

EPISTEMOLOGÍA E HISTORIA DE LA CIENCIA

SELECCIÓN DE TRABAJOS DE LAS XX JORNADAS

VOLUMEN 16 (2010)

Pío García
Alba Massolo

Editores



ÁREA LOGICO-EPISTEMOLÓGICA DE LA ESCUELA DE FILOSOFÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES DE LA FACULTAD DE FILOSOFÍA Y HUMANIDADES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons atribución NoComercial-SinDerivadas 2.5 Argentina



Desmontando un experimento: la dinámica de reconocimiento quirál

Silvia Polzella* • Penélope Lodeyro**

Introducción

La quiralidad tiene un rol esencial en la química orgánica por lo cual ha sido ampliamente estudiada desde su descubrimiento. El término “quiralidad” refiere a figuras geométricas asimétricas tales que sus imágenes reflejas en el plano de un espejo no son superponibles, es decir, son enantiómeras entre sí. Esta propiedad es dual (izquierda, levógira o derecha, dextrógira), geométrica y tridimensional. Las moléculas orgánicas presentan esta propiedad cuando un carbono se une a cuatro radicales distintos, constituyendo un núcleo quirál o estereocentro (Fig. 1)

Este es el ámbito donde la orientación espacial tiene significado. El cuerpo humano tiene más de 10^{27} moléculas con aproximadamente cien mil formas y funciones diferentes. Es notable el hecho de que las moléculas orgánicas con actividad biológica se presenten en una asimetría determinada. Los aminoácidos, proteínas, azúcares y ácidos nucleicos son quirales. Por ejemplo, los azúcares que consumimos, son dextrógira: si ingiriéramos la variante levógira, no la podríamos degradar. La dinámica biológica es altamente selectiva a distintos niveles en el reconocimiento de moléculas -extendiéndose a los receptores sensoriales-. En la actualidad, la investigación sobre catalizadores quirales, es un área de intensa investigación para la síntesis de principios activos altamente específicos, en las industrias farmacéutica y agroquímica entre otras.

Una investigación reciente realizada por Magalí Lingenfelder *et al.* (2007) sobre reconocimiento quirál, logró determinar experimentalmente que la dinámica del acoplamiento estereoselectivo de enantiómeros tiene lugar a través de cambios conformacionales mutuos inducidos a nivel molecular, en concordancia con la teoría general de la especificidad biológica propuesta por Linus Pauling (1948) sesenta años atrás. El proceso dinámico obtenido mediante este experimento muestra cómo opera el reconocimiento desde los niveles más básicos, señalando el curso que sigue la complejidad biológica. Precisamente, la relevancia de la especificidad del reconocimiento obedece a que la quiralidad se transfiere a las estructuras más complejas y, dado que muchas de ellas funcionan en base a este reconocimiento, se considera que la quiralidad es una parte fundamental en el desarrollo de la vida.

La implementación del experimento antes mencionado, requirió la utilización de instrumentos de alta tecnología como el microscopio de escaneado dinámico de efecto túnel (STM, *scanning tunneling microscope*), de modelos científicos como el de ajuste inducido, el empleo de simulaciones

*UNSa

**UNC -Foncyt

computacionales -teoría del funcional de la densidad (DFT) y dinámica molecular (MD)- y otras técnicas experimentales como la fotoemisión de rayos X. Nuestro propósito es analizar la rica interacción de los elementos intervinientes en este proceso experimental, en particular la combinación STM-DFT, dado que la misma delinea un estilo de trabajo de laboratorio que se ha instalado dentro de las prácticas científicas de modo creciente constituyéndose prácticamente en una nueva metodología para la determinación sin ambigüedad de la estructura de moléculas simples.

La filosofía de la experimentación ha focalizado su atención en la complejización creciente de los experimentos que incorporan instrumentos de alta tecnología, simulaciones computacionales, modelos y mediciones cada vez más precisas. Algunos filósofos de la ciencia como Ian Hacking (1992) y Peter Galison (1988), elaboraron taxonomías de los elementos constitutivos del laboratorio. No obstante, sólo recientemente se ha tomado en consideración el modo en que la intervención de las computadoras está modificando las prácticas de laboratorio. En este contexto, suele utilizarse la noción de “experimentos asistidos por computadoras” (Klaus Manzner 1999, Ann Johnson 2006), para designar los roles que las mismas desempeñan. Consideramos que el experimento analizado pone de manifiesto, en el peculiar interjuego de sus elementos, que la caracterización en términos de “experimentos asistidos por computadoras” no logra capturar la relevancia que las simulaciones computacionales tienen en el mismo. Ellas permitieron obtener conocimiento novedoso, precisamente, sin su intervención no se hubiese logrado determinar en forma acabada la secuencia del proceso dinámico de reconocimiento quiral. Con este ejemplo, intentamos mostrar la relevancia de atender a las prácticas científicas para aproximarnos a estas nuevas interacciones en la vida de los laboratorios donde se destaca el rol de las simulaciones computacionales en la producción de nuevo conocimiento.

