cuerpo a ciertos eventos.
- En el sistema nervioso central, la estructura encargada de promover un estado de excitación alerta y preparación para la acción es el locus coeruleus, que participa en mejorar el procesamiento de estímulos, disminuyendo los tiempos de reacción así como en el aumento de la atención y la concentración.

La norepinefrina ejerce sus efectos cuando se une a los llamados “receptores noradrenérgicos”, de la misma forma, las partes del organismo que producen norepinefrina o donde ésta actúa se denominan “noradrenérgicas”.

Por otro lado, una disminución de norepinefrina parece provocar tensión arterial baja, bradicardia (baja frecuencia cardíaca), disminución de la temperatura corporal y depresión.

Además de producirse en nuestro organismo, también puede inducirse con fines terapéuticos. Existe una gran variedad de fármacos cuyos efectos inciden en los sistemas noradrenérgicos de todo nuestro cuerpo.

Estos medicamentos pueden potenciar los niveles de norepinefrina o imitar algunos de los efectos de la norepinefrina ya existente, o por el contrario fármacos que ejerzan el efecto contrario. Principalmente tratan problemas cardiovasculares y ciertas condiciones psiquiátricas, especificando algunos de sus usos terapéuticos:

- Se tratan casos de hipotensión grave con la administración de norepinefrina por inyección intravenosa.
- Para casos de presión arterial alta, arritmia o insuficiencia cardíaca, angina de pecho o glaucoma, se utilizan fármacos inhibidores de norepinefrina.
- La ansiedad generalizada, el trastorno de pánico o por estrés postraumático se tratan con fármacos inhibidores.
- Mientras que los fármacos de potenciación de norepinefrina, se utilizan ampliamente para tratar la depresión.
- En casos de Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad se usan fármacos que aumenten los niveles de norepinefrina.

El pH de la sangre es de 7,4 por lo tanto, la norepinefrina en realidad se encuentra en su forma protonada en el organismo, suponiendo que es el grupo amonio el que se protona. En este estudio hemos realizado un análisis conformacional de la (R)-norepinefrina protonada por medio de diferentes metodologías teóricas.

Hasta la fecha se han publicado diversos estudios conformacionales de la norepinefrina protonada destacando de entre ellos un reciente estudio espectroscópico (Wako,H. et al, 2017) y dos estudios computacionales (Lee, DR. et al., 2011; Nagy, P. et al., 2003).

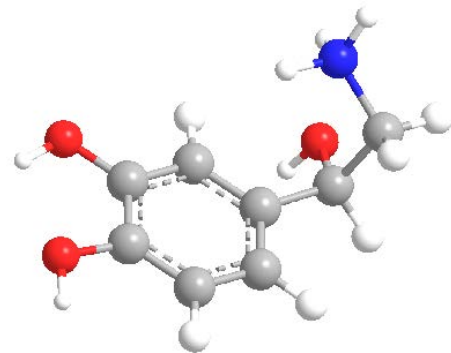


Figura 2. Estructura de la norepinefrina protonada

3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

3.1. OBJETIVOS

La finalidad de este trabajo es el análisis conformacional de uno de los principales neurotransmisores y hormonas, la norepinefrina; este estudio se realiza sobre la (R)-norepinefrina protonada, tanto en fase gas como en disolución.

Los objetivos que nos hemos propuesto cumplir en el presente Trabajo Fin de Grado son los siguientes:

- (a) Analizar la Superficie de Energía Potencial (SEP) de la norepinefrina protonada en fase gas a través de diferentes métodos teóricos lo que nos proporciona información para deducir los confórmeros más estables, y a su vez para comparar las distintas herramientas teóricas empleadas.
- (b) Desarrollar un análisis de la densidad electrónica de carga con el objetivo de racionalizar la preferencia conformacional observada.
- (c) Investigar la solvatación de los confórmeros más estables de la norepinefrina por medio de métodos implícitos de continuo.
- (d) Realizar un análisis comparativo de la preferencia conformacional en los dos medios evaluados, fase gas y disolución.
- (e) Calcular las constantes cinéticas de los procesos de interconversión interna en los confórmeros más estables, tanto en fase gas como en disolución.

3.2. PLAN DE TRABAJO

En la elaboración de este TFG se han llevado a cabo las siguientes etapas:

- a. Búsqueda de antecedentes en la bibliografía.
- b. Estudio mediante la mecánica molecular de la Superficie de Energía Potencial de la norepinefrina protonada en fase gas.
- c. Asignación de los conformeros más estables (comprendidos en un rango de 4 kcal/mol) para su posterior cálculo de las propiedades energéticas con niveles superiores de cálculo.
- d. Cálculo de las poblaciones relativas de Boltzman de los diferentes conformeros.
- e. Comparación de los resultados obtenidos.
- f. Estudio puntual de las energías para los funcionales M062X, B3LYP y MP2, aplicando el método de agregados acoplados, para los conformeros más estables.
- g. Comparación de los conformeros atendiendo a sus diferencias estructurales y energéticas así como a la topología de su densidad de carga electrónica, buscando tendencias en el comportamiento de la orientación espacial de los mismos.
- h. Estudio de la solvatación de los distintos conformeros a través de métodos implícitos de continuo.
- i. Cálculo de las constantes cinéticas asociadas a la interconversión entre los conformeros más estables en ambas fases.
- j. Elaboración de la memoria.

4. METODOLOGÍA

Toda la información utilizada para la elaboración de este apartado se ha obtenido de los siguientes libros de química computacional y química física general: (Atkins P., de Paula J., 2008), (Levine I.N., 2004), (Cramer, C.J., 2004) y (Bertrán J., 2000)

4.1. Ecuación de Schrödinger independiente del tiempo

Al resolver la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo (1) obtenemos las propiedades moleculares de un sistema compuesto por electrones. La resolución de dicha ecuación nos proporciona la energía y las funciones de onda (estacionarias) del estado fundamental como de los estados excitados del sistema.

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (1)$$

El hamiltoniano está compuesto por cinco términos: un componente de los operadores de la energía cinética de los núcleos, otro de los operadores de la energía cinética de los electrones y tres componentes de energía potencial; uno de atracción entre los núcleos, otro de repulsión entre los núcleos y por último uno de repulsión entre los electrones.

Por lo que el operador Hamiltoniano (2) presenta la siguiente forma para un sistema de n electrones y N núcleos;

$$\hat{H} = -\sum_{K=1}^N \frac{\nabla_K^2}{2M_K} - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{K=1}^N \frac{Z_K}{R_{i,K}} + \sum_{i=2}^n \sum_{j<i}^n \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{K=2}^N \sum_{L>K}^N \frac{Z_K Z_L}{R_{KL}} \quad (2)$$

4.2. Aproximación de Born-Oppenheimer

El hecho de que el Hamiltoniano (2) dependa de las coordenadas atómicas y de las nucleares hace que la ecuación inicial de Schrödinger independiente del tiempo (1) no sea posible de resolverse de manera exacta para cualquier molécula, ya que la estructura molecular más simple está compuesta por dos núcleos y un electrón, es decir, tres partículas.

Para simplificar esta problemática, se aplica la aproximación de Born-Oppenheimer, según la cual, los núcleos al ser mucho más pesados que los electrones también se desplazarán más lentamente. Por lo que podemos considerar que los núcleos se mueven tan lento que se adaptarán, de hecho, a la estructura electrónica del sistema.

Esto indica que podemos desglosar la ecuación de Schrödinger en dos ecuaciones independientes: una para los electrones moviéndose alrededor de un conjunto fijo de núcleos atómicos y otra ecuación nuclear que tome como referencia la estructura electrónica obtenida al resolver la ecuación anterior. Para el desarrollo del presente TFG es suficiente con resolver la primera ecuación, ya que no estamos interesados en describir el movimiento nuclear.

Por tanto, el Hamiltoniano electrónico representa el movimiento de los electrones en un campo de núcleos fijos, teniendo la siguiente forma:

$$H_e = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{K=1}^M \frac{Z_K}{R_{i,K}} + \sum_{i=2}^n \sum_{j<1}^n \frac{1}{r_{ij}} \quad (3)$$

Manteniendo la hipótesis de que los núcleos se mantienen fijos y, por tanto, solo teniendo en cuenta el movimiento de los electrones; en la ecuación de Schrödinger se omite la componente de los operadores de la energía cinética de los núcleos y la energía potencial de repulsión entre los núcleos es una mera constante que se puede sumar a posteriori, ya que su distancia se mantiene fija.

De esta forma la ecuación de Schrödinger electrónica se formula de la siguiente forma al trabajar únicamente con el Hamiltoniano electrónico:

$$H_e(r, R)\Psi_e(r, R) = E(R)\Psi_e(r, R) \quad (4)$$

Donde H_e es el hamiltoniano electrónico, E la energía electrónica que incluye la repulsión nuclear y Ψ_e la función de onda electrónica.

De esta manera se puede expresar la energía del sistema en función de los parámetros geométricos (distancias, ángulos de enlace, ángulos diedros): $E=E(R)$, donde R simboliza el conjunto de coordenadas o variables geométricas del sistema. La representación de la energía en función de los parámetros geométricos da lugar a la Superficie de Energía Potencial (SEP), que comentaremos en más detalle en el siguiente apartado al ser de fundamental importancia en nuestro estudio.

4.3. Superficie de Energía Potencial

Utilizando la aproximación de Born-Oppenheimer, se resuelve la ecuación electrónica de Schrödinger (4) para una configuración nuclear fija. La superficie de energía potencial se define entonces como la suma de la energía electrónica más el término de repulsión internuclear para un conjunto de configuraciones nucleares. Variando la configuración nuclear, se va a obtener E (suma de las dos energías anteriormente comentadas) en función de las coordenadas nucleares.

Una molécula de N átomos, tiene $3N$ coordenadas nucleares, de las cuales 3 son traslacionales 3 rotacionales, pero no modifican E , ya que no afectan a la distancia internuclear. Por este motivo E va a ser una función de $3N-6$ variables. En realidad la SEP es una hipersuperficie, ya que si tenemos n variables o coordenadas geométricas necesitaríamos un espacio de dimensión $n+1$ para representarla. En el espacio tridimensional (o bidimensional) se acude a cortes en la SEP o proyecciones en un plano.

Para poder realizar un estudio de la SEP, se suele emplear una aproximación, la cual considera todas las variables del sistema, pero sólo estudia aquellos puntos máximos y mínimos (puntos estacionarios o críticos), puntos para los cuales se anula la primera derivada de la energía. El estudio topológico de la SEP permite diferenciar dos tipos de puntos críticos, cuya naturaleza vendrá dada por la segunda derivada:

- Mínimos: todas las derivadas segundas de la energía son positivas. Corresponden a estructuras de equilibrio; reactivos, productos e intermedios de reacción.

- Puntos de silla de primer orden: todas las segundas derivadas positivas, excepto una negativa (máximo) a lo largo de la coordenada de reacción. Se asocian a los estados de transición. La estructura del estado de transición corresponde con el punto máximo a lo largo del camino de mínima energía o coordenada de reacción.

Para la realización de este estudio fue necesario analizar la SEP de la norepinefrina protonada buscando todos los posibles mínimos (asociados a los diferentes confórmeros del sistema). Adicionalmente, hemos realizado un estudio cinético asociado a la interconversión de dos pares de confórmeros concretos. Con este fin, fue necesario localizar los correspondientes puntos de silla de primer orden.

Una vez localizado un punto estacionario hay que comprobar que el número de derivadas segundas negativas es el correcto: cero para los mínimos y una para los de primer orden. Esto se desarrolla calculando y diagonalizando la matriz Hessiana (aquella cuyos elementos son las derivadas segundas de la energía con respecto a las coordenadas) a través de diferentes métodos de optimización. Para los puntos de silla de primer orden el vector propio asociado al valor negativo nos va a indicar la dirección de la reacción hacia reactivos o productos, por lo que se conoce como vector de transición.

