

¡Disolvente fuera!: azúcares en fase gas

Emilio J. Cocinero, Alberto Lesarri

Resumen: Presentamos diversas estrategias de la Química-Física para el estudio en fase gas de monosacáridos, glicanos y complejos modelo glicano-proteína, basadas en el uso de espectroscopías de alta resolución láser y microondas. Estos estudios espectroscópicos son posibles gracias al desarrollo de las técnicas de vaporización láser, que evitan la descomposición de muestras termolábiles. El potencial de estos métodos experimentales se ilustra con diversos problemas relativos a conformación, polimerización, solvatación y agregación intermolecular.

Palabras clave: Carbohidratos, microsolvatación, complejos glicano-proteína, espectroscopía láser, espectroscopía de microondas.

Abstract: We present Physical Chemistry strategies for the gas-phase study of monosaccharides, glycans and glycan-protein model complexes based on high-resolution laser and microwave spectroscopies. Spectroscopy is supported by sugar vaporization using laser ablation, avoiding sample decomposition. The potential of these experimental methods is illustrated with different problems concerning conformation, polymerization, solvation and molecular aggregation.

Keywords: Carbohydrates, microsolvation, glycan-protein complexes, laser spectroscopy, microwave spectroscopy.

Introducción

Los azúcares son moléculas extremadamente versátiles que pueden adoptar múltiples funcionalidades biológicas y que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Su importancia justifica la acuñación del término *Glicobiología*,¹ un área de las ciencias bioquímicas que pretende unificar la Química tradicional de carbohidratos y el estudio de su estructura, biosíntesis y aplicaciones bioquímicas y biotecnológicas. Dentro de este inmenso campo nuestro interés se centra en los bloques más sencillos que conforman las estructuras macromoleculares de los seres vivos. Esta escala reducida permite una descripción molecular muy detallada, pudiendo establecer las bases del funcionamiento de sistemas más complejos. Estos trabajos tienen cuatro puntos destacados: el estudio de los problemas de conformación, reactividad, solvatación y reconocimiento molecular. Todos estos aspectos han sido abordados con técnicas muy diversas. En este artículo pretendemos ilustrar la contribución de los métodos de la Química-Física a la resolución de problemas

estructurales en la Química de los azúcares desde un *punto de vista molecular*.

La palabra clave de la metodología químico-física es des-agregación. Al contrario de los estudios en disolución o en el medio cristalino, que examinan las propiedades de un sistema en interacción con una infinidad de moléculas vecinas (ya sea el propio disolvente o ellas mismas), los estudios en fase gaseosa permiten aislar una sola molécula, pudiendo analizar sus propiedades individuales sin ninguna interferencia.^{2,3} Es obvio que la fase gas está muy alejada del medio fisiológico o biológico donde las moléculas ejercen su función. Sin embargo, ofrece varias ventajas únicas. En primer lugar, proporciona una descripción detallada de las propiedades estructurales intrínsecas. Cada molécula puede presentar a su vez múltiples conformaciones, que representan una “fotografía instantánea” de sus disposiciones espaciales preferentes (los puntos más estables de la superficie de energía potencial). Estructura y conformación ponen de manifiesto los factores internos que gobiernan la estabilidad del sistema. De esta forma, podemos detectar la presencia de efectos intramoleculares como los enlaces de hidrógeno o las interacciones entre orbitales (estereoelectrónicas) como el efecto anomérico, normalmente enmascarados en fases condensadas. Por otra parte, la fase gas permite el estudio de *interacciones intermoleculares a la carta*, seleccionando, bien la formación controlada de agregados intermoleculares, o bien la interacción a través de fuerzas específicas que involucren a grupos funcionales de interés. Así, por ejemplo, podemos controlar la formación de agregados microsolvatados con un cierto número de moléculas de agua, o generar complejos entre dos moléculas cualesquiera. La formación de complejos intermoleculares generalmente está controlada por interacciones débiles no covalentes (que no dan lugar a enlaces químicos), como por ejemplo, enlaces de hidrógeno o interacciones dispersivas.⁴ Los complejos intermoleculares constituyen así modelos a escala reducida que reproducen las interacciones locales que tienen lugar en sistemas mucho más grandes, como puede ser la unión entre un glicano y una proteína. Esta *aproximación reduccionista* se justifica también por la pequeña magnitud de las interaccio-



E. J. Cocinero^a



A. Lesarri^b

^aUniversidad del País Vasco (UPV/EHU), Facultad de Ciencia y Tecnología, Departamento de Química Física.

C-e: emiliojose.cocinero@ehu.es,
<http://grupodeespectroscopia.es/MW/>

^bUniversidad de Valladolid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Física y Química Inorgánica

C-e: lesarri@qf.uva.es, www.uva.es/lesarri/

Recibido: 19/07/2013. Aceptado: 08/11/2013.

nes no covalentes ($< 20 \text{ kJ mol}^{-1}$) y por la propia complejidad de muchos sistemas bioquímicos (donde visualizamos un sumatorio de muchos factores químicos), que resultarían inabordables mediante técnicas de alta resolución. Otro aspecto de los estudios en fase gas es la posibilidad de comparar directamente sus resultados con las predicciones teóricas.⁵ De esta comparación se obtiene un doble beneficio, ya que es posible calibrar los métodos teóricos con medidas experimentales y, por otra parte, permite establecer qué modelos serían más apropiados para la investigación de otros sistemas de tamaño semejante o con determinadas interacciones intermoleculares. La descripción que proporcionan los estudios en fase gas es una visión complementaria a los estudios en fases condensadas (p.e. RMN⁶ o difracción de rayos X⁷), aportando un punto de vista alternativo para comprender en su totalidad las propiedades y funcionalidades biológicas.

En este artículo presentaremos técnicas experimentales empleadas en el estudio de problemas moleculares de la Química de azúcares. Posteriormente señalaremos algunos ejemplos relevantes en orden de complejidad creciente, comenzando con los bloques estructurales más sencillos, los monosacáridos, y progresando hacia especies de mayor tamaño, como glicanos, sus hidratos y complejos intermoleculares representativos de las uniones azúcares-proteínas. Destacaremos en cada punto qué información química puede obtenerse y qué problemas se plantean cara a futuros estudios.

Caja de herramientas (... espectroscópicas)

Los medios experimentales desarrollados en nuestro trabajo están basados en técnicas espectroscópicas de alta resolución, que utilizan la interacción entre la radiación electromagnética y la materia para desentrañar las propiedades moleculares. Las técnicas espectroscópicas incluyen múltiples variantes atendiendo al tipo de radiación y a los procesos de absorción/emisión/dispersión observados. En este artículo presentaremos dos tipos de métodos espectroscópicos aún poco empleados en España, incluyendo las técnicas de espectroscopia láser electrónico-vibracional^{8,9,10} y la espectroscopia de rotación molecular en la región de microondas.^{11,12} Ambas técnicas tienen en común la preparación de la muestra en forma de chorros supersónicos fríos, evitando la utilización de mezclas gaseosas estáticas a temperaturas ordinarias.¹³ La generación del chorro supersónico se produce a partir de la expansión cuasiadiabática de una mezcla gaseosa presurizada (2-10 bar) en el seno de una cavidad de alto vacío ($\sim 10^{-7}$ mbar) y conlleva tres ventajas principales. En primer lugar, se traduce en un fuerte enfriamiento rovibracional, con temperaturas efectivas de rotación de sólo 2-3 K (1-2 órdenes de magnitud superior en el caso de la vibración). Por tanto se pueblan solamente los niveles de rotación-vibración más bajos, simplificando enormemente los espectros. Por otra parte, el régimen de colisiones en el chorro disminuye prácticamente a cero al alejarse de la tobera. Por tanto, todos aquellos complejos intermoleculares generados en el momento de la expansión, sea cual sea su naturaleza u origen (p.e. dímeros, trímeros, complejos con agua o con otras especies) permanecen inalterados en el chorro pese a su extrema fragilidad, permitiendo la observación de especies

inestables que de otra manera sería imposible abordar. Por último, la ausencia de colisiones entre las moléculas y las paredes del recipiente contribuye a disminuir notablemente la anchura de línea, mejorando muy notablemente la resolución de los experimentos. La utilización de chorros supersónicos combina de forma natural con el uso de láseres o fuentes de radiación pulsadas, dado que los tiempos de operación de un láser (ns-ps-fs) son varios órdenes de magnitud más cortos que la escala temporal de la expansión (μs -ms). En otras palabras: las especies débilmente enlazadas creadas en la expansión sobreviven el tiempo necesario para ser estudiadas con las técnicas espectroscópicas de medida.

