



Editorial de la
Universidad Tecnológica Nacional

**La Universidad Tecnológica Nacional - U.T.N. -
en el Nordeste Argentino – N.E.A.**
Investigación y Desarrollo en la Facultad Regional Resistencia

Compiladoras:

**Carola Sosa
Nidia Dalfaro**



ALIMENTOS

*Análisis de la Estructura Electrónica de la Trehalosa Anhidra y
Dihidratada.*

Autores: Pamies, Petelski, Meier, Castro, Benítez y Sosa



Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional – edUTecNe

<http://www.edutecne.utn.edu.ar>

edutecne@utn.edu.ar

© [Copyright] La Editorial de la U.T.N. recuerda que las obras publicadas en su sitio web son de libre acceso para fines académicos y como un medio de difundir el conocimiento generado por autores universitarios, pero que los mismos y edUTecNe se reservan el derecho de autoría a todos los fines que correspondan.

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA ELECTRÓNICA DE LA TREHALOSA ANHIDRA Y DIHIDRATADA

Pamies, S. C.[†]; Petelski, A. N.[†]; Meier, H. G.[†]; Castro, E. A.[‡]; Benítez, E. I.[†] y Sosa, G. L.^{*,†}

[†] Laboratorio de Química Teórica y Experimental-QuiTEx, Departamento de Química, Facultad Regional Resistencia, Universidad Tecnológica Nacional, French 414 (3500) Resistencia (Chaco). Argentina.

[‡] Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA, CCT La Plata CONICET CC 16, Suc. 4, 1900 La Plata, Argentina.

Resumen. Con el propósito de contribuir al entendimiento del mecanismo de bioprotección de los azúcares, en este trabajo se ha realizado un estudio detallado de la estructura electrónica de la trehalosa. Las propiedades topológicas de la densidad de carga electrónica se analizaron sobre funciones de onda obtenidas al nivel B3LYP/6-311++G**, mediante la Teoría de Átomos en Moléculas (AIM). Las interacciones hiperconjugativas de transferencia de carga fueron analizadas mediante la técnica de los orbitales naturales de enlaces (NBO). El estudio ha revelado que la red de enlaces de hidrógeno establecida en el dihidrato se localiza en una región específica de la molécula y deja disponibles un gran número de grupos oxhidrilos para unirse a los grupos polares de las biomoléculas. El análisis NBO ha mostrado que la trehalosa exhibe importantes efectos estereoelectrónicos de deslocalización (efectos anomérico y exoanomérico).

Palabras claves: AIM, Bioprotección, efectos anomérico y exo-anomérico, Disacáridos

* e-mail: glsosa@frre.utn.edu.ar; Te: 03722-432928; Fax:

INTRODUCCIÓN

Ha sido observado que ciertos organismos, llamados anhidrobióticos, cuando se someten a condiciones severas de deshidratación y altas temperaturas, luego de sintetizar una gran cantidad de sacáridos entran en un estado de animación suspendida, donde su crecimiento, reproducción y metabolismo cesan temporalmente y en el cual pueden permanecer durante largos períodos de tiempo. Cuando las condiciones ambientales se vuelven favorables estos organismos recuperan su actividad metabólica normal (Westh, Ramlov, 1991). La síntesis de sacáridos ha sido identificada como un hecho clave de este fenómeno, llamado criptobiosis (Crowe, 2002; Crowe, Oliver, Tablin, 2002) y ha conducido a un gran número de investigaciones sobre la capacidad de los sacáridos, particularmente la de la trehalosa, como agentes bioprotectores (Adams, Kendall, Kartha, 1990; Crowe, Crowe, Jackson, 1983; Lee, Hafeman, Debenedetti, Pethica, Moore, 2006; Nakagaki, Nagasse, Ueda, 1992; Xie, Timasheff, 1997; Robinson, 2001; Green, Angell, 1989).

La trehalosa ocurre naturalmente en la forma α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranosido. Esta forma, es la conformación de menor energía entre los tres isómeros posibles de la trehalosa (α , α -, α , β -, y β - β). Se trata además de un azúcar no reductor, dado que la unión glicosídica involucra a los grupos OH de los dos carbonos anoméricos. Desde un punto de vista termodinámico y cinético, la trehalosa es el disacárido natural más estable. La energía del enlace glicosídico es baja, comparada con las de otros disacáridos, menor que -4,2 kJ/mol (Roser, 1991), (el de la sacarosa es de +113 kJ/Mol). También ha sido demostrado que la trehalosa es capaz de actuar como protector frente al estrés físico provocado por la desecación, cambios osmóticos, frío, calor y presencia de metales pesados (Crowe, Crowe, Chapman, 1984; Belton, Gil, 1994; Sun, Leopold, 1994). En ausencia de agua, mantiene a los lípidos en fase fluida evitando la separación de fase, ruptura y disgregación de las membranas (Crowe, Crowe, Carpenter, Wistrom, 1987). Evita eficazmente las reacciones de Maillard que se producen entre un azúcar reductor y el grupo amino de los aminoácidos (Maillard, 1912). Estas propiedades de la trehalosa encuentran numerosas aplicaciones en la industria medicinal, alimentaria, cosmética y farmacéutica (Franks, 1985; Crowe, Crowe, Oliver, Tsvetkova, Wolkers, Tablin, 2001; Wang, 1999; Haydon, 2000). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual la trehalosa y

los azúcares en general, ejercen un papel protector, no es totalmente comprendido y sigue siendo objeto de una intensa actividad científica. Durante el curso de estas investigaciones, han surgido varias hipótesis para explicar el mecanismo de bioprotección de los azúcares, algunas de las cuales son: (i) La hipótesis de reemplazo de agua “*water-replacement*” (Crowe, Crowe, Chapman, 1984). ii) La hipótesis de agua atrapada, “*water-entrapment*” (Belton, Gil, 1994) y iii) La hipótesis de *vitrificación* (Sun, Irving, Leopold, 1994).