Es importante destacar que la diagonalización de la matriz Hessiana proporciona a su vez las constantes de fuerza, a partir de las cuales pueden calcularse las frecuencias de vibración de cada una de las coordenadas. Estas frecuencias de vibración nos permiten por un lado obtener el espectro de infrarrojo de un confórmero determinado, que podrá compararse con un espectro obtenido experimentalmente; y por otro lado definir las propiedades termodinámicas (energías libres de Gibbs, entalpías, capacidades caloríficas, etc.). Esta última aplicación se debe a que el cálculo de las frecuencias de vibración junto con los valores de las constantes rotacionales, dependientes de las posiciones nucleares y las masas, nos permiten aplicar las ecuaciones de la Termodinámica Estadística (basadas en el modelo del oscilador armónico, rotor rígido y partícula en una caja) que se pueden consultar en los textos de Química Física mencionados en la bibliografía.

Concretamente en este estudio nos interesa la energía libre de Gibbs, cuyos valores nos permitirán obtener las poblaciones relativas de Boltzman de los distintos confórmeros.

4.4. Métodos para la resolución de la ecuación de Schrödinger electrónica

La ecuación de Schrödinger electrónica (3) ha de resolverse usando métodos aproximados toda vez que la resolución exacta no es posible, como se comentó anteriormente. Hay diferentes metodologías que permiten realizar aproximaciones para resolver esta ecuación, pero sólo se van a desarrollar aquellas utilizadas en éste trabajo, que pueden dividirse en dos grandes grupos:

- **Métodos basados en campos de fuerzas (mecánica molecular):** En esta metodología no se tiene en cuenta la energía electrónica, sino que se consideran las moléculas a través de un modelo de bolas (átomos) y muelles (enlaces). Se trata por tanto de evaluar la energía mecánica involucrada en la deformación molecular (estiramiento de enlaces, giros, torsiones, etc.). Es una aproximación muy simplificada, en la que no se toma en consideración ningún efecto cuántico y únicamente se aplica la mecánica clásica. Por lo que se suelen aplicar como primera aproximación, de la cual se van a obtener unas primeras estructuras de los conformeros, y así es como hemos usado el método MMFF en nuestro estudio.
- **Métodos mecanocuánticos:** donde se aplican las ecuaciones de la Mecánica Cuántica para el estudio de los sistemas moleculares. Aunque aumente el coste computacional y las limitaciones en cuanto a las dimensiones de la molécula de estudio, cuando se consiguen aplicar estos métodos, son mucho más potentes que los métodos de la mecánica molecular. A su vez se subdividen en:
 - I. Métodos basados en la función de onda: son aquellos que resuelven la ecuación de Schrödinger (3) a través de alguna metodología aproximada (teoría de perturbaciones, teorema variacional, etc.)
 - II. Métodos semiempíricos: parten de los métodos basados en la función de onda, pero en ellos se pueden desprejar algunos términos del Hamiltoniano o simplificar algunas integrales, despreciándolas u obteniéndolas a partir de información experimental.

- III. Métodos basados en la densidad electrónica: que resuelven el problema electrónico (3) tomando como herramienta de trabajo la densidad electrónica de carga, no la función de onda.

Los métodos basados en la función de onda (I) y algunos de los métodos basados en la densidad electrónica (III) evalúan las integrales haciendo uso únicamente de los valores de constantes universales, no haciendo uso de información experimental. Éstos se denominan métodos ab initio.

Algunos métodos basados en la densidad de carga que se consideran métodos semiempíricos, deben diferenciarse de los métodos semiempíricos clásicos (II) ya que contienen muy pocos parámetros empíricos en comparación a estos últimos. En este estudio hemos usado dos métodos semiempíricos, el AM1 y el PM3.

En el presente trabajo hemos utilizado un método basado en la función de onda que se basa en un desarrollo perturbativo de la energía de correlación hasta segundo orden y se conoce con el nombre de MP2. También hemos utilizado el método CCSD(T) [Coupled Cluster Single Double and perturbative estimation of triple excitations]. La base teórica de estos métodos es compleja y no se comentará en este trabajo.

También hemos usado varios métodos basados en la Teoría del Funcional de la Densidad, que se describen brevemente a continuación.

4.5. Teoría del Funcional de la Densidad

Basada en los teoremas de Hohenberg y Kohn, y se basa en que la energía del estado electrónico fundamental puede ser determinada mediante la densidad electrónica del sistema. Es decir, hay una relación entre la densidad electrónica y la energía. Se prueba que:

- La densidad electrónica de carga determina todas las propiedades de un sistema polielectrónico. Y, en particular, la energía electrónica de un sistema de N electrones es también un funcional (función de funciones) de la densidad, es decir, es una función de la densidad electrónica.
- La densidad asociada a la energía del estado fundamental es concretamente la densidad del estado fundamental. Cualquier otra densidad proporciona una energía más alta.

Por tanto, la energía de un sistema en su estado fundamental es funcional de la densidad electrónica, pero se desconoce la forma de dicho funcional. Sólo se dispone de aproximaciones más o menos elaboradas al funcional exacto de la densidad que se quiere obtener. Estas aproximaciones se basan principalmente en el número y tipo de componentes que incorporan, y se clasifican de la siguiente forma:

- a) *Aproximación de la densidad local (LDA)*: funcionales que incorporan únicamente información de la densidad electrónica.
- b) *Aproximación del gradiente generalizado (GGA)*: funcionales que incorporan información tanto de la densidad electrónica como de su gradiente.
- c) *Funcionales híbridos*: aquellos que además de la información de la densidad y su gradiente, añaden parte de la contribución de intercambio Hartree-Fock.
- d) *Funcionales meta-GGA*: no incorporan el intercambio Hartree-Fock pero añaden información de la laplaciana de la densidad.
- e) *Funcionales meta-GGA híbridos*: incorporan tanto parte del intercambio Hartree-Fock como la laplaciana de la densidad.

A día de hoy existen desarrollos más actuales que incorporan otras contribuciones más complejas, que no vamos a desarrollar ya que no tienen interés en nuestro estudio.

En nuestro caso, hemos seleccionado los funcionales M06L (GGA), M062X (meta-GGA-híbrido), B3LYP (híbrido) y wB97XD (híbrido); pertenecientes a distintas clases de la clasificación anterior. En la actualidad se debate la calidad de los distintos funcionales, a los que se suman nuevos desarrollos teóricos que se están publicando de forma continua.

De forma general, parece evidente que la calidad de los resultados teóricos incrementa de forma proporcional al coste computacional de la forma:

Métodos semiempíricos < Métodos basados en la densidad < Métodos basados en la función de onda

Siendo la diferencia entre las dos últimas metodologías muy pequeña y muy dependiente de los métodos concretos que se utilicen.

4.6. Funciones de base

Todas las metodologías que utilicen la mecánica cuántica para la resolución de la ecuación de Schrödinger electrónica de moléculas poliatómicas, necesitan de la ayuda de un conjunto de funciones de base que definan los orbitales moleculares como una combinación lineal de las mismas. En los métodos basados en la densidad electrónica o en la función de onda, las funciones de base son funciones matemáticas simple que no tienen que estar necesariamente relacionadas con los orbitales atómicos, por lo menos no directamente. Por lo que los orbitales moleculares se pueden expresar:

$$\phi_i = \sum_{\mu=1}^m C_{i\mu} \chi_{\mu} \quad (5)$$

Donde $C_{i\mu}$ son los coeficientes de expansión del orbital molecular y χ_{μ} son las funciones de base centradas en los átomos. Los cálculos realizados en este estudio nos proporcionan los coeficientes de expansión, ya que las funciones de base se desarrollan previamente por grupos de investigación especializados.

En este trabajo hemos utilizado un único conjunto de funciones de base, el 6-31G* (base extendida de valencia) desarrollada por Pople y colaboradores. En esta base se intenta describir mejor las capas de valencia, cada orbital interno se describe con una única función que es contracción de 6 funciones gaussianas y cada orbital de valencia es doble-zeta (dos funciones), una de ellas contracción de 3 gaussianas y la otra una única gaussiana primitiva. El término (*) corresponde a que a la base se le añade una función de polarización que tiene en cuenta los orbitales d de átomos más pesados que el H, tipo C, O, N... Esta función de polarización ayuda a describir los cambios en la densidad electrónica de un átomo en el entorno molecular.

4.7. Modelos de disolvente: métodos implícitos de continuo

Hay dos formas diferenciadas de incorporar los efectos del disolvente en una molécula. La forma más sencilla y evidente es introducir el disolvente explícitamente, incorporando moléculas de disolvente a nuestro cálculo es fase gas. Pero hay que tener en cuenta que mediante este procedimiento sólo un pequeño número de las moléculas de capas externas (primera o segunda) de solvatación pueden considerarse, ya que el coste computacional se hace demasiado elevado rápidamente.

Una segunda posibilidad es considerar al disolvente de forma implícita como un sólido, cuya constante dieléctrica es la del disolvente. El sólido tendrá una configuración tal que producirá una cavidad donde encajará nuestra molécula, no se consideran de forma explícita las moléculas disolvente. Esta metodología se conoce como métodos implícitos de continuo y proporcionan resultados fiables a un bajo coste computacional. Sin embargo, no pueden ser aplicados en aquellos casos en los que las moléculas de disolvente desempeñen un papel relevante en el proceso químico, como por ejemplo asistiendo una transferencia de protón.

Para el presente trabajo los métodos implícitos de continuo son adecuados y hemos utilizado dos de ellos: el método CPCM (Conductor Polarizable Continuum Model) y el método SMD (Solvation Model based on Density). La principal diferencia entre estos métodos es que están parametrizados a distintos niveles de cálculo, CPCM se encuentra a un nivel HF/6-31G* mientras que SMD a M062X/6-31G. Al utilizar estos modelos se pretende obtener la siguiente información:

- 1) La energía de solvatación de cada conformero, definida como la diferencia entre la energía libre de Gibbs de un conformero en disolución y en fase gas.

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{disolución} - \Delta G_{gas} \quad (6)$$

En nuestro caso hemos utilizado ambos modelos de disolvente para el cálculo de las energías de solvatación de los conformeros, con el fin de comparar los resultados.

- 2) Los cambios geométricos asociados a la adición del disolvente en los distintos conformeros, respecto a sus sendas estructuras en fase gas. Con este fin hemos

utilizado únicamente el modelo SMD ya que está parametrizado al mismo nivel de cálculo usado en fase gas.

4.8. Teoría de Átomos en Moléculas del Prof. Richard Bader

La teoría de la estructura molecular del Prof. Bader es un formalismo matemático que permite definir los conceptos de átomo en una molécula, enlace químico, y estructura molecular a partir del análisis topológico de la densidad electrónica de carga.

Las propiedades topológicas de la densidad de carga, $\rho(\mathbf{r})$, se establecen en función del número y clase de los puntos críticos (puntos de gradiente nulo $\nabla\rho(\mathbf{r}) = \mathbf{0}$). Los puntos críticos se clasifican por el par (r, s) donde r representa el *rango* (número de valores propios de la matriz Hessiana de $\rho(\mathbf{r})$ no nulas en el punto crítico), y s la *signatura* (diferencia entre el número de valores propios positivos con respecto de los negativos)

Para el estudio que hemos realizado nos interesan los puntos de rango 3 ($r=3$) que a su vez se dividen en cuatro tipos en función del valor de la signatura, s :

- (a) (3,-3). Máximo local. Se corresponde con máximos locales de $\rho(\mathbf{r})$ y se asocian a las posiciones de los núcleos.
- (b) (3,-1). Punto de silla de primer orden (dos valores propios negativos y un valor propio positivo). Se corresponden con los denominados *puntos críticos de enlace* que aparecen entre dos átomos cuando entre ellos existe un enlace.
- (c) (3, +1). Punto de silla de segundo orden (dos valores propios positivos y un valor propio negativo). Se corresponden con puntos críticos de anillo que aparecen en estructuras cíclicas.
- (d) (3, +3). Mínimo local de $\rho(\mathbf{r})$. Se corresponden con puntos críticos de caja asociados a estructuras cíclicas tridimensionales, como el cubano.

Los más relevantes para el presente trabajo son los puntos (3,-1) o puntos críticos de enlace ya que caracterizan topológicamente la existencia de enlace químico entre dos átomos. O, dicho de otra manera, para saber si entre dos átomos existe o no un enlace todo lo que

debemos hacer es buscar un punto crítico de enlace entre ellos. Este procedimiento nos permitirá caracterizar los enlaces intramoleculares en la dopamina protonada.