Los procesos implicados en las espectroscopías láser y de microondas son variados. La espectroscopia láser combina una o varias fuentes sintonizables en las regiones ultravioleta-visible-infrarroja, con resoluciones capaces de discriminar transiciones vibrónicas y, en algunos casos, rotacionales, en procesos de absorción o emisión de uno o varios fotones. Un factor clave de estos experimentos es la alta irradiancia de los láseres, que proporciona simultáneamente excitación electrónica y, posteriormente, ionización molecular ($A \rightarrow A^* \rightarrow A^+$: ionización multifotónica resonante, REMPI). De esta forma es posible observar transiciones vibrónicas empleando detectores de iones, selectivos a la masa de especies específicas y mucho más sensibles que los detectores de fotones. El empleo simultáneo de varios láseres permite diseñar diferentes experimentos. Cabe destacar los de doble resonancia (DR), que posibilitan selectividad para conformaciones moleculares determinadas. Así, por ejemplo, la DR UV-UV, que emplea un láser de bombeo (*pump*) a frecuencia fija sintonizado a una transición electrónica y un láser sonda (*probe*) de barrido, permite registrar separadamente los espectros vibrónicos de las diferentes conformaciones moleculares (despoblación conformacional o “*hole burning*”). Aún más, empleando DR IR-UV (despoblación iónica o “*ion dip spectroscopy*”) donde es posible obtener el espectro de vibración puro, con la ventaja de que pueden filtrarse las especies (selectividad en masa) y las conformaciones deseadas (selectividad conformacional). La información contenida en las vibraciones moleculares se interpreta con ayuda de predicciones teóricas mecanocuánticas y permiten evaluar por comparación qué conformaciones o interacciones intra/intermoleculares actúan en la molécula aislada o sus complejos. Otros experimentos láser más elaborados se revisan en la bibliografía.¹⁴

Las técnicas de rotación molecular son complementarias. En este caso, el uso de fuentes coherentes a frecuencias de microondas, escasamente energéticas y de mayor resolución (kHz), permite el análisis de transiciones de rotación pura (generalmente en el estado fundamental de vibración). La información inercial conduce directamente a la determinación de la estructura molecular sin necesidad de suposición teórica alguna, lo que resulta especialmente valioso para validar las predicciones estructurales de los modelos teóricos. La espectroscopia de microondas moderna (FT-MW) está basada en técnicas de excitación pulsada, semejantes conceptualmente a la FT-RMN aunque a escalas temporales mucho más cortas (μs).^{11,12} Un pulso de microondas genera una polarización eléctrica de las especies de la muestra, lo que orienta los dipolos eléctricos de forma coherente. Al cesar la excitación

la pérdida de coherencia se traduce en una emisión molecular transitoria, cuya transformación de Fourier (FT) proporciona el espectro en el dominio de frecuencias.

Ambas técnicas espectroscópicas pueden ayudarse de otras herramientas experimentales. Un problema común a las técnicas de caracterización en fase gas es la dificultad de vaporización de especies térmicamente lábiles, lo que hace difícil o imposible su observación por métodos convencionales de calentamiento. En la última década los autores han contribuido al desarrollo de la espectroscopia con ablación láser,¹⁵ que permite la vaporización efectiva de muestras inestables con una mínima fragmentación o descomposición usando láseres de ns y ps. Los trabajos que presentamos aquí utilizan este tipo de herramientas de vaporización.

Con independencia de sus distintos mecanismos, una de las diferencias significativas entre la espectroscopia láser y la espectroscopia de microondas se encuentra en su rango de aplicabilidad. El espectro de rotación depende de las masas y geometrías moleculares. Un aumento de la masa supone un incremento en los momentos de inercia. Por este motivo en los sistemas de mayor tamaño las transiciones se acumulan y desplazan a frecuencias menores, haciendo más difícil la interpretación de los espectros. Este hecho hace que, si bien la espectroscopia de rotación permite una mejor resolución y caracterización estructural, su aplicación se limita a sistemas de tamaño reducido (< 30-40 átomos). Por el contrario, la espectroscopia láser, aunque tiene una resolución vibracional menos detallada, permite examinar especies mucho más grandes (incluso virus), lo que hace posible el examen de pequeños glicanos y complejos intermoleculares.²

Monosacáridos: especies poliestructurales y policonformacionales

Azúcar es un nombre general para moléculas que combinan un aldehído/cetona con grupos hidroxilo. Los azúcares más sencillos son los monosacáridos, que, pese a su simplicidad, se caracterizan por una enorme flexibilidad estructural. Muchas aldosas o cetosas se ciclan intramolecularmente por la formación de grupos hemiacetal o hemicetal, por lo que pueden alternar entre formas de cadena abierta o cíclicas, cada una con múltiples posibilidades conformacionales (incluso cientos de estructuras potenciales: Figura 1). Los primeros trabajos espectroscópicos en fase gas sobre monosacáridos fueron realizados por el grupo de John P. Simons¹⁶ (Oxford) empleando técnicas láser. La idea era crear un pequeño “alfabeto” a partir de las bandas de vibración de los grupos hidroxilo (extremadamente sensibles al entorno que les rodea, en particular a los enlaces de hidrógeno) y extrapolar este alfabeto a sistemas más complejos. Estos estudios iniciales analizaron los espectros de vibración de diferentes aldosas de seis (glucosa, galactosa, manosa...) y cinco átomos de carbono (xilosa,...). Sin embargo, debido al uso de detección REMPI estas moléculas necesitan un grupo cromóforo adicional (p.e. fenilo), lo que modifica parcialmente el sistema. El primer trabajo con espectroscopia de microondas de un azúcar (sin cromóforo) fue publicado en 2012 y se dedicó a la ribosa,¹⁷ una pentosa que se encuentra en compuestos biológicos (ARN, ATP,...) en forma de β -furanosa (anillo de cinco miembros). El espectro de rotación detectó una gran varia-