(i) La hipótesis de reemplazo de agua, considera el hecho de que en el estado hidratado, el agua forma una red de enlaces de hidrógeno que regula y mantiene la arquitectura tridimensional necesaria para que las biomoléculas cumplan su rol biológico. Cuando el agua es removida, estas biomoléculas sufren reordenamientos estructurales que resultan en una pérdida de su funcionalidad. El alto contenido de grupos OH de los azúcares propicia la formación de enlaces de hidrógeno con las biomoléculas evitando así el efecto de la pérdida de agua.

(ii) La hipótesis de agua atrapada, postula que en el estado deshidratado los azúcares interactúan simultáneamente con el agua y las biomoléculas. El agua residual queda así, atrapada en la interfase azúcar-biomolécula causando un ligero incremento de hidratación en esta interfase.

(iii) Por otra parte, la hipótesis de *vitrificación* se basa en la capacidad de los azúcares para inducir un estado vítreo que interrumpe o disminuye la movilidad molecular confiriendo estabilidad a las biomoléculas (Williams, Leopold, 1989; Sun, Irving, Leopold, 1994; Sun, Leopold, Crowe, Crowe, 1996; Sun, Leopold, 1997). Si bien cada una de estas hipótesis han sido sustentadas e igualmente refutadas, lo más probable es que los procesos de reemplazo de agua, atrapamiento de agua y vitrificación no sean mutuamente excluyentes, sino que actúen en forma sinérgica en el mecanismo de preservación de las estructuras biológicas.

Con el propósito de contribuir al entendimiento del mecanismo de bioprotección de los azúcares, en este trabajo se realiza un estudio detallado de la estructura electrónica de las formas anhidra y dihidratada de la trehalosa. El estudio, se realiza al nivel B3LYP/6-311++G** de teoría. Las propiedades topológicas de la densidad de carga electrónica se analizan en el marco de la teoría de Átomos en Moléculas (AIM) de Bader (1990). Luego, mediante un análisis de los orbitales naturales de enlaces (NBO) (Reed, Curtis, Weinhold, 1988; Weinhold, 1988) se evalúan las interacciones de transferencia de carga entre los orbitales dadores y aceptores y se exploran y cuantifican los efectos anomérico y exo-anomérico.

DETALLES COMPUTACIONALES

Los cálculos fueron realizados con el paquete de programas Gaussian03 (2004). La geometrías de la forma anhidra y dihidratada de la trehalosa fueron totalmente optimizadas con la Teoría del Funcional de la densidad utilizando el funcional híbrido B3LYP (Becke, 1993; Lee, Yang, Parr, 1988) y el conjunto base 6-311++G**. Luego, con las geometrías optimizadas se realizó un análisis de los orbitales naturales de enlace con la versión 3.1 del programa NBO implementado en Gaussian03. Los cálculos AIM fueron realizados con las funciones de onda generadas al nivel B3LYP/6-311++G** con el programa AIM2000 (2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estructura inicial de la trehalosa dihidrato fue obtenida de una base de datos cristalográficos (Jeffrey, Nanni, 1985; Brown, Rohrer, Berking, Beevers, Gould, Simpson, 1972) (sitio web del Dr. Stefan Immel (www.csi.chemie.tu-darmstadt.de/ak/imm/structures/xrays/carbohydrates.html)). La trehalosa anhidra se obtuvo por remoción de las dos moléculas de agua de la forma hidratada. Las geometrías de las formas anhidra y dihidratada fueron posteriormente optimizadas sin ninguna restricción al nivel B3LYP/6-311++G** de teoría. En la figura 1 se muestra una representación esquemática de la trehalosa. En la tabla 1a se comparan los valores calculados de algunos parámetros geométricos con los valores experimentales obtenidos por difracción de Rayos-X (valores entre paréntesis) y en la tabla 1b se muestran los parámetros geométricos calculados, que definen las interacciones de enlaces de hidrógeno (EH).

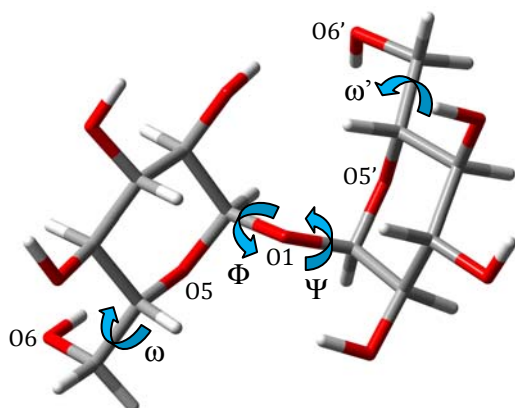


Figura 1. Representación esquemática de la trehalosa, se indica la numeración de los átomos pesados, los ángulos de torsión se definen como: $\Phi = \text{O5-C1-O1-C1}'$ y $\Psi = \text{C1-O1-C1}'\text{-O5}'$; $\omega = \text{O5-C5-C6-O6}$ y $\omega' = \text{O5}'\text{-C5}'\text{-C6}'\text{-O6}'$.

Tabla 1a. Comparación de algunos parámetros geométricos calculados a nivel B3LYP/6-311++G** con valores experimentales^{a, b, c}.

	Trehalosa anhidra	Trehalosa dihidrato
d(O5-C1)	1,4061 (1,4004)	1,4101 (1,4215)
d(O5'-C1')	1,4122 (1,4047)	1,4150 (1,3918)
d(O5-C5)	1,4453 (1,4447)	1,4453 (1,4367)
d(O5'-C5')	1,4436 (1,4590)	1,4429 (1,4360)
$\angle \text{O5-C1-O1}$	111,5 (112,0)	112,1 (112,3)
$\angle \text{O5}'\text{-C1}'\text{-O1}$	110,8 (111,9)	111,5 (112,1)
ω	-58,5 (-61)	-58,2 (-75,1)
ω'	60,8 (-63,4)	58,9 (69,9)
φ	-15,9 (-72,1)	-36,02 (-39,8)
ψ	-46,8 (71,0)	-48,3 (-61,1)
Φ	99,9 (60,8)	80,5 (75,1)
Ψ	69,8 (60,1)	68,9 (61,6)
θ	114,3 (113,0)	115,4 (115,7)

^a Las distancias de enlaces se dan en Å y los ángulos en grados.