4.9. Análisis cinético: la ecuación de Eyring

Para finalizar este trabajo hemos realizado un pequeño estudio cinético, para evaluar la posible interconversión entre confórmeros. Para el cálculo de las constantes de velocidad hemos hecho uso de la ecuación de Eyring, que presenta la forma:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (7)$$

Esta ecuación es parte de la teoría del estado de transición (o bien, teoría del complejo activado) y equivale de modo trivial a la ecuación de Arrhenius obtenida empíricamente. Permite obtener constantes cinéticas a través de la energía libre de Gibbs asociada al estado de transición.

Esta ecuación no es muy exacta pero sí permite obtener relaciones fiables entre constantes de velocidad asumiendo que los parámetros pre-exponenciales son parecidos, lo que es suficiente para nuestro estudio.

5. RESULTADOS

5.1. Análisis conformacional de la (R)-norepinefrina en fase gas

5.1.1. Análisis inicial mediante Mecánica molecular

A través de un primer análisis conformacional a nivel de mecánica molecular, se han obtenido 38 conformaciones distintas para la norepinefrina protonada. En la siguiente tabla se recogen las energías electrónicas relativas de cada conformero:

	MMFF		MMFF
C1	0,00	C20	7,97
C2	0,94	C21	8,96
C3	2,42	C22	8,99
C4	2,78	C23	9,38
C5	3,02	C24	10,41
C6	3,55	C25	10,50
C7	3,88	C26	10,63
C8	4,52	C27	11,18
C9	4,56	C28	12,36
C10	4,84	C29	12,40
C11	4,84	C30	13,64
C12	5,47	C31	14,17
C13	5,67	C32	15,03
C14	5,73	C33	15,04
C15	6,68	C34	15,27
C16	6,69	C35	15,32
C17	6,78	C36	15,35
C18	6,78	C37	20,66
C19	7,94	C38	20,75

Tabla 1. Energías relativas (en kcal/mol) de cada uno de los conformeros de la norepinefrina protonada obtenidas por el campo de fuerzas (MMFF).

A la vista de las energías se puede estimar que los conformeros más estables son los 7 primeros (de C1 a C7), ya que la diferencia de energía es poco superior a 3 kcal/mol. Pero al ser la mecánica molecular un método de cálculo menos preciso y de resultados poco fiables; estudiaremos con métodos más precisos hasta el conformero 8, pudiendo éste presentar energías más pequeñas con niveles de cálculo superiores.

A continuación, realizaremos diferentes análisis de las energías de cada una de las 8 primeras conformaciones, utilizando distintos métodos que aumentarán progresivamente el

nivel de cálculo. De la mecánica molecular, a métodos semiempíricos, hasta métodos que utilizan la teoría del funcional de la densidad DFT y métodos basados en la función de onda.

5.1.2. Análisis comparativo de las diferentes metodologías teóricas

En la Tabla 2 se recogen los resultados de las energías electrónicas relativas de dichos conformeros, para cada uno de los métodos de cálculo utilizados:

	MMFF	AM1	PM3	M06L	M062X	B3LYP	WB97xD	MP2
C1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C2	0,95	0,92	0,67	0,41	0,43	0,44	0,47	0,51
C3	2,42	1,81	0,99	2,03	2,55	1,08	2,31	2,27
C4	2,78	2,12	1,41	2,45	2,92	1,46	2,70	2,66
C5	3,02	0,92	0,15	3,33	4,03	3,54	4,12	4,17
C6	3,55	1,50	1,41	1,36	1,49	1,39	1,51	1,54
C7	3,88	1,85	1,82	2,77	2,67	2,64	2,65	2,60
C8	4,52	1,85	2,71	2,77	2,67	2,64	2,65	2,60

Tabla 2. Energías electrónicas relativas (en kcal/mol) de los diferentes conformeros de la norepinefrina protonada: mecánica molecular (MMFF), métodos semiempíricos (AM1,PM3), métodos DFT (M06L, M062X, B3LYP, WB97xD) métodos basados en la función de onda (MP2).

Se puede observar que todos los métodos de cálculo coinciden en establecer un mismo conformero como el más estable, C1, y un segundo conformero que a determinados niveles de cálculo es prácticamente isoenergético, C2.

Los métodos DFT así como el método MP2 son los métodos más sofisticados usados en este estudio. Todos ellos coinciden en el orden de estabilidad excepto para los conformeros C3 y C4 con el funcional B3LYP cuyas energías relativas son mucho menores en comparación al resto de métodos. Salvo por esta diferencia, los resultados obtenidos a este nivel de teoría son coincidentes.

Los métodos semiempíricos generan malos resultados en general aunque sí que predicen correctamente que los isómeros más estables son C1 y C2. Sin embargo, predicen incorrectamente una alta estabilidad para C5, que es prácticamente isoenergético con C1 y C2 a este nivel de teoría.

La mecánica molecular de forma cualitativa sí que coincide con los métodos DFT en el orden de estabilidad de los dos primeros conformeros, mientras que no concuerda a partir de C3, éste incluido.

La Tabla 2 muestra resultados energéticos muy similares para los conformeros C7 y C8 a los niveles teóricos más elevados. Hemos comprobado que, en efecto, a nivel DFT y MP2, el conformero C8 se relaja geoméricamente al conformero C7. Por este motivo el conformero C8 no se discutirá a partir de ahora. Es interesante destacar que tanto el campo de fuerzas MMFF como los métodos semiempíricos predicen C8 y C7 como dos conformeros diferentes.

Para intentar solventar las dudas sobre la estabilidad de los distintos conformeros, ya que C6 no está completamente claro que sea el tercero más estable frente a C3, realizamos cálculos puntuales de energía utilizando el método de agregados acoplados conocido como CC (Coupled Cluster) sobre los que sospechamos que son los conformeros más estables después de C1 y C2.

Con este método los resultados serán más exactos, aunque el coste computacional también aumente, por lo que comparando C3 y C6 frente a C1, podremos establecer el orden de estabilidad definitivo. Los resultados de estos cálculos se recogen en la siguiente tabla:

	M062X	CC//M062X	B3LYP	CC//B3LYP	MP2	CC//MP2
C1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C3	2,55	2,03	1,08	2,10	2,27	2,06
C6	1,49	1,62	1,39	1,64	1,54	1,64

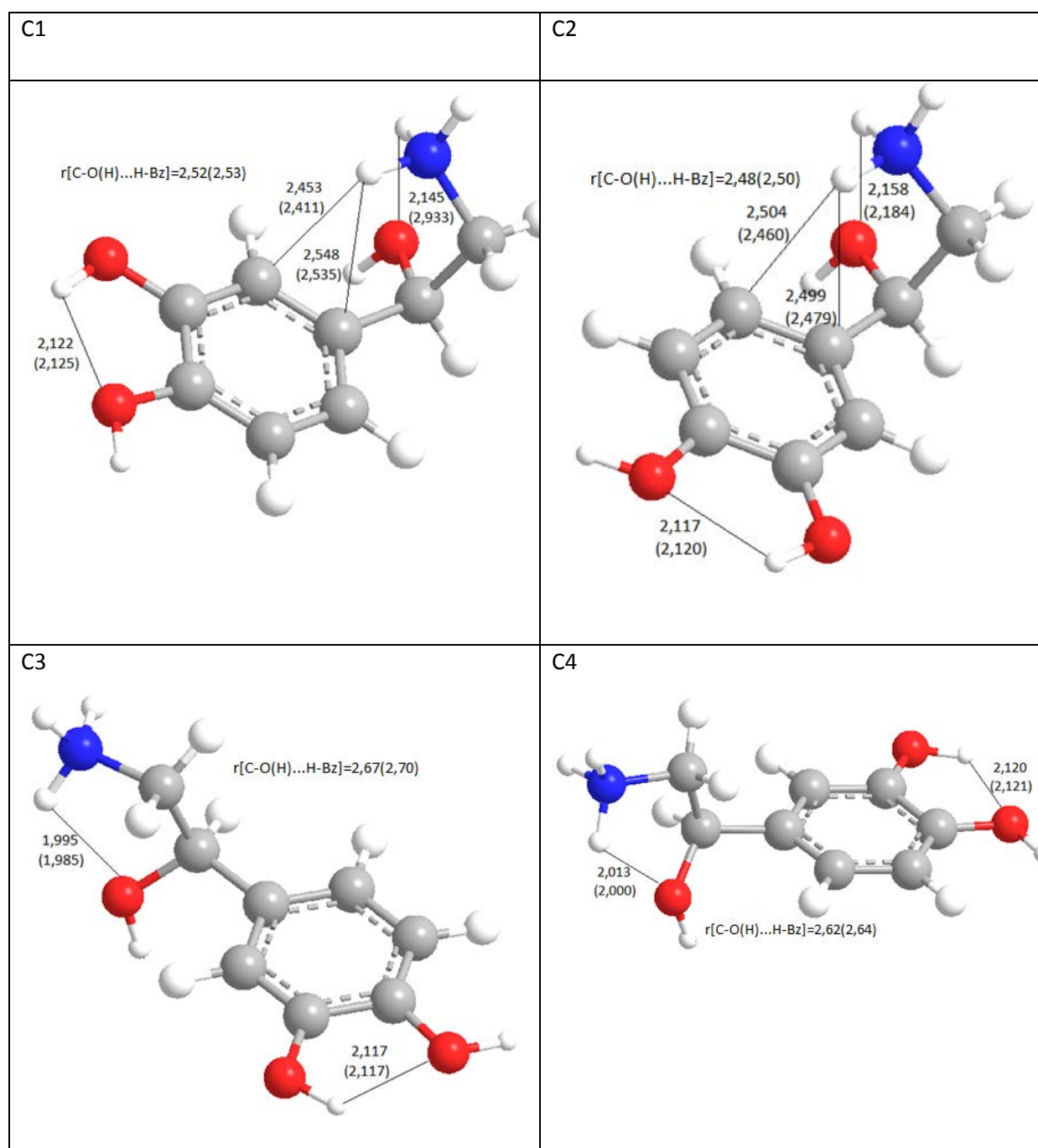
Tabla 3. Energías electrónicas relativas (kcal/mol) de los conformeros C1, C3 y C6 de la norepinefrina protonada. CC denota CCSD(T). Los cálculos CC se han realizado sobre las geometrías M062X (CC//M062X), B3LYP (CC//B3LYP), y MP2 (CC//MP2).

A la vista de los resultados presentados con el método de agregados acoplados los valores se asemejan notablemente entre los distintos métodos DFT, por lo que podemos concluir que los resultados que habíamos obtenido previamente por B3LYP pueden considerarse erróneos ya que los resultados se ajustan mejor con lo predicho por los funcionales M062X y MP2.

La diferencia energética entre C1 y C3 (2,03-2,10 kcal/mol) es mayor que la diferencia entre C1 y C6 (1,62-1,64 kcal/mol), lo que nos lleva a concluir que el tercer conformero más estable es C6. Predecimos, por tanto, en esta primera fase del estudio que el orden de estabilidad será: C1>C2>C6

5.1.3. Análisis geométrico de las conformaciones más estables

En la Figura 3 se muestran las geometrías de equilibrio de los 8 conformeros más estables de la norepinefrina obtenidas con los métodos M062X y MP2.