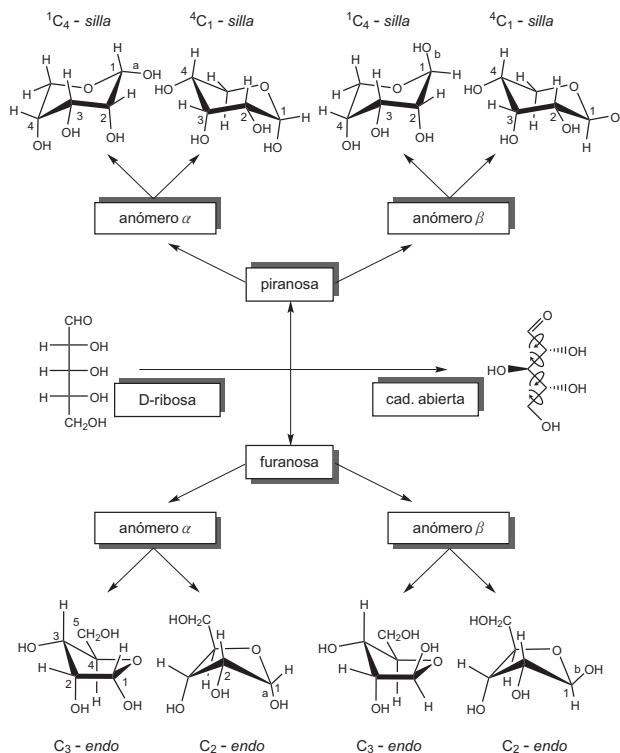


Figura 1. Polimorfismo estructural de una pentosa: D-ribosa.

bilidad conformacional, con seis estructuras muy próximas en energía (ca. 4,6 kJ mol⁻¹, Figura 2). Ahora bien, en todos los casos la ribosa adopta una forma tautomérica piranósida (anillo de seis miembros), que no tiene papel biológico. Los conformeros observados se distribuyen entre β -piranosas (más estables) y α -piranosas, con conformaciones tipo silla 1C_4 o 4C_1 próximas en energía. Es característico que todas las conformaciones están estabilizadas por una red cooperativa de enlaces de hidrógeno intramolecular O-H...O, que constituyen el factor principal de estabilidad de los monosacáridos aislados. Los efectos anoméricos contribuyen también notablemente a la estabilización de estos pequeños “ladrillos de la vida”.

Este estudio ha sido seguido por el análisis de la 2-deoxiribosa,¹⁸ fructosa¹⁹ (primera cetosa observada en fase gas), xilosa²⁰ y eritrosa,²¹ a fin de comparar el efecto que produce la eliminación de un grupo hidroxilo, o la introducción/eliminación de un átomo carbono en el azúcar. En todos los casos se concluye que los piranósidos son las formas preferidas en fase gas, corroborando en este caso la preferencia general observada en solución y en el medio cristalino.²² Esta regularidad no se extiende a la composición conformacional. Las preferencias por un epímero particular o por un tipo de anillo vienen asociadas a la maximización del número y fortaleza de las fuerzas de estabilización intramoleculares, destacando el enlace de hidrógeno. Así, en la 2-deoxiribosa la falta de un grupo OH da lugar también a la observación de seis conformaciones, con ambas configuraciones anoméricas. Donde una de las estructuras difiere de la más estable de ribosa sólo en la orientación de la red de enlaces de hidrógeno, que se maximiza revertiendo su dirección. En el caso de la fructosa la molécula se bloquea en torno a un conformero dominante

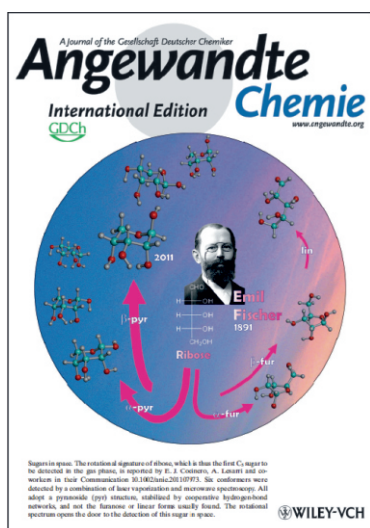
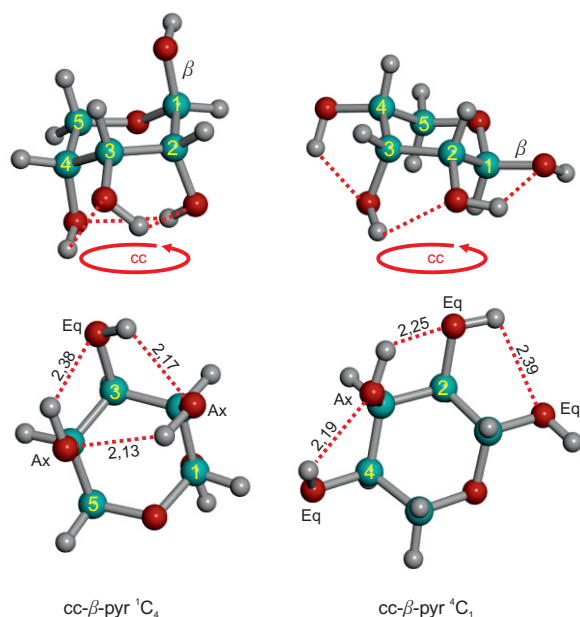


Figura 2. Conformeros más estables de D-ribosa y redes cooperativas de enlaces de hidrógeno intramolecular.¹⁷ Los conformeros se denotan atendiendo al tipo de anillo (1C_4 o 4C_1), forma anomérica y sentido de la red cooperativa de enlaces de hidrógeno.

β -pir 2C_5 (equivalente a 1C_4 en aldosas) en el que se asocian cooperativamente cinco enlaces de hidrógeno consecutivos.

Un aspecto muy interesante de la espectroscopía de microondas es la posibilidad de observación de especies isotópicas (p.e. una sustitución con ${}^{13}C$). Debido a su extrema resolución, cada especie de masa diferente (e incluso cada isótopo) genera un espectro independiente, y nos permite acceder directamente a la estructura de forma muy precisa. En los estudios de deoxirribosa y fructosa se observaron los espectros de rotación de las especies monosustituidas con ${}^{13}C$, ${}^{18}O$ y 2D , algunos en abundancia natural (0,02%-1,1%). De esta información resultan directamente las coordenadas nucleares (estructura de sustitución), o una estructura efectiva (mejor ajuste de los parámetros de rotación). Estas

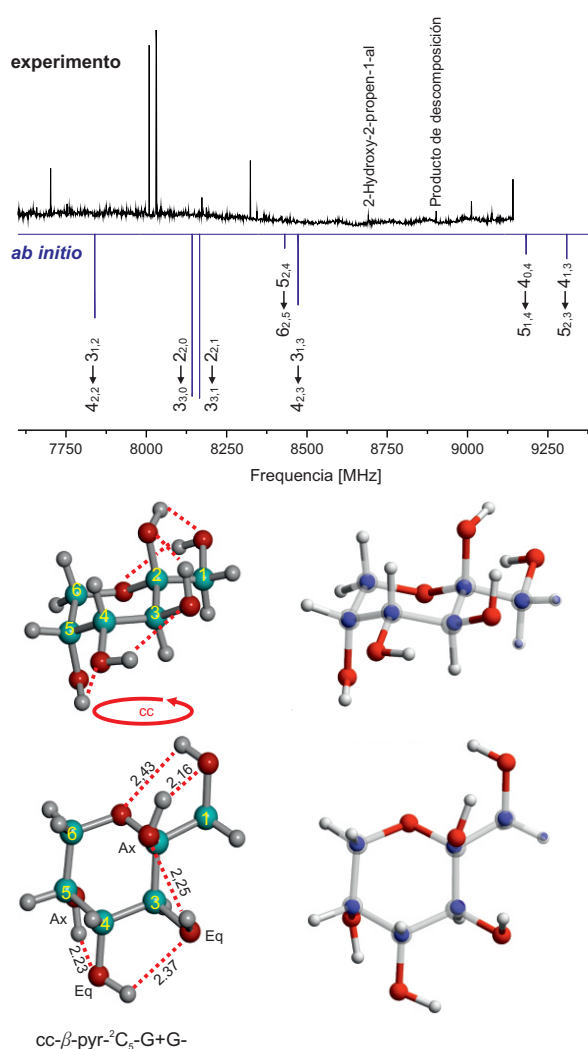


Figura 3. Espectro de rotación molecular en la región de microondas y conformero más estable de la fructosa,¹⁹ mostrando la red de cinco enlaces de hidrógeno cooperativos. Debajo se comparan la estructura de sustitución experimental para el esqueleto carbonado (esferas azules) con la estructura teórica *ab initio* (MP2).

estructuras pueden compararse con los modelos teóricos, siendo el escaparate idóneo para examinar la validez de los mismos (Figura 3). Otro punto interesante es confirmar en qué medida la población en fase gas se correlaciona con la composición del sólido de partida, ya que la epimerización no es probable en el jet. Estas preguntas se enfrentan todavía a la falta de información sobre otras familias de compuestos que permitan entender de forma integral sus equilibrios conformacionales, la influencia del medio y su inserción en moléculas biológicas como ADN o ARN.