^b Los valores entre paréntesis corresponden a los valores experimentales obtenidos por difracción de rayos-X (ver Ref. 35-36).

^c Los ángulos de torsión se definen como $\omega = \text{O5-C5-C6-O6}$; $\omega' = \text{O5}'\text{-C5}'\text{-C6}'\text{-O6}'$; $\varphi = \text{H1-C1-O1-C1}'$; $\psi = \text{H1}'\text{-C1}'\text{-O1-C1}$; $\Phi = \text{O5-C1-O1-C1}'$; $\Psi = \text{C1-O1-C1}'\text{-O5}'$.

$\theta = \text{C1-O1-C1}'$ ángulo de enlace entre las dos unidades de glucosa.

Comparando los resultados presentados en la tabla 1a, se observa un buen acuerdo entre los valores calculados y experimentales en las longitudes de enlaces y en los ángulos de enlaces (entre estos últimos se encuentran diferencias entre 0,5-1°). Las diferencias más marcadas entre los valores calculados y los experimentales se observan en los ángulos de torsión φ y ψ de las formas anhidra e hidratada y en el ángulo de torsión Φ de la forma anhidra.

Los valores experimentales de los ángulos dihedros Φ y Ψ de la forma anhidra son casi idénticos, en contra de lo que se esperaría teniendo en cuenta la observación experimental del espectro CP/MASS RMN de la trehalosa anhidra, que da dos picos bien resueltos para los C1 y C1' (Jeffrey, Nanni, 1985) y están en línea con los valores calculados que difieren en 30°. En la trehalosa hidratada, los valores de φ y ψ , tanto calculados como experimentales difieren en alrededor de 11° contrariando el espectro RMN del dihidrato que da un solo pico para los C1 y C1'.

Tabla 1b. Parámetros geométricos calculados a nivel B3LYP/6-311++G** definidos en los enlaces de hidrógeno^a.

Interacción	d(O...H)	$\Delta d(O...H)^b$	$\angle O...H-(O/C)$
Trehalosa anhidra			
O6'...H-O2	2,1968	0,5032	151,23
O2... H-C5'	2,3404	0,3596	138,52
Trehalosa dihidrato			
O _w ...H-O2	1,7591	0,9409	170,37
O6'...H-O _w	1,7984	0,9016	168,37
O2...H-O _w	1,8550	0,8450	172,84
O _w ...H-O4'	1,9301	0,7699	166,65
O _w ...H-C3'	2,6520	0,0480	132,74
O _w ...H-C5'	2,6540	0,0460	131,57
O2...H-C5'	2,6874	0,0126	158,26

^a Las distancias de enlaces se dan en Å y los ángulos en grados.

^b $\Delta d(O...H)$ es la diferencia entre la distancia de equilibrio O...H observada y la suma de los radios de van der Waals correspondiente a los átomos de H y O.

También es interesante notar que en las dos unidades de glucosa, tanto en la forma anhidra como en la hidratada, se observa que el enlace O5-C5 es aproximadamente 4 mÅ más largo que el enlace O5-C1 este resultado como se discutirá más adelante está en acuerdo con el efecto anomérico.

Con respecto a los parámetros geométricos que definen a los EHs, puede verse en la tabla 1b, que las distancias de equilibrio entre el átomo dador y el átomo aceptor de H, en todos los casos, es menor que la suma de los radios de van der Waals de estos átomos, 2,70 Å (considerando los radios de van der Waals para los átomos de H y de O tomados de Bondi, 1964: H: 1.20 Å y O: 1.50 Å). La diferencia entre ambos valores, expresada como $\Delta d(O...H)$ en la tabla 1b, es llamada distancia de penetración (Bondi, 1964; Klein, 2006) y se correlaciona con la fortaleza del enlace. De acuerdo con esto el EH más fuerte, es el que se establece entre el oxígeno del agua y el OH unido al C2. También para este EH, se observa el valor más alto del ángulo O...H-O.

Análisis topológico. A continuación se describen algunos aspectos principales de la teoría de Átomos en Moléculas.

La teoría de átomos en moléculas (AIM, por sus siglas en inglés) desarrollada por Bader y col. (1990), nos proporciona una rigurosa definición de los átomos, enlaces y estructura química. En esta teoría las propiedades de una distribución de densidad electrónica se basan en el campo del vector gradiente de la densidad electrónica, $\nabla\rho(\mathbf{r})$, y en el Laplaciano de la densidad $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$. La distribución de la densidad electrónica de una dada molécula se describe mediante el conjunto $\rho(\mathbf{r}, q)$, donde \mathbf{r} es un vector en el espacio tridimensional y q representa un conjunto particular de coordenadas nucleares en el espacio correspondiente a la configuración nuclear de la molécula.

Un átomo en una molécula se define como una región del espacio tridimensional bordeado por una superficie de flujo cero, esto es, los puntos sobre esta superficie satisfacen la condición de flujo cero: $\nabla\rho(\mathbf{r}) \cdot n(\mathbf{r}) = 0$, donde $n(\mathbf{r})$ es un vector unidad normal a la superficie en \mathbf{r} .