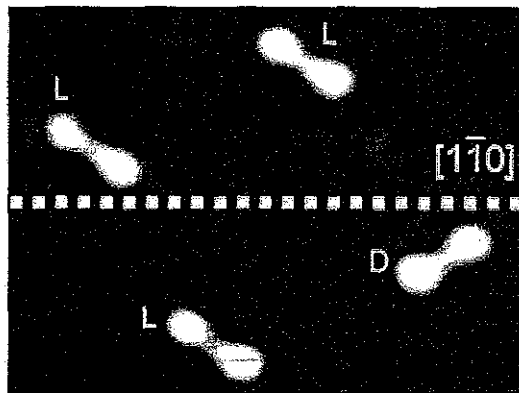
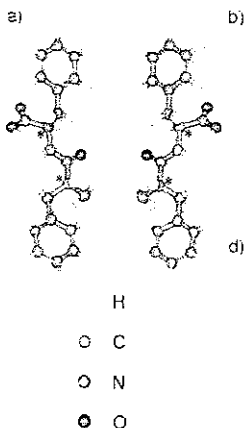
El caso experimental

Linus Pauling (1948) especuló acerca de un mecanismo dinámico para explicar el proceso de reconocimiento biomolecular, que luego desarrollara Daniel Koshland Jr (1958) en su modelo de ajuste inducido (*induced fit*) para las reacciones enzimáticas. Esta teoría se oponía al modelo de llave-cerradura (*lock and key*) de Emil Fischer¹ (1894), según el cual tanto la enzima como el sustrato poseían formas geométricas específicas complementarias que encastraban exactamente unas con otras. Y a su posterior adaptación, el modelo de tres puntos que presentara Ogston en 1948, que postulaba tres sitios activos de enlace en la enzima los cuales especificarían el sustrato. Koshland por su parte planteó una modificación a los modelos anteriores, dado que las enzimas eran bastante flexibles y presentaban en sus sitios activos cambios de forma en interacción con el sustrato. Básicamente, Pauling y Koshland consideraban que el reconocimiento molecular específico dependía de arreglos precisos de los átomos en estructuras complementarias que

interactúan por fuerzas de corto rango. En 1997 Booth, Wahnon y Wainer describieron una posible secuencia del proceso de reconocimiento. 1) formación de un complejo selector-seleccionado; 2) posicionamiento del complejo selector-seleccionado para optimizar las interacciones (ajustes conformacionales), 3) formación de una interacción secundaria (activación del complejo) y 4) expresión del ajuste molecular (reconocimiento quiral). Sin embargo, ante la imposibilidad experimental de capturar la dinámica conformacional de enantiómeros, interactuando a nivel molecular, el reconocimiento quiral continuó siendo tratado dentro de modelos estáticos como el modelo de enlace de tres puntos.

La investigación experimental de Magalí Lingenfelder *et al.* (2007) logró seguir la interacción de moléculas individuales procurando "observar" el mecanismo subyacente al reconocimiento de moléculas de difenilalanina montadas sobre una superficie de cobre. Por medio del microscopio de escaneado dinámico de efecto túnel (STM) y de simulaciones computacionales consiguieron mostrar cómo la dinámica de interacción, altamente específica, induce el ajuste conformacional de las moléculas.