Oligosacáridos y glicanos

La unión de varias unidades de monosacáridos forma los oligosacáridos, cuyo estudio se ha llevado a cabo hasta la fecha empleando espectroscopía láser. La variedad en este campo es enorme, y abarca desde los más sencillos di- o

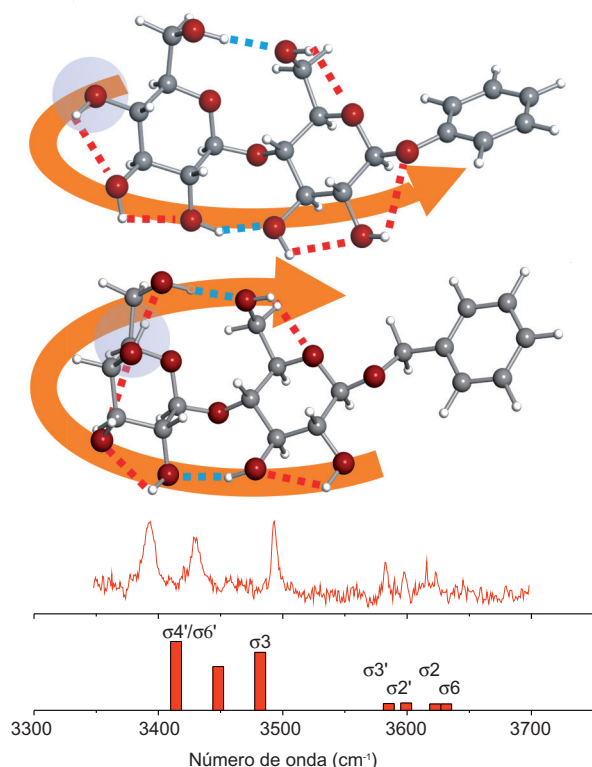


Figura 4. Especies más estables de los disacáridos de celobiosa (arriba) y lactosa (centro), mostrando una configuración *cis* glicosídica apoyada por una red de enlaces de hidrógeno intra- (rojos) y extraanulares (azules). Los grupos fenilo o bencilo se añaden como cromóforos para la detección electrónica vía R2PI. Debajo se muestra el espectro de vibración de doble resonancia IR-UV por desdoblamiento iónico (*ion-dip*) de la lactosa junto con la predicción teórica.²³

trisacáridos, a sistemas más complejos como los glicanos, que pueden presentar una diversidad casi infinita de uniones y sustituyentes. El papel, no sólo estructural, sino de portador de información y mediador celular de estas moléculas hace que despierten un gran interés.

Ilustraremos estos estudios con varios ejemplos. El espectro de vibración IR-UV²³⁻²⁶ se registra normalmente en la región correspondiente a las vibraciones de elongación de los grupos O-H y N-H, especialmente sensibles a las interacciones de enlaces de hidrógeno y, por ende, a la conformación molecular. La estructura molecular se obtiene al comparar el espectro experimental con simulaciones obtenidas de modelos teóricos. En la Figura 4 se muestran los casos de la celobiosa y la lactosa. La celobiosa es la unidad básica de la celulosa (molécula más abundante de la biosfera) y está formada por dos unidades de glucosa (Glc) enlazadas por un enlace O-glicosídico $\beta(1\rightarrow4)$, que denotamos Glc- $\beta(1\rightarrow4)$ -Glc. La lactosa (conocido como el azúcar de la leche) es su epímero C4' y está formada por galactosa (Gal) y glucosa, o Gal- $\beta(1\rightarrow4)$ -Glc. En la Figura 4 se observa que estos disacáridos conservan el esqueleto silla de sus unidades elementales, mientras que sus grupos hidroxilos se reorganizan para maximizar la estabilidad molecular. Los puntos más relevantes son de nuevo las redes de enlaces de hidrógeno intra- e interanulares, que pueden condicionar la orientación de los grupos hidroxilo del monosacárido. Notemos, p.e., como en la lactosa el cambio de orientación axial a ecuatorial del grupo -OH en posición 4 (azul en la Figura) alarga la red de enlaces de hidrógeno a la par que reinvierte su dirección. Llama especialmente la atención la disposición *cis*-glicosídica observada en fase gas, a diferencia de lo que ocurre en el medio fisiológico donde la celulosa o la lactosa adoptan una configuración *trans*. La observación de las propiedades intrínsecas de la celobiosa o la lactosa sugiere así que la configuración *trans* observada en la naturaleza no resulta de la interacción entre residuos, sino que tiene que ser motivada por algún factor externo, como la hidratación o los mecanismos de biosíntesis.

Los estudios sobre disacáridos pueden extenderse de forma natural a cadenas más extensas, si bien tanto la interpretación de los espectros como la búsqueda conformacional se hacen progresivamente más complicadas. Además, estos proyectos pueden requerir de un esfuerzo sintético laborioso. La trimanosa de la Figura 5 es ilustrativa porque es una subunidad clave que se encuentra en la mayoría de las N-glicoproteínas (proteínas unidas a polisacáridos de forma

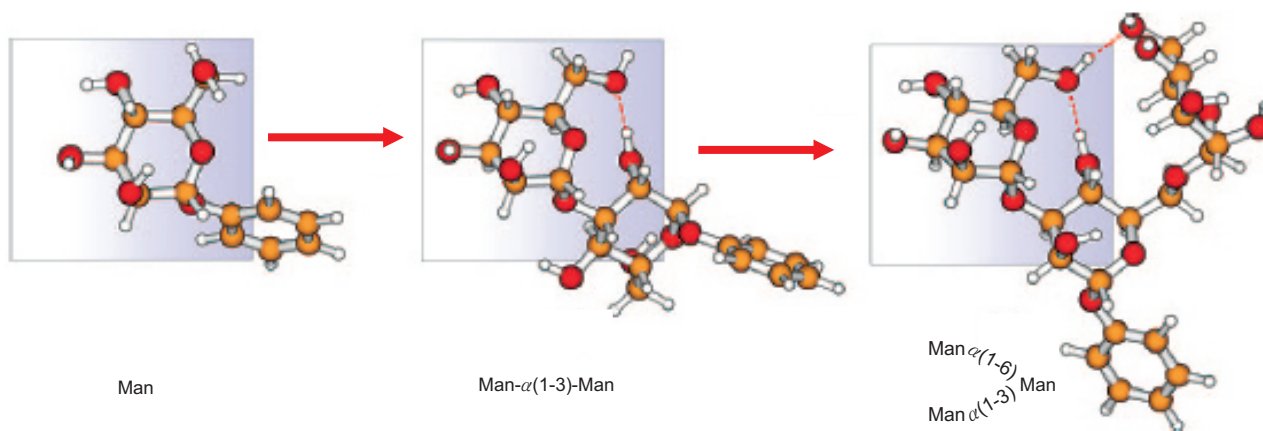


Figura 5. Evolución de las estructuras del mono-, di- y trisacárido de manosa (Man- $\alpha(1\rightarrow3)$ -Man- $\alpha(1\rightarrow6)$ -Man).²⁴ Se resalta la estructura conservada en los tres sistemas y los enlaces de hidrógeno interanulares que estabilizan las estructuras del disacárido y trisacárido.