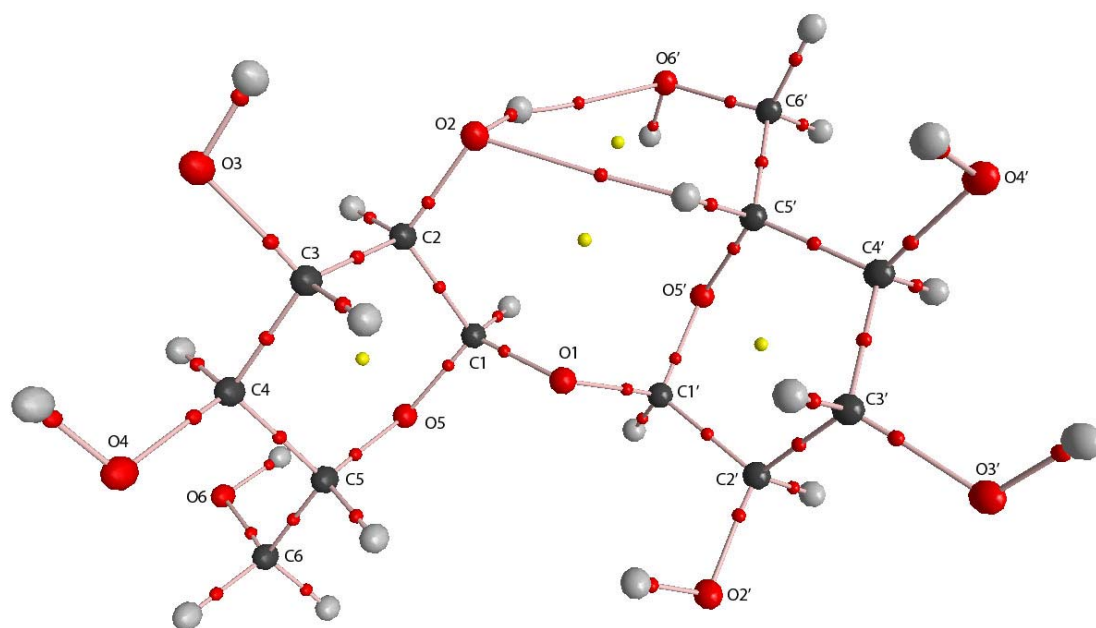
En una molécula, la interacción entre dos átomos crea un punto crítico en la densidad electrónica, en el que $\nabla\rho = 0$, llamado punto crítico de enlace (PCE). Las coordenadas de los PCEs cuyas coordenadas son denotadas por \mathbf{r}_c . El par de caminos de gradiente que se originan en el PCE y terminan en los núcleos vecinos definen una línea, llamada línea de interacción atómica, a través de la cual, la densidad electrónica $\rho(\mathbf{r})$ es un máximo con respecto a cualquier línea vecina. La presencia de esta línea que une a dos núcleos de una molécula en su geometría de equilibrio implica que los dos átomos están enlazados y en esta instancia la línea es llamada camino de enlace. La condición necesaria, para que dos átomos estén enlazados, es por lo tanto,

que sus núcleos estén unidos por una línea de enlace. La red de caminos de enlaces en una molécula en una dada configuración nuclear q define un grafo molecular.

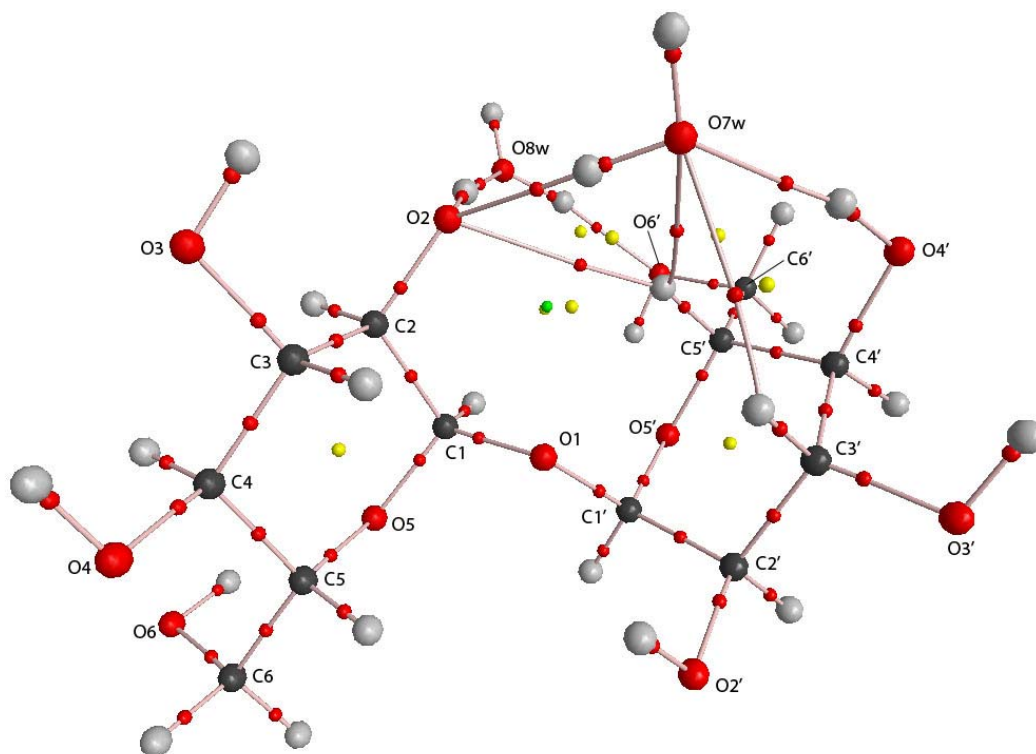
Los puntos críticos en $\rho(\mathbf{r})$ se caracterizan por los tres autovalores λ_1, λ_2 y λ_3 de la matriz Hessiana de $\rho(\mathbf{r})$ y son rotulados como (r, σ) de acuerdo con su rango, r (número de autovalores no nulos) y signatura, σ (suma algebraica de los signos de los autovalores). Existen cuatro PCs, de rango 3, asociados, cada uno, a un elemento de estructura molecular: punto crítico de enlace PCE (3, -1); punto crítico nuclear, PCN (3, -3) generalmente localizados en las posiciones de los núcleos, punto crítico de anillo, PCA (3, +1) asociado a una estructura de anillo y finalmente, punto crítico de caja PCC (3, +3), asociado a una estructura de caja.

Los diferentes parámetros que pueden calcularse en el PCE: densidad, $\rho(\mathbf{r}_c)$, Laplaciano de la densidad, $\nabla^2\rho(\mathbf{r}_c)$, relación entre la curvatura perpendicular a la línea de enlace λ_1 y la curvatura paralela a misma λ_3 , $|\lambda_1|/\lambda_3$, densidades de energía cinética y potencial $G(\mathbf{r}_c)$ y $V(\mathbf{r}_c)$, la relación, $|V(\mathbf{r}_c)|/G(\mathbf{r}_c)$, y densidad de energía total, $H(\mathbf{r}_c)$ permiten caracterizar el tipo de interacción entre dos fragmentos, en covalentes, de capa cerrada (enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno e interacciones de Van der Waals) o intermedias (con características intermedias entre las del tipo covalente y las de capa cerrada).