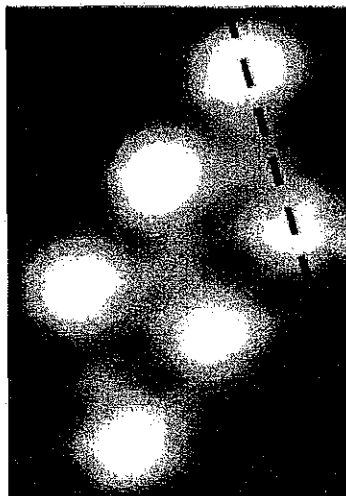
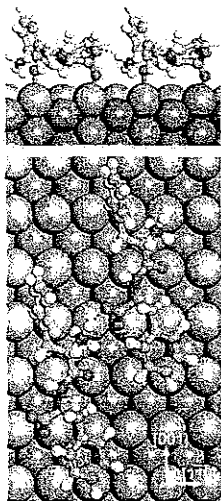
Las imágenes del STM mostraron que las moléculas simples aisladas se adsorbían al sustrato de cobre con un mismo ángulo pero con orientaciones opuestas según eran dextrógiras o levógiras (sentido horario y antihorario respectivamente) (Fig. 2). Asimismo, dada una mezcla de moléculas de distinta quiralidad en proximidad, se observó la discriminación de levógiras y dextrógiras entre sí, y la producción de una organización supramolecular en forma de cadenas homocorales.



1) Dibujo esquemático de las moléculas de di-fenilalanina Levo-difenilalanina y Dextro-difenilalanina, los asteriscos indican los estereocentros.

2) Imagen del STM de moléculas individuales mostrando que los dos enantiómeros son imágenes reflejas respecto al plano perpendicular del plano de cobre [110]

La *quiralidad* de las moléculas adsorbidas evidente en las topografías del STM, indicó que sus estereocentros están implicados en la interacción de la superficie molecular. Significativamente, el sistema mostró también que la quiralidad se transfería de los dipéptidos a las cadenas, es decir, exhibía *quiralidad supramolecular* como consecuencia del auto-acoplamiento estereoselectivo de dos o más dipéptidos en cadenas homocirales (Fig. 3 – 4; Video 2). En este caso, se observó que el eje molecular principal de las moléculas simples rotaba nuevamente para el acoplamiento —como antes, en direcciones opuestas para las cadenas de Levo-difenil y Dextro-difenil respectivamente—. Cabe destacar, que nunca se observaron cadenas heteroquirales estables (Video 3).



3), 4) Imágenes de DFT y STM respectivamente de la geometría de adsorción de dipéptidos de Levo-difenilalanina en cadenas homocirales.

El STM brinda información a nivel de la superficie, pero no permite ver dentro de la molécula la actividad de cada grupo químico en particular. Por este motivo, se recurrió al empleo de simulaciones computacionales, donde se presentaron dos conformaciones moleculares para la Levo-difenil, una en forma de C con los dos grupos funcionales del mismo lado respecto del eje molecular, y otra, en forma de S (Ver Fig 3) con los grupos funcionales señalando direcciones opuestas. Las simulaciones clásicas de dinámica molecular (MD) indicaron que la conformación C era más estable que la conformación S y las simulaciones de teoría del funcional de la densidad (DFT) mostraron que el dipéptido adsorbido de conformación C aislado en la superficie de cobre se liga a la misma a través de un enlace de tres puntos, hecho frecuentemente registrado en sistemas análogos. En las simulaciones, el ángulo entre el eje molecular y la dirección del plano de

cobre resultó acorde con el valor medido por el STM, así como la cantidad de energía calculada para la interacción de la superficie molecular. Por contraste, los cálculos sobre moléculas aisladas adsorbidas en la conformación S predecían una energía de interacción más baja y una orientación del eje molecular que no fueron observadas en las imágenes del STM.

Estos resultados de las simulaciones indicaron que las moléculas aisladas debían adsorberse en la conformación C, sin embargo, solamente la geometría de adsorción S era compatible con el enlace necesario para formar las cadenas supramoleculares observadas. Por ello, se realizaron nuevas simulaciones DFT en las cuales se adsorbieron moléculas de Levo-difenil en conformación S repetidas periódicamente a una distancia compatible con la orientación de la cadena como lo observado en las imágenes del STM. Estas nuevas simulaciones mostraron que, en la estructura de energía mínima, el eje molecular resultaba inclinado con respecto a la dirección del plano del cobre con un ángulo igual al detectado por el STM. Asimismo, exhibieron que

la principal interacción intermolecular era un enlace hidrógeno entre los distintos grupos funcionales de las moléculas adyacentes (Video 1). Notablemente, la simulación reveló además, que ocurría una transferencia espontánea de protones entre los dos grupos funcionales, la cual generaba la producción de una cadena de moléculas polares que fortalecía el enlace hidrógeno estabilizando la cadena. Estos resultados, fruto de las simulaciones computacionales y que no habían sido observados con el STM, fueron contrastados mediante otra técnica experimental, la fotoemisión de rayos X.