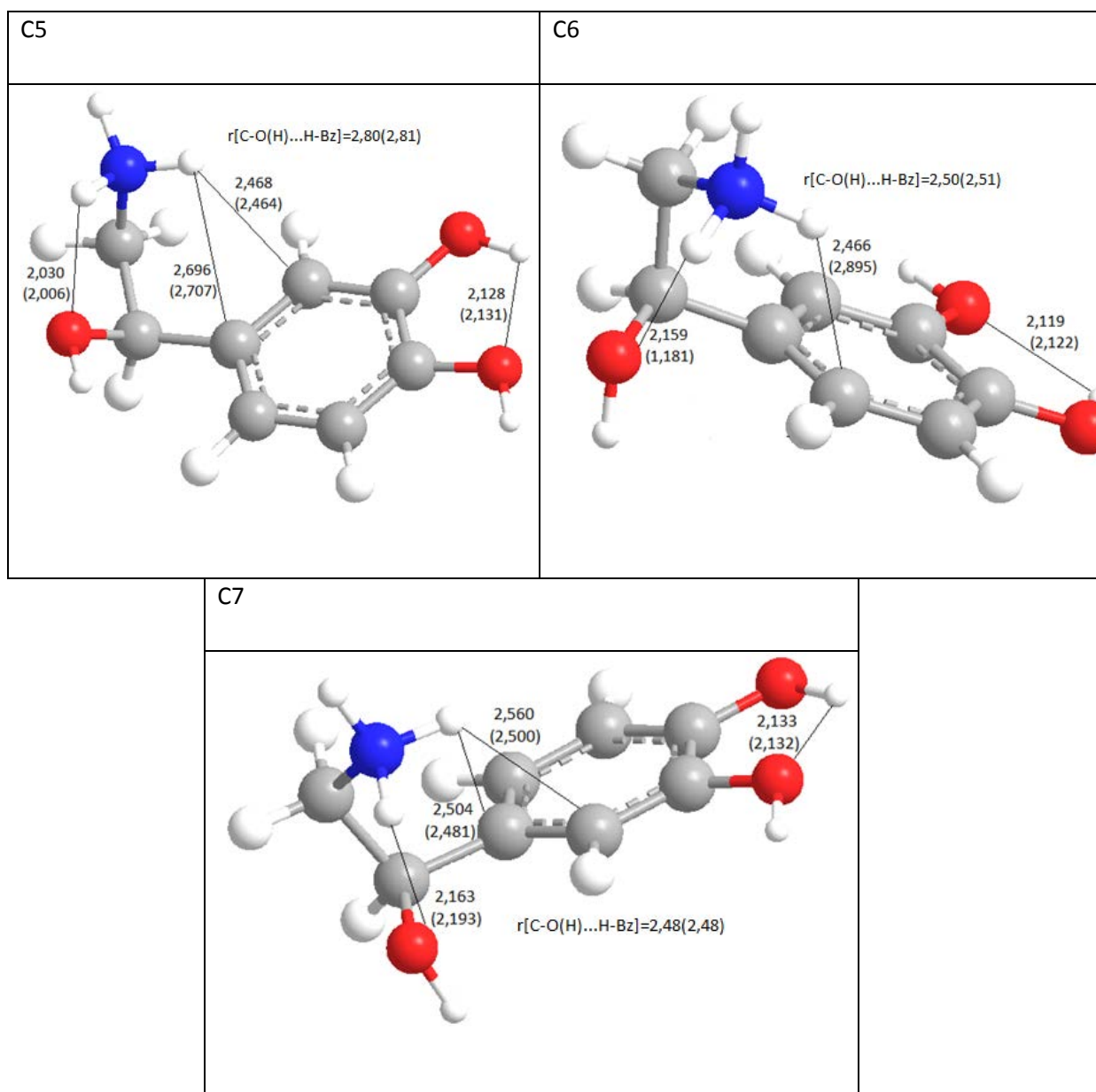


Figura 3. Geometrías de equilibrio de los conformeros más estables de la norepinefrina. Distancias de enlace expresadas en Å, valores con método M062X y en paréntesis los valores con MP2.

De forma general, la mayor parte de las estructuras son de tipo plegado (C1, C2, C5, C6 y C7), lo que favorece interacciones intramoleculares de los hidrógenos del grupo amonio con el anillo aromático. Hay que destacar, sin embargo, dos conformeros con estructura extendida (C3 y C4) donde esta interacción evidentemente no es posible. Ambos tipos de conformaciones, plegadas y extendidas, están caracterizadas por una interacción

intramolecular de hidrógeno $\text{OH(alc)}\cdots\text{NH}_3^+$ entre el hidrógeno del grupo amonio y oxígeno del grupo hidroxilo de resto carbonado. La distancia de enlace entre los dos grupos es del orden de 2,1-2,2 Å en todos los conformeros.

Otra posible interacción que estabiliza la estructura se debe a la proximidad del O alcohólico del resto carbonado con el H más cercano del anillo catecólico aunque aquí las distancias de enlace $\text{O(H)}\cdots\text{H(fenilo)}$ son mayores, del orden de 2,5-2,8 Å.

Todas las conformaciones estudiadas presentan aparentemente un enlace intramolecular de hidrógeno entre los hidroxilos del catecol. Estos hidroxilos pueden estar orientados hacia el lado menos sustituido (C1, C2, C3, C4 y C5) o hacia el lado más sustituido (C6 y C7). Las distancias de enlace se encuentran en todos los casos cercanas a los 2,1 Å.

Podemos destacar que los conformeros más estables (C1, C2 y C6) tienen en común, además del enlace $\text{OH(alc)}\cdots\text{NH}_3^+$ que estabiliza todas las conformaciones estudiadas, la cercanía del grupo amonio al anillo aromático (a una distancia de unos 2,5 Å) por lo que podemos suponer que ésta interacción representa un factor determinante en la preferencia conformacional.

5.1.4. Termoquímica y poblaciones relativas

En la Tabla 4 se recogen las energías electrónicas relativas, las energías electrónicas con la corrección del punto cero, las energías libres de Gibbs relativas y las poblaciones de Boltzmann de los 7 confórmeros más estables.

M062X (MP2)				
	ΔE	$\Delta E+ZPE$	ΔG	N
C1	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	38,25 (57,17)
C2	0,43 (0,51)	0,09 (0,48)	-0,15 (0,43)	49,42 (27,62)
C3	2,55 (2,27)	2,05 (1,78)	1,51 (1,35)	2,97 (5,85)
C4	2,92 (2,66)	2,51 (2,22)	2,01 (1,76)	1,28 (2,91)
C5	4,03 (4,17)	3,75 (3,96)	3,51 (3,53)	0,10 (0,15)
C6	1,49 (1,54)	1,21 (1,53)	1,08 (1,54)	6,17 (4,26)
C7	2,67 (2,60)	2,41 (2,53)	2,23 (2,39)	0,89 (1,02)

Tabla 4. Energías relativas electrónicas ΔE (kcal/mol) con respecto a C1 (-592,0062944 hartree/partícula). $\Delta E+ZPE$, diferencias de la suma de la energía electrónica y la energía vibracional del punto cero (kcal/mol). ΔG , energía libre de Gibbs relativa (kcal/mol). N, poblaciones de Boltzmann (%). Valores entre paréntesis: obtenidos por el método MP2.

Los resultados recogidos en la Tabla 4 muestran que no hay grandes diferencias entre las energías relativas al incluir las contribuciones térmicas y el factor entrópico. La única excepción ocurre precisamente en C2, el segundo confórmero más estable según las energías electrónicas que se convierte en el más estable a nivel M062X (por -0,15 kcal/mol). A nivel MP2, sin embargo, C2 continúa por encima de C1 aunque las diferencias de energía continúan siendo pequeñas (0,43 kcal/mol). La causa de esta diferencia entre el método DFT y MP2 radica en la diferente predicción de la frecuencia asociado al modo normal más bajo que, creemos, está sobrestimada con el método MP2. Esto causa una contribución entrópica demasiado baja a este nivel de cálculo. A falta de un análisis más profundo pensamos que la predicción M062X debería ser más correcta.

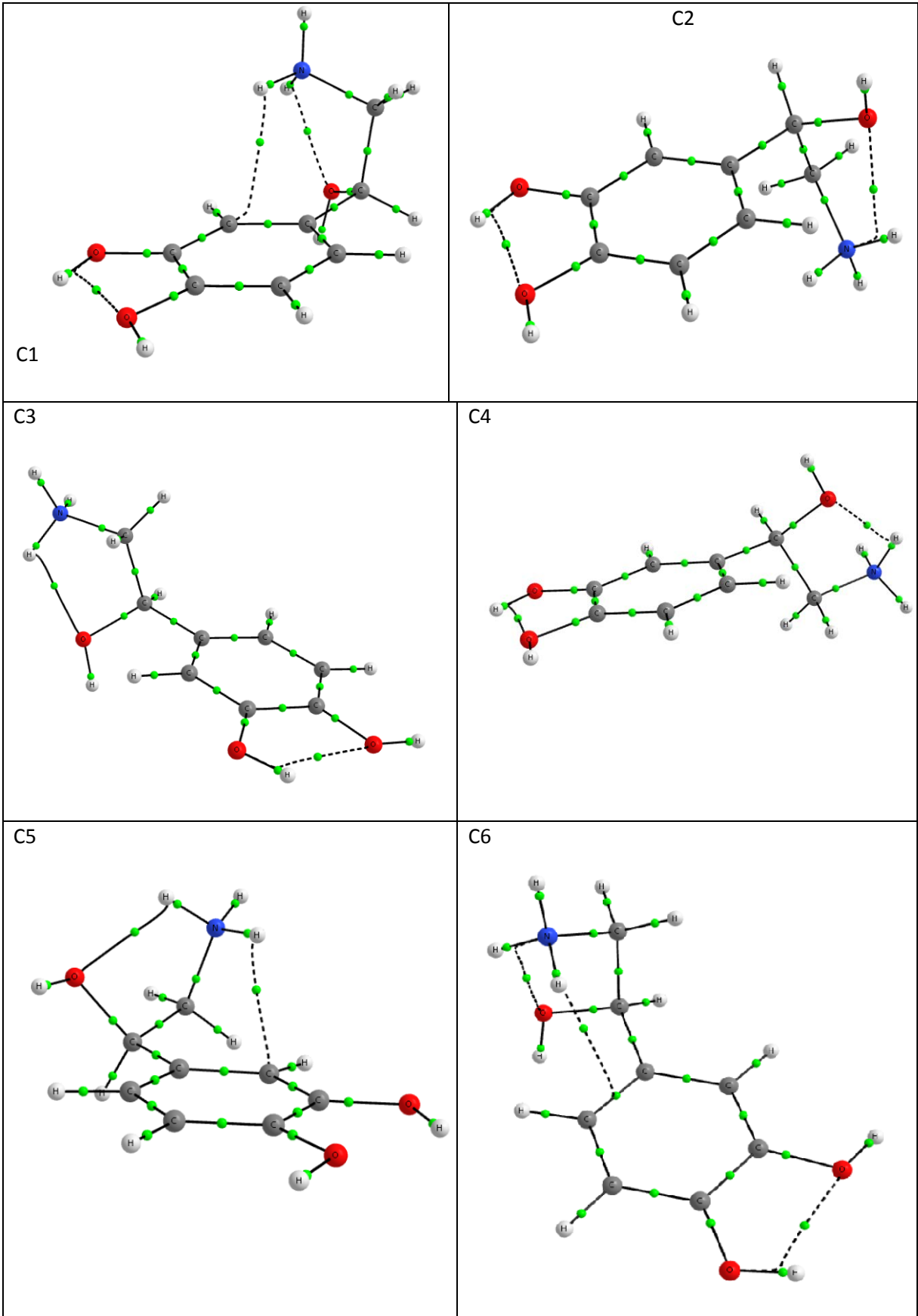
Los niveles poblacionales de Boltzmann indican que la mayor parte de las molécula de norepinefrina se van a encontrar en la forma C1 o en la forma C2, encontrarse en cualquiera de los demás confórmeros va a ser mucho menos probable, ya que su población es muy baja.

Con respecto a los resultados obtenidos por el método M062X, la forma mayoritaria es C2 ($\approx 50\%$) seguida por C1 ($\approx 39\%$); mientras que el método MP2 llega a resultados contrarios, la norepinefrina se encontrará principalmente en la forma C1 ($\approx 58\%$) seguida de la forma C2 ($\approx 28\%$). En cualquier caso, ambos métodos coinciden en que tanto C1 como C2 serán los confórmers claramente más poblados sumando más del 80% de la población total.

5.1.5. Análisis topológico de la densidad electrónica de carga

De los resultados geométricos y energéticos discutidos anteriormente podemos concluir que la interacción intramolecular $\text{OH(alc)}\cdots\text{NH}_3^+$ es más fuerte que la $\text{catecol}\cdots\text{NH}_3^+$ puesto que la primera aparece en todas las conformaciones y caracteriza precisamente las 3 conformaciones más estables. El enlace intramolecular entre los grupos hidroxilo del catecol siempre está presente aunque no parece haber una clara preferencia por su orientación hacia el lado más o menos sustituido del anillo puesto que el conformero C6 (los hidroxilos están orientados hacia el lado más sustituido) sólo está 1 kcal/mol por encima del C1.