En la tabla 2 se informan los resultados obtenidos en los PCEs en las formas anhidra y dihidratada de la trehalosa y en las figuras 2 y 3 se muestran los correspondientes grafos moleculares. La existencia de los PCEs; O6'...H-O2 y O2...H-C5' en la trehalosa anhidra indican la ocurrencia de un enlace de hidrógeno bifurcado (o de tres centros), en el que el O2 exhibe un comportamiento dual, actúa como dador de H al O6' y como aceptor de H del C5', los parámetros calculados en tales PCEs son los que corresponden a una interacción de capa cerrada: (la relación entre las curvaturas $|\lambda_1|/\lambda_3 < 1$, $\rho(\mathbf{r}_c)$ presenta valores relativamente bajos, $\nabla^2\rho(\mathbf{r}) > 0$; las densidades de energía cinética y potencial son del mismo orden de magnitud, y la relación $|V(\mathbf{r}_c)|/G(\mathbf{r}_c) < 1$ es positivo) y contrastan con los valores observados en los PCEs: C-H y O-H, los cuales correspondientes a una interacción covalente (la relación $|\lambda_1|/\lambda_3 > 1$; la $\rho(\mathbf{r}_c)$ alcanza valores más altos (casi un orden de magnitud mayor), el Laplaciano, $\nabla^2\rho(\mathbf{r}) < 0$; y la densidad de energía potencial $V(\mathbf{r}_c)$ es un orden de magnitud mayor que la densidad de energía cinética, $G(\mathbf{r}_c)$, la densidad de energía total $H(\mathbf{r}_c) < 0$ y la relación $|V(\mathbf{r}_c)|/G(\mathbf{r}_c) > 1$). Es interesante notar que los valores de todos estos parámetros son sólo ligeramente menores en el PC del enlace O2...H-C5', que en el PC del enlace O6'...H-O2, dado que, como ha sido observado en numerosos estudios, el valor de la densidad en el PCE se correlaciona con la fortaleza de la interacción, estos resultados indican que la fortaleza de los dos EH son similares, aún cuando en el primer caso, el átomo dador es un átomo de carbono.



(a)



(b)

Figura 2. (a) Grafo molecular de la trehalosa anhidra. **(b)** Grafo molecular de la trehalosa dihidratada. Los pequeños círculos rojos denotan a los puntos críticos de enlaces (PCE) y los amarillos a los puntos críticos de anillo (PCA).

Tabla 2. Parámetros topológicos calculados en los PCEs O...H-C, O-H...O; H-O y C-H^a.

	$ \lambda_1 /\lambda_3$	$\rho(\mathbf{r}_c)$	$\nabla^2\rho(\mathbf{r})$	$G(\mathbf{r}_c)$	$V(\mathbf{r}_c)$	$H(\mathbf{r}_c)$	$ V(\mathbf{r}_c) /G(\mathbf{r}_c)$
Trehalosa anhidra							
O2...H-C5'	0,1954	0,0132	0,0427	0,0094	0,0081	0,0013	0,8613

H-C5'	1,4018	0,2858	-0,9828	0,0367	0,3191	-0,2824	8,6971
O6'...H-O2	0,2140	0,0153	0,0489	0,0109	0,0096	0,0013	0,8772
H-O2	1,7292	0,3555	-2,4685	0,0691	0,7554	-0,6862	10,9300
Trehalosa dihidrato							
O7w...H-O2	0,2445	0,0372	0,1290	0,0328	0,0333	-0,0005	1,0163
H-O2	1,6721	0,3402	-2,3864	0,0663	0,7291	-0,6629	11,0024
O2...H-C5'	0,1710	0,0068	0,0202	0,0045	0,0040	0,0005	0,8784
H-C5'	1,4165	0,2858	-0,9822	0,0376	0,3207	-0,2831	8,5393
O2...H-O8w	0,2285	0,0296	0,1062	0,0252	0,0239	0,0013	0,9477
H-O8w	1,6950	0,3430	-2,4055	0,0661	0,7335	-0,6674	11,1013
O6'...H-O7w	0,2449	0,0351	0,1167	0,0294	0,0297	-0,0003	1,0088
H-O7w	1,6729	0,3382	-2,3655	0,0662	0,7238	-0,6576	10,9297
O8w...H-O4'	0,2209	0,0253	0,0926	0,0212	0,0192	0,0020	0,9054
H-O4'	1,7289	0,3508	-2,4450	0,0682	0,7477	-0,6795	10,9593
O8w...H-C3'	0,1840	0,0069	0,0226	0,0049	0,0042	0,0007	0,8487
H-C3'	1,4142	0,2809	-0,9508	0,0381	0,3139	-0,2758	8,2361
O8w...H-C5'	0,1685	0,0066	0,0236	0,0050	0,0042	0,0009	0,8272

En la trehalosa dihidratada, se verifica un total de 7 EHs, el O2 participa en un EH trifurcado, dona H al oxígeno de una molécula de agua (O7w...H-O2) y acepta H del C5' y del oxígeno de la segunda molécula de agua (O2...H-C5'; O2...H-O8w). El O7w cede H al O6' formando un EH inter-residuo (O6'...H-O7w). El átomo de oxígeno de la segunda molécula de agua a su vez, acepta H de los átomos O4', C3', C5' (O8w...H-O4'; O8w...H-C3' y O8w...H-C5'). Como se ve reflejado en los valores de la densidad en los PCEs, los EHs del tipo O...H-O son mucho más fuertes que los del tipo O...H-C, siendo el de mayor fortaleza el enlace O7w...H-O2 ($\rho(\mathbf{r}_c) = 0,0372$). Es importante, notar que la red de EHs formada, abarca a una única región de la molécula, ubicada por encima del oxígeno glicosídico, y es consistente con la solvatación anisotrópica de la trehalosa observada en los trabajos de Choi y col. (2006). Esta particularidad, tiene que ver con el tipo de unión glicosídica de la trehalosa y podría ser la explicación de la mayor capacidad bioprotectora que exhibe este disacárido. Los grupos OH unidos a los C3, C4, C6, C2' y C3' al no formar EHs, intramoleculares ni intermoleculares con el agua, quedarían disponibles para unirse a los grupos polares de las estructuras biológicas mediante EHs.