covalente), y por tanto representa un motivo químico recurrente.²⁴ Este trisacárido está formado por una unidad de manosa central ramificada con otras dos unidades de manosa por medio de dos enlaces glicosídicos $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\alpha(1\rightarrow6)$. Cabe señalar que, en caso de oligosacáridos complejos, la asignación espectral puede no ser siempre unívoca, pero aún así la espectroscopía electrónica permite discernir a que familia estructural pertenece. En el caso de la trimanosa las dos estructuras que mejor reproducen el espectro experimental se encuentran estabilizadas característicamente por dos enlaces de hidrógeno interanulares fuertes. Por tanto, en ausencia de disolvente el trisacárido adopta una forma compacta fuertemente empaquetada favorecida por los enlaces de hidrógeno entre las diferentes unidades de manosa. Sólo la rama $\alpha(1\rightarrow3)$ preserva la disposición conformacional previamente observada en el disacárido, lo que recuerda la flexibilidad de los enlaces de hidrógeno intramoleculares para adaptarse rápidamente a entornos químicos cambiantes.

Podemos ampliar aun más nuestra visión sobre oligosacáridos y la utilidad bioquímica de la espectroscopía láser con el ejemplo del pentasacárido ramificado Man-Man-Man-GlcNAc-GlcNAc, integrado por tres unidades de manosa (Man) y dos de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc).²⁵ Esta secuencia de cinco monosacáridos es una unidad estructural que aparece en la mayoría de las *N*-glicoproteínas donde el carbohidrato se une a la proteína a través del grupo amino de la cadena lateral de la asparagina. La Figura 6 muestra la unión de una *N*-glicoproteína, destacando el motivo común, pentasacárido y los posibles residuos glicosílicos (“antenas”) en sus extremos. La dificultad de este problema hizo que se abordara secuencialmente. Se examinó en primer lugar el disacárido de *N*-acetil-glucosamina o quitobiosa GlcNAc- $\beta(1\rightarrow4)$ -GlcNAc [Figura 7(1)], punto de anclaje del polisacárido con la proteína. Se observaron

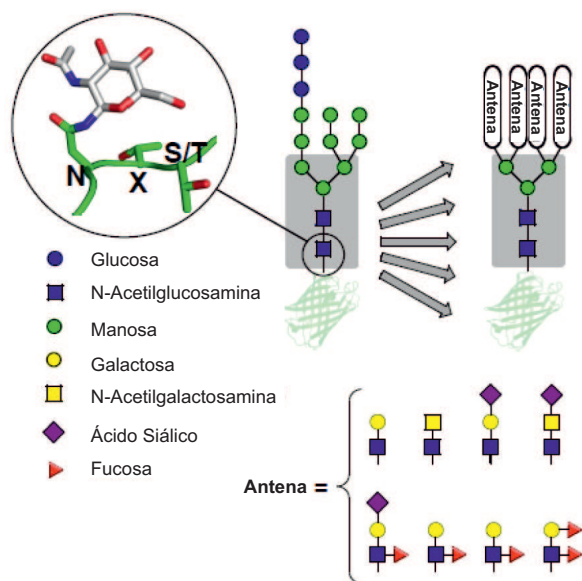


Figura 6. Esquema de una *N*-glicoproteína destacando el núcleo pentasacárido permanente, (Man)₃-(GlcNAc)₂. La unión entre el polisacárido y la proteína se hace a través de la cadena lateral de la asparagina. Se muestran ejemplos de diferentes secuencias terminales de polisacáridos.

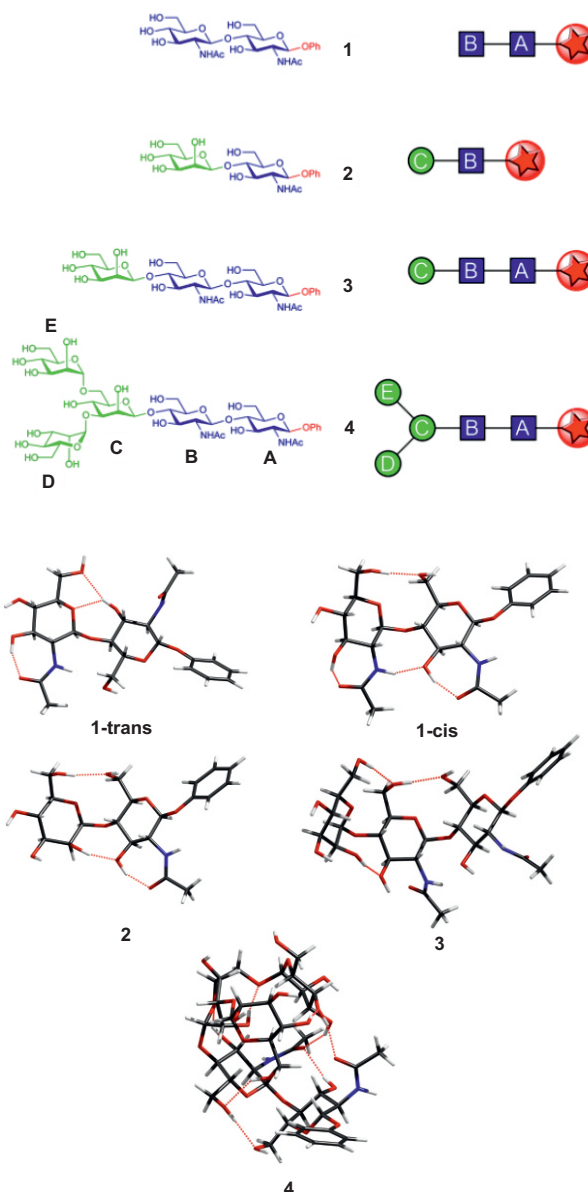


Figura 7. Bloques estructurales (1, 2, 3, 4) en que se dividió el estudio del pentasacárido y debajo sus estructuras observadas. Se destacan los enlaces de hidrógenos interanulares.