En este apartado hemos llevado a cabo un análisis topológico de la densidad de carga sobre las siete conformaciones más estables en fase gas con el fin de buscar aquellas interacciones intramoleculares o enlaces de hidrógeno que aclaren la preferencia conformacional observada. En nuestro caso los confórmers más estables (C1, C2 y C6) tienen conformación plegada y en el caso de C1 y C2 la misma orientación de los hidrógenos de los grupos hidroxilo. En la siguiente figura se recogen las densidades electrónicas para cada conformero estudiado:



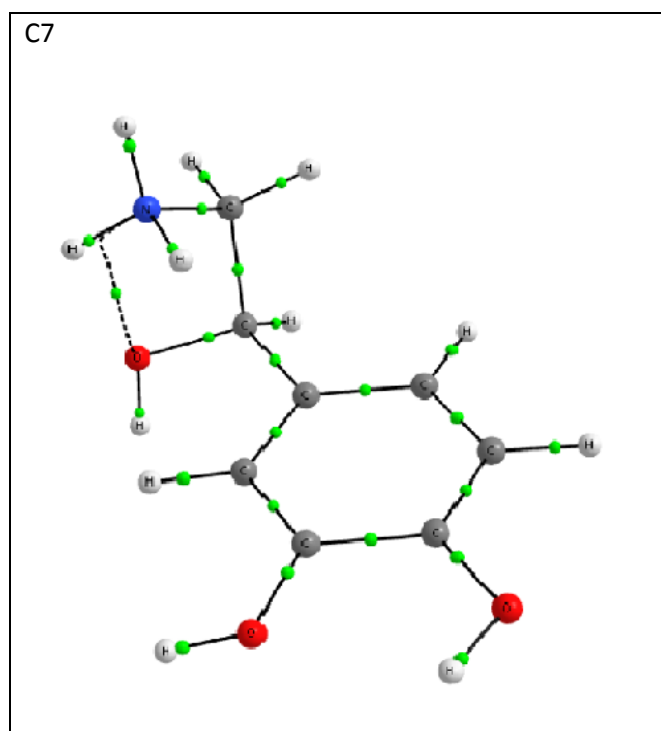


Figura 4. Análisis topológico de la densidad para las 7 conformaciones más estables de la norepinefrina protonada.

En la figura aparecen los puntos críticos de enlace (en verde) cuya interpretación se encuentra en el apartado 4.8 de metodología, pero no aparecen los puntos críticos de anillo para poder simplificar la figura y observar con más facilidad la posible formación de interacciones intramoleculares.

Como se ha discutido anteriormente hay tres posibles interacciones clave en la preferencia conformacional: (1) un enlace entre el anillo aromático y el hidrógeno más cercano del grupo amonio catecol \cdots NH $_3^+$, (2) un enlace entre el hidrógeno del grupo amonio y el hidroxilo del resto carbonado OH(alc) \cdots NH $_3^+$ y, por último, (3) un enlace de hidrógeno entre los hidroxilos del grupo catecol.

La única interacción que aparece en todos los conformeros es la (2), es decir, en todas las disposiciones geométricas más estables podemos asegurar que hay enlace entre el hidrógeno del amonio más cercano al hidroxilo y el oxígeno de éste, enlace que al aparecer en todos los conformeros no nos proporciona información sobre la preferencia

conformacional, aunque lo consideramos un factor determinante en la estabilidad de los distintos confórmeros.

Hay que tener en cuenta que el hecho de que no aparezca un punto crítico de enlace no asegura que no exista enlace, sino que la densidad no se ve fuertemente perturbada como para que ese punto crítico aparezca. Con esto en mente observamos que en C1 y C6 (primero y tercero en estabilidad correspondientemente) existen las tres interacciones, lo que explica su mayor estabilidad frente a los demás confórmeros. Mientras que en C2 (segundo en estabilidad) sólo aparecen los enlaces (2) y (3) por lo que suponemos que el enlace de hidrógeno del hidrógeno del amonio con el ciclo no es suficientemente fuerte como para seguir interaccionando cuando hay una pequeña variación geométrica. Sin embargo es esta interacción, si bien no muy fuerte pero si existente, la que justifica la preferencia de la conformación plegada sobre la extendida, ya que evidentemente este enlace está ausente en C3 y C4 (conformaciones extendidas).

Suponemos que el enlace entre los hidroxilos tampoco es lo suficientemente fuerte como para aparecer punto crítico de enlace en todos los confórmeros, pero es esta interacción la que explica la preferencia espacial de los hidrógenos de los hidroxilos mirando los dos hacia el mismo lado, buscando favorecer el enlace anteriormente citado. El hecho de que los hidrógenos se orienten hacia el lado más o menos sustituido no puede explicarse con este estudio topológico, ya que no hay una interacción intramolecular entre los hidroxilos y el grupo amonio que justifique su orientación relativa.

Como conclusión, podemos confirmar la existencia del enlace intramolecular de hidrógeno $\text{OH(alc)} \cdots \text{NH}_3^+$ mientras que la ausencia de los puntos críticos de enlace que caracterizan las otras dos posibles interacciones intramoleculares sugiere que estos enlaces no son lo suficientemente fuertes como para que el punto crítico de enlace aparezca al sufrir pequeños cambios geométricos.

5.2. Análisis conformacional de la norepinefrina en disolución

Una vez estudiada la norepinefrina en fase gas, pasamos a evaluar los distintos cambios conformacionales que sufre en disolución, ya que es como se encuentra en el organismo.

5.2.1. Energías de solvatación

En este estudio hemos seleccionado el agua como disolvente y continuamos sólo con los 7 conformeros más estables.

La Tabla 5 recoge las energías de solvatación de los diferentes conformeros así como las energías de solvatación relativas. Las cuatro primeras columnas muestran las energías obtenidas sobre las geometrías optimizadas en fase gas con los métodos CPCM y SMD. Las dos últimas columnas, por otra parte, muestran las energías de solvatación obtenidas cuando se permite relajar la geometrías de los conformeros en disolución.

	$\Delta G_{\text{solv}}^{\text{gas}}(\text{CPCM})$	$\Delta\Delta G_{\text{solv}}^{\text{gas}}(\text{CPCM})$	$\Delta G_{\text{solv}}^{\text{gas}}(\text{SMD})$	$\Delta\Delta G_{\text{solv}}^{\text{gas}}(\text{SMD})$	$\Delta G_{\text{solv}}^{\text{opt}}(\text{SMD})$	$\Delta\Delta G_{\text{solv}}^{\text{opt}}(\text{SMD})$
C1	-72,73	0,00	-68,69	0,00	-72,13	0,00
C2	-73,21	-0,48	-69,16	-0,47	-72,77	-0,64
C3	-75,40	-2,67	-70,76	-2,07	-75,46	-3,33
C4	-75,85	-3,12	-71,30	-2,61	-75,12	-2,99
C5	-72,21	0,52	-69,44	-0,75	-72,76	-0,63
C6	-74,31	-1,58	-70,15	-1,46	-73,87	-1,74
C7	-75,24	-2,51	-71,12	-2,43	-74,81	-2,68

Tabla 5. Energías libres de Gibbs de solvatación ΔG_{solv} (kcal/mol) para distintos métodos y energías libres de Gibbs de solvatación relativas $\Delta\Delta G_{\text{solv}}$ (kcal/mol) con respecto a C1. Nivel de cálculo M062X/6-31G*.

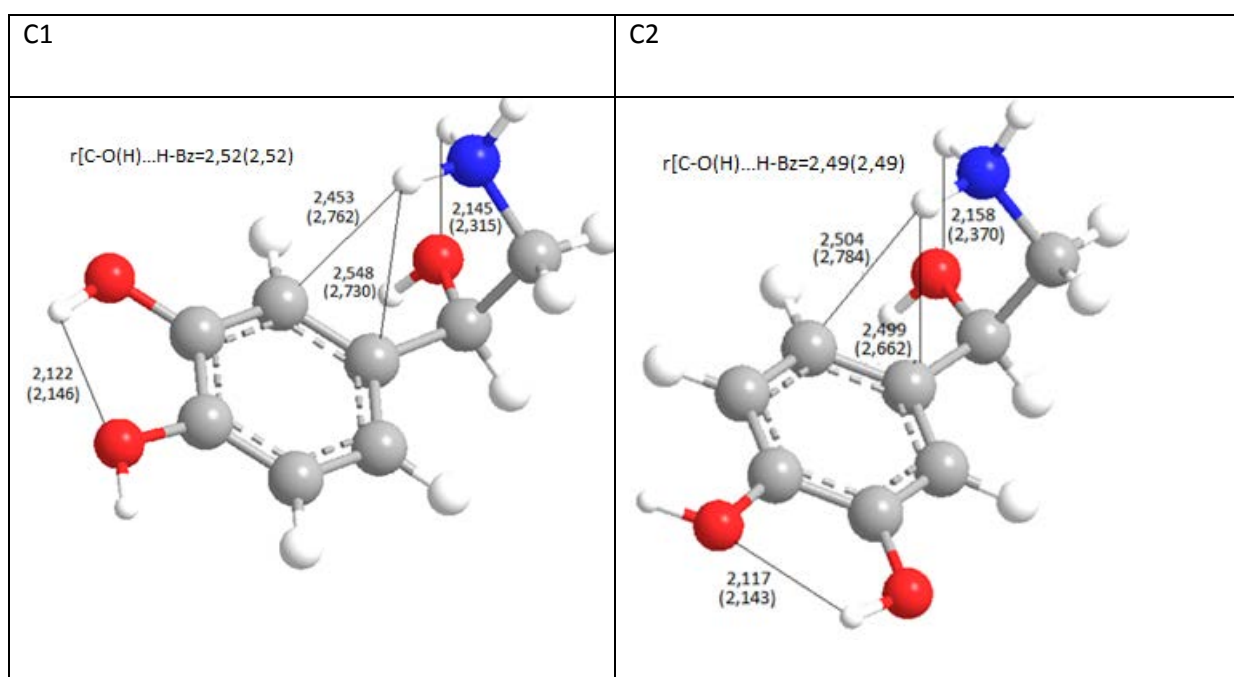
Las energías de solvatación mostradas en la Tabla 5 son altas, del orden de las 70-76 kcal/mol, dado que el soluto está cargado positivamente y el disolvente es polar. Por otra parte, los dos modelos de solvatación utilizados proporcionan resultados muy semejantes. Una conclusión interesante de los resultados recogidos en la Tabla es que no hay, aparentemente, cambios geométricos importantes al pasar de fase gas a disolución puesto que las energías de solvatación SMD usando ambas geometrías como referencia son muy parecidas, salvo quizá en C3. Un análisis geométrico más detallado de los conformeros en disolución se discutirá más adelante.

Evaluamos los resultados de las energías de solvatación de las distintas conformaciones, obteniendo que las más favorablemente solvatadas son C3 y C4, en lo que concuerdan cualitativamente todos los métodos utilizados. Al nivel más elaborado, SMD con optimización de geometrías, C3 y C4 se estabilizan 3 kcal/mol más que C1 en disolución.

Esta estabilización adicional de los conformeros C3 y C4 se debe a que tienen una estructura de tipo extendida. Aparentemente, el grupo amonio tiende a interactuar más con las moléculas de agua cuyos O^{2-} son más nucleófilos, que con el anillo π relativamente poco nucleófilo. Por esto las estructuras extendidas, donde el grupo amonio está alejado del anillo se favorecen las interacciones con el agua, lo que estabiliza el conformero.

5.2.2. Geometrías de equilibrio en disolución

En la Figura 5 se muestran las geometrías de equilibrio de los seis conformeros más estables de la norepinefrina obtenidas con el método M062X tanto en fase gas como en fase condensada.