Análisis NBO. La aproximación de los orbitales naturales de enlaces, NBO, es una técnica de análisis poblacional, que proporciona una representación localizada de la densidad de electrones en una molécula, a partir de funciones de onda electrónicas. Los orbitales localizados pueden ser identificados con los enlaces, pares libres y antienlaces. La fortaleza o energía de las interacciones de deslocalización, $E^{(2)}$ entre orbitales se estiman mediante la teoría de perturbación de segundo orden y dependen de la orientación relativa de los orbitales y de la diferencia de energía entre los orbitales dadores y aceptores.

En la tabla 3 se informan los resultados del análisis NBO. Con n_o se denotan los números de ocupación (poblaciones) de los orbitales correspondientes a los pares libres (PL), de los átomos de oxígeno. Con σ^* se denotan las poblaciones los orbitales antienlazantes y con E^2 (dador \rightarrow aceptor) a las energías de las interacciones hiperconjugativas de transferencia de carga (ITC) entre los orbitales dadores y aceptores. Como es usual en un análisis NBO, las poblaciones se expresan en u.a. (e) y E^2 en kcal/mol.

La observación de los resultados reportados en la tabla 3 revela que las ITC entre los orbitales involucrados en los EHs, de la trehalosa anhidra son muy bajas (2,7 kcal/mol para $n_{O6'} \rightarrow \sigma^*_{O2-H}$ y 1,04 para $n_{O2} \rightarrow \sigma^*_{C5'-H}$) si se comparan con las que se observan en otros sistemas de EHs (Martínez Amezaga, Pamies, Peruchena, Sosa, 2010), en los que estas interacciones alcanzan valores entre 10 y 30 kcal/mol, sin embargo están en línea con los valores de los parámetros topológicos calculados en los PCEs.

En la trehalosa dihidratada, aquellas ITC que involucran a un EH en las que el átomo dador de H es un átomo de C, son más bajas aún (varían entre 0,23 y 0,66 kcal/mol), mientras que para las interacciones del tipo $n_{O \rightarrow} \sigma^*_{H-O}$ varían en un rango de 5,32 a 16,62 kcal/mol, éste último valor es el más alto encontrado en la tabla 3 y corresponde a la ITC $n_{O7w \rightarrow} \sigma^*_{(H-O2)}$. Estos resultados también en buen acuerdo con los resultados del análisis topológico de la trehalosa dihidratada, sin embargo, no son consistentes con las poblaciones elevadas de los antienlaces $\sigma^*(C-H)$, por ejemplo la población del antienlace C3'-H es de 0,03867 e. Esto sugiere que debe haber otro orbital distinto al par libre del O8w que transfiera carga a este antienlace contribuyendo de manera más importante a su población. En efecto, otra ITC que contribuye a la población del antienlace C3'-H proviene del par libre del O3' cuyo valor es de 7,52 kcal/mol (resultado no informado en la tabla 3). Lo mismo ocurre con los otros antienlaces, en todos los casos, el par libre de un átomo de oxígeno cercano transfiere carga electrónica a los antienlaces $\sigma^*(C-H)$.

Finalmente resulta interesante examinar mediante el análisis NBO los efectos anomérico y exoanomérico en la trehalosa. El efecto anomérico determina que, para los sustituyentes electronegativos en posición 1 de los anillos de piranosa, la orientación axial es más estable que la ecuatorial, en contra de lo esperado en base a interacciones estéricas. De acuerdo con el modelo estereoelectrónico, esta preferencia tiene su origen en la deslocalización hiperconjugativa de un par electrónico no enlazante del oxígeno endocíclico, con el orbital σ^* del enlace contiguo C1-O1, la cual es posible solamente en la orientación axial. Debido a este hecho, en la configuración axial (anómero α) se observa un acortamiento del enlace O5-C1, un alargamiento del enlace C1-O1 y un aumento del ángulo O5-C1-O1, con respecto al análogo ecuatorial. Por lo expuesto, el efecto anomérico en la trehalosa, puede cuantificarse mediante la energía de estabilización hiperconjugativa que involucra a los pares libres de los oxígenos de los anillos (O5 y O5') y a los orbitales antienlazantes $\sigma^*(C1-O1)$ y $\sigma^*(C1'-O1')$.

Por otro parte, el efecto exo-anomérico se refiere al predominio de una orientación de tipo gauche para la torsión exocíclica, es decir, afecta al ángulo diedro definido por el enlace glicosídico. Los oligosacáridos que presentan conformación exoanomérica presentan valores del ángulo diedro definido por el enlace glicosídico $\varphi = H1-C1-O1-C1'$ y $\psi = H1'-C1'-O1-C1$ entre 0 y -60° y los que presentan conformación no-exoanomérica valores positivos. En base al modelo estereoelectrónico, el efecto exoanomérico establece que se encuentran favorecidas aquellas conformaciones alrededor del enlace interglicosídico que permitan la interacción entre el par libre del átomo de oxígeno unido a la posición 1 del anillo de piranosa con el orbital σ^* del enlace endocíclico C1-O5. Este efecto puede entonces cuantificarse mediante la energía de estabilización hiperconjugativa $E^2: n_{O1} \rightarrow \sigma^*(C1-O5)$ y $E^2: n_{O1} \rightarrow \sigma^*(C1'-O5')$.

Tabla 3. Análisis NBO en la trehalosa: números de ocupación de los antienlaces σ^*_{C-O} , $\sigma^*_{(O-H)}$ y $\sigma^*_{(C-H)}$, de los pares libres n_O , y las energías perturbativas de segundo orden E^2 (dador \rightarrow aceptor) involucrando a los antienlaces $\sigma^*_{(C-O)}$, $\sigma^*_{(O-H)}$ y $\sigma^*_{(C-H)}$ ^a.