dos conformeros prácticamente isoenergéticos adoptando configuraciones *trans* y *cis*, ambas estabilizadas por enlaces de hidrógeno moderados interanulares que incluyen uniones con los grupos acetamido O-H...O=C(NH) (forma *trans*) y N-H...O-H (forma *cis*). Por el contrario, el disacárido Man- $\beta(1\rightarrow4)$ -GlcNAc [Figura 7(2)] presenta un conformero dominante que adopta una estructura plegada *cis*. El análisis del trisacárido Man- $\beta(1\rightarrow4)$ -GlcNAc- $\beta(1\rightarrow4)$ -GlcNAc [Figura 7(3)] reveló que todos los segmentos presentan una configuración *cis*, apoyada por dos enlaces de hidrógeno que conectan el grupo hidroximetilo exocíclico de la Man y las unidades de GlcNAc. Además, esta estructura se ve favorecida por una fuerte interacción entre las dos unidades GlcNAc. Por último, la molécula del pentasacárido adopta una estruc-

tura globular compacta con una conformación *cis* alrededor de la unión -GlcNAc-GlcNAc-, con la cabeza trimanósida Man-Man-Man vuelta “hacia atrás” y enlazada con los dos residuos GlcNAc. Al igual que en otros casos, esta estructura compacta en fase gas maximiza la fortaleza y número de enlaces de hidrógeno. Las conformaciones *trans* (observadas en el medio fisiológico) que dan lugar a configuraciones extendidas, aparecen a energías más altas y se ven favorecidas entrópicamente. El espectro del pentasacárido muestra sin embargo las limitaciones de una molécula de este tamaño. En principio se esperaba un espectro muy congestionado con 16 bandas vibracionales (catorce grupos OH más dos NH). Sin embargo, el espectro experimental muestra una absorción casi continua desde 3200-3600 cm^{-1} , lo que hace pensar en un más que probable enfriamiento deficiente en nuestro chorro para una molécula de este tamaño. No obstante, el conjunto de resultados experimentales confirma el distinto papel de los bloques constitutivos de la molécula: La unión proximal -GlcNAc-GlcNAc- actúa como un cilindro rígido, mientras que el bloque central -Man-GlcNAc- es más flexible y modula las ramificaciones distales de ambas unidades de manosa.

Microsolvatación

Una de las ventajas de los estudios en fase gas mediante espectroscopía láser es que permiten la selección de agregados de carbohidratos con un número específico de moléculas de agua. Estos estudios permiten establecer, no sólo las vías de hidratación o puntos de anclaje preferentes, sino, lo que es más importante, hasta qué punto el disolvente modifica las preferencias conformacionales de la molécula aislada. De esta forma es posible evaluar los inicios de la evolución estructural desde la forma aislada hasta la molécula insertada en el medio fisiológico. En algunos casos se detectan motivos estructurales recurrentes que requieren explícitamente la intervención de moléculas de hidratación.

Los estudios sobre hidratación se iniciaron con los anómeros α y β de una serie de hexosas y pentosas (manosa, glucosa, galactosa, xilosa y otros derivados de importancia biológica). Estos primeros trabajos permitieron establecer cuáles son las reglas generales que controlan la regioselectividad y las preferencias conformacionales en monosacáridos con una, dos y tres moléculas de agua.²⁶ La microsolvatación de estos monosacáridos resulta altamente selectiva, y muestra un patrón común en el que, cuando existe, las moléculas de agua se agrupan en torno al grupo flexible hidroximetilo exocíclico, generalmente insertándose entre las posiciones 4 y 6 del azúcar. Otros factores que ejercen un control adicional son la configuración anomérica y la disposición relativa (axial/ecuatorial) de los grupos hidroxilo, que hemos visto anteriormente cómo condiciona la formación de las redes de enlaces de hidrógeno intramoleculares. La Figura 8 muestra las especies mono y dihidratadas de glucosa. Percibimos de nuevo la readaptación del grupo hidroximetilo y de los grupos hidroxilo para maximizar la estabilidad molecular (traducida en una inversión de orientación de los hidroxilos del monosacárido aislado al hidrato), así como la tendencia del agua a buscar “huecos” atractivos sobre la topografía electrónica del azúcar. Por el contrario, la hidratación de azúcares con grupos acetamido, como la GlcNAc, muestra una tendencia

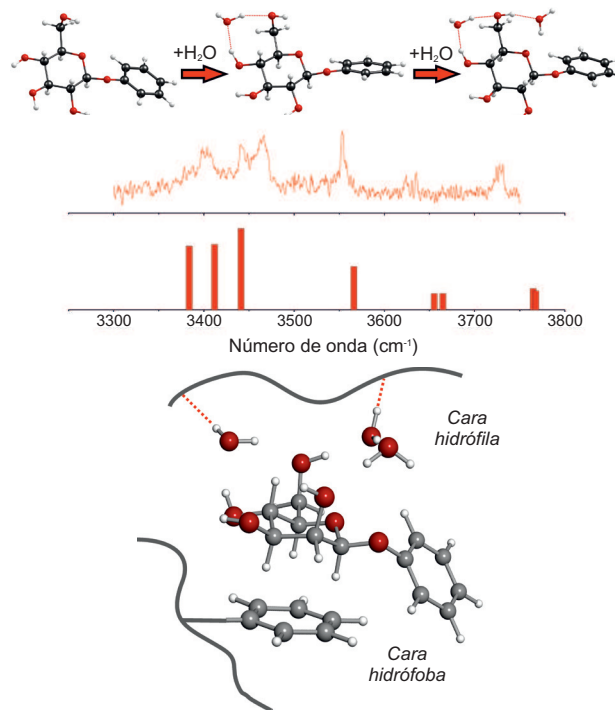


Figura 8. Cambios conformacionales en la molécula de glucosa desde la molécula aislada hasta el dihidrato. En los hidratos las moléculas de agua se unen en torno al grupo hidroximetilo exocíclico. En el centro una comparación entre el espectro de vibración experimental y teórico de la $\text{Glc}\cdots(\text{H}_2\text{O})_2$. Por último, se muestra las dos caras hidrófila e hidrófoba de la $\text{Man}\cdots(\text{H}_2\text{O})_3$, en la que las tres moléculas de agua crean una corona sobre el azúcar.

a la agrupación sobre dicho grupo, incluso en el trihidrato.²⁶ Estos estudios permiten observar además un cierto carácter anfipático de los azúcares. En la Figura 8 también se puede observar cómo las tres moléculas de agua forman una corona sobre una de las caras del azúcar creando una cara hidrófila (húmeda), mientras que la parte inferior (cara hidrófoba) está completamente seca. Ambas caras van a permitir al azúcar enlazarse a la proteína a través de enlaces de hidrógeno (cara hidrófila) o mediante enlaces de hidrógeno débiles tipo $\text{C-H}\cdots\pi$,⁴ como ya se ha observado mediante RMN.²⁷ Una estrategia interesante en estos estudios es el empleo de agua pesada (D_2O), facilitando que la sustitución isotópica permita discriminar entre las bandas originadas por el carbohidrato y las de hidratación.²⁸ De esta manera las asignaciones espectrales son mucho más fiables.

La solvatación de oligosacáridos es mucho más espectacular, al revelar como un pequeño número de moléculas de agua puede modificar la estructura. De hecho puede observarse en algunos casos como algunas moléculas de agua se constituyen en moléculas “enlazadas” en el sentido de que pasan a formar parte de la superestructura. En el trisacárido de manosa $\text{Man-}\alpha(1,3)\text{-Man-}\alpha(1,6)\text{-Man}$ ²⁴ de la Figura 5 la introducción de una sola molécula de agua compacta la estructura al actuar de puente entre la manosa central y uno de los extremos (Figura 9). Esta estructura contrasta notablemente con la configuración abierta observada en solución acuosa mediante RMN y cálculos de dinámica molecular.²⁹

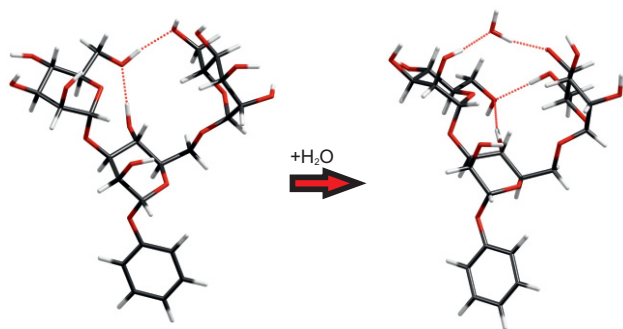


Figura 9. La introducción de una única molécula de agua aumenta de dos a cuatro el número de enlaces de hidrógeno interanulares en la trimanosa Man- α (1→3)-Man- α (1→6)-Man, compactando su estructura.