Un análisis detallado de los modelos estructurales de las simulaciones, reveló que la rotación del eje molecular observado mediante el STM después del ensamble es solamente la consecuencia más evidente de un arreglo conformacional más complejo. A saber, para formar cadenas supramoleculares el dipéptido necesitaba cambiar desde la conformación C a la S, modificando las posiciones relativas de los grupos funcionales. La evidencia experimental de este cambio conformacional fue dada por las imágenes de alta resolución del STM.

La figura rígida del modelo de llave-cerradura suponía que el proceso de formación de cadenas consistía en una mera yuxtaposición de moléculas, en contraposición con el proceso dinámico determinado por esta experimentación. “En conclusión, nuestros resultados muestran a nivel de molécula simple que el reconocimiento es un proceso dinámico que involucra ajustes conformacionales mutuamente inducidos”. (Lingenfelder *et al.*, 2007: 2)

Lectura acerca de las facetas del experimento

Los estudios en torno a las simulaciones computacionales en filosofía de la química han proliferado en los últimos años, sin embargo son escasos los que tratan su rol dentro del laboratorio. En general se caracteriza a los experimentos que emplean simulaciones

computacionales como “experimentos asistidos por computadora”. Por ejemplo, Mainzer en su artículo “*Computational Models and Virtual Reality*” aborda el tema del modelado molecular en las investigaciones de la química, focalizándose en los programas que emplean métodos de diseño molecular computacionalmente asistido (CAMD), entre ellos, las simulaciones computacionales. Plantea que, a grandes rasgos, los hay para visualizar y comparar moléculas, para construir nuevas moléculas a partir de átomos o fragmentos, o para calcular las interacciones en el acoplamiento de dos moléculas. Mainzer sostiene que. “El objetivo [de estos programas] es que el científico comprenda la cantidad de información producida por modelos basados en teorías, y enfocar la búsqueda de una manera más productiva.” (p117) “Sus programas proveen estrategias para refinar concepciones científicas (...) Ellos ayudan a evitar y a seleccionar experimentos en el laboratorio menos productivos, costosos o aún peligrosos.” (p125). Mainzer estudia los métodos de diseño molecular computacionalmente asistidos *per se*, es decir en forma independiente del experimento. Por ello, considera a las simulaciones computacionales como herramientas auxiliares que se desarrollan de modo paralelo a la experimentación, y cuyos resultados focalizan las investigaciones de manera productiva.

Por nuestra parte, pensamos que atender a las simulaciones computacionales dentro del proceso experimental permite apreciar que desempeñan un rol que excede el de meros auxiliares. Como se pone de manifiesto en nuestro caso de estudio, las simulaciones aportaron información novedosa que no era posible obtener mediante el STM individualmente y que surgió de la interacción de ambos. De hecho, la combinación DFT - STM se perfila de modo creciente como una nueva metodología para la determinación sin ambigüedad de la estructura de moléculas simples.

Como hemos visto en el apartado anterior, las imágenes del STM exhibieron la dinámica del acoplamiento estereoselectivo y la discriminación de las moléculas de difenilalanina de distinta quiralidad. Al mismo tiempo, ofrecieron información suficiente para trazar un mapa topológico de la estructura de las moléculas, como los ángulos de contacto, la posición de las mismas con respecto al sustrato metálico, a qué distancia están entre sí las moléculas, etc. Lo más sobresaliente de este instrumento es que posibilita observar la libre interacción, es decir, las moléculas individuales son depositadas sobre un sustrato metálico a temperatura ambiente y se observa su evolución de manera dinámica. Sin embargo, como no permite determinar la configuración, ni la actividad interna de las mismas fue necesario recurrir al empleo de las simulaciones computacionales, MD y DFT. Las simulaciones aportaron esta nueva información a nivel interno de las moléculas y grupos funcionales. En primer lugar, determinaron dos conformaciones posibles para el dipéptido de difenilalanina, en forma de C y de S. La más estable era la conformación C y cabe destacar que la S nunca se había observado con el microscopio; sin embargo, esta última conformación, con los grupos funcionales en lados opuestos, posibilitaba el enlace necesario para el acoplamiento. Por