	$E^2 (n_O \rightarrow \sigma^*)$	n_O	σ^*
Trehalosa anhidra			
$n_{O6'} \rightarrow \sigma^*_{(O2-H)}$	2,700	1,95435	0,01640
$n_{O2} \rightarrow \sigma^*_{(C5'-H)}$	1,040	1,95022	0,03736
$n_{O5} \rightarrow \sigma^*_{(C1-O1)}$	13,61	1,90474	0,06565
$n_{O5'} \rightarrow \sigma^*_{(C1'-O1)}$	11,99	1,90854	0,06163
$n_{O1} \rightarrow \sigma^*_{(C1'-O5')}$	12,31	1,88937	0,05555
$n_{O1} \rightarrow \sigma^*_{(C1-O5)}$	12,24		0,05231
Trehalosa dihidrato			
$n_{O2} \rightarrow \sigma^*_{(C5'-H)}$	0,66	1,94699	0,03688
$n_{O2} \rightarrow \sigma^*_{(H-O8w)}$	5,32		0,02431
$n_{O6'} \rightarrow \sigma^*_{(H-O7w)}$	12,64	1,94213	0,03292

$n_{O8w} \rightarrow \sigma^*_{(C3'-H)}$	0,23		0,03867
$n_{O8w} \rightarrow \sigma^*_{(C5'-H)}$	0,28	1,97820	0,03688
$n_{O8w} \rightarrow \sigma^*_{(H-O4')}$	8,61		0,02486
$n_{O7w} \rightarrow \sigma^*_{(H-O2)}$	16,62	1,96271	0,03819
$n_{O5} \rightarrow \sigma^*_{(C1-O1)}$	12,84	1,90647	0,06299
$n_{O5'} \rightarrow \sigma^*_{(C1'-O1)}$	11,69	1,90975	0,06164
$n_{O1} \rightarrow \sigma^*_{(C1-O5)}$	13,09		0,05481
$n_{O1} \rightarrow \sigma^*_{(C1'-O5')}$	11,95	1,88773	0,05459

^a Las poblaciones se expresan en u.a. y las energías E^2 en kcal/mol.

Como puede verse en la tabla 3, en la trehalosa anhidra, se observa un efecto anomérico importante, sin embargo, el hecho de que la E^2 correspondiente a la interacción $n_{O5} \rightarrow \sigma^*_{(C1-O1)}$ sea 1,62 kcal/mol más alta que la que corresponde a la interacción $n_{O5'} \rightarrow \sigma^*_{(C1'-O1)}$ indica que la orientación relativa de los orbitales dador-aceptor (ver figura 4) es más favorable en la primera unidad de glucosa que en la segunda. Esto también se ve reflejado en la menor población del par libre del O5, la mayor población del antienlace $\sigma^*(C1-O1)$ y en los parámetros geométricos, dado que la distancia de enlace O5-C1 es más corta que la del enlace O5'-C1', la del enlace C1-O1 más larga que la del enlace C1'-O1 y el ángulo O5-C1-O1 mayor que el ángulo O5'-C1'-O1 (ver tabla 1). Con respecto al efecto exoanomérico, en cambio, las energías correspondientes a las interacciones $n_{O1} \rightarrow \sigma^*_{(C1-O5)}$ y $n_{O1} \rightarrow \sigma^*_{(C1'-O5')}$ son prácticamente iguales.

En la trehalosa hidratada tanto el efecto anomérico como el exoanomérico son mayores en una unidad de glucosa. Estos resultados también son consistentes con los parámetros geométricos.

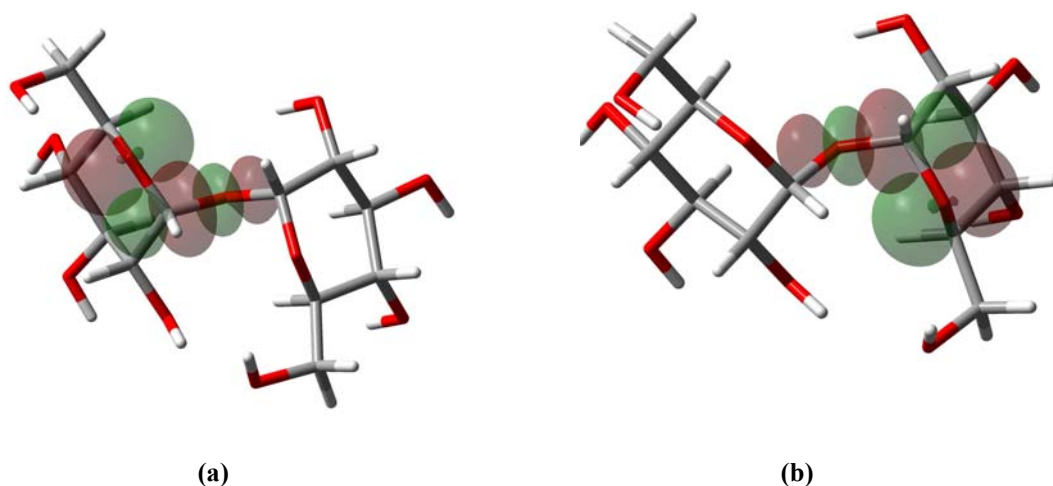


Figura 4. Orbitales NBO en la trehalosa anhidra (a) Solapamiento entre el PL del O5 y el antienlace $\sigma^*_{(C1-O1)}$. (b) Solapamiento entre el PL del O5' y el antienlace $\sigma^*_{(C1'-O1)}$. Nótese el menor solapamiento entre estos orbitales

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha realizado un estudio detallado, al nivel B3LYP/6-311++G** de teoría, de la estructura electrónica de las formas anhidra e hidratada de la trehalosa. El análisis topológico basado en la teoría AIM revela, la formación de un EH bifurcado, O6'...H-O2...H-C5' en la trehalosa anhidra. En la forma hidratada revela la ocurrencia de una red de EHs con las moléculas de agua, que involucra a sólo tres grupos OH de la trehalosa y que se localiza en una región delimitada de la molécula por encima del oxígeno glicosídico. Estos resultados consistentes con la solvatación anisotrópica de la trehalosa observada en otros estudios, sugieren, que la unión 1-1 glicosídica es un factor clave en el mecanismo de protección de la

trehalosa dado que ello determina que varios grupos OH no puedan formar EHs entre sí y al mismo tiempo liberados para unirse mediante EHs a los grupos polares de las estructuras biológicas.