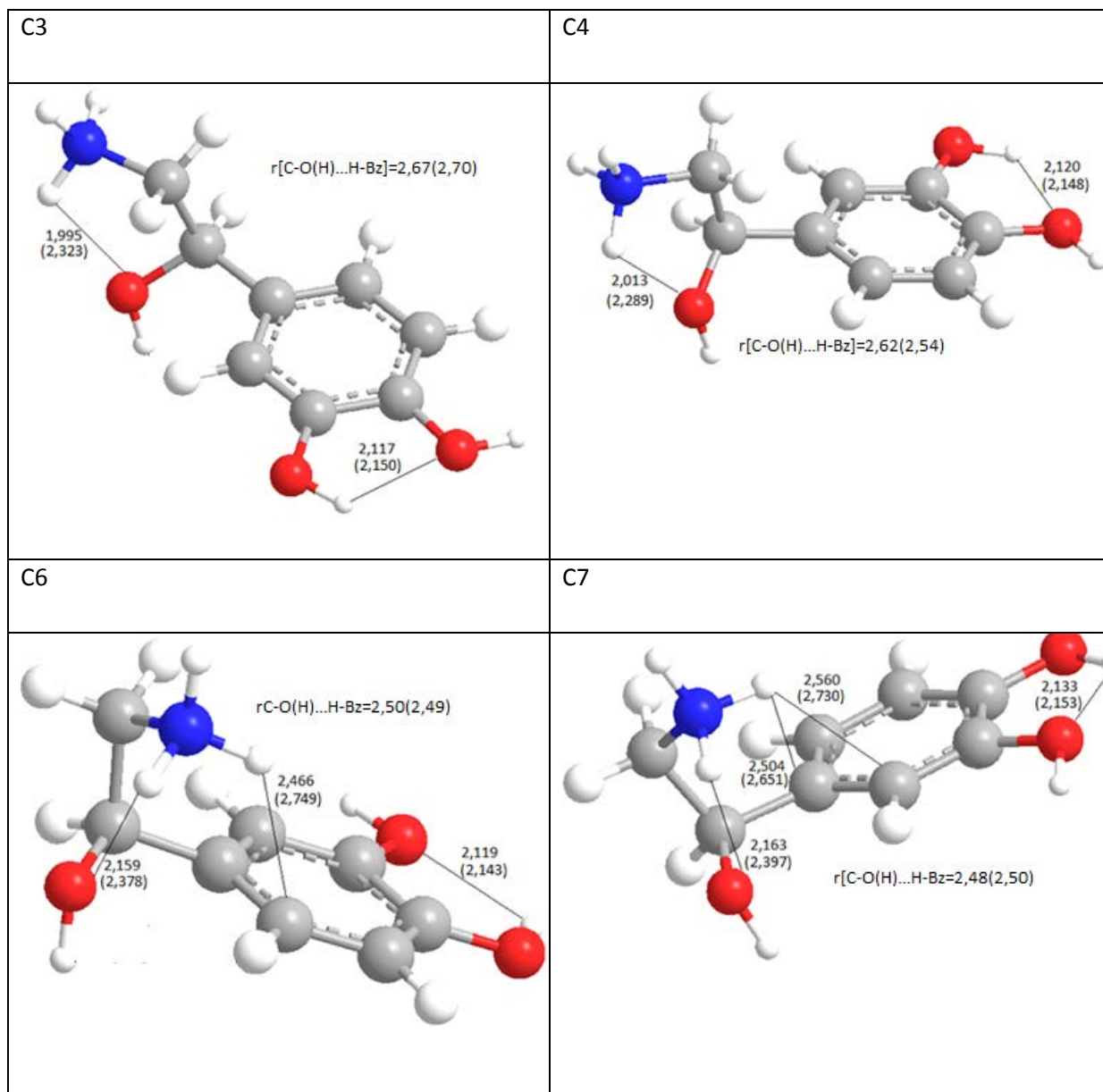


Figura 5. Confórmeros de las geometrías más estables. Distancias de enlace en fase gas con el método M062X y en paréntesis distancias de enlace en disolución; todas ellas expresadas en Å. El confórmero C5 no aparece en esta figura por motivos que se discuten en el texto.

A la vista de lo observado en las figuras, las estructuras no varían significativamente de fase gas a disolución, sus distancias de enlace no sufren mucha variación. Esto está de acuerdo con lo comentado anteriormente y justifica que las energías de solvatación no muestren diferencias importantes usando las geometrías en fase gas o disolución como referencia.

La única excepción es el conformero C5 que sí sufre una variación geométrica considerable en fase condensada. En concreto, el grupo amonio rota colocándose por encima del grupo –OH del resto carbonado, podemos observar el cambio estructural en la Figura 6. De hecho, hemos comprobado que la geometría de C5 en disolución coincide con la de C2, por lo que en fase condensada sólo tenemos uno de los dos conformeros que hemos continuado denominando C2.

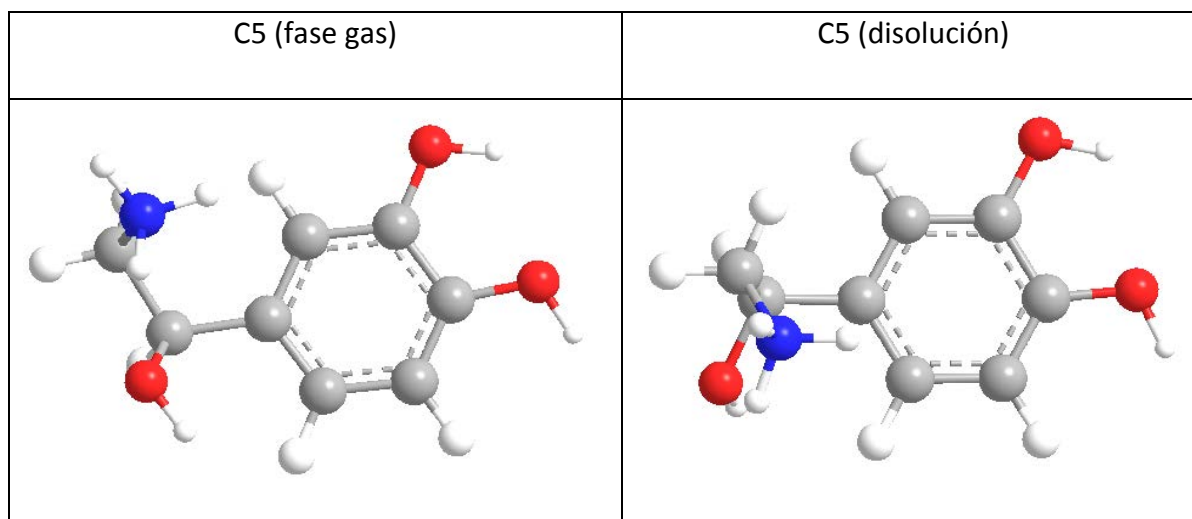


Figura 6. Comparación de las estructuras en fase gas y en disolución del conformero C5.

5.2.3. Poblaciones de los conformeros en disolución

La Tabla 6 recoge las energías libres de Gibbs relativas en fase gas de los 6 conformeros considerados y ya discutidas anteriormente junto con las energías libres de Gibbs en disolución obtenidas con los métodos CPCM y SMD sobre las geometrías en fase gas (segunda y tercera columnas) y en disolución (cuarta columna). La quinta columna muestra las poblaciones de Boltzmann en disolución que se han calculado tomando las energías libres SMD con geometrías optimizadas en disolución.

	ΔG^{gas}	$\Delta G^{\text{gas}}(\text{CPCM})$	$\Delta G^{\text{gas}}(\text{SMD})$	$\Delta G^{\text{disol}}(\text{SMD})$	N
C1	0,00	0,00	0,00	0,00	2,72
C2	-0,15	-0,63	-0,62	-0,79	10,40
C3	1,51	-1,16	-0,56	-1,82	58,61
C4	2,01	-1,11	-0,59	-0,98	14,14
C6	1,08	-0,50	-0,38	-0,66	8,33
C7	2,23	-0,28	-0,21	-0,45	5,80

Tabla 6. Energías libres de Gibbs relativas en fase gas y en disolución con distintos métodos, respecto al conformero C1. Todas ellas expresadas en kcal/mol. Nivel de cálculo M062X. N, poblaciones de Boltzmann expresadas en %.

Dadas las altas energías de solvatación de los conformeros C3 y C4 discutidas anteriormente, y la escasa separación energética en fase gas con respecto de C1 y C2, no es sorprendente encontrar que C3 y C4 son los conformeros más estables en fase condensada estando C3 claramente más favorecido que C4 (por una diferencia de 0.84 kcal/mol). Los siguientes conformeros en estabilidad son C2 > C6 > C7 siendo C1 el menos estable en disolución. Es interesante hacer notar que las 6 conformaciones se encuentran en un rango pequeño de 1.82 kcal/mol.

Consecuentemente con estos resultados las poblaciones de Boltzmann están más repartidas que en fase gas donde dos conformeros acumulaban el 84-87% de la población total mientras que ahora el 86% se reparte entre cuatro conformeros. El conformero más poblado es claramente C3 (55,30%) seguido de C4 (13,34%) y C2 (9,81%). En fase gas el conformero más poblado era C2 (49,42%) a nivel M062X o C1 (57,17%) a nivel MP2 con C3 y C4 mostrando poblaciones muy reducidas menores del 6%.

5.3. Estudio cinético

Hemos realizado un estudio de los posibles estados de transición entre los conformeros más estables y, por tanto, los más poblados. Se consideran tres posibles cambios conformacionales:

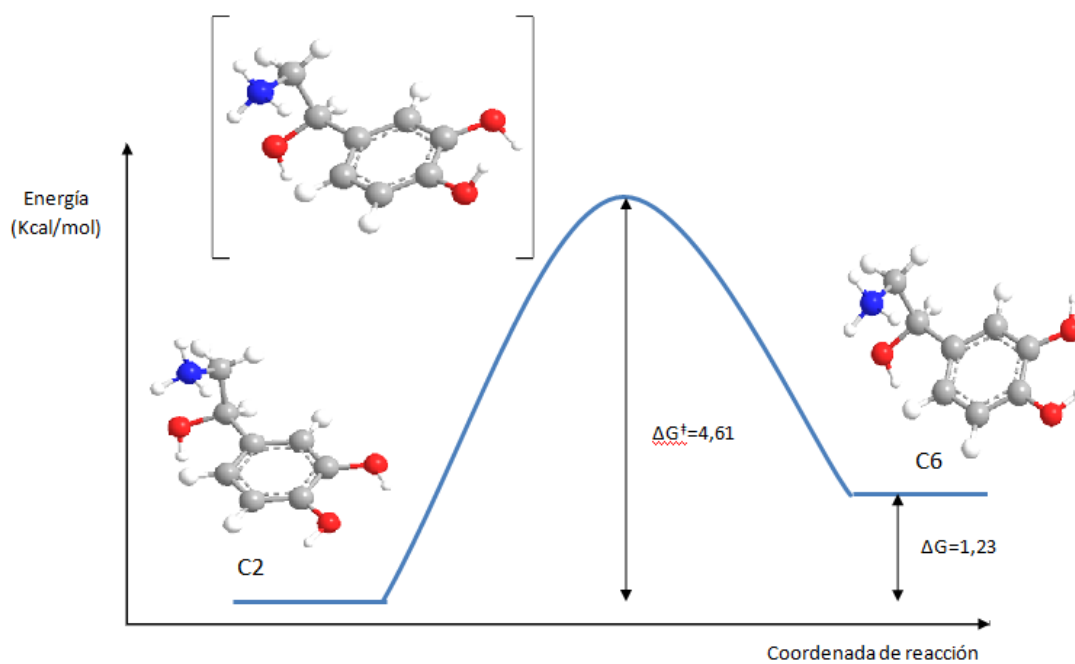
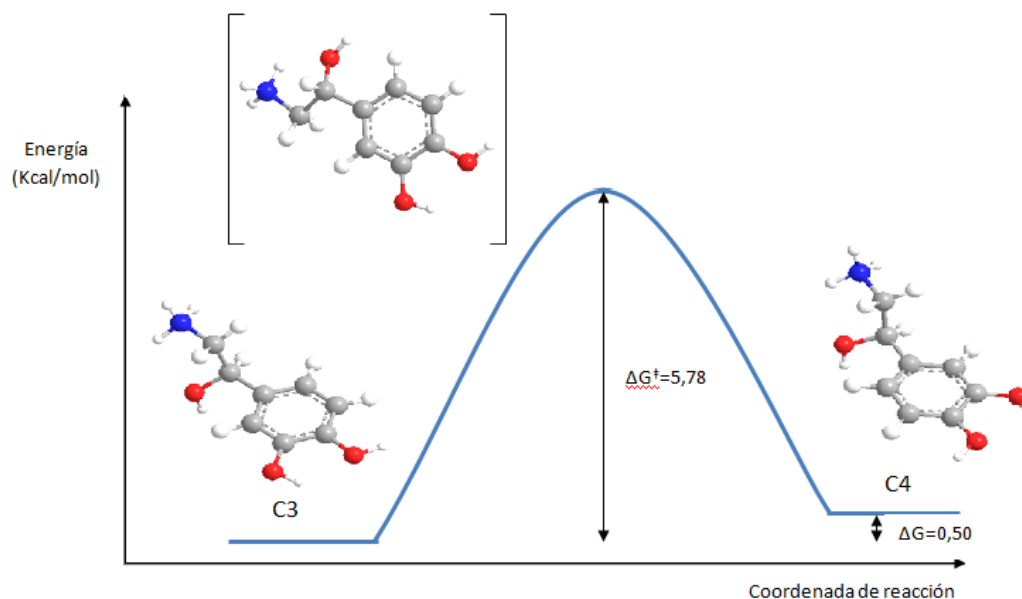
1. Asociado a la orientación del brazo (resto carbonado) respecto al anillo catecólico, la pareja de conformeros involucrada que vamos a analizar es **C3→C4**.
2. Relacionado con la orientación de los grupos hidroxilo, que vamos a estudiar a través de la transición **C2→C6**.
3. Cambio de conformación plegada a extendida, cuyas barreras cinéticas vamos a evaluar en la transición **C2→C4**.