Sin embargo, los cálculos en fase gas predicen también una forma alternativa abierta de solvatación central, favorecida entrópicamente, muy semejante a la que se ha determinado en fase acuosa. Esta forma abierta es también coincidente con la estructura del *N*-glicano (Man)₉-(GlcNAc)₂ que se observa en la Figura 10 y que incorpora una molécula de agua clave en la manosa central. Por tanto, la molécula de agua podría tener un papel estructural clave en la formación de esta glicoproteína. Desafortunadamente no existen todavía datos experimentales que permitan comparar las formas aisladas e hidratadas más allá de los trisacáridos. Por tanto, el reto en este campo es progresar hacia especies de mayor tamaño e índice de hidratación.

Complejos azúcar-proteína

Los procesos de agregación o complejación de azúcares son muy importantes para aclarar las interacciones de tipo carbohidratos-proteínas, como las asociadas a los procesos de reconocimiento molecular presentes en muchos procesos biológicos. Los estudios cristalográficos y de RMN sugieren diferentes tipos de interacciones de enlace de hidrógeno,⁶ preferentemente entre los carbohidratos y las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos del esqueleto proteínico. Sin embargo, también podrían

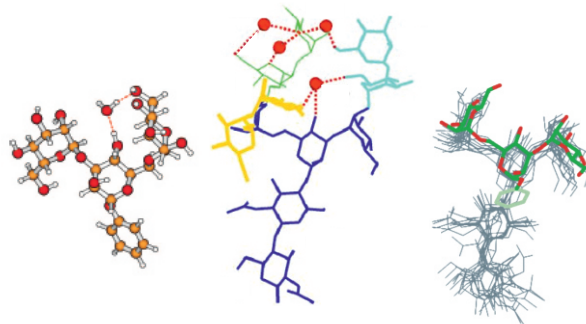


Figura 10. Forma abierta del trisacárido Man- α (1→3)-Man- α (1→6)-Man (izqda.) y comparación con la conformación promedio en solución del *N*-glicano (Man)₉-(GlcNAc)₂ (centro) y el segmento pentasacárido (Man)₃-(GlcNAc)₂ (dcha.), superponiendo el trisacárido (gris oscuro).²⁴

existir interacciones más débiles entre las caras protonadas o regiones apolares de los azúcares y los residuos aromáticos de tipo C-H... π . La competencia entre todas estas interacciones intermoleculares, así como los efectos que causa la complejación sobre las conformaciones peptídicas pueden monitorizarse con complejos modelo.

En este tipo de estudios se examina la unión individual entre un azúcar seleccionado y cadenas aminoácidas truncadas (p.e. tolueno o fenol) o péptidos específicos. Los péptidos examinados hasta el momento incluyen entre otros las metilamidas de *N*-acetil-L-fenilalanina^{30,31} y *N*-acetil-L-tirosina,³² que se complejaron con α/β -metilglucosa (MeGlc), α/β -metilgalactosa (MeGal) y α/β -metilfucosa (MeFuc) formando heterodímeros. La Figura 11 muestra los complejos del primero con MeGal y MeGlc. Varios aspectos resaltan de estos trabajos. El péptido puede adoptar dos configuraciones plegadas y una extendida, que sólo difieren en la posición del anillo bencénico del residuo de la fenilalanina y son reminiscentes de estructuras secundarias encontradas en proteínas (láminas β o torsiones γ). La adopción de una u otra en el complejo depende de manera delicada del tipo y número de uniones

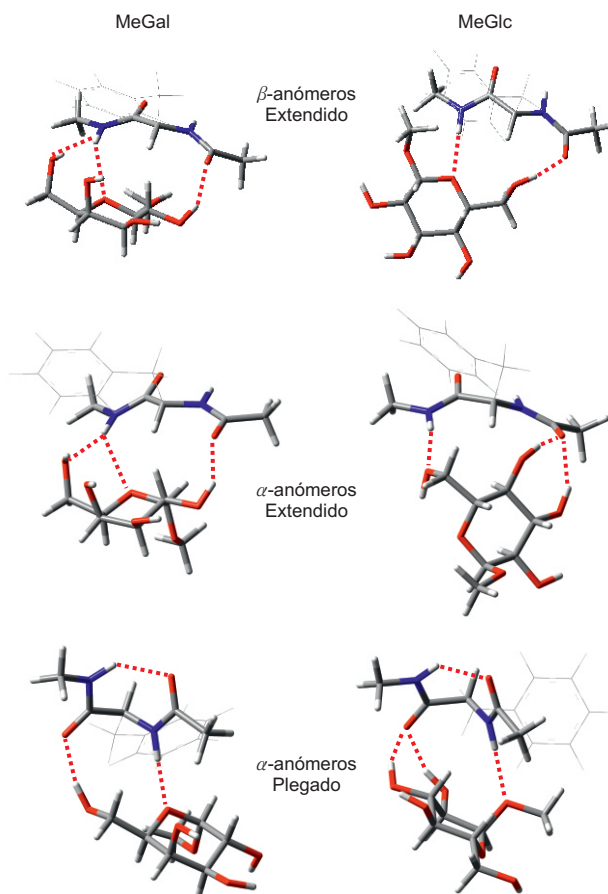


Figura 11. Complejos formados entre *N*-acetilfenilalanina metilamida (Ac-Phe-NHMe) y metilgalactosa (MeGal) y metil glucosa (MeGlc). Los espectros muestran que los anómeros α forman complejos con el péptido en su forma plegada y extendida, mientras que los anómeros β sólo forman complejos con la forma extendida del péptido. La cadena lateral de fenilo se ha dibujado en trazos más finos.

intermoleculares. Cuando el péptido se encuentra extendido sus uniones preferentes son a través de los grupos amino y carbonilo de sus extremos, mientras que si se encuentra plegado son sus grupos polares internos los que definen la unión. En todos los casos se observa una diversidad de uniones, que tienen en común la maximización de los efectos estabilizadores del complejo, fundamentalmente de nuevo las redes de enlaces de hidrógeno inter- e intramoleculares. De esta forma cada caso representa un problema semejante a la unión de dos engranajes, en los que el número y orientación axial/ecuatorial de los grupos hidroxilo del azúcar resulta determinante para establecer la geometría de un complejo determinado. La formación de complejos permite explorar aspectos generales asociados al enlace selectivo y al reconocimiento quiral, generalmente asociados a factores de flexibilidad molecular y cooperatividad.³³ Estos datos pueden luego ser de utilidad en la interpretación de uniones más voluminosas.

Además de las uniones de enlace de hidrógeno moderado entre carbonilos y amidas y grupos hidroxilo, algunos de estos complejos permiten observar otras interacciones de enlace de hidrógeno débil, como aquellas en las que un enlace C-H actúa como donador protónico débil. En los complejos entre *N*-acetil-L-tirosina y α/β -MeGal las geometrías mostraron una disposición apilada en la que juegan un papel relevante las interacciones de tipo C-H $\cdots\pi$, que no aparecen en los mismos complejos con glucosa.