El análisis NBO, ha revelado que las interacciones de transferencia de carga no contribuyen de forma significativa a la estabilidad de los EHs, y también, que las dos formas de la trehalosa anhidra e hidratada exhiben efectos anoméricos y exoanoméricos.

REFERENCIAS

- Adams, R. P.; Kendall, E.; Kartha, K. K. (1990). Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochem.Syst. Ecol.*, 18, 107–110.
- Bader, R.F.W. (1990). *Atoms in Molecules. A Quantum Theory*, Clarendon, Oxford.
- Becke, A. D. (1993). Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, 98, 5648.
- Belton, P. S.; Gil, A. M. (1994). IR and Raman spectroscopic studies of the interaction of trehalose with hen egg white lysozyme. *Biopolymers*, 34, 957–961.
- Blieger-König, F.; Schönbohn, J. (2002). *AIM2000 program package*, Version 2.0; chemical adviser Bader, R. F. W.; Büro für Innovative Software Streibel Blieger-König: Germany.
- Brown, G. M.; Rohrer, D. C.; Berking, B.; Beevers, C. A.; Gould, R. O.; Simpson, R. (1972). The crystal structure of α,α -trehalose dihydrate from three independent X-ray determinations. *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.*, 28, 3145.
- Bondi, A. (1964). van der Waals Volumes and Radii. *J. Phys. Chem.*, 68, 441.
- Choi, Y.; Cho, K. W.; Jeong, K.; Jung, S. (2006). Molecular dynamics simulations of trehalose as a ‘dynamic reducer’ for solvent water molecules in the hydration shell *Carbohydr. Res.*, 341, 1020-1028.
- Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Jackson, S. A. (1983). Preservation of structural and functional activity in lyophilized sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.*, 220, 477–484.
- Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science*, 223, 701–703.
- Crowe, J. H.; Oliver, A. E.; Tablin, F. (2002). Is there a single biochemical adaptation to anhydrobiosis? *Integr. Comp. Biol.*, 42, 497–503.
- Crowe, L. M. (2002). Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Biochem. Phys. A*, 131, 505–13.
- Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Carpenter, J. F.; Wistrom, C. A. (1987). Stabilization of dry phospholipids bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.*, 242, 1–10.
- Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Oliver, A. E.; Tsvetkova, N.; Wolkers, W.; Tablin, F. (2001). The trehalose myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*, 43, 89.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian 03, revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.

- Green, J. L.; Angell, C. A. (1989). Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *J. Phys. Chem.*, 93, 2880–2882.
- Haydon, C. *SPC, Soap, Perfum., Cosmet.* 2000, 73, 39.
- Jeffrey, G. A.; Nanni, R. (1985). The crystal structure of anhydrous α,α -trehalose at -150° . *Carbohydr. Res.*, 137, 21.
- Klein, R. A. (2006). Modified van der Waals atomic radii for hydrogen bonding based on electron density topology. *Chem. Phys. Lett.* 425, 128-133
- Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. (1988). Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, 37, 785.
- Lee, S. L.; Hafeman, A. E.; Debenedetti, P. G.; Pethica, B. A.; Moore, D. J. (2006). Solid-State Stabilization of α -Chymotrypsin and Catalase with Carbohydrates. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45, 5134–5147.
- Liu, Q.; Schmidt, R. K.; Teo, B.; Karplus, P. A.; Brady, J. W. (1997). Molecular Dynamics Studies of the Hydration of α,α -Trehalose. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 7851–7862.
- Maillard, L.C. (1912) Action des acides amines sur les sucres; formation des melanoidines par voie methodique. *Comptes. Rendus Acad. Sci. (Paris)* 154, 66.
- Martínez Amezaga, N. J.; Pamies, S. C.; Peruchena, N. M. and Sosa, G. L. (2010). Halogen Bonding: A Study based on the Electronic Charge Density. *J. Phys. Chem. A*, 114, 552-562.
- Nakagaki, M.; Nagasse, H.; Ueda, H. (1992). Stabilization of the lamellar structure of phosphatidylcholine by complex formation with trehalose membrane *J. Membr. Sci.*, 73, 173–180.
- NBO Versión 3.1, Glendening, E. D.; Reed, A. E.; Carpenter.
- Reed, A. E.; Curtis, L. A.; Weinhold, F., (1988). Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint *Chem. Rev.*, 1988, 88, 899.
- Robinson, C. H. (2001). Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytol.*, 151, 341–353.
- Roser, B. (1991). Trehalose, a new approach to premium dried foods. *Trends Food Sci. Technol.* , 2, 166-169.
- Sun, W. Q.; Leopold, A. C.; Crowe, L. M.; Crowe, J. H (1996). Stability of dry liposomes in sugar glasses. *Biophys. J.*, 70, 1769–1776
- Sun, W. Q.; Leopold, A. C. (1997). Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. *Comp. Biochem. Phys. A*, 117, 327–333.
- Sun, W. Q.; Irving, T. C.; Leopold, A. C. (1994) The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiol. Plant.*, 90, 621–628.
- Sun, W. Q.; Leopold, A. C. (1994). Glassy state and seed storage stability: a viability equation analysis. *Ann. Bot.*, 74, 601–604.
- Wang, W. (1999). Instability, stabilization and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.*, 185, 129.
- Weinhold, F., Natural bond orbital methods in: P.v.R. Schleyer (Ed.), (1988). *Encyclopedia Comput. Chem.*, Wiley, Chichester, UK, 1793-1810.
- Westh, P.; Ramlov, H. (1991). Trehalose accumulation in the tardigrade *Adorybiotus coronifer* during anhydrobiosis. *J. Exp. Zool.*, 258, 303–311.
- Williams, R. J.; Leopold, A. C. (1989). The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Plant Physiol.*, 89, 977–981.
- Xie, G. F.; Timasheff, S. N. (1997). The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophys. Chem.*, 64, 25–43.