En todos los casos se buscaron los estados de transición que conectan estos conformeros en la superficie de energía potencial, tanto en fase gas como en disolución. Los perfiles de reacción se representan en las figuras 7 y 8, en fase gas y disolución acuosa respectivamente. En estas figuras todas las barreras de interconversión se dan con respecto al conformero más estable. Vamos a ir comentando cada transición de forma individual:

- 1) El cambio conformacional comienza con la rotación del brazo carbonado, en concreto del enlace C(catenol)-C(HOHCH₂NH₃⁺), provocando que todo el resto carbonado (grupo amonio e hidroxilo) se orienten hacia abajo. En el estado de transición el enlace entre el carbono del brazo y el carbono del ciclo se encuentra en el mismo plano que el benceno.
- 2) Este movimiento comienza con el hidrógeno del lado menos sustituido del ciclo, que empieza a orientarse hacia arriba lo que provoca que el hidrógeno del otro hidroxilo gire hacia abajo, completándose así la transición. El estado de transición presenta los hidrógenos con orientación enfrentada.
- 3) El cambio de conformación se inicia con la traslación del enlace C-N hacia arriba, pasando por el estado de transición donde el grupo amonio está a media recorrido entre arriba y abajo.

De la información obtenida de las figuras podemos concluir que las barreras de transición son mayores en fase gas (para las transiciones 1 y 2 del orden de 5 kcal/mol,

mientras que para la transición 3 del orden de 7 kcal/mol) que en disolución (del orden de 3 kcal/mol y 6 kcal/mol respectivamente) por lo que podemos predecir que el cambio conformacional se da más fácilmente en disolución. Todas las barreras son relativamente altas debido al coste energético que supone romper los enlaces de hidrógeno intramoleculares (los del grupo amonio con el ciclo y con el grupo hidroxilo del brazo, y los existentes entre los hidroxilos).



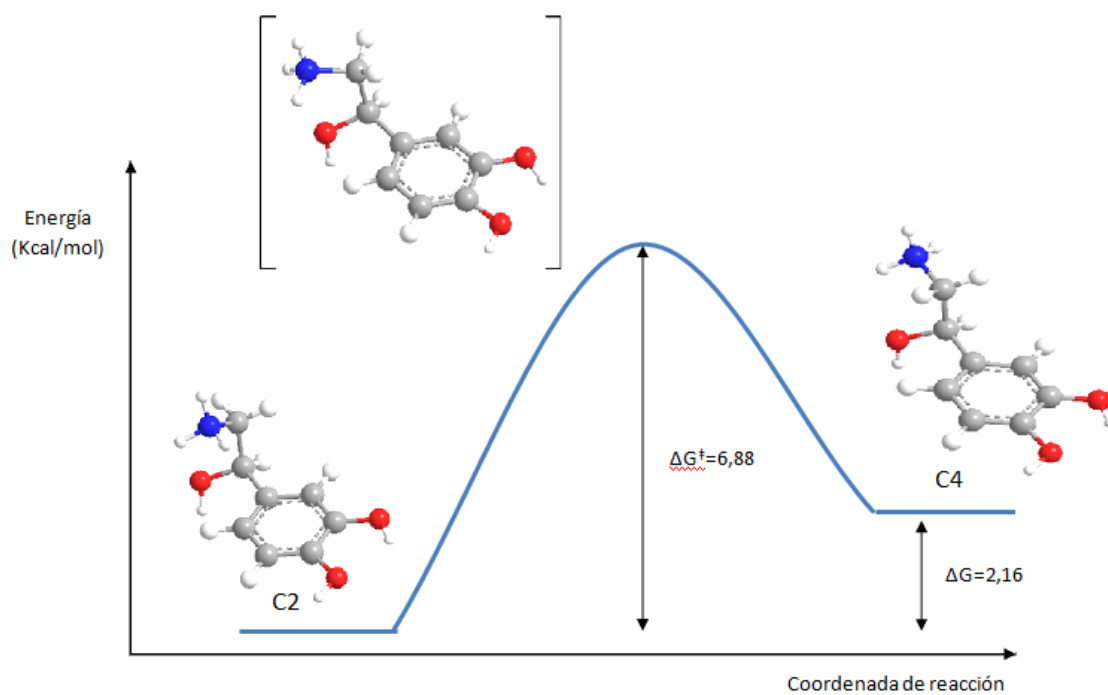
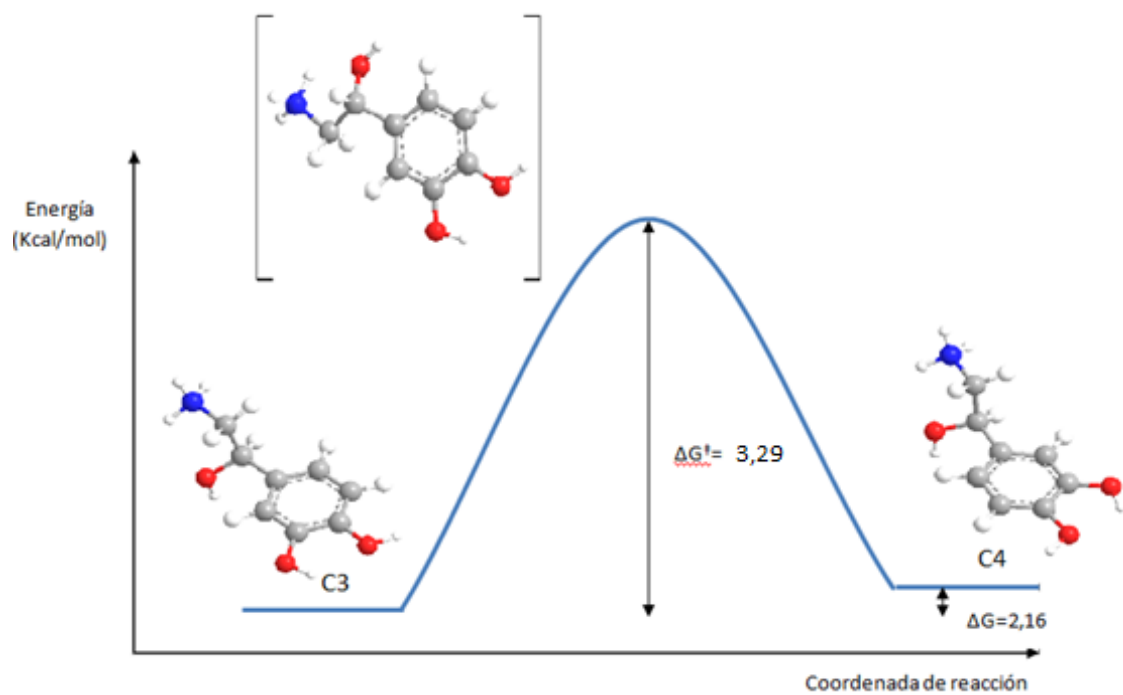


Figura 7. Estados de transición en fase gas, Energías ΔG (kcal/mol) relativas con respecto al conformero más estable representado.



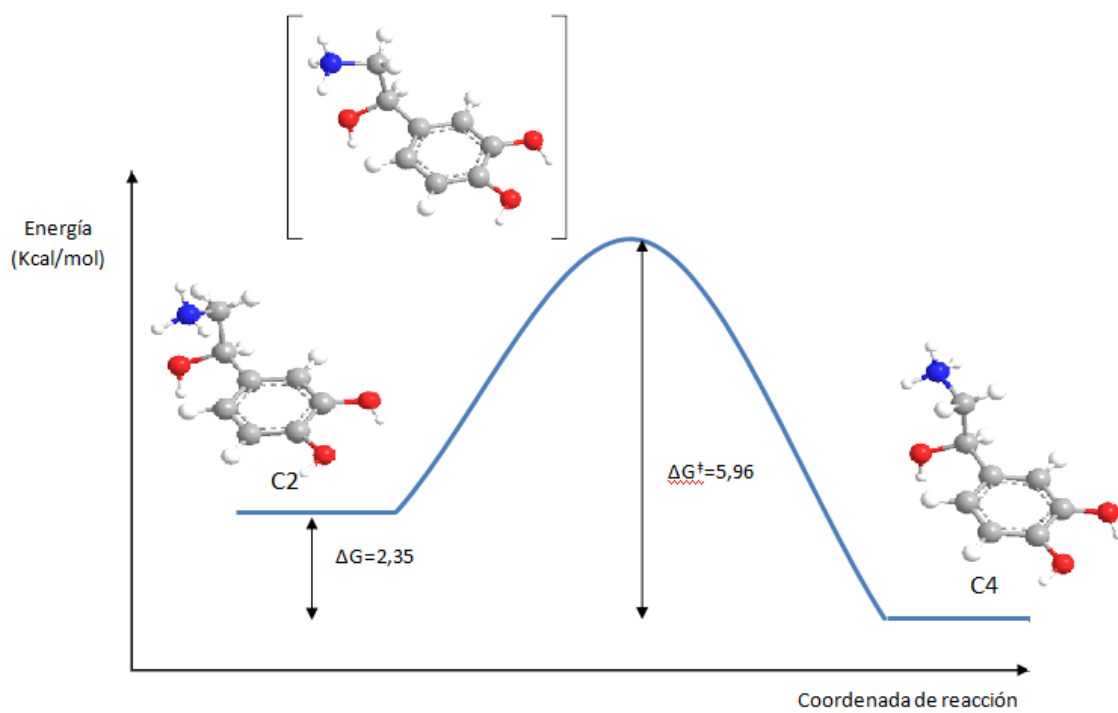
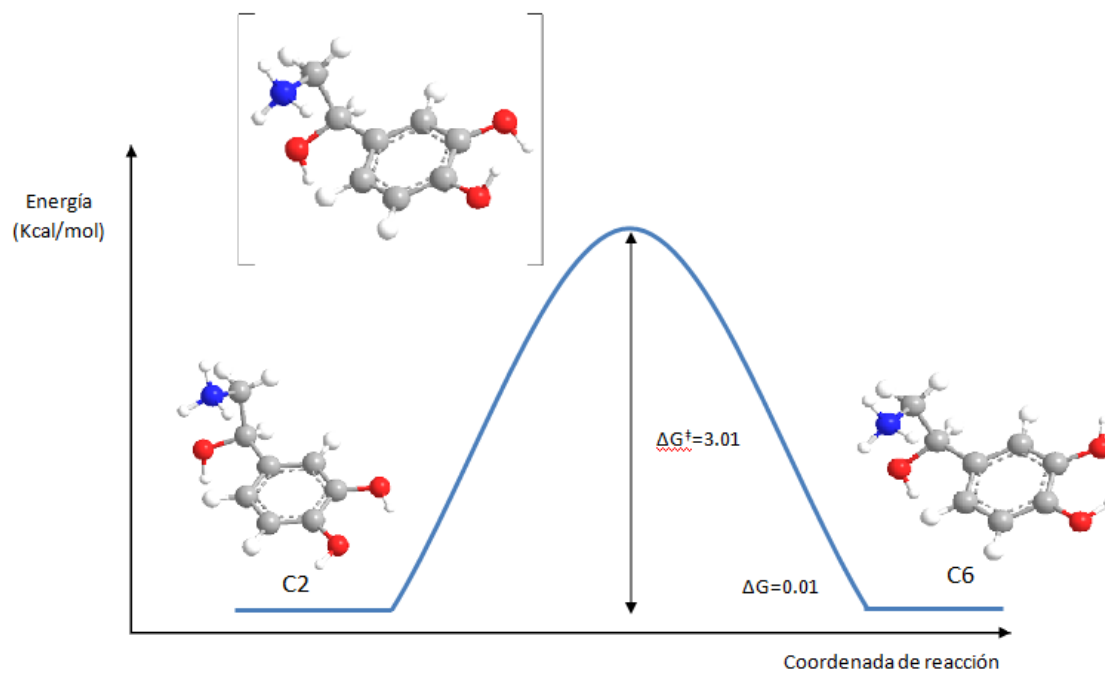