Dos últimos aspectos pueden señalarse como retos de cara a la investigación futura. En primer lugar la determinación de energías de enlace. Recientemente, se ha abierto la puerta con la evaluación de las energías de enlace de varios monosacáridos microhidratados,³⁴ donde la espectroscopía láser puede aportar una cuantificación no disponible en otras técnicas. Por otra parte, el estudio de especies protonadas, actualmente incipiente, puede suponer un impulso al estudio de los problemas asociados a la reactividad y funcionalidad biológicas.

Esta perspectiva general, aunque rápida por motivos de extensión, ha pretendido ilustrar la utilidad de las técnicas espectroscópicas de alta resolución, en especial aquellas que disponen de resolución vibracional o rotacional. Los datos resultantes, cuando se comparan con los que ofrecen otras técnicas y los datos teóricos, pueden ayudar a establecer una visión general de los factores que contribuyen a la estabilidad molecular de los azúcares y otras biomoléculas.

Agradecimientos

Agradecemos la financiación del MICINN y MINECO (CTQ2011-22923, CTQ2012-39132), el Gobierno Vasco y la Universidad del País Vasco. EJC agradece igualmente un contrato "Ramón y Cajal" del MICINN. Finalmente, agradecemos la colaboración de todos los investigadores que han participado en los estudios reseñados, en especial al Prof. John P. Simons y el Dr. Pierre Çarçabal.

Bibliografía

1. A. Varki, R. Cummings, J. Esko (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Lab Press, **2009**.
2. J. P. Schermann, *Spectroscopy and modeling of biomolecular building blocks*, Elsevier, Amsterdam, **2008**.

3. a) M. S. de Vries, P. Hobza, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 585. b) W. Chin, F. Piuze, I. Dimicoli, M. Mons, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 1033. c) G. Grégoire, M.-P. Gageot, D. C. Marinica, J. Lemaire, J.-P. Schermann, C. Desfrancois, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 3082. d) T. R. Rizzo, J. A. Stearns, O. V. Boyarkin, *Int. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *28*, 481.
4. a) G. A. Jeffrey, *An introduction to hydrogen bonding*, Oxford UP, Oxford, **1997**. b) G. R. Desiraju, T. Steiner, *The weak hydrogen bond*, Oxford UP, Oxford, **1999**.
5. P. Hobza, K. Müller-Dethlefs, *Non-covalent interactions, Theory and experiment*, RSC Publishing, Cambridge, **2010**.
6. a) H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637. b) J. Jiménez-Barbero, J. L. Asensio, F. J. Cañada, A. Poveda, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 549.
7. D. Sisak, L. B. McCusker, G. Zandomeneghi, B. H. Meier, D. Blser, R. Boese, W. B. Schweizer, R. Gilmour, J. D. Dunitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *439*, 4503.
8. E. C. Stanca-Kaposta, J. P. Simons, in *Handbook of high-resolution spectroscopy*, Wiley, New York, **2011**.
9. B. Martínez-Haya, P. Hurtado, A. R. Hortal, S. Hamad, J. D. Steill, J. Oomens, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 7048.
10. L. Rubio-Lago, G. A. Amaral, A. N. Oldami, J. D. Rodríguez, M. G. González, G. A. Pino, L. Bañares, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 1082.
11. a) J.-U. Grabow, in *Handbook of high-resolution spectroscopy*, pp. 723-799, Wiley, New York, **2011**. b) W. Caminati, *Ibid.*, pp. 829-852.
12. E. J. Cocinero, A. Lesarri, P. Écija, J.-U. Grabow, J. A. Fernández, F. Castaño, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 12486.
13. D. H. Levy, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1980**, *31*, 197.
14. I. León, R. Montero, F. Castaño, A. Longarte, J. A. Fernández, *J. Phys. Chem. A*, **2012**, *116*, 6798.
15. A. Lesarri, S. Mata, E. J. Cocinero, S. Blanco, J. C. López, J. L. Alonso, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4673.
16. J. P. Simons, P. Çarçabal, B. G. Davis, D. P. Gamblin, I. Hünig, R. A. Jockusch, R. T. Kroemer, E. M. E. M. Marzluff, L. C. Snoek, *Int. Rev. Phys. Chem.* **2005**, *24*, 489.
17. E. J. Cocinero, A. Lesarri, P. Écija, F. J. Basterretxea, J.-U. Grabow, J. A. Fernández, F. Castaño, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3119.
18. I. Peña, E. J. Cocinero, C. Cabezas, A. Lesarri, S. Mata, P. Écija, A. M. Daly, A. Cimas, C. Bermúdez, F. J. Basterretxea, S. Blanco, J. A. Fernández, J. C. López, F. Castaño, J. L. Alonso, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11840.
19. E. J. Cocinero, A. Lesarri, P. Écija, A. Cimas, B. G. Davis, F. J. Basterretxea, J. A. Fernández, F. Castaño, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2845.
20. I. Peña, S. Mata, A. Martín, C. Cabezas, A. M. Daly, J. L. Alonso, *Phys. Chem. Phys. Chem.*, **2013**, *15*, 18243.
21. C. Cabezas, I. Peña, A. M. Daly, J. L. Alonso, *Chem. Comm.* **2013**, *49*, 10826.
22. S. J. Angyal, en *Assymetry in Carbohydrates*, Cap. 2, Dekker, New York, **1979**.
23. E. J. Cocinero, D. P. Gamblin, B. G. Davis, J. P. Simons, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11117.
24. E. C. Stanca-Kaposta, D. P. Gamblin, E. J. Cocinero, J. Frey, R. T. Kroemer, A. J. Fairbanks, B. G. Davis, J. P. Simons, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10691.
25. C. S. Barry, P. Çarçabal, D. P. Gamblin, E. C. Stanca-Kaposta, E. J. Cocinero, S. M. Remmert, S. Rudic, J. P. Simons, B. G. Davis, *sometido*, **2013**.

26. a) E. J. Cocinero, E. C. Stanca-Kaposta, E. M. Scanlan, D. P. Gamblin, B. G. Davis, J. P. Simons, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 8947. b) E. J. Cocinero, E. C. Stanca-Kaposta, M. Dethlefsen, B. Liu, D. P. Gamblin, B. G. Davis, J. P. Simons, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 13427. c) N. Mayorkas, S. Rudic, E. J. Cocinero, B. G. Davis, J. P. Simons, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 18671.
27. a) J. L. Asensio, A. Arda, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 946. b) V. Roldos, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *ChemBioChem*, **2011**, *12*, 990.
28. M. Pincu, E. J. Cocinero, N. Mayorkas, B. Brauer, B. G. Davis, R. B. Gerber, J. P. Simons, *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 9498.
29. R. J. Wood, A. Pathiaseril, M. R. Wormald, C. J. Edge, R. A. Dwek, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *258*, 372.
30. E. J. Cocinero, P. Çarçabal, T. D. Vaden, B. G. Davis, J. P. Simons, *Nature* **2011**, *469*, 76.
31. E. J. Cocinero, P. Çarçabal, T. D. Vaden, B. G. Davis, J. P. Simons, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4548.
32. E. C. Stanca-Kaposta, P. Çarçabal, E. J. Cocinero, P. Hurtado, J. P. Simons, *J. Phys. Chem. B* **2013**, dx.doi.org/10.1021/jp404527.
33. A. Zehnacker, M. A. Suhm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6970.
34. P. Çarçabal, E. J. Cocinero, J. P. Simons, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1830.

IV curso de divulgación

Los Avances de la Química y su Impacto en la Sociedad

Curso interuniversitario (UAH, UAM, UCM, URJC)

Del 22 de noviembre de 2013 al 25 de abril de 2014

Lugar: UAH, UAM, UCM, URJC

Más información:

b.herradon@csic.es

<http://www.losavancesdelaquimica.com/>