ello, se realizaron las nuevas simulaciones DFT que combinaban los indicios con que se contaba: se dispusieron moléculas en conformación S ubicadas periódicamente con la orientación y la distancia que indicaba el STM. Ellas mostraron que la principal interacción intermolecular era un fuerte enlace hidrógeno entre los distintos grupos funcionales de las moléculas adyacentes (Video 1). Y fundamentalmente, revelaron aspectos no esperados a partir de la observación con el STM: la transferencia espontánea de protones entre los dos grupos que fortalecían el enlace hidrógeno estabilizando la estructura de las cadenas homocirculares. Es decir, las simulaciones exhibieron que el hidrógeno “salta” de un grupo funcional de una molécula al otro grupo de la molécula que está al lado (Video 1). En una última lectura, mostraron el despliegue del proceso de acoplamiento: las moléculas sufren un tránsito, desde la conformación C a S para el acoplamiento, en el cual los grupos funcionales cambian sus posiciones relativas a lo largo de la dirección del plano del cobre, al tiempo que rota el eje de la cadena principal del péptido.

Muchos de los resultados de las simulaciones se fueron cotejando con las mediciones realizadas por el STM, por ejemplo, en la estructura de energía mínima el eje molecular estaba inclinado en aproximadamente 74° en sentido anti horario (para Levo-difenil) con respecto a la dirección del sustrato de cobre tal como indicaban las mediciones del STM. Del mismo modo, la evidencia experimental del cambio conformacional fue dada por el STM que en el análisis de la secuencia del video, confirmó que esos cambios conformacionales son inducidos por la interacción intermolecular mutua, ya que ocurren solamente cuando dos moléculas están cerca una de la otra. Sin embargo, la información novedosa arrojada por las simulaciones correspondía a un nivel interno inaccesible al STM, por lo cual debió ser contrastada con otra técnica experimental, la fotoemisión de rayos X, en esta instancia los valores de energía obtenidos concordaban con los valores correspondientes a los grupos funcionales indicados por la simulación. De esta manera, se pone de relieve que la información obtenida por las simulaciones computacionales no tiene el mismo estatus que la obtenida por el STM. Dado que este instrumento determina en forma *directa* la superficie de la estructura tridimensional de las moléculas a nivel atómico podemos decir que esta instancia soporta el peso de la prueba del proceso experimental.

Las simulaciones contribuyeron a racionalizar y refinar los datos obtenidos por el STM y aportaron información novedosa que no era posible obtener mediante este instrumento. Si bien, ‘guaron la investigación de manera productiva’ consideramos que, en este caso, desempeñaron un rol que excede el de meros auxiliares. Porque, aportaron información novedosa que formó parte constitutiva del resultado final del experimento. Fueron parte activa en la elucidación del proceso, incorporando un nuevo nivel de especificidad al modelo. mostraron el despliegue del mecanismo de reconocimiento quiral. Creemos que acercarnos a las prácticas científicas nos permitió encontrar nuevas interacciones en la vida de los laboratorios en las que se destaca el

rol protagónico que tienen las simulaciones computacionales en la producción de este nuevo conocimiento.

El estudio de la dinámica molecular prácticamente se ha convertido en una disciplina. Dentro de este campo, las simulaciones computacionales, como las del experimento en cuestión, constituyen una potente herramienta de modelado dinámico y tridimensional que permite nuevos modos de investigación. Y la interacción STM-DFT, que hemos estudiado, se ha ido estableciendo como una nueva metodología para la determinación sin ambigüedades de la estructura de moléculas simples.

Consideraciones finales

El experimento de estos investigadores logró corroborar que el reconocimiento quiral obedece a un proceso dinámico en el que las moléculas simples se amoldan entre sí para el acoplamiento -ajuste inducido- y, fundamentalmente, determinó que esta información estructural se transfiere a niveles más altos de complejidad. Los resultados obtenidos por el experimento son de fundamental importancia para los desarrollos teóricos en torno de la estereoespecificidad, y una guía heurística en la elucidación del curso que sigue la complejidad de la materia viva.