Figura 8. Estados de transición en disolución, Energías ΔG (Kcal/mol) relativas con respecto al conformero más estable representado.

Una vez obtenidas las barreras de transición calculamos las constantes de velocidad asociadas a los distintos procesos, y con ellas el tiempo de vida medio de la conformación más estable. Ambos datos se recogen en la tabla 7. Suponemos las isomerizaciones como reacciones de primer orden.

		ΔG^\ddagger (298k)	k (s ⁻¹)	t _{1/2} (s)
Fase Gas	C3→C4	5,78	3,59E+08	1,93E-09
	C2→C6	4,61	2,60E+09	2,67E-10
	C2→C4	6,88	5,60E+07	1,24E-08
Disolución	C3→C4	3,29	2,41E+10	2,87E-11
	C2→C6	3,01	3,89E+10	1,78E-11
	C2→C4	5,96	2,65E+08	2,62E-09

Tabla 7: Energía de activación ΔG^\ddagger (kcal/mol) en fase gas y en disolución. Constantes de velocidad k (s⁻¹) y tiempo de vida medio t_{1/2} (s). Nivel de cálculo M062X/6-31G*.

Podemos observar que las constantes de velocidad son uno o dos órdenes de magnitud inferiores en fase gas que en disolución, información que concuerda con las mayores barreras de transición calculadas en el proceso de interconversión en fase gas. Tanto el proceso de cambio conformacional de la orientación de los hidroxilos como del resto carbonado respecto al ciclo, presentan constantes de cinéticas parecidas mientras que el cambio de conformación plegada a extendida presenta constantes cinéticas inferiores y con menor diferencia entre fases, hecho evidente al tener en cuenta que la conformación plegada es más estable frente a la extendida en fase gas, pero en fase condensada presenta mayor estabilidad la conformación extendida.

El hecho más destacable de este estudio cinético es que los tiempos de vida medio son lo suficientemente pequeños como para asegurar un equilibrio conformacional entre conformeros. Sin embargo, hay que considerar que la ecuación de Eyring es muy aproximada por lo que para una predicción más rigurosa de constantes cinéticas y tiempos de vida medio habría que recurrir a modelos teóricos más sofisticados.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que hemos extraído durante y tras el desarrollo de este Trabajo Fin de Grado son:

- A. La norepinefrina protonada presenta diferentes conformaciones según la orientación de sus distintos grupos funcionales. Según la disposición geométrica del grupo amonio presentará conformación plegada o extendida. Por otro lado los grupos hidroxilos del catecol pueden disponerse de 4 formas distintas, pero en nuestro estudio solo observamos aquellas en las que se puede formar un enlace de hidrógeno intramolecular (H orientados al mismo lado), ya que son las más estables. La conformación más estable (C1) es de tipo plegada con los grupos hidroxilo orientados hacia el lado menos sustituido del benceno, al igual que la segunda más estable (C2). También de conformación plegada pero con los hidroxilos orientados hacia el lado más sustituido del catecol es el tercer conformero más estable (C6), solo 1,62 kcal/mol por encima de la conformación más estable. El cuarto conformero más estable (unos 2 kcal/mol por encima de C1) es de tipo extendido con los hidroxilos hacia el lado menos sustituido (C3).
- B. Es difícil determinar con exactitud que conformación es la más estable de la norepinefrina protonada, ya que las dos más bajas en energía presentan diferencias energéticas tan bajas que pueden incluso considerarse isoenergéticas. Es necesario aplicar metodologías más elaboradas para poder resolver la preferencia conformacional de la norepinefrina protonada de forma completa, ya que se ha comprobado que los factores entrópicos son determinantes a la hora de asignar el conformero más estable.
- C. Para completar el estudio conformacional en fase gas se realizó un análisis topológico de la densidad electrónica de carga, cuyos resultados confirmaron la existencia de diferentes interacciones intramoleculares en los distintos conformeros. Se confirmó que pueden darse tres posibles enlaces de hidrógeno: del amonio con el catecol, del amonio con el grupo hidroxilo del resto carbonado y entre los hidroxilos catecólicos. Se observó que la interacción más fuerte es la del amonio con el catecol, que está

presente en todos los conformeros estudiados; pero que es el enlace catecol...NH₃⁺ el que explica la preferencia por la conformación plegada frente a la extendida. Por otro lado, la preferencia conformacional de los hidroxilos del catecol no puede explicarse con este estudio topológico.

- D. Del análisis conformacional en fase acuosa concluimos que los conformeros más estables son los que presentan conformación extendida, ya que el grupo amonio no interacciona con el catecol y , por tanto, se solvata con mayor facilidad.
- E. Al efectuar una comparación entre las energías libres en fase gas y en disolución se observó que la diferencia energética en disolución es mucho menor que en fase gas, lo que provoca que las poblaciones de Boltzmann estén mucho más repartidas en fase condensada. A su vez se compararon las geometrías de los conformeros en ambos estados de agregación y se observó que las distancias de enlace no sufren cambios significativos a excepción del conformero C5, lo que implica que las diferentes geometrías no sufren grandes cambios en contacto con el disolvente.
- F. Se llevó a cabo un estudio cinético de las barreras de potencial en tres posibles cambios conformacionales: en la orientación del resto carbonado respecto al catecol, en la orientación de los hidrógenos de los hidroxilos del catecol y de la conformación plegada a extendida. En ambos estados de agregación las barreras obtenidas son bajas, lo que conlleva unas constantes de velocidad elevadas y unos tiempos de vida medio cortos, por lo que se alcanzará fácilmente un equilibrio conformacional.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Atkins P., de Paula J., 2008, *Química Física*. Ed: Panamericana.
- Bertrán J., Branchandell V., Moreno M., Sodupe, M., 2000, *Química Cuántica: Fundamentos y Aplicaciones Computacionales*. Ed. Síntesis.
- Carlson, N.R. (2006). *Fisiología de la conducta* 8ª Ed. Madrid: Pearson. pp: 129-130
- Cox, S. *Norepinephrine*. Recuperado el 23 de noviembre de 2016, de RICE University.
- Cramer, C.J., 2004, *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. Ed: John Wiley & Sons.
- García, R., Núñez, Santín, L., Redolar, D., & Valero, A. (2014). Neuronas y comunicación neural. En: Redolar D, (ed.) *Neurociencia Cognitiva* (págs. 27-66). Madrid: Médica Panamericana.
- Lee, DR; Galant, NJ; Lee, DM; Dawson, SSH; Ding, VZY; Setiadi, DH; Viskolcz, B; Csizmadia, IG., 2011. *Theoretical investigation of the conformational intricacies and thermodynamic functions of noradrenaline*. Can. J. Chem. 89, 1010-1020
- Levine I.R., 2004, *Fisicoquímica*. Ed: McGraw Hill.
- Nagy, P., Alagona, G., Ghio, C., Takacs-Novak, K., 2002. *Theoretical Conformational Analysis for Neurotransmitters in the Gas Phase and in Aqueous Solution. Norepinephrine*.
- Wako, H; Ishiuchi, S; Kato, D; Feraud, G; Dedonder-Lardeux, C; Jouvét, C; Fujii, M ., 2017. *A conformational study of protonated noradrenaline by UV-UV and IR dip double resonance laser spectroscopy combined with an electrospray and a cold ion trap method*. Phys. Chem. Chem. Phys. 19, 10777-10785.

8. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

8.1. Listado de tablas

Tabla	Descripción	Página
1	Energías relativas (en kcal/mol) de cada uno de los conformeros de la norepinefrina protonada obtenidas por el campo de fuerzas (MMFF).	24
2	Energías electrónicas relativas (en kcal/mol) de los diferentes conformeros de la norepinefrina protonada: mecánica molecular (MMFF), métodos semiempíricos (AM1,PM3), métodos DFT (M06L, M062X, B3LYP, WB97xD) métodos basados en la función de onda (MP2).	25
3	Energías electrónicas relativas (kcal/mol) de los conformeros C1, C3 y C6 de la norepinefrina protonada. CC denota CCSD(T). Los cálculos CC se han realizado sobre las geometrías M062X (CC//M062X), B3LYP (CC//B3LYP), y MP2 (CC//MP2).	26
4	Energías relativas electrónicas ΔE (kcal/mol) con respecto a C1 (-592,0062944 hartree/partícula). $\Delta E+ZPE$, diferencias de la suma de la energía electrónica y la energía vibracional del punto cero (kcal/mol). ΔG , energía libre de Gibbs relativa (kcal/mol). N, poblaciones de Boltzmann (%). Valores entre paréntesis: obtenidos por el método MP2.	30
5	Energías libres de Gibbs de solvatación ΔG_{solv} (kcal/mol) para distintos métodos y energías libres de Gibbs de solvatación relativas $\Delta\Delta G_{solv}$ (kcal/mol) con respecto a C1. Nivel de cálculo M062X/6-31G*.	35
6	Energías libres de Gibbs relativas en fase gas y en disolución con distintos métodos, respecto al conformero C1. Todas ellas expresadas en kcal/mol. Nivel de cálculo M062X. N, poblaciones de Boltzmann expresadas en %.	38
7	Energía de activación ΔG^\ddagger (kcal/mol) en fase gas y en disolución. Constantes de velocidad k (s^{-1}) y tiempo de vida medio $t_{1/2}$ (s). Nivel de cálculo M062X/6-31G*.	44

8.2. Listado de figuras

Figura	Descripción	Página
1	<i>Estructura de la (R)-norepinefrina</i>	7
2	<i>Estructura de la norepinefrina protonada</i>	9
3	<i>Geometrías de equilibrio de los confórmeros más estables de la norepinefrina. Distancias de enlace expresadas en Å, valores con método M062X y en paréntesis los valores con MP2.</i>	27-28
4	<i>Análisis topológico de la densidad para las 7 conformaciones más estables de la norepinefrina protonada.</i>	32-33
5	<i>Confórmeros de las geometrías más estables. Distancias de enlace en fase gas con el método M062X y en paréntesis distancias de enlace en disolución; todas ellas expresadas en Å. El confórmero C5 no aparece en esta figura por motivos que se discuten en el texto.</i>	36-37
6	<i>Comparación de las estructuras en fase gas y en disolución del confórmero C5.</i>	38
7	<i>Estados de transición en fase gas, Energías ΔG (kcal/mol) relativas con respecto al confórmero más estable representado.</i>	41-42
8	<i>Estados de transición en disolución, Energías ΔG (Kcal/mol) relativas con respecto al confórmero más estable representado.</i>	42-43