Entendemos que para el experimento la intuición de Pauling y Koshland constituyó el telón de fondo, mientras que el modelo del mecanismo fue el propuesto por Booth *et al.* que marcaba esquemáticamente puntos del proceso. El STM confirmó esta secuencia e incorporó un nuevo nivel de detalle de la dinámica del reconocimiento: rotaciones opuestas para los distintos enantiómeros con sus respectivos ángulos, la distancia entre moléculas, las cadenas, las oscilaciones, las formaciones estables e inestables en los acoplamientos, etc. Ahora bien, las simulaciones, además de contribuir a racionalizar y refinar los datos provistos por el STM, dieron a conocer nueva información, aportando aspectos del proceso a nivel interno de las moléculas, como el intercambio protónico entre las moléculas que reforzaba el enlace hidrógeno estabilizando las cadenas homoquirales formadas. En este sentido, consideramos que más que un papel auxiliar desempeñaron un rol activo en el desentrañamiento del mecanismo de reconocimiento quiral y sus resultados se integraron a la información provista por el STM pasando a formar parte del despliegue completo del proceso de acoplamiento estereoselectivo.

Del análisis del proceso experimental se desprende que la incorporación de las simulaciones computacionales conjugadas con el microscopio de escaneo dinámico efecto túnel permitió un discernimiento pormenorizado de la dinámica del mecanismo, que devino en un modelo del fenómeno mucho más rico y complejo, con lo cual se pone en evidencia el rol protagónico que tienen las mismas en el experimento.

Nota

1 Para explicar la especificidad del sustrato, E. Fischer (1894) propuso el modelo de llave-cerradura como análogo a los fenómenos representativos de la estereoselectividad. En 1948 Ogston presenta su modelo de enlace de tres puntos, para explicar la enantioselectividad, señalando que sólo un enantiómero se une a una enzima y se involucra en la reacción, el modelo se basa en la idea de que la molécula quiral, cuando es vista en una de sus fases tetraédricas representada como una pirámide, tiene diferentes arreglos de los elementos constituyentes en las "esquinas de la pirámide" para cada enantiómero, de tal modo que sólo uno de ellos puede acoplarse a la misma enzima.

Bibliografía

- Binning Gerd & Röhrer Heinrich (1982) "United States Patent: Scanning Tunneling Microscope" Assignee: International Business Machines Corporation, Armonk, NY. Patent Number: 4, 343, 993. August 10, 1982.
- Booth Tristán, Wahnou Daphne & Wainer Irving, "Is chiral recognition a three-point process?" *Chirality*, vol 9, N° 2, 96-98, McGill University, Montreal, Quebec, Canada, 1997.
- Fischer Emil (1894). "Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme" *Ber. Dt. Chem. Ges.* 27. 2985-93. doi.10.1002/cber.18940270364 <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k90736r/f364/chemindefer>.
- Galison Peter, "Philosophy in the Laboratory", *The Journal of Philosophy*, Vol 85, No. 10, Eighty-Fifth Annual Meeting American Philosophical Association, Eastern Division, pp. 525-527, Oct., 1988.
- Hacking Ian, "The Self-Vindication of the Laboratory Sciences", *Science as Practice and Culture*, Pickering Andrew (ed.), The University of Chicago Press, Chicago, 1992.
- Johnson Ann (2006) "Virtual Tools: The Epistemological and Social Issues of Computer-Aided Chemical Process Design", Baird, Davis *et al.* (eds.) *Philosophy of Chemistry*, 273-291 Springer, Netherlands, 2006.
- Koshland Daniel Jr (1958) "Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 44. 98-104
- Lingenfelder Magali, Tomba Giulia, Constantini Giovanni, Colombi Ciacchi Lucto, De Vita Alessandro & Kern Klaus (2007) "Tracking the Chiral Recognition of Adsorbed Dipeptides at the Single-Molecule Level", *Angewandte Chemie Int. Ed.* 2007.
- Mainzer Klaus (1999) "Computational Models and Virtual Reality New Perspectives of Research in Chemistry", *Hyle*, Vol. 5 N° 2, 117-126.
- Ogston A. G. (1948) "Interpretation of experiments on metabolic using isotopic tracer elements", *Nature* 163, 963
- Pauling Linus, (1948) "Nature of forces between large molecules of biological interest", *Nature* N° 4097, Vol. 161, p 707-709, 1948
- Rothbart Daniel. & Schrefels John. (2006) "Visualizing Instrumental Techniques of Surface Chemistry", Baird, Davis *et al.* (eds.) *Philosophy of Chemistry*, 309-324. Springer, Netherlands, 2006.
- Tersoff Jerry & Hamann Donald (1984) "Theory of the Scanning Tunneling Microscope" *Physical Review B*, Vol 31 N° 2, 805-813, 1985.

Información complementaria

ver videos en. http://www.wileyvch.de/contents/jc_2002/2007/z700194_s